

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**β-GALAKTOZİDAZIN ÇEŞİTLİ TAŞIYICILARDA İMMOBİLİZASYONU VE BAZI  
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**FULYA AYTAÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. AYŞEGÜL PEKSEL**

**İSTANBUL, 2012**

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

$\beta$ -GALAKTOZİDAZIN ÇEŞİTLİ TAŞIYICILARDA İMMOBİLİZASYONU VE BAZI  
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

FULYA AYTAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN  
DOÇ. DR. AYŞEGÜL PEKSEL

İSTANBUL, 2012

**T.C**  
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**$\beta$ -GALAKTOZİDAZIN ÇEŞİTLİ TAŞIYICILARDA İMMOBİLİZASYONU VE BAZI  
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Fulya AYTAÇ tarafından hazırlanan bu tez ..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL

Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL

Yıldız Teknik Üniversitesi

-----

Prof. Dr. Barbaros Nalbantoğlu

-----

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Özlem SAÇAN

İstanbul Üniversitesi

-----

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince beni destekleyen tecrübe ve bilgi birikiminden yararlandığım sevgili danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL'e gösterdiği anlayış ve iyi niyetinden dolayı,

Yaşamım boyunca her zaman örnek alacağım, çalışkanlığı, azmi, güler yüzlülüğü ve kararlılığı ile yoluma ışık tutan, kalben yanımda hissettiğim kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Hülya YAĞAR'a,

Çalışmam süresince benimle her türlü düşüncesini paylaşan, çalışma şartları ve akademik yaşam konusunda pek çok şey öğrendiğim Sayın Arş. Gör. Nilay Altaş KIYMAZ'a,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen biyokimya çalışma grubu hocalarım Yrd. Doç. Dr. Volkan SÖZER'e, Yrd. Doç. Dr. Melda ATIKOĞLU'na, Uzman Neşe ATACI'ya Arş. Gör. İbrahim ETHEM ÖZYİĞİT'e,

Çalışmam süresince fikir alışverişinde bulunduğum, tez yazım aşamamda tecrübesini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Canda ULUTÜRK'e,

Tanıştığımız günden itibaren yaşamıma renk katan, çalışmam boyunca yanımda olan sevgili arkadaşlarım Dilara BÜLBÜL ve Aysin ÖZPINAR ve Nursel YAVUZ'a ve gurbetteki arkadaşlarıma,

Beni bugünlere getiren, her konuda büyük ilgilerini hissettiğim, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, sabır ve şefkatlerini eksik etmeyip, gerçekleştirdiğim her işte gözlerindeki gururlu sevinci gördüğüm sevgili annem Aygül AYTAÇ ve sevgili babam Şinasi AYTAÇ'a,

Tez çalışmam süresince her türlü özveride bulunup, sevincime, üzüntüme ortak olan biricik kardeşim Hamza AYTAÇ ve Dilvin BÖLÜK'e,

Tüm kalbimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos, 2012

Fulya AYTAÇ

## İÇİNDEKİLER

---

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ .....	ix
KISALTIMA LİSTESİ .....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ .....	xiv
ÖZET.....	xvi
ABSTRACT .....	xviii
<b>BÖLÜM 1</b>	
<b>GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1    Literatür Özeti .....	1
1.2    Tezin Amacı .....	2
1.3    Hipotez .....	3
<b>BÖLÜM 2</b>	
<b>ENZİMLER.....</b>	<b>4</b>
2.1    Enzimolojinin Tarihçesi .....	4
2.2    Enzimlerin Etkisi .....	5
2.2.1    Aktivasyon Enerjisi .....	5
2.2.2    Aktif Bölgedeki Değişiklikler .....	5
2.3    Biyoteknoloji.....	6
2.3.1    Enzimlerin Üretimi Ve Biyoteknolojide Kullanımı .....	7
2.4    Enzimlerin Sınıflandırılması.....	8
2.5    Türkiye’de Enzim Üretimi, Önemli Endüstriyel Enzimler .....	8
2.5.1    Amilolitik Enzimler .....	9
2.5.2    Glukoz İzomeraz .....	9
2.5.3    Galaktozidazlar .....	9
2.5.4    Pektolitik Enzimler .....	10
2.5.5    Selülazlar.....	10

2.6	Hypocrea jecorina .....	12
2.7	Galaktozidazlar.....	12
2.7.1	$\alpha$ -Galaktozidazlar.....	13
2.7.2	$\alpha$ -Galaktozidazın Etki Mekanizması.....	14
2.7.3	$\alpha$ -Galaktozidazın Kullanım Alanları.....	14
2.8	$\beta$ -Galaktozidaz (E.C 3.2.1.23).....	16
2.8.1	$\beta$ -Galaktozidazın Etki Mekanizması.....	18
2.8.2	$\beta$ -Galaktozidazın Özellikleri .....	20
2.8.3	$\beta$ -Galaktozidazın Endüstride Kullanımı.....	22
2.8.4	$\beta$ -Galaktozidazın Fizyolojik Önemi ve Eksikliği .....	26
2.8.5	Laktoz İntoleransı ve Süt Alerjisi.....	26
2.8.6	$\beta$ -Galaktozidazın Biyoteknolojik Uygulamaları.....	29
2.9	Laktoz .....	30
2.9.1	Laktoz Hidrolizi .....	31
2.10	$\beta$ -Galaktozidaz ile İlgili Önceki Çalışmalar .....	32

### BÖLÜM 3

ENZİM İMMOBİLİZASYONU.....	37	
3.1	İmmobilizasyonun Tarihçesi .....	37
3.2	İmmobilizasyonun Avantajları .....	38
3.3	İmmobilizasyonun Parametreler .....	39
3.4	İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılar ve İstenilen Özellikleri.....	40
3.4.1	Bentonit .....	41
3.4.1.1	Bentonitin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri .....	42
3.4.2	Kitosan (Çitosan).....	43
3.4.3	Cam Boncuk .....	45
3.4.4	Amberlit .....	46
3.4.5	Silika .....	47
3.4.5.1	Silikajel .....	47
3.4.6	Hidroksi Apatit.....	48
3.5	İmmobilizasyon Yöntemleri .....	48
3.5.1	Kimyasal İmmobilizasyon Yöntemleri.....	49
3.5.1.1	Kovalent Bağlama.....	50
3.5.1.2	Çapraz Bağlama.....	50
3.5.2	Fiziksel İmmobilizasyon Yöntemleri .....	52
3.5.2.1	Adsorbsiyon Yöntemiyle İmmobilizasyon .....	53
3.5.2.2	Hapsetme Yöntemiyle İmmobilizasyon .....	54
3.5.2.3	İyonik Bağlanma Yöntemiyle Adsorbsiyon.....	56
3.6	$\beta$ -Galaktoz İmmobilizasyonu Üzerine Yapılan Son Yıllardaki Çalışmalar ..	57

## BÖLÜM 4

MATERYAL VE YÖNTEMLER .....	61
4.1 Kullanılan Materyaller.....	61
4.1.1 Hypocrea jecorina QM9414.....	61
4.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	61
4.1.3 Kullanılan Cihazlar .....	63
4.2 Metotlar .....	64
4.2.1 Kültür Ortamı.....	64
4.2.1.1 Saf Kültür Ortamı.....	64
4.2.1.2 Spor Çözeltilerinin Hazırlanması .....	64
4.2.2 Enzim Üretim Ortamı.....	65
4.2.2.1 Sıvı Besiyerinin Bileşimi.....	65
4.2.3 $\beta$ -Galaktozidazın Kısmi Saflaştırılması .....	65
4.2.3.1 <i>Hypocrea jecorina</i> dan Ekstrasellüler $\beta$ -Galaktozidazın Eldesi .....	65
4.2.3.2 $\beta$ -Galaktozidazın Aktivitesinin Tayini .....	66
4.2.3.3 Çözeltiler.....	67
4.2.4 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması.....	67
4.2.4.1 Spesifik Aktivitesinin Hesaplanması.....	68
4.2.4.2 ONP Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi.....	68
4.2.5 Protein Miktarının Belirlenmesi .....	68
4.2.5.1 Protein Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi .....	69
4.2.6 <i>H.jecorina</i> Hücrelerinden Hücre Dışı $\beta$ -Galaktozidaz Eldesi.....	70
4.2.6.1 Etil Alkol Çöktürmesi .....	70
4.2.6.2 Aseton Çöktürmesi.....	70
4.2.6.3 <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazını Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması .....	70
4.2.6.4 <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının %60 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi.....	71
4.2.7 Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -Galaktozidazın İmmobilizasyonu.....	71
4.2.7.1 $\beta$ -Galaktozidazın Adsorbsiyon Yöntemiyle İmmobilizasyonu .....	72
Cam Boncuk (212-300 $\mu$ m) Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu .....	72
Cam Boncuk (2mm) Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu .....	72
Kitosan Boncuklar Üzerine $\beta$ -Galaktozidazın Adsorbsiyonu .....	73
PEG 6000 Kaplı Kitosan Boncuklarına $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu....	74
Amberlit- XAD16 Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu.....	75
Bentonit Üzerine $\beta$ -Galaktozidazın Adsorbsiyonu .....	75
Deniz Kumuna $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu .....	76
Silika Üzerine $\beta$ -Galaktozidazın Adsorbsiyonu .....	76
Hidroksi Apatit Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu .....	77
Alümina Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu .....	77
Selit Üzerine $\beta$ -Galaktozidazın Adsorbsiyonu.....	78
4.2.8 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Kimyasal ve Fiziksel Karakterizasyonu 78	
4.2.8.1 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Aktivitesine pH Etkisi.....	78
4.2.8.2 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Aktivitesine Sıcaklık Etkisi.....	78

4.2.8.3 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	79
4.2.8.4 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Termal Kararlılığı .....	79
4.2.8.5 Hazırlanan Kitosana Boncukların Boyutlarının Hesaplanması .....	80
4.2.8.6 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Depo Kararlılığı .....	80
4.2.9 Çeşitli İyon ve Bileşiklerin İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Aktivitesi Üzerine Etkileri .....	80

## BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	82
5.1 $\beta$ -Galaktozidazın Adsorbsiyon Yöntemiyle İmmobilizasyonları.....	82
5.1.1 212-300 $\mu$ m Boyutundaki Cam Boncuk Üzerine <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının İmmobilizasyonu .....	83
5.1.2 2 mm Boyutundaki Cam Boncuk Üzerine <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının İmmobilizasyonu .....	85
5.1.3 Kitosan Boncuk Üzerine <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu .....	86
5.1.4 PEG 6000 Kaplı Kitosan Boncuk Üzerine <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu.....	88
5.1.5 Amberlit-XAD16 Üzerine <i>H.jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu .....	92
5.1.6 Bentonit Üzerine <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu .....	93
5.1.7 Deniz Kumu Üzerine <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu ..	94
5.1.8 Silika Üzerine <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu .....	96
5.1.9 Hidroksi Apatit Üzerine <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu .	97
5.1.10 Alümina Üzerine <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu.....	98
5.1.11 Selit Üzerine <i>H. jecorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu .....	99
5.2 $\beta$ -Galaktozidaz İçin En Uygun Adsorbsiyon Yönteminin Belirlenmesi....	101
5.3 Kitosan Boncuklara İmmobilize Edilmiş $\beta$ -Galaktozidaz' ın Kimyasal ve Fiziksel Özelliklerinin Belirlenip, Karakteristiğinin Saptanması .....	101
5.3.1 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Üzerine pH Etkisi.....	101
5.3.2 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	104
5.3.3 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	106
5.3.4 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Termal Kararlılığı.....	108
5.3.5 Kitosan Boncukların Boyutlarının Hesaplanması.....	109
5.3.6 İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı.....	110
5.4 İmmobilize <i>H.jeceorina</i> $\beta$ -Galaktozidazının Aktivitesi Üzerine Çeşitli İyon ve Bileşiklerin Etkisi.....	111

## BÖLÜM 6

TARTIŞMALAR .....	113
KAYNAKLAR .....	118
ÖZGEÇMİŞ .....	123

## SİMGE LİSTESİ

---

A	Absorbans
$\alpha$	Alfa
$V_0$	Başlangıç hız
$\beta$	Beta
rpm	Devir / dakika
g	Gram
t	İndüksiyon zamanı
C	Konsantrasyon
L	Litre
$V_{max}$	Maksimum hız
$K_m$	Michaelis Menten sabiti
$\mu$	Mikro
$\mu L$	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molar
$R^2$	Regresyon katsayısı
$^{\circ}C$	Santigrat derece
Mg	Serbest bırakılan ONP' nin molekül ağırlığı
U	Ünite
%	Yüzde

## KISALTMA LİSTESİ

---

Abs	Absorbans
BSA	Siğır Serum Albumin
E	Enzim
EC	Enzim kataloğu
PDA	Patates Dekstroz Agar
PGE	Polietilen glikol
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
TW 80	Tween 80 (Polysorbate 80)
TW 20	Tween 20 (Polysorbate 20)
ONPG	o-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli ..... 6
Şekil 2. 2	Enzim üretiminin endüstride kullanım alanları ve yüzdeler dağılımları ..... 7
Şekil 2. 3	<i>Hypocrea jecorina</i> ..... 12
Şekil 2. 4	$\alpha$ -D-Galaktoz ..... 13
Şekil 2. 5	Melibiyoz ..... 14
Şekil 2. 6	Laktoz ..... 17
Şekil 2. 7	p-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid ..... 17
Şekil 2. 8	$\beta$ -Galaktozidazın üç boyutlu yapısı ..... 17
Şekil 2. 9	$\beta$ -Galaktozidazın etki mekanizması ..... 19
Şekil 2. 10	p-Nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozidin hidroliz tepkimesi ..... 20
Şekil 2. 11	Laktozun enzimatik hidrolizi ..... 32
Şekil 3. 1	Kitosanın kimyasal yapısı ..... 43
Şekil 3. 2	Selülozun kimyasal yapısı ..... 43
Şekil 3. 3	Kabuklu deniz hayvanlarından kitin ve kitosan üretimi ..... 44
Şekil 3. 4	DeneySEL çalışmada oluşturulan kitosan boncuklar ..... 45
Şekil 3. 5	Cam boncuk mikroskop görüntüsü ..... 46
Şekil 3. 6	Amberlit-XAD reçinelerinin mikroskop görüntüsü ..... 47
Şekil 3. 7	İmmobilizasyon yöntemleri ..... 49
Şekil 3. 8	Çapraz bağlama ..... 51
Şekil 3. 9	Schiff bazı tepkimesi ..... 52
Şekil 3. 10	Adsorbsiyon yöntemiyle immobilizasyon ..... 54
Şekil 3. 11	Kafes tipi (a) ve mikrokapsül ile hapsetme (b) ..... 55
Şekil 4. 1	DeneySEL çalışmada <i>Hypocrea jecorinadan</i> $\beta$ -galaktozidazın ekstrasellüler üretimi ..... 65
Şekil 4. 2	ONPG'nin hidroliz tepkimesi ..... 66
Şekil 4. 3	ONP standart eğrisi ..... 68
Şekil 4. 4	Protein standart eğrisi ..... 69
Şekil 5. 1	Cam boncuk üzerine (212-300 $\mu$ m) immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması ..... 83

Şekil 5. 2	Cam boncuk üzerine (2 mm) immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	85
Şekil 5. 3	Kitosan boncuk üzerine immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	87
Şekil 5. 4	Kitosan-PEG 6000 (8:2) boncuk üzerine (2 mm) immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	88
Şekil 5. 5	Kitosan-PEG 6000 (6:4) immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	89
Şekil 5. 6	Kitosan-PEG 6000 (7:3) üzerine immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	90
Şekil 5. 7	Amberlit-XAD16 üzerine immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	92
Şekil 5. 8	Bentonit üzerine immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	93
Şekil 5. 9	Deniz kumu üzerine immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	94
Şekil 5. 10	Silika üzerine immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	96
Şekil 5. 11	Hidroksi apatit üzerine immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	97
Şekil 5. 12	Alümina üzerine immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	98
Şekil 5. 13	Selit üzerine immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın ve serbest $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması .....	99
Şekil 5. 14	Kitosan boncuklara adsorbe edilmiş immobilize $\beta$ -galaktozidazın optimum pH' ı ve total ünite değerleri .....	101
Şekil 5. 15	Kitosan boncuklara adsorbe edilmiş immobilize $\beta$ -galaktozidazın optimum pH' ı ve spesifik aktivite değerleri .....	101
Şekil 5. 16	Serbest $\beta$ -galaktozidazın optimum pH' ı ve total ünite değerleri .....	102
Şekil 5. 17	Serbest $\beta$ -galaktozidazın optimum pH' ı ve spesifik aktivite değerleri .....	102
Şekil 5. 18	Kitosan boncuklara adsorbe edilmiş immobilize $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklığı ve total ünite değerleri .....	103
Şekil 5. 19	Kitosan boncuklara adsorbe edilmiş immobilize $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklığı ve spesifik aktivite değerleri .....	104
Şekil 5. 20	Serbest $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklığı ve total ünite değerleri .....	104
Şekil 5. 21	Serbest $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklığı ve spesifik aktivite değerleri .	105

Şekil 5. 22	Kitosan boncuklara immobilize $\beta$ -galaktozidazın $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerini içeren Linewear-Burk grafiği.....	106
Şekil 5. 23	Kitosan boncuklara serbest $\beta$ -galaktozidazın $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerini içeren Linewear-Burk grafiği.....	107
Şekil 5. 24	Kitosan boncuklara immobilize edilen $\beta$ -galaktozidazın termal kararlılığı.	108
Şekil 5. 25	Kitosan boncuklara adsorbe edilen immobilize $\beta$ -galaktozidazın depo kararlılığı.....	109

## ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Endüstride kullanılan bazı enzimler ve kullanım alanları ..... 11
Çizelge 2. 2	Farklı kaynaklardan izole edilmiş $\beta$ -galaktozidazların özellikleri..... 21
Çizelge 2. 3	Yaygın olarak kullanılan $\beta$ -galaktozidaz kaynakları ..... 23
Çizelge 2. 4	Şekerlerin tatlılık oranları ..... 29
Çizelge 3. 1	$\beta$ -Galaktoz immobilizasyonu üzerine yapılan son yıllardaki çalışmalar .. 57
Çizelge 4. 1	Kullanılan kimyasal maddeler ..... 61
Çizelge 5. 1	Cam boncuk (212-300 $\mu$ m) üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri.. 83
Çizelge 5. 2	Cam boncuk (2mm) üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri..... 84
Çizelge 5. 3	Kitosan boncuk üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri..... 86
Çizelge 5. 4	Kitosan-PEG 6000 (8:2) üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri..... 88
Çizelge 5. 5	Kitosan-PEG 6000 (6:4) üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri..... 89
Çizelge 5. 6	Kitosan-PEG 6000 (7:3) üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri..... 90
Çizelge 5. 7	Amberlit-XAD16 üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri..... 91
Çizelge 5. 8	Bentonit üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri ..... 93
Çizelge 5. 9	Deniz kumu üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri ..... 94
Çizelge 5. 10	Silika üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri ..... 95
Çizelge 5. 11	Hidroksi apatit üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri..... 96
Çizelge 5.12	Alümina üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri ..... 98
Çizelge 5.13	Selit üzerine adsorbe edilmiş $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri ..... 99

Çizelge 5. 14	<i>Hypocrea jecorina</i> immobilize $\beta$ -galaktozidazının aktivitesi üzerine çeşitli iyon ve bileşiklerin etkisi .....	110
---------------	--	-----

---

## β-GALAKTOZİDAZIN FARKLI TAŞIYICILARDA İMMOBİLİZASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Fulya AYTAÇ

Biyokimya Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL

Galaktozidazlar, ekzoglikozidazların en iyi bilinen sınıfıdır. Glikozidik bağın α- veya β- çeşidine etki etmelerine göre α-galaktozidazlar ve β-galaktozidazlar olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. β-galaktozidaz, β-D-galaktozil grupları içeren oligosakkaritleri hidroliz edebildiği gibi galaktozil kalıntılarının bir molekülden diğer moleküle aktarılmasını sağlayarak transferaz aktivitesi de gösteren bir glikozidazdır. β-Galaktozidaz endüstride; sütün hidrolizinde, laktozsuz süt ürünlerinin eldesinde, dondurma üretiminde, peyniraltı suyunun hidrolizinde, hayvansal besin uygulamalarında kullanılır.

Bu çalışmada β-galaktozidaz küf mantarı *Hypocrea jecorina*' dan kısmi olarak saflaştırıldı. *H. jecorina* β-galaktozidaz ilk defa çeşitli taşıyıcı materyallere bağlanarak adsorbsiyon yöntemiyle immobilize edildi. Çalışmada kullanılan taşıyıcılar cam buncuklar, kitosan boncuklar, PEG 6000 kaplı kitosan boncuklar, amberlit XAD-16, bentonit, deniz kumu, silika, hidroksi apatit, selit ve alüminadır. *H. jecorina* β-galaktozidaz' ı için uygun immobilizasyon metodu seçildikten sonra immobilize enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, termal stabilite, Km ve Vmax değerleri belirlendi. Karakterizasyon çalışması için seçilen immobilizasyon yöntemi kullanılarak, immobilize β-galaktozidaz üzerine çeşitli iyon ve bileşiklerin etkisi incelendi. Immobilize enzimin depo kararlılığı belirlendi.

Çalışmanın sonucunda, β-galaktozidazın immobilizasyonu için uygun olan yöntem kitosan boncuklara adsorbsiyon olarak belirlendi. Kitosan boncuklara adsorbsiyon

yöntemine göre, immobilize  $\beta$ -galaktozidazın karakteristikleri; optimum pH' ı 8, optimum sıcaklığı 80°C,  $K_m$  değeri  $1,026 \cdot 10^{-3}$  g/ml,  $V_{max}$  değeri 0,1447 U/ml olarak bulundu. Depo kararlılığı 50 gün olarak bulundu.  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ag^{+}$  iyonlarının ve tritonX-100 yüzey aktif maddesinin immobilize  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesini %100' ün üzerinde arttırdığı tespit edildi.

**Anahtar Sözcükler:**  $\beta$ -galaktozidaz, *Hypocrea jecorina*, enzim immobilizasyonu, kitosan, adsorbsiyonu

**IMMOBILIZATION OF  $\beta$ -GALAKTOSİDASE ON DIFFERANT CARRIERS AND  
INVESTIGATION OF SOME PROPERTIES**

AYTAC, Fulya

Department of Biochemistry

Master Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

The galactosidases are well-known class of the exoglicosidases. According to the effect to the kind of  $\alpha$ - or  $\beta$ - of glycosidic bond the galactosidases divide in two subclass as  $\beta$ -galactosidases and  $\alpha$ -galactosidases. Not only the  $\beta$ -galactosidase hydrolase the oligo-saccharids which containe  $\beta$ -D galactosyl groups but also it is a glicosidase which shows the activity of transferase by carrying the galactosyl moieties from a molecule to another  $\beta$ -galactosidase is used in the industry for hydrolysis of milk, getting the productions of lactose free milk, manufacturing the ice-cream, hydrolysis of whey and the practises in animal nutrition.

In this study, the partial purification of  $\beta$ -galactosidase than the fungus of *Hypocrea jecorina* was done. For the first time, the  $\beta$ -galactosidase of *H. jecorina* was immobilized by the methods of adsorption by linking to various carriers. Carriers used in this study; chitosan beads, chitosan beads which contains PEG 6000, amberlite-XAD16, bentonite, sea sand, silica, hydroxy apatite, celite, alumina. The proper method for the immobilization of the  $\beta$ -galactosidase of *H. jecorina* was chosen. Later on, the optimum pH, the optimum temperature, thermal stability, of  $K_m$  and  $V_{max}$  values of the immobilized enzyme were determined. It is examined the effect of various ions and compounds on immobilized  $\beta$ -galactosidase by using the immobilization method which was chosen for labour characterization. Storage stability of the immobilized enzyme were determined.

As a result of the study, the proper method for immobilization of the  $\beta$ -galactosidase of *H. jecorina* were emerged as: the adsorption of chitosan beads. According to the adsorption method, the characteristics of the immobilized  $\beta$ -galactosidase are found as the following; the optimum pH is 8, the optimum temperature is 80°C, the Km value is  $1,026.10^{-3}$  g/ml, the Vmax value is 0,1447 U/ml. Storage stability was found to be 50 days.  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ag^{+}$  ions and surface active-agent triton X-100 activity of immobilized enzyme was found to increase by over 100%.

**Key words:**  $\beta$ -galaktosidase, *Hypocrea jecorina*, immobilization of enzyme, chitosan, adsorption

#### 1.1 Literatür Özeti

Enzimler canlı hücrelerde oluşan ve organizmalardaki tüm reaksiyonların çok yumuşak koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları düzenleyen biyolojik katalizörlerdir [1].

Proteinlerin önemli bir grubu; biyolojik bakımdan eskiden ferment olarak isimlendirilen enzimlerdir [2].

Endüstride kullanılan kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında enzimlerin kullanımı pek çok avantaj sağlamaktadır. Öne çıkan avantajların başında, yüksek katalitik etkinlikleri ve sahip oldukları özgüllükleridir. Enzimler sadece reaksiyonlara karşı değil substratlara karşı da yüksek özgüllük sergilediklerinden istenilen tek bir son ürünün oluşumunu sağlamakta ve gereksiz yan ürünlerin oluşmasını engellemektedirler. Bu da yüksek reaksiyon verimini sağladığından dolayı maliyeti düşürmektedir. Bunlara ek olarak enzimler diğer katalizörlere kıyasla daha ılıman şartlarda çalıştıklarından enerji sarfiyatını, dolayısıyla işletme maliyetini düşürmektedirler. Çevre boyutu ele alındığında enzimlerin protein yapıda olmaları biyolojik olarak bozundurulabilmelerine olanak tanır ve atık yönetimini kolaylaştırır. Tüm bu özelliklerinden dolayı 1960'lardan bu yana enzimlerin endüstriyel katalizör olarak kullanımları artan bir ivmeyle yaygınlaşmaktadır. Önemli avantajlarının yanında enzimlerin pratik kullanımında bazı sorunlarla karşılaşmaktadır. İzolasyon ve saflaştırma işlemlerinin yüksek maliyete neden olması, doğadaki ortamlarından izole edildikleri takdirde proses koşullarına olan duyarlılıkları, enzimlerin katalitik aktiviteleri için önemli olan moleküler yapılarının yüksek sıcaklık, düşük ya da yüksek basınç, organik çözücülerin varlığında hatta diğer

katalizörler için elverişli olan ortamlarda bozunmaya yatkınlık göstermeleri, kısa kullanım zamanları, diğer konvansiyonel heterojen katalizörlerin aksine çoğu enzimin suda çözülmüş olarak, homojen katalizör sistemlerinde işlev göstermeleri dolayısıyla ürüne kontamine olmaları ve reaksiyon karışımından aktif formda yeniden kullanım için geri elde edilememeleri serbest enzimlerin endüstriyel kullanımında karşılaşılan problemlerdendir. Serbest enzimlerde görülen bu dezavantajları ortadan kaldırmak için pek çok metot denenmektedir. İmmobilizasyon bu amaçla kullanılan en başarılı yöntemlerden biridir. İmmobilize enzimler, “fiziksel olarak hapsedilmiş veya kesin olarak tanımlanmış bir bölgeye, sahip oldukları katalitik aktiviteyi koruyarak yerleştirilmiş, tekrarlı ve sürekli olarak kullanılabilen enzimler” olarak tanımlanırlar [3]. Enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir ve endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilir. Bu nedenle enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler [1]. Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %80’i polimerlerin doğal yapısını bozabilme yeteneğine sahip olan hidrolazlardır.  $\beta$ -galaktozidaz, laktozdaki  $\beta$ -glikozidik bağının enzimatik hidrolizini katalizleyerek, laktozdan daha tatlı ve çözünürlüğü laktoza göre daha fazla olan glukoz ve galaktozun oluşmasını sağlayan hidrolaz sınıfına ait bir enzimdir.  $\beta$ -galaktozidaz; laktoz intoleransı olan insanlar için endüstüride sütteki laktozun uzaklaştırılmasında, ayrıca peynir altı suyundaki laktozun geri kazanılmasında, oligasakkaritlerin sentezlenmesinde kullanılır [4]. *Hypocrea jecorinad* küf mantarından elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz için literatürde immobilizasyon çalışmasının gözlenmemesi çalışmamızı özel kılan nedenlerden biridir.

## 1.2 Tezin Amacı

İmmobilize enzimlerin kullanımının yaygınlaşmasına rağmen henüz evrensel olarak kabul edilen enzim immobilizasyon metotları yoktur. Günümüzde immobilizasyon çalışmalarında deneme yanılma yöntemiyle enzim için en uygun metot belirlenmektedir. Bu çalışmanın amacı  $\beta$ -galaktozidazın yüksek verimle immobilizasyonu için uygun koşulların belirlenmesi, uygun immobilizasyon yöntemi ve uygun taşıyıcıların saptanmasıdır. Uygun immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen

enzimin bazı özelliklerinin, dayanıklılığının ve kararlılığının arttırılması çalışmanın temel hedefidir. Farklı taşıyıcılarla immobilizasyon gerçekleştirilerek, avantaj veya dezavantaj sağlayacakları düşünülmüştür. Uygun yöntem belirlendikten sonra immobilize enzimin sıcaklık ve pH kararlılıkları, tekrar kullanılabilirliği ve saklama kararlılığı için karakterizasyon çalışmaları yürütülmesi, bu çalışmaların sonuçlarının serbest enzim için aynı parametreler adına karşılaştırılması hedef alınmıştır. Aynı zamanda uygun yöntemin belirlendiği şartlardaki immobilize enzimin kinetik sabitlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### **1.3 Hipotez**

*Hypocrea jecorina*  $\beta$ -galaktozidazı cam boncuk, deniz kumu, selit, bentonit, hidroksi apatit, silika, alümina, amberlit, kitosan ve PEG 6000 kaplı kitosan boncuk taşıyıcıları üzerine adsorbe edilerek immobilizasyonu gerçekleştirildi. En uygun immobilizasyon metodu seçilerek, immobilize  $\beta$ -galaktozidazın; sıcaklık ve pH kararlılıkları, tekrar kullanılabilirliği, ve saklama kararlılığı için karakterizasyonu belirlendi, kinetik sabitleri saptandı.

## BÖLÜM 2

---

### ENZİMLER

Enzimler, biyolojik sistemdeki tepkimelerin canlılığa zarar vermeyecek şekilde gerçekleşmesini sağlayan protein yapısındaki, spesifik biyokatalizörlerdir. Canlı organizmada gerçekleşen çok sayıda tepkime enzimlerle katalizlenir. Bununla beraber yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle enzimlere ilişkin tüm nicelik ve özellikleri bir bütün olarak inceleyen enzimoloji başta olmak üzere, biyokimya ve moleküler biyoloji, fizikokimya, bakteriyoloji ve mikrobiyoloji, genetik, botanik ve tarım, farmokoloji ve toksikoloji, patoloji, fizyoloji, tıp, mühendislik, biyomühendislik gibi bilim dalları ile çeşitli endüstriyel alanlar için büyük bir önem taşımaktadır [5].

#### 2.1 Enzimolojinin Tarihi

İnsanlar farkında olmadan enzimlerden, ekmek, peynir, bira, şarap vb. maddelerin yapımında ve ayrıca ilaç olarak yararlanmışlardır. Bu gibi işlemler ilk biyoteknolojik prosesler olarak tanımlanabilirler. Tarihsel sürece baktığımızda;

1783 yılında Spallanzi tarafından atmacanın mide suyunun eti eritebildiği gösterilerek kanıtlanmıştır.

1811 yılında Kirchoff buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemiştir.

1830 yılında Robiquet, Boutron ve Chalan'ın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini keşfetmesi, enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir.

Payen ve Persoz'un 1833 yılında nişastayı şekere dönüştüren termobil bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleri enzimoloji alanındaki en önemli kilometre taşlarından biri olmuştur.

Enzimlerin keşfinin başladığı ilk yıllarda pek çok araştırmacı fermantasyon olaylarında mayalar ve etkilerini göz önüne aldıkları için enzimleri tanımlamaya yönelik olarak ferment terimini kullanmışlardır. Enzimler için "katalizör" sözcüğü ilk kez 1838 yılında Berzelius tarafından, "enzim" sözcüğü ise 1878 yılında Kühne tarafından kullanılmıştır.

Yunanca'da en: içinde, zyme: bırakmak anlamındadır. Çağdaş enzim kimyası çalışmaları, enzimatik reaksiyonlarla ilgili, Michelis-Menten varsayımı ve James Sumner tarafından 1926 yılında üreazın izolasyonu ile başlamıştır.

1953'de insülinin aminoasit dizisinin saptanması, 1958'de 124 aminoasitten oluşan ribonükleazın aminoasit dizisinin aydınlatılması ve 1969'da Merrifield ve çalışma arkadaşlarının biyolojik aktivite gösteren ribonükleazı kimyasal sentez yoluyla elde etmeyi başarmaları enzimolojinin gelişmesine büyük katkı sağlamıştır [6].

## **2.2 Enzimlerin Etkisi**

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

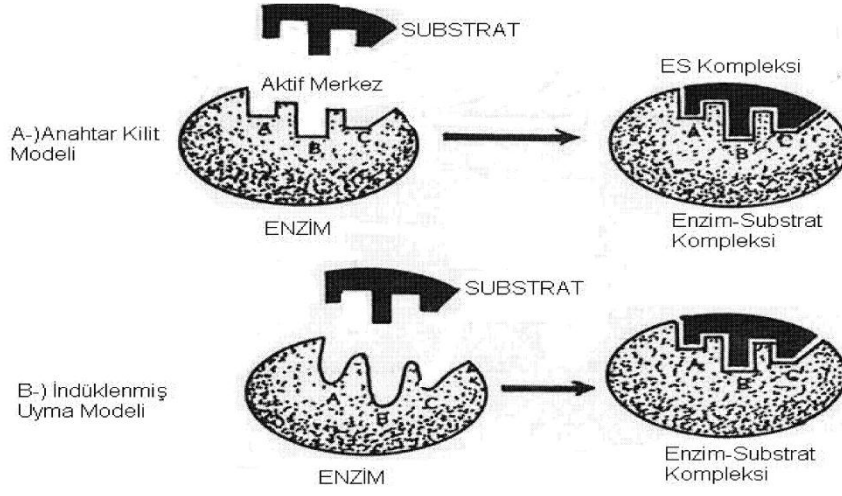
### **2.2.1 Aktivasyon Enerjisi**

Bütün kimyasal tepkimelerde aktivasyon enerjisi denilen bir enerji engelinin aşılması gerekmektedir. Enerji engeli ne kadar büyük olursa birim zamanda bu engeli aşan molaküllerin sayısı da o oranda az olacaktır. Tepkime hızını arttırabilmek için sisteme biyolojik ya da kimyasal bir katalizör ilave edilebilir. Bu durumda katalizör substrat ile (ES) kompleksi yaparak aktivasyon enerjisini aşağılara çekebilir.

### **2.2.2 Aktif Bölgedeki Değişiklikler**

Aktif merkez, bir enzimin substrata yapıştığı bölge, bir de kataliz olayının gerçekleştirildiği bölge (katalitik yer) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Bir enzimin

yapısındaki amino asit artıklarının çoğu substratla temas halinde değildir. Birçok enzimde katalitik yerde serin, sistin, histidin, tirozin ve lizin bulunur [7].



Şekil 2.1 Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli [7]

### 2.3 Biyoteknoloji

Biyoteknoloji; mikroorganizma, hücre veya doku kültürlerinden veya mikrobiyal metabolitlerden, mikrobiyoloji, biyokimya ve mühendislik bilimlerinin kullanılarak değerli ürünlerin elde edildiği interdisipliner bir bilim dalıdır [8].

Biyoteknoloji, canlı hücreler (mikroorganizmalar, bitki ve hayvan hücreleri veya dokuları) veya canlı hücrelerden elde edilen enzimler veya organeller aracılığıyla besin, kimyasal madde, antibiyotik, aşı, hormon, ilaç gibi bazı maddelerin daha temiz teknoloji ile daha ekonomik, daha saf daha çok olarak üretimini, su, toprak, bitki, hayvan ıslahı ve amaca uygun değişimini amaçlar. Biyoteknoloji bunları gerçekleştirirken şu teknolojilerden yararlanmaktadır:

- Fermentasyon teknolojisi,
- Hücre kültürleme teknolojisi,
- Genetik mühendisliği (Rekombinant DNA teknolojisi),
- Ürün analizi ve saflaştırılmasında kimyasal sentez ve analiz yöntemlerinin tümü.

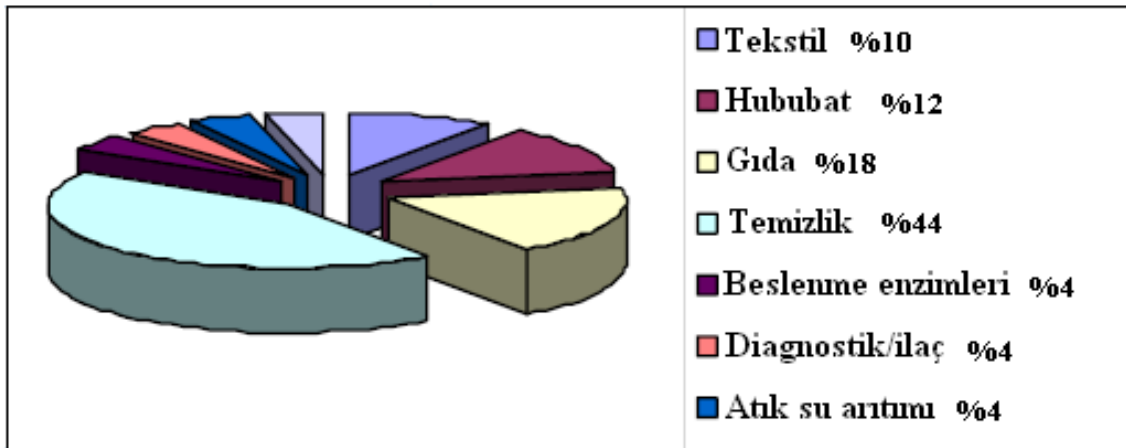
Biyolojik yöntemlerin büyük çoğunluğunu oluşturan fermentasyon teknolojisi, substratın mikroorganizma hücreleri tarafından ürüne dönüştürülmesi şeklinde gerçekleştirilir. Benzeri tepkimeleri serbest ve immobilize enzim preparatları ile de başarmak mümkündür.

Substrat + Mikroorganizma hücreleri (mühendislik hizmetleri) → Ürün

Biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan mikroorganizma, familya ve tür sayısı sınırlı olup genellikle istenilen suşların (özellikleri istenilen yönde değişime uğratılmış mikroorganizma toplulukları) mikroorganizma koleksiyon merkezlerinden sağlanması gerekmektedir [8].

### 2.3.1 Enzimlerin Üretimi ve Biyoteknolojide Kullanımı

Enzimler bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı orijinlerden elde edilmektedir. Fakat potansiyel endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal enzimler geniş çapta kullanılmaktadır. Hayvansal kaynaklardan enzim üretimi, pahalı olmasının yanında, arz ve talep gibi pazar faktörleri tarafından da etkilenmektedir. Buna karşılık birçok bitkisel kaynaklı enzim nispeten kolay elde edilebilir. Fakat, bitkisel kaynakların da endüstriyel hammadde olarak kullanılmaları, gıda ihtiyaçlarına bağlıdır. Mikrobiyal enzimler ise büyük çapta üretimi mümkün kılacak yöntemlerle üretilebilirler. Ayrıca, mikroorganizmaların üreme süreleri kolaylıkla enzimlerin pazar ihtiyaçlarına uyarlanabilir. Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır [9].



Şekil 2.2 Enzim üretiminin endüstride kullanım alanları ve yüzdeleri dağılımları

## **2.4 Enzimlerin Sınıflandırılması**

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler, altı büyük sınıfa ayrılırlar, her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır.

### **1- Oksidoredüktazlar**

Elektron ve hidrojen transfer ederek hücrelerdeki yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerini katalizlerler.

### **2-Transferazlar**

Fosfat, metil, açıl, amino gibi grup transferini yapan enzimlerdir.

### **3-Hidrolazlar**

Hidrolik parçalanmayı sağlayan proteazlar, lipazlar, laktazlar gibi enzimlerdir.

### **4- Liyazlar**

Birleştirici ve ayırıcı tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir.

### **5- İzomerazlar**

İzomerizasyonun olduğu, molekül içi çevrimleri oksijenli ve oksijensiz ortamlarda katalizleyen enzimlerdir.

### **6- Ligazlar (Sentetazlar)**

ATP parçalanmasından serbest kalan enerji ile yeni bağların, dolayısıyla yeni bileşiklerin oluşmasını sağlayan enzimlerdir [11].

## **2.5 Türkiye’de Enzim Üretimi, Önemli Endüstriyel Enzimler**

Ülkemizde enzim üretimi gerçekleştiren bir kuruluş vardır (ORBA Biyokimya San. ve Tic. A.Ş. İstanbul). Kuruluş orta ölçekli bir işletme olup araştırma ve geliştirme çalışmaları sonucu tasarlanmış ve faaliyete geçirilmiştir. Gıda ve tekstil sektörü için amilaz enzimini üretmektedir. Kuruluşta, son zamanlarda deri ve deterjan sektörü için alkalin fosfatazın da üretimine başlanmıştır. Enzim üretimi yapan Orba'ya ek olarak immobilize enzim teknolojisini kullanan iki kuruluşumuz daha vardır (Fako A.Ş. ve Unifar A.Ş.) Bu kuruluşlar immobilize penisilin asilaz enzimini yurt dışından ithal etmekte yine ithal

ettikleri penisilini hidrolizleyerek 6-aminopenisillanik asit (6-APA) üretmektedirler ve ürettikleri 6-APA'ya farklı yan zincir moleküller bağlayarak semisentetik penisilinlerin sentezinde kullanılmaktadırlar [12].

### 2.5.1 Amilolitik Enzimler

Bakteriyal amilaz preparatları yüksek oranda  $\alpha$ -amilaz içerir. Bu enzim termostabildir,  $\alpha$ -1,4-glikozid bağlarını parçalayan bir endoenzimdir. Mantar amilazları ise termostabil olmakla birlikte  $\alpha$ -amilaz ve glukoamilazda içerir. Glukoamilaz nişastayı bir uçtan başlayarak hem  $\alpha$ -1,4-glikozid bağlarından hem de  $\alpha$ -1,6-glikozid bağlarından parçalayabilen enzimdir. Amilazlar nişasta endüstrisi başta olmak üzere, ekmekçilikte, tekstil sanayinde de kullanılırlar [13].

### 2.5.2 Glukoz İzomeraz

GI (Glukoz/Ksiloz İzomeraz; EC 5.3.1.5) enzimi, büyümeleri için ksilozu kullanan bakterilerde bulunan intrasellüler bir enzimdir. GI, in vivo koşullarda D-ksilozun D-ksiluloza ve in vitro koşullarda D-glukozun D-fruktoza dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. GI enzimi *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter* ve bazı *Streptomyces* türleri gibi çeşitli mikroorganizmalardan saflaştırılmaktadır. Glukozun fruktoza enzimatik izomerizasyonunun endüstriyel alanda ilk uygulaması ABD'de 1967 yılında yapılmıştır. İmmobilize GI ise 1974 yılında kullanılmaya başlanmıştır. GI, bugün meşrubat, fırıncılık, konserve yapımı ve şekerleme endüstrisinde en büyük pazar payına sahip olan bir enzimdir [4].

### 2.5.3 Galaktozidazlar

$\beta$ -galaktozidazlar, mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvan dokularında yaygın olarak bulunmaktadır. Bununla birlikte bakteriyal kaynaklı  $\beta$ -galaktozidazlar daha çok tercih edilmektedirler. Çünkü yüksek enzim aktivitesi gösterirler ve kararlıdırlar. Mikrobiyal kaynaklar olarak maya ve küfler gösterilebilir.  $\beta$ -galaktozidazlar sütteki laktozun uzaklaştırılmasında, oligosakkaritlerin sentezinde, peynir altı suyundaki laktozun uzaklaştırılmasında görev alırlar [4].

Biyoteknoloji ve tıpta kullanılabilirliğinin yüksek olması sebebiyle  $\alpha$ -galaktozidazlara büyük ilgi duyulmaktadır. Endüstriyel alandaki en büyük uygulamaları şeker pancarından şeker üretimi, kağıt hamurunun işlenmesi, kağıt endüstrisi, soya ürünlerinin üretimi ile hayvan yemi üretimidir [5].

#### **2.5.4 Pektolitik Enzimler**

Galakturonik asidin doğal polimeri olan pektinleri parçalayan enzimlerdir. Pektini parçalayan enzimler meyve sularının berraklaştırılmasında, meyve suyu üretiminde filtrasyonu kolaylaştırıp verimin arttırılmasında kullanılırlar [13].

#### **2.5.5 Selülazlar**

Selülaz üretiminde daha çok *Trichoderma viride* kullanılır. Enzim oluşumu selüloz tarafından indüklenir. Doğada en yaygın şekilde bulunan selüloz, glukoz birimlerinin  $\beta$ -1,4-glikozid bağları ile bağlanması sonucu oluşan bir polimerdir ve sekonder yapısı çok sıkıdır.

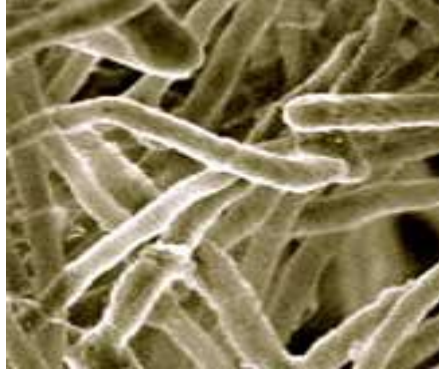
Endüstride selülaz enzimleri diyet gıdaların hazırlanmasında ve teknik süreçte istenmeyen liflerin uzaklaştırılmasında, sebze, meyve püreleri hazırlanmasında, bitkisel gıdaların kurutulmasında kullanılırlar [1].

Çizelge 2.1 Endüstride kullanılan bazı enzimler ve kullanım alanları [5].

Enzim	Uygulama Alanı
Lipazlar	Yağların parçalanması ve interesterifikasyon
Rennin, pepsin	Peynir üretimi
Çeşitli proteazlar	Sindirime yardımcı, dericilik
Papain	Etin gevrekleştirilmesi
Papain, fisin, bromelain	Biranın soğuğa dayanıklılığının artırılması
Tripsin, papain, fisin, pepsin	Balık pres suyu vizkozitesinin düşürülmesi
Amilaz, pullulanaz	Nişasta hidrolizi
İnvertaz	Sakkaroz inversiyonu
Pektinazlar	Meyve suyu, sirke ve şarap berraklaştırılması
Nükleazlar	Lezzet kontrolü
Diğer hidrolitik enzimler	Besin maddesinden istenmeyen ve toksik bileşiklerin uzaklaştırılması
Oksidazlar	Oksidasyonun önlenmesi ve besin maddelerinde renk kontrolü
Pronoz, amino peptidaz	Amino asit üretimi
<b>Laktaz (<math>\beta</math>-galaktozidaz)</b>	<b>Peynir atık suyu ve sütteki laktozun hidrolizi</b>
Selülaz	Selüloz hidrolizi
Amiloglukozidaz	Dekstroz üretimi
Aminoaçilaz	Aminoasit rasemik karışımlarının ayrılması
Penisilin amidaz	Penisilin üretimi

## 2.6 *Hypocrea Jecorina*

*H. jecorina*, selülotik ve hemiselülotik enzimlerin üretimi için endüstriyel olarak kullanılan *Trichoderma reesei* anamorfı olarak bilinen filamentli, tropikal bir küftür. *H. jecorina*, ilk olarak 2. Dünya Savaşı sırasında Solomon adalarında Amerikan Ordusu tarafından, çadır ve paraşüt gibi pamuklu materyallerin yol açtığı sorunların sebeplerinin araştırılması sırasında izole edilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan orjinal QM6a kültürü *T. viride* olarak isimlendirilmiş, ancak QM6a kültürünün morfolojik olarak diğer *T. viride* yapılarından farklı olduğu bulununca isim *T. reesei* olarak değiştirilmiştir [14]. Bu, bilim adamları tarafından yeni bir mantarsı yapı olarak kabul edilmiş ve kültürü ilk olarak saflaştıran Elwyn *T.reese*'den esinlenilerek isimlendirilmiştir. İlerleyen çalışmalarda, QM6a kültürünün başka bir *Trichoderma* türü olan *T. longibrachiatum*'dan ayrı tutulamayacağı belirtilmiştir. Son yapılan çalışmalarla *T. reesei*'nin, iyi tanımlanmış bir üreme döngüsüne sahip olan *H. jecorina*'nın klonal bir türevi olduğu kanıtlanmıştır [5].



Şekil 2.3 *Hypocrea jecorina* [15]

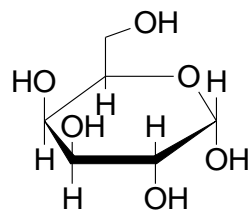
## 2.7 Galaktozidazlar

Galaktozidazlar glikozidazların bir alt sınıfı olan hidrolatik enzimlerdir. Glikozidazlarda glikozil bileşikleri üzerinde etikili olan oldukça geniş, önemli bir enzim grubudur. Glikopiranozil grupları ile glikozidik bağların anomerik konfigürasyonlarına karşı oldukça spesifik olan glikozidazlar bitkilerde, hayvanlar ve mikroorganizmalarda oldukça yaygın olarak bulunur. Glikozidazlar genel olarak şeker halkasının konfigürasyonuna sahiptirler. Örneğin;  $\alpha$ -galaktozidazlar monosakkarit, oligosakkarit, glikopeptid ve fenole  $\alpha$ -bağlı terminal galaktoz artıklarını,  $\beta$ -galaktozidazlar ise;  $\beta$ -1,6-

$\beta$ -1,4-, veya  $\beta$ -1,3-, bağı terminal galaktoz artıklarını hidrolizleyebilirler. Glikozidazlar genel olarak endo ve ekzo glikozidazlar olarak iki gruba ayrılırlar. Ekzoglikozidazlar sadece terminal artıklar üzerinde etkilidir, bunlara;  $\beta$ -amilaz (EC 3.2.1.2),  $\alpha$ -galaktozidaz (EC 3.2.1.22),  $\beta$ -galaktozidaz (EC 3.2.1.23) örnek gösterilebilir. Galaktozidazlar, ekzoglikozidazların en iyi bilinen sınıfıdır. Ekzoglikozidazlar, glikoprotein ve glikolipidlerdeki karbonhidrat yapısını modifiye ederler. Galaktozidazlar o-glikozil bileşiklerini hidrolizleyen enzimler olup  $\alpha$ - ve  $\beta$ - galaktozidazlar olarak iki gruptan oluşurlar [64]. Galaktozidazlar, galaktoz ve galaktozdan farklı bir diğer şeker molekülü arasındaki glikozidik bağı koparan enzimlerin bir sınıfını oluştururlar. Hidrolazların glikozilazlar alt sınıfının glikozidazlar grubunda yer alırlar. Glikozidik bağı  $\alpha$ - veya  $\beta$ - çeşidine etki etmelerine göre  $\alpha$ -galaktozidazlar ve  $\beta$ -galaktozidazlar olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar [5].

### 2.7.1 $\alpha$ -Galaktozidazlar (E.C 3.2.1.22)

$\alpha$ -Galaktozidaz ( $\alpha$ -D-galaktozid galaktohidrolaz, melibiyaz)  $\alpha$ -D-galaktozil grupları içeren oligosakkaridlerdeki indirgen olmayan terminal uçtaki  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) bağı  $\alpha$ -D-galaktoz kalıntılarını katalizleyen bir ekzoglikozidazdır. Rafinoz ailesi şekerlerinden rafinoz, stakiyoz, melibiyoz, verbaskoz gibi oligosakkaritler ile galaktomannan, deve kemiği zamkı ve B kan grubu polisakkaritleri gibi substratlar üzerinde etki göstermektedirler. Doğada oldukça yaygın olarak bulunan hidrolaz sınıfı bir enzimdir.



Şekil 2.4  $\alpha$ -D-Galaktoz

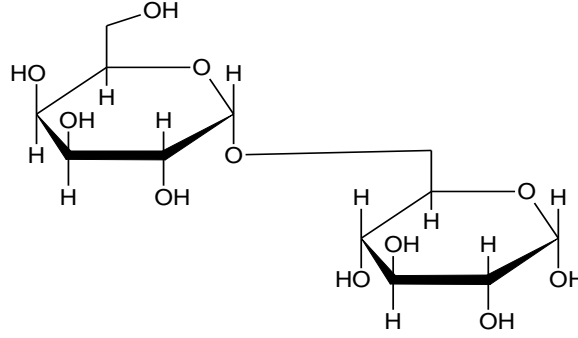
$\alpha$ -Galaktozidaz, bir lizozomal glikozidazdır. Epididimis, seminal kabarcıklar, uterus, mesane, nefes borusu, bronşlar, tiroid bezi ve sinir hücrelerinde yüksek aktivite gösterir.  $\alpha$ -Galaktozidaz, kompleks karbohidratların derecelerini düşürmede rol oynamaktadır [5].  $\alpha$ -Galaktozidaz melibiyoz, rafinoz ve stakiyoz gibi oligosakkaritlerden, polimerik galaktomannan ve galaktolipidlerden  $\alpha$ -1,6 bağı terminal  $\alpha$ -galaktoz birimlerinin hidrolizini gerçekleştirir. Yüksek substrat

konsantrasyonlarında da transgalaktozilasyon reaksiyonunu katalizlemektedir [17], [18].

### 2.7.2 $\alpha$ -Galaktozidazın Etki Mekanizması

$\alpha$ -Galaktozidazın etki tarzı ile ilgili farklı mekanizmalar ileri sürülmüştür.  $\alpha$ -Galaktozidaz substrat molekülünün glikozidik bağınyı hidroliz eder ve substratla aynı anomerik konfigürasyonu gösteren galaktozil kalıntılarını meydana getirir. Farklı kaynaklardan izole edilen  $\alpha$ -galaktozidazların hidrolitik etkisinin ya aktif bölgesindeki karboksil ve imidazol gruplarından ya da aktif bölgesinde bulunan iki karboksil, birer tirozin ve triptofan gruplarının bulunmasından ileri geldiği açıklanmaktadır [5].

$\alpha$ -Galaktozidazın substratı olarak kullanılan melibiyoz Şekil 2.5’de gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Melibiyoz

$\alpha$ -Galaktozidaz melibiyozu  $\alpha$ -D-galaktoz ve  $\alpha$ -D-glukoz birimlerine hidrolizleyerek ayırır.

### 2.7.3 $\alpha$ -Galaktozidazın Kullanım Alanları

Biyoteknoloji ve tıpta kullanılabilirliğinin yüksek olması sebebiyle  $\alpha$ -galaktozidazlara büyük ilgi duyulmaktadır. Endüstriyel alandaki en büyük uygulamaları şeker pancarından şeker üretimi, kağıt hamurunun işlenmesi ve kağıt endüstrisi, soya ürünlerinin üretimi ile hayvan yemi üretimidir.

Şeker pancarının işlenmesi sürecinde, kristalizasyon basamağında meydana gelen rafinoz inhibisyonunu önlemek amacıyla  $\alpha$ -galaktozidaz tarafından katalizlenen rafinoz degradasyonundan yararlanılmaktadır [5].  $\alpha$ -Galaktozidaz melastaki rafinozu hidrolizleyerek kristalize şeker verimini arttırmak için biyoteknolojik proseslerde kullanılmaktadır. Biyoteknolojik uygulama alanları nedeniyle  $\alpha$ -galaktozidazlar oldukça önemli bir enzim grubudur [64].

En önemli endüstriyel kullanım alanı gıda endüstrisinde, şeker yapımıdır. Sükrozun kristalleşmesi, düşük miktarda rafinoz ve stakioz tarafından dahi engellenebilmektedir. Rafinoz ve stakiozun enzimatik hidroliz ile sükroza çevrilmesi kristalleşmeyi, dolayısıyla da ürün verimini artırır.  $\alpha$ -Galaktozidaz ayrıca rafinoz ve stakioz gibi galaktozidleri yapılarından uzaklaştırarak soya fasulyesi gibi baklagillerin sindirimini kolaylaştırabilir ve galaktomannanların jelleşme kapasitelerini artırır [17], [19].

Son yıllarda  $\alpha$ -galaktozidazlarla yapılan klonlama çalışmaları da oldukça büyük önem ve hız kazanmıştır. Saflaştırılan enzimin oldukça büyük miktarlarda üretilmesi ve enzimatik özelliklerinin geliştirilmesi için  $\alpha$ -galaktozidazdan cDNA klonunun izole edilerek dizisinin aydınlatılması gerekmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalardan birinde kahve çekirdeği  $\alpha$ -galaktozidazını kodlayan cDNA önce klonlanmış ve ardından dizisi aydınlatılmıştır. cDNA klonu 378 amino asitlik bir proteini kodlayan tek bir sistemi içermektedir. Diğer kaynaklardan elde edilen cDNA klonları ile % 52-80 arasında bir dizi homologluğu göstermektedir.  $\alpha$ -Galaktozidaz cDNA 'sı çok çeşitli kaynaklardan; insan, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cyamopsis tetragonolobus* ve bitki tohumlarından klonlanmıştır. Bu kaynaklardan izole edilen enzim kahve çekirdeği  $\alpha$ -galaktozidazı ile kıyaslandığında, fizyolojik koşullar altında B-grubu antijenlerinden terminal galaktoz artıklarının uzaklaştırılmasında kahve  $\alpha$ -galaktozidazının daha etkin olduğu tespit edilmiştir [17].

Barsaklarda işlev bozukluğu, şişkinlik gibi sorunlara sebep olan, baklagillerde bulunan rafinoz ve stakioz oligosakkaritlerinin hidrolizi  $\alpha$ -galaktozidazın bir başka uygulama alanıdır.

$\alpha$ -Galaktozidaz, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde ksilanaz ile birlikte ağartma işlemlerinde kullanılmaktadır.

Ucuz jelleştirme ajanı olarak kullanılan guar zamkını, deve kemiği zamkı gibi daha etkin bir jelleştirici ajana dönüşümü, guar polisakkaritinden  $\alpha$ -galaktozidazın katalizlediği bir reaksiyonla bazı galaktozil birimlerinin uzaklaştırılmasıyla gerçekleştirilmektedir [5].

Lizozomal glikozidaz olan  $\alpha$ -galaktozidaz tıp alanında, matriks moleküllerinin yıkılımı ile ilgili lizozomal enzimlerin eksikliğinde ortaya çıkan bir depo hastalığı olan Fabry

hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hastalıkta proteoglikanlardan karbohidratlar kısmi olarak yıkılmakta, yıkılamayan bileşenler hücre içinde membranla kaplı veziküllerde birikmektedir. Biriken bileşenler organın genişlemesine ve fonksiyonunun azalmasına sebep olmaktadır.

Gangliozidoz grubunda yer alan Fabry hastalığında başlıca beyin, deri ve RES (karaciğer ve dalak) etkilenmektedir. Sentez hızı normal olan lipidin normal yıkılımı için gerekli olan  $\alpha$ -galaktozidazı kodlayan genin mutasyonu sonucu enzim yeterli olarak sentezlenememekte veya enzimin aktivasyonu için gerekli kritik protein bulunmamaktadır [5].

Hipertermofilik kaynaklardan  $\alpha$ -galaktozidazlar, hayvan yemlerinde mevcut olan galaktoz oligosakkaritlerini hidroliz ederek, hayvan yemini muamele etmede faydalıdır. *Thermotoga maritima*dan  $\alpha$ -galaktozidazlar; hayvan yemi kompozisyonlarında yaygın olarak bulunan sindirilemeyen oligosakkaritler olan rafinoz stakiyoz ve verbaskozu hidrolize etmede faydalıdır. Bu enzimleri yüksek sıcaklıklarda ve yani tipik olarak hayvan yemi formülasyonu veya işlemlerine eşlik eden endüstriyel proseslerde normal olarak karşılaşılan sıcaklıklarda kullanma yeteneği; hayvan yemine besin değeri katmak ve işlemede fleksibilite eklemek için avantajlıdır. Hipertermofilik  $\alpha$ -galaktozidazlar, ayrıca insan gıdası için gıda katkı maddeleri olarakta faydalıdır [20].

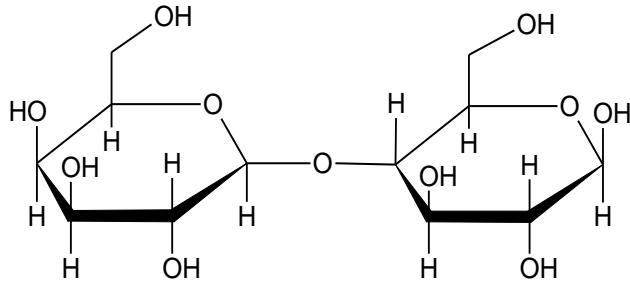
## **2.8 $\beta$ -Galaktozidazlar (EC 3.2.1.23)**

$\beta$ -galaktozidaz ( $\beta$ -D-galaktozid galaktohidrolaz, laktaz,  $\beta$ -laktozidaz)  $\beta$ -D-galaktozil grupları içeren oligosakkaritleri hidroliz edebildiği gibi galaktozil kalıntılarının bir molekülden diğer moleküle aktarılmasını sağlayarak transferaz aktivitesi de gösteren bir glikozidazdır.

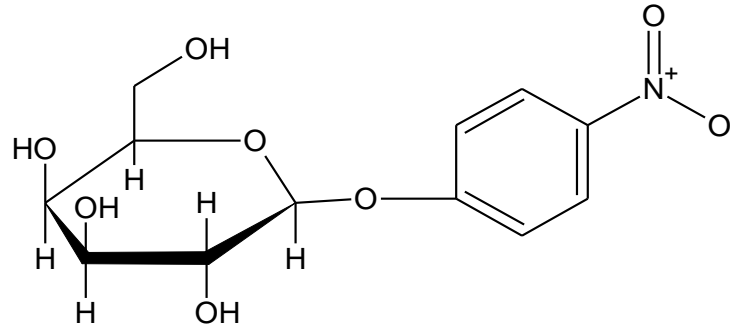
Laktozim, trilaktaz,  $\beta$ -D-galaktanaz, orizatim, sumiklat, maksilat ve hidrolat  $\beta$ -galaktozidazın ticari isimleridir.  $\beta$ -Galaktozidaz birçok doğal (laktoz) ve sentetik (p-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid) substrat üzerinde etki gösterir. Şekil 2.6 ve Şekil 2.7'de laktoz ve p-nitrofenil-  $\beta$ -D-galaktopiranozidin molekül şekilleri gösterilmiştir.

Bu enzim, glikolipidler, glikoproteinler, polisakkaritler ve laktoz gibi disakkaritlerdeki  $\beta$ -galaktozil zincirinin koparılmasında görevlidir [5].

$\beta$ -Galaktozidazlar galakto-oligosakkaritlerin (GOS) üretimini sağlayan transgalaktosilasyon tepkimesini de gerçekleştirir [21].

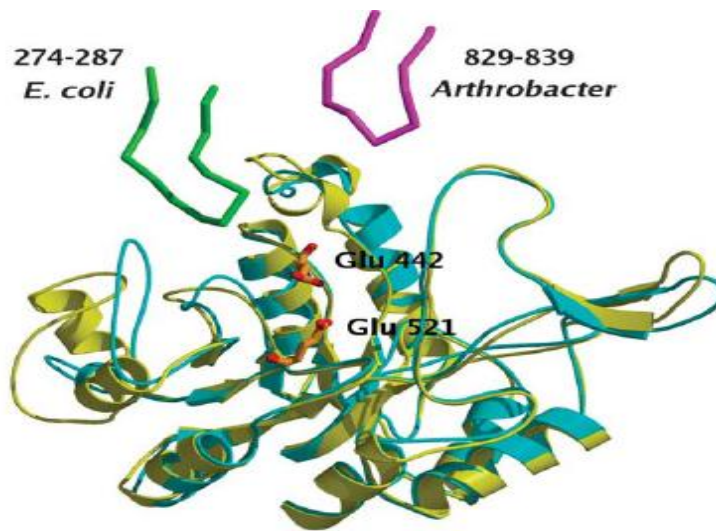


Şekil 2.6 Laktoz



Şekil 2.7 p-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid

$\text{Na}^+$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  iyonları içeren bir metalo enzim olan  $\beta$ -galaktosidazın görevi, bir disakkarit olan laktozu onun monosakkarit bileşenleri olan glukoz ve galaktoza hidroliz etmektir. Bir başka deyişle süt şekerini üzüm şekerine çeviren bağırsak enzimi olarak da tanımlanabilir [22], [23].



Şekil 2.8  $\beta$ -Galaktozidazın üç boyutlu yapısı [22]

Gıda teknolojisi ve beslenme açısından, laktozun glukoz ve galaktoza parçalanması,

büyük önem taşır. Çünkü yapılan hidrolizin temel ürünleri daha tatlı, daha çözünebilir, fermente edilebilir ve ince barsak tarafından doğrudan absorbe edilebilir niteliktedir [22], [24], [25].

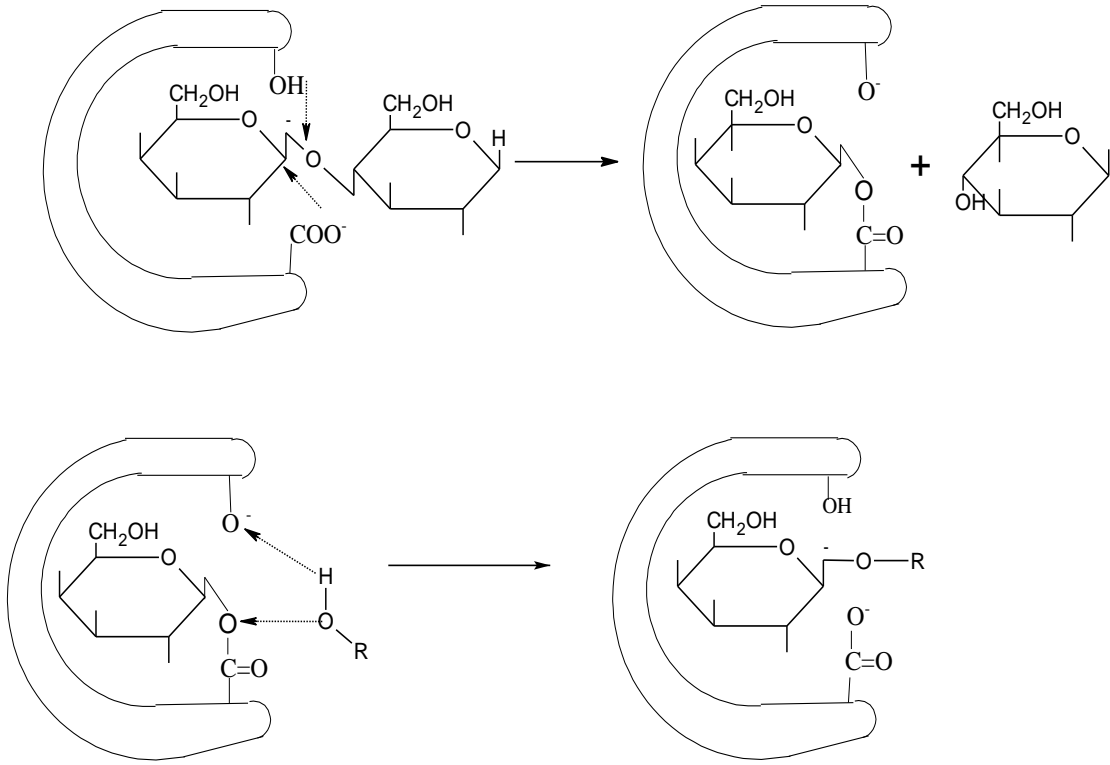
Günümüzde enzimlerin üç boyutlu yapıları, X-ışınları kristalografisi ile ayrıntılı bir şekilde görüntülenebilmektedir.  $\beta$ -galaktozidazın üç boyutlu yapısı Şekil 2.8'de gösterilmiştir. *Arthrobacter sp.C2-2*  $\beta$ -galaktozidaz için sarı renk ile TIM alanları, kırmızı renk ile F zincirinin 829-839 kalıntıları gösterilmiştir. *E.coli*  $\beta$ -galaktozidaz enzimi için ise TIM alanları mavi ile D 274-287 zincirinin kalıntıları da yeşil ile gösterilmiştir. Glu 442 ve C221- $\beta$ -Gal'ın Glu 521 katalitik kalıntıları ise kavun içi renk ile gösterilmiştir. İki farklı kaynaklardan elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz enziminin TIM alanına yüklenmiştir.

Her iki  $\beta$ -galaktozidazdaki farklı heksamerik ve tetramerik oligomerizasyon, TIM alanına ve  $\beta$ -galaktozidazın aktif merkezine yakın olacak şekilde, komşu monomerlerin farklı bölümlerini meydana getirir [26], [27].

Molekül ağırlığı yaklaşık 540.000 olan  $\beta$ -galaktozidaz dört eşdeğer alt birimden oluşan tetramerik bir enzimdir. Her alt birim yaklaşık 120-135 kDa molekül ağırlığındadır.  $\beta$ -galaktozidaz açıklanan en uzun protein zincirine sahip enzimdir. Her alt birimi yaklaşık 1021-1170 amino asit içermektedir [28], [29].

### **2.8.1 $\beta$ -Galaktozidazın Etki Mekanizması**

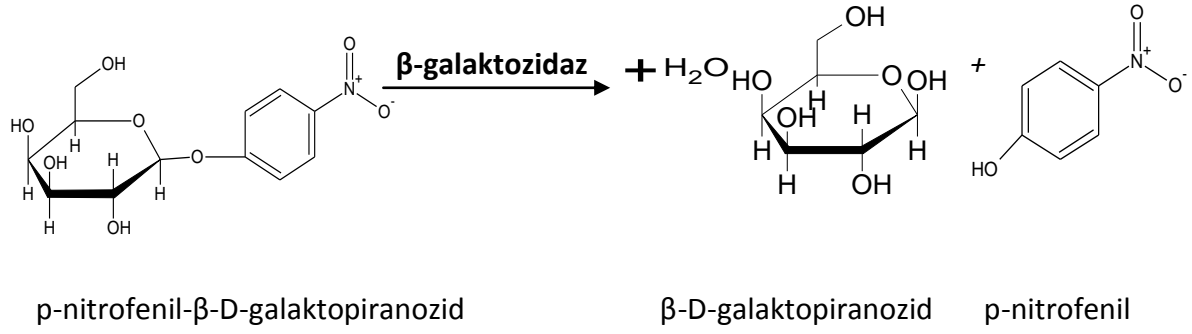
Laktozun glikozidik bağının enzimatik hidrolizi, iki önemli kalıntıya gereksinim olduğu bilinen genel asit katalizi yolu ile gerçekleşir. Bu iki önemli kalıntı, bir proton verici grup ve akseptör olarak bir nükleofil ya da bir baz grubu gibi davranır. İlk olarak Wallenfels tarafından tanımlanan laktoz hidrolizinin önerilen mekanizmasında, sistein kalıntısı proton vericisi olarak, histidin kalıntısı ise nükleofil olarak etki eder. Fakat son yıllarda açıklık kazanan önemli bir gelişme, çok çeşitli mikrobiyal kaynaklardan izole edilen  $\beta$ -galaktozidazların iki glutamik asit kalıntısına (Glu482 ve Glu551) sahip olduğunu gösterir. Enzimatik reaksiyonda bu iki glutamik asit kalıntısı proton verici ve nükleofilik baz olarak aynı zamanda etki eder. Şekil 2.9'da  $\beta$ -galaktozidazın etki mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.9  $\beta$ -Galaktozidazın etki mekanizması [5]

İki basamaklı mekanizmanın, ilk basamağında enzim-galaktozil kompleksi oluşur ve glukoz, glikozid bağının kopması ile ayrılır. İkinci basamakta enzim-galaktozil kompleksi, hidroksil grubu içeren bir alıcıya transfer edilir. Seyreltik bir laktöz çözeltisinde su veya glukoz gibi diğer şekerler alıcı molekül (R-OH) olarak reaksiyona girer ve son ürün oluşur. Alıcı olarak laktöz, daha fazla rekabet halindedir. Böylece galaktoz oluşturulur ve aktif bölgeden serbest bırakılır. Diğer taraftan, derişik laktöz çözeltisinde, laktöz molekülü alıcı olarak daha fazla etki etme hakkına sahiptir.

$\beta$ -Galaktozidazın substrat olarak p-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid kullandığı tepkimesi şekil 2.10'da gösterilmiştir.



Şekil 2.10 p-Nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozidin hidroliz tepkimesi

$\beta$ -Galaktozidaz, hücrede lizozomun her yerinde bulunur. Optimum pH değeri organ, substrat ve tampon çözeltiye bağlı olarak 3 ile 5 arasında değişir.  $\beta$ -Galaktozidaz, D-galaktoz, laktoz ve p-kloromerkübenzoat tarafından inhibe edilir. Böbrek, karaciğer, dalak, epididimis ve uterus  $\beta$ -galaktozidaz bakımından zengin organlardır. Enzimin bağlandığı lizozomlarda ise bu organlara oranla daha az miktarda bulunur. Dokulardaki % 4 formaldehid veya % 2,5 oranında glutaraldehid,  $\beta$ -galaktozidazın yaklaşık % 75'ini inhibe eder. Bu inhibisyon dokulardaki düşük aktiviteye veya hücrelerdeki yetersizliğe sebep olabilir. Biyokimyasal çalışmaların sonucuna bakılarak doku kimyasında  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesine karar verilir. Yetişkin hayvanların ince barsaklarında tepkimeye katılımı ya çok zayıftır ya da hiç yoktur. Buna karşılık  $\beta$ -galaktozidaz, genç memeli hayvanların ince barsaklarında çok hızlı bir şekilde emilime uğrar [5].

### 2.8.2 $\beta$ -Galaktozidazın Özellikleri

$\beta$ -Galaktozidazın muhtemel kaynakları bitkiler, hayvan doku ve organları, mayalar (intraselüler enzim) ve mantar (ekstraselüler enzim) lardır. Enzimin özellikleri kaynağına göre farklılık göstermektedir. Farklı kaynaklardan izole edilmiş  $\beta$ -galaktozidazların özellikleri Çizelge 2.2' de gösterilmiştir. En yüksek molekül ağırlığına 520000 ile 850000 Dalton arasında değişen değerlerde *E. coli*  $\beta$ -galaktozidazı sahipken, *S. fragilis* ve *A. oryzae* için bu değerler sırasıyla 201000 ve 90000 Dalton'dur. Termofilik organizma sınıfına giren bazı  $\beta$ -galaktozidaz kaynağı mikroorganizmalar enzimin termostabilitesini etkilemeleri açısından ilgi çekicidirler. 60°C ve üstündeki yüksek sıcaklıklarda dahi uzun süre aktivitelerini koruyabilen termostabil enzimlerin iki avantajı bulunmaktadır:

- Daha yüksek dönüştürme kapasitesine sahiptirler.

- Mikrobiyal kontaminasyona uğrama olasılıkları daha düşüktür.

Çizelge 2.2 Farklı kaynaklardan izole edilmiş  $\beta$ -galaktozidazların özellikleri

Kaynak	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	Molekül Ağırlığı (kD)	Aktifleştirici İyonlar
<i>A. niger</i>	3.0-4.0	55-60	124	-
<i>A. oryzae</i>	5.0	50-55	90	-
<i>S. fragilis</i>	6.6	37	201	Mn <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup>
<i>S.lactis</i>	6.9-7.3	35	135	Mn <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>
<i>E. coli</i>	7.2	55-57	540	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6.5-7.5	55	500-600	-
<i>B.stearothermophilus</i>	6.0-6.4	65	215	-
<i>B. circulans</i>	6.0	60-65	-	-
<i>Bacillus sp.</i>	6.8	65	-	-
<i>L. bulgaricus</i>	7.0	42-45	-	-
<i>Mucor pucillus</i>	4.5-6.0	60	-	-
<i>Alternaria alternara</i>	4.5-5.5	50-70	-	-
<i>Thermus aquaticus</i>	4.5-5.5	80	570	-

### 2.8.3 $\beta$ -Galaktozidazın Endüstride Kullanımı

- Sütün hidrolizi,
- Laktozsuz süt ürünlerinin eldesi,
- Dondurma üretimi,
- Peynir altı suyunun hidrolizi,
- Hayvansal besin uygulamaları'dır [33].

Farklı kaynaklardan elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz;  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galaktozid bağı içeren bileşiklerin yapı aydınlatılmasında, laktoz intoleransı olan bebeklerin bu durumlarının giderilmesinde ve gıda sanayiinde peynir üretimi başta olmak üzere geniş kullanım alanı olan bir enzimdir. Eğer enzim gıda sektörü uygulamaları için kullanılacaksa, tüm  $\beta$ -galaktozidaz kaynakları kullanım açısından kabul edilebilir ve güvenli değildir.

*A. niger*, *A. oryzae* ve *K. sp (lactis ya da fragilis)* güvenilir kabul edilir. Çünkü bu kaynaklar daha önce pek çok testlerden geçirilmiş ve bu sektörde kullanımı mevcut olan kaynaklardır.

$\beta$ -Galaktozidazın, *E.coli* 'den kolaylıkla elde edilebilmesine, *E. coli*  $\beta$ -galaktozidazının, en iyi şekilde karakterize edilen ve en yaygın olarak tanımlanmış galaktozidaz olmasına karşılık, yüksek maliyeti ve koliform ekstraktlarının sebep olduğu toksisite sorunları sebebiyle gıda sektöründe kullanımı bulunmamaktadır.

Endüstride kullanılan  $\beta$ -galaktozidazlar başlıca *S. lactis*, *S. fragilis* gibi mayalardan ve *A. niger* gibi küflerden üretilir. Son yıllarda  $\beta$ -galaktozidazlar, *B. stereothermophilis*, *B. bifidum* ve *B. infantis* bakterilerinden de saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Değişik mikroorganizmalardan türevlendirilen  $\beta$ -galaktozidazlar farklı özelliklere sahiptir. Bu özellikler, molekül ağırlığı, protein zincirinin uzunluğu ve aktif bölgenin pozisyonudur.

İnsan organizmasında ince bağırsaklarda bulunan  $\beta$ -galaktozidaz, laktozdaki  $\beta$ -galaktozid bağının hidrolizini sağlayarak süt ve süt ürünlerinden organizmanın yararlanmasına olanak verir. Bununla birlikte Dünya popülasyonunun %70'inde intestinal  $\beta$ -galaktozidaz eksikliği olduğu tahmin edilmektedir.

Sadece süt ve süt ürünleriyle beslenen bebekler için, intestinal  $\beta$ -galaktozidazın varlığı büyük önem taşır. Bu enzimin eksikliğinde bebeklerde laktoz hidroliz edilemediğinden glukoz ve galaktozun emilmesi olanaksız hale gelir.  $\beta$ -galaktozidaz eksikliği bulunan bebeklerin beslenme bozukluğunu gidermek üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla çeşitli kaynaklardan elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz sıvı halde süte katılmış ve kapsül veya enterik tablet halinde verilerek laktoz intoleransı önlenerek sütten yararlanım sağlanmıştır [5].

Çeşitli yöntemlerle elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz sadece laktoz intoleransı olan bebeklerin süt ürünlerinden yararlanmasını sağlamak amacıyla kullanılmaz, peynir üretiminde de üretim hızını ve lezzet kalitesini arttırmak amacıyla kullanılır [5], [30].

Peynir yapımındaki en önemli sorun, peynirlerin olgunlaşma ve aromalarının gelişmesi için, depolanmasıdır. Örneğin cheddar peynirlerinin olgunlaşması 6-12 ay, parmesan'ın olgunlaşması ise 12 ay sürmektedir. Bu süre zarfında, istenmeyen aromalar ve acılık gelişebilmektedir. Bu sorunu çözmek için, peynir yapımı kaynatılmış ve ılık hale getirilmiş süte başlatıcı kültürün katılmasıyla başlatılmaktadır. Kültürler, çeşitli bakteri suşlarını ihtiva ederler. Bunlar sütteki proteini parçalayarak hem peynirin aromasını verirler hem de daha çabuk olgunlaşmasına yardımcı olurlar. Çoğu zaman  $\beta$ -galaktozidaz kaynağı ilave kültür olarak *Lactobacillus bulgaricus* kullanılır. Bunun amacı acılığı azaltarak aromayı zenginleştirmektir. Yapılan çalışmalara göre,  $\beta$ -galaktozidazı üreten genler başlatıcı kültürdeki bakterinin bir parçası olduğundan, gelecekte üreticilerin ek kültür ilavesine gereksinim kalmayacaktır [5], [31].

Çizelge 2.3' te yaygın olarak kullanılan  $\beta$ -galaktozidaz kaynakları gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 Yaygın olarak kullanılan  $\beta$ -galaktozidaz kaynakları

BİTKİ	ORGAN	MAYA	BAKTERİ	MANTAR
Şeftali	Bağırsak	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>
Kayısı	Beyin Dokusu	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Yabani gül	Deri Dokusu	<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
Kahve taneleri	-	<i>Brettanomyces anomalus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>
Kefir taneleri	-	<i>Wingea roberstii</i>	<i>Lactobacillus sporogenes</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Badem	-	<i>Sirobasidium magnum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Aspergillus phoenicis</i>
Kabayonca çekirdeği	-	<i>Sterigmatalomyces elviae</i>	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Mucor pucillus</i>
-	-	<i>Rhodoiorulaminula</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Mucor miehei</i>

Çizelge 2.3 Yaygın olarak kullanılan  $\beta$ -galaktozidaz kaynakları (Devamı)

BİTKİ	ORGAN	MAYA	BAKTERİ	MANTAR
-	-	-	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Alternaria palmi</i>
-	-	-	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Curvularia inaequalis</i>
-	-	-	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
-	-	-	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Alternaria alternara</i>
-	-	-	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Sulfolobus shibatae</i>
-	-	-	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>

Çizelge 2.3 te de görüldüğü üzere; bitkilerde; şeftali, kayısı, badem, kefir taneleri, yaban gülü, kahvede bulunan  $\beta$ -galaktozidaz, hayvansal organizmalarda; beyin, ince bağırsaklarda ve deri dokusunda bulunur. Mantar grubu olarak, *Neurospora crassa*, *Mucor pucillus*, *Alternaria palmi*, *Asperigillus foetidus*, *Mucor mieheri curvularia inoequalis*, *Asperigillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Asperigillus flovus*, *Alternaria alternara*, *Asperigillus oryzae*, *Asperigillus phoenicis* örnek gösterilir.  $\beta$ -Galaktozidazın kaynağı olarak mayaların yer aldığı kısımda ise; *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces*

*fragilis*, *Candida pseudotropicalis*, *Brettanomyces anomolus*, *Wingea robersii* yer alır.  $\beta$ -Galaktozidazın bulunduğu bakteriler arasında *Escherichia coli*, *Thermus aquaticus*, *Bacillus sp.*, *Bacillus megaterium*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearotherophilus*, *Lactobacillus sporogenes* sıralanır [32].

#### **2.8.4 $\beta$ -Galaktozidazın Fizyolojik Önemi ve Eksikliği**

$\beta$ -Galaktozidaz, vücutta ince barsak duvar hücreleri tarafından salgılanır, laktozun ince barsakta bu enzimle hidrolizlenmesi sonucu oluşan glikoz ve galaktoz yine ince barsaktan absorplanarak kan dolaşımına geçer ve karaciğerde metabolize edilir. Enzimin ince barsakta üretimi yeni doğan bir bebek için çok önemlidir. Sindirilmemiş laktoz çocuklarda ve yetişkinlerde hiçbir işe yaramadığı gibi çocuklukta büyümeyi engellemektedir.

GM1 Gangliozidosis hastalığı lizozomal bir enzim olan  $\beta$ -galaktozidaz eksikliği sonucu meydana gelen otozomal resesif kalıtım gösteren bir lipid depo hastalığıdır. Çeşitli klinik bulguları olan bir grup hastalıktır. İnfantil formunda hepatosplenomegali, ödem, döküntü, maküler kiraz kırmızı nokta, disostozis multipleks ve kardiyomegali bulguları vardır. Geç ortaya çıkan formunda ataksi, disartri ve serebral palsi benzeri spastisite bulguları vardır. Tanı beyaz kan hücrelerinde ve kültür cilt fibroblastlarında enzim eksikliğinin saptanması ile konur [32].

#### **2.8.5 Laktoz İntoleransı ve Süt Alerjisi**

Besin olarak yenen her madde alerjen olabilir. Bununla birlikte, bazı gıda maddeleri diğerlerine göre daha sık alerji tepkimelere neden olabilmektedir. Ayrıca, bu tepkimelerin oluşmasında, besinlerin geleneksel yeme alışkanlığı kadar, hazırlanış şekillerinin de etkisi vardır. Süt alerjileri de genellikle kalıtsal olup, bazı etnik gruplarda daha sıklıkta olmakla beraber dünya nüfusunun yüzde 18 kadarında görülen gıda alerjileri arasında anılmaktadır.

Alerjen olarak sütte söz edilirken, anne ve inek sütü alerjenlerinin ayrı incelenmesi gereklidir. Anne sütünde alerjen etmenleri, anne sütü ile geçen yabancı proteinler ve ilaçlar olarak sayılabilir. Yapılan çalışmalarda, alerjik reaksiyondan sorumlu

tutulabilecek anne sütü vakalarının önemsenmeyecek kadar az olduğu saptanmıştır. İnek sütü alerjenlerinin araştırıldığı çalışmalarda ise, immünolojik ve kimyasal olarak birbirinden farklı bileşenlerin örneğin kazein, laktalbumin, laktoglobulin (süt proteinleri) ve laktozun (süt şekeri) etkili olduğu belirlenmiştir. Süt alerjisindeki en sık rastlanan genellikle reaksiyonlar deri bağlantılıdır. Ürtiker, anjiyoödem, ekzama ve bireye göre değişen cilt sorunlarıdır. Kusma, diyare, kanlı gayta, reflü gibi gastrointestinal sorunlar yanında az rastlanmakla beraber burun akıntısına da rastlanabilmektedir. Süt alerjileri, genel olarak laktoz ve protein duyarlılığı olarak iki ana başlıkta incelenebilir.

Süt şekeri olarak tanımlanan laktoz, sütün tek karbonhidratı olup, anne sütündeki oranı yüzde 7 ve inek sütündeki oranı ise yüzde 4.8 kadardır. Laktoz diğer şekerlerden farklı değerlendirilmekte ve ocuk beslenmesindeki önemi tartışılmaz kabul edilmektedir.

Süt ve ürünleri ile alınan laktoz, organizmada glikoz ve galaktoza yıkılır. Ancak, bazı kişilerin metabolizmaları bu görevi yerine getiremez. Laktaz ( $\beta$ -Galaktozidaz) eksikliği sonucunda oluşan duyarlılık, laktozun bağırsak bakterileri tarafından fermente edilememesi ve ince bağırsak mukozasındaki laktaz enzimi aktivitesinin azalması veya tamamen ortadan kalkması ile kramp ve diyarenin ortaya çıkması şeklinde tanımlanmaktadır.

Hidrolize olmayan laktozun konsantrasyonu artmakta ve sonuçta bağırsakta yüksek osmatik basınc oluşmaktadır. Bu basınc, bağırsak boşluklarına su akımına yol açmakta; kişide şişkinlik, bağırsakta gaz toplanması, kramp ve diyare görülmektedir. Yetersiz görülen laktaz aktivitesinin doğuştan, enfeksiyon ve beslenme bozukluğuna bağlı olarak sonradan oluşabileceği ifade edilmektedir. Doğuştan yetersiz laktaz aktivitesi kalıtsal olup, rastlanma sıklığı çok düşüktür. İkinici tip ise laktoz aktivitesinin doğuştan normal olduğu, ancak nedeni belirlemeyen şekilde sonradan azaldığı durumlar söz konusudur. Ayrıca bağırsak mukozasının zedelenererek (mide-bağırsak ameliyatları, kolera yaşanması gibi) emilimin güçleştiği sorunlar da laktoz intleranslığına neden olabilir.

İnek sütünde alerjik etmenlerden bir diğeri de süt bileşiminde bulunan proteinlerdir. Süt proteinlerinden olan kazein ve laktoglobulin, bazı insanlarda olumsuz etkilere neden olabilmektedir. İnek sütü proteinlerine duyarlı bireylerin, koyun ve keçi sütüne de duyarlı oldukları saptanmıştır. Bazı bireylerin ise inek sütü tüketime alışkanlıklarına

bağlı olarak diğer sütlere duyarlılık gösterebilecekleri de kaydedilmektedir.

10 000-20 000 bebekten birinde rastlanabilen süt proteini alerjisi, sütteki temel amino asitlerden biri olan fenilalanin'in normal parçalanmasını katalizleyen enzimin yokluğu ile kendini gösterir. Fenilalanin yıkılmayınca, bu amino asidin kandaki miktarı yükselir, sonuç olarak idrar ve ter kötü kokar. Ayrıca, bu olayın merkezi sinir sisteminde serotonin oluşumunu azalttığı ve buna bağlı olarak mental yetersizliğin gözlenebildiğini, spazm, titreme ve saçta pigment azalması gibi bulgulara rastlanabildiği ifade edilmektedir. Bu tip bir alerji görülen bebeklerde süt gibi değerli bir gıdayı beslenmeden tamamen çıkarmak yerine, tam olmasa bile başka seçeneklerin dahil edilmesi yoluna gidilmelidir. Bu amaçla, alerjik özelliği kontrol edildikten sonra soya proteini katkılı mamalar diyetle alınabilir.

Süt alerjileri, laktoz ve süt proteinlerine bağlı olarak ayrı incelenirse bile, süt içen ve istenilmeyen etkilerle karşılaşan bireyler için sütün diyetlerden çıkarılması gibi bir sonuç ortaya çıkarılmamalıdır.

Laktoz duyarlılığında süt az miktarda, sulandırılarak tüketilmeli ve düzenli olarak içilen miktar artırılarak duyarlılık azaltılmalıdır. Süt yerine peynir ve yoğurt beslenmeye dahil edilmeli veya laktozu indirgenmiş sütler tüketilmelidir [32].

Laktoz intoleransı, sütün baskın şekeri laktozun yeterli sindirilememesinden kaynaklanır. Laktoz intoleransı olan kişilerde ince bağırsak duvarından çok az miktarda laktoz molekülü hücre içerisine ve geride kalan büyük miktardaki laktoz vücut tarafından kullanılamaz. Sindirilemeyen laktoz ince bağırsaklardan kalın bağırsağa hareket eder. Burada iki olay meydana gelmektedir; bunlardan birincisi fiziksel diğeri ise biyokimyasal bir işlemdir. Fiziksel işlemden, ince bağırsak sıvısındaki laktoz moleküllerinin tanecik sayısının artması sonucunda oluşan osmotik etki ile dokulardaki sıvı ince bağırsağa çekilir. Biyokimyasal işlemden ise; laktoz, kolondaki bakteriler tarafından fermente edilerek organik asitler ve CO<sub>2</sub> 'ye dönüştürülür. Bu maddeler şişlik hissi, mide bulantısı, karın bölgesinde kramplar, gaz ve bir çok ishal semptomlarına yol açmaktadır [34], [37]. Bu semptomlar laktoz alındıktan yarım saat ile iki saat arasında bir süre sonra başlar. Semptomların şiddeti kişinin laktozu tolere edebilmesine göre değişir. Daha seyrek olarak çocuklarda laktaz üretimi doğuştan düşük olabilir. Birçok insan için ise laktaz eksikliği doğal olarak zamanla gelişen bir

durumdur. Yaklaşık 2 yaşından sonra, vücut laktazı daha az üretmeye başlar. Bununla birlikte birçok insan yaşlanmadan önce semptomlarla karşılaşmayabilir.  $\beta$ -galaktozidaz'ın insan bağırsağında bulunmasına rağmen bazı kişilerde yaşam boyunca hiç aktivite göstermediği veya aktivitesinin zamanla kaybedebildiği rapor edilmektedir [34], [35].

### 2.8.6 $\beta$ -Galaktozidazın Biyoteknolojik Uygulamaları

Günümüzde  $\beta$ -galaktozidaz süt endüstrisinde birçok değişik amaç için artan oranlarda kullanılmaktadır. Laktozu hidrolizlenmiş süt ve süt ürünlerinin avantajı laktozun hidrolizini teşvik etmektedir. Glikoz ve galaktoz kolay çözünebilen, kristallenmeye yatkınlığı az olan ve tatlandırıcı olarak kullanılabilen şekerlerdir. Laktoza göre daha kolay absorbe ve metabolize edilmektedir. Hidroliz ürünleri glikoz ve galaktozun tatlılığının laktoza göre daha yüksek olması, laktozun hidrolizlenmesinin kazandırdığı önemli bir ekonomik avantajdır.

Çizelge 2.4 Şekerlerin tatlılık oranları

Şekerin Adı	Tatlılık Oranı
Sakkaroz	100
Laktoz	40
Glikoz	75
Galaktoz	70

Laktoz intoleransı rastlanan kişilerin tüketimine sunulacak olan sütteki laktozun hidrolizi, laktozun kolay kristalize olabilmesi nedeniyle dondurma gibi donmuş yiyeceklerin kristallenmesini önlemek ve şekerleme üretiminde tatlılık oranını arttırmak için  $\beta$ -galaktozidaz kullanılmaktadır. Ayrıca fermente ve alkolsüz içkilerin üretiminde ve fırıncılıkta mayanın gelişmesi için  $\beta$ -galaktozidazdan faydalanılmaktadır [7].

$\beta$ -Galaktozidaz kullanılarak geliştirilmiş bazı süt ürünlerini şu şekilde sıralayabiliriz:

- Düşük laktozlu süt,
- Laktozu hidrolizlenmiş süttten yoğurt üretimi,

- Laktozu hidrolizlenmiş sütte peynir üretimi,
- Düşük laktozlu konsantre dondurma,
- Peynir altı suyu laktozundan tatlı şurup üretimi,

Laktozu hidrolizlenen sütte üretilen peynir, normal sütte yapılandan daha hızlı bir şekilde olgunlaşmaktadır. Laktozu hidrolizlenmiş sütte yapılan yoğurt sadece tatlılık oranının artmasından dolayı geleneksel yoğurda tercih edilmekle kalmaz aynı zamanda yoğurt yapımında bu sütün kullanılması yoğurt oluşum pH'ına ulaşılması için gereken süreyi kısaltmaktadır. Laktozun enzimatik hidrolizi, peynir endüstrisinde bir yan ürün olan ve birikimi önemli bir çevre problemine neden olan peynir altı suyunun şeker içeriğinden yararlanmayı geliştiren birçok biyoteknolojik işlemin temelini teşkil etmektedir. Peynir endüstrisi büyük miktarda peynir altı suyu üretmektedir (kullanılan toplam suyun hacimce yaklaşık % 83'ü). Bu ürün orijinal sütün toplam besin unsurlarının yaklaşık %50'sini içermektedir.  $\beta$ -Galaktozidaz sütün endüstrisinde atık madde olan peynir altı suyunun birçok değerlendirilebilir materyale dönüşmesinde kullanılmaktadır. Laktazın peynir altı suyu ve ürünlerine uygulanması ile daha yoğun şuruplar, alkollü içecekler, hayvan yemi ve tatlı yapımında yararlı sonuçlar elde edilmektedir. Peynir altı suyunda yüksek oranda bulunan laktozun geri kazanılmasıyla bisküvi, çikolata, dondurma, hazır çorba ve şarküteri ürünlerinin imalatında belirli oranlarda kullanıldığında sütün yerine kullanılabilen bir ürün elde edilmekte ve aynı zamanda ekonomiye katkı sağlanmaktadır.

$\beta$ -Galaktozidaz sentezi için genel olarak peynir altı suyu ve şeker kamışı küspesinden yararlanılmaktadır. Peynir altı suyundaki yüksek sütün şekeri içeriği dolayısıyla bazı tesisler bu şekerin bir kısmını kristalize laktoz olarak elde ederler. Daha sonra temizlenerek ilaç ve şekerleme endüstrisinde kullanılmaktadır [7], [34].

## 2.9 Laktoz

Laktoz (1,4-o- $\beta$ -D-galaktopiranozil-D-glukoz), doğada yalnızca sütte bulunan, 6 karbonlu monosakkaritler glukoz ve galaktozun  $\beta$ -1,4 glikozidik bağı ile bağlanması sonucu oluşmuş 12 karbonlu bir disakkarittir. Ticari ismi sütün şekeri ve yalnızca memeli canlılar tarafından sentezlenmektedir.

### 2.9.1 Laktoz Hidrolizi

Karbon kaynağı olarak laktozu direkt kullanabilen çok az sayıdaki mikroorganizmaya kıyasla galaktoz ve glukozu metabolize eden mikroorganizmaların ticari önemi daha fazladır. Bu sebeple, disakkaritlerin monosakkaritelere öncelikli hidrolizi, içeriğinde laktoz bulunduran peyniraltı suyundan elde edilen biyoürünlerin sayısını önemli oranda arttırmaktadır. Hidroliz işleminden sonra, laktozun tatlılığı ve çözünürlüğünün artması, peyniraltı suyunun kullanımını desteklemektedir.

Laktoz hidrolizi için iki metot bulunmaktadır:

1. Asidik (Katalitik) hidroliz

2. Enzimatik hidroliz

İlk metot, ılıman olmayan pH (1-2) ve sıcaklık (100-150°C) değerlerinde karakterize edilmekteyken, ikinci metot kullanılan enzimin özelliklerine bağlı olarak daha ılıman koşullarda gerçekleştirilmektedir.

Asidik hidroliz; asidin çözelti içinde serbest olduğu homojen reaksiyonla ya da katyon değiştirici reçine içinde bulunan asitteki hidrojen iyonları tarafından katalizlenen heterojen reaksiyonla gerçekleştirilmektedir. Daha önce bahsedilmiş olan ılıman olmayan pH ve sıcaklık koşullarında, kısa periyotlu reaksiyon süresinde, yüksek dereceli hidroliz elde edilmiştir. Tipik bir örnek olarak üç dakikalık reaksiyon sonucunda pH 1.2, 150°C sıcaklıkta %80 oranında gerçekleşen hidroliz verilebilir. Asidik hidrolizin uygulaması kolaydır ve pahalı enzimler kullanmayı gerektirmemektedir. Ancak bazı dezavantajları bulunmaktadır:

1. Yüksek sıcaklık ve düşük pH koşullarında proteinlerin denatüre olması sebebiyle, süt ve peyniraltı suyu gibi protein içerikli laktoz çözeltilerinde uygulanamaz.

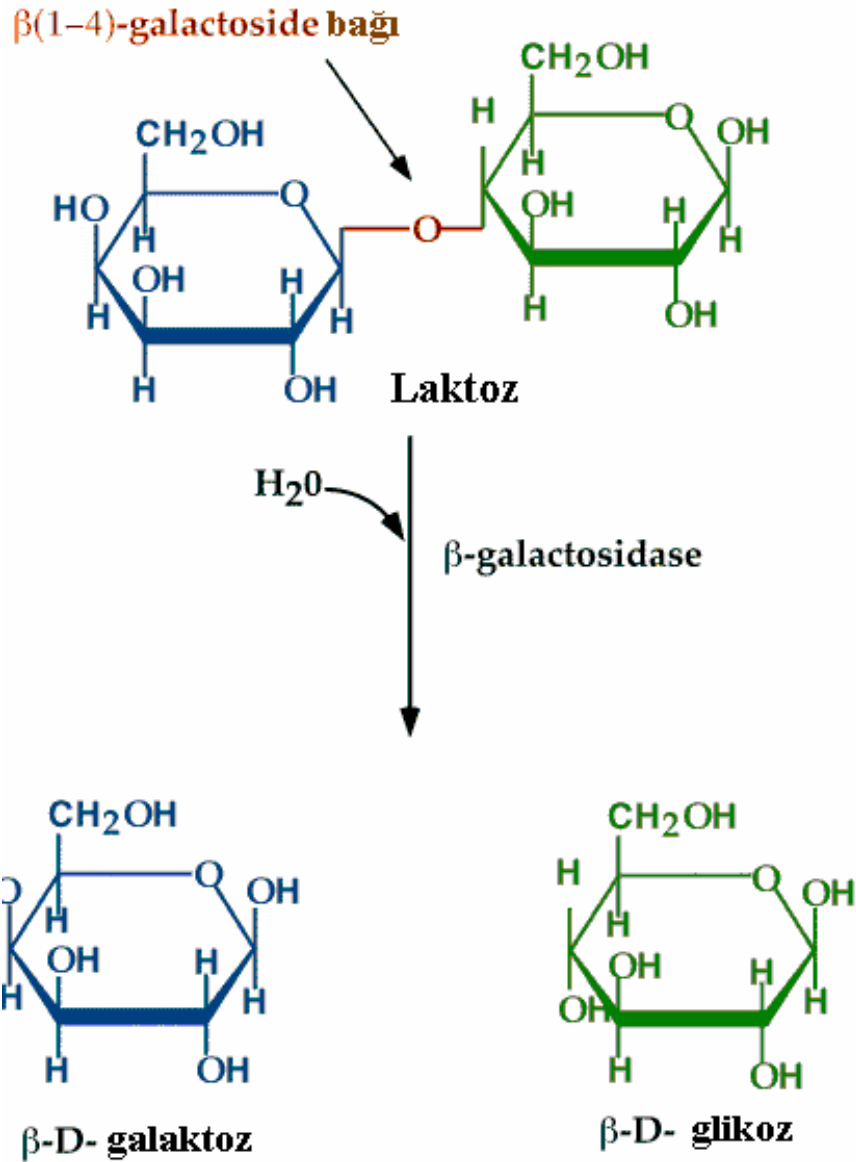
2. Peyniraltı suyunda bulunan tuz, asidin inhibe olmasına sebep olur.

3. Reaksiyon süresi içinde meydana gelen kahverengi renk oluşumu, genellikle karbonun aktive edilmesiyle gerçekleştirilen renksizleştirme basamağını zorunlu kılar.

4. Asitler, proteinler ve yağlar arasında istenmeyen ikincil reaksiyonlar meydana gelir.

Enzimatik hidroliz; hayvan, bitki, bakteri, maya ve mantarlarda bulunan  $\beta$ -galaktozidaz ile gerçekleştirilmektedir. Endüstride, sadece mikroorganizmalardan elde edilen

enzimler kullanılmaktadır. Herhangi bir ön işleme gerek duyulmaksızın elde edilen son ürünlerin bozulmadan kalması ve besin içeriğinde herhangi bir kayıp olmaması nedeni ile enzimatik hidroliz teknik açıdan daha uygundur [5], [33]. Laktozun enzimatik yolla hidrolizi şematik olarak Şekil 2.11’de gösterilmiştir.



Şekil 2.11 Laktozun enzimatik hidrolizi [33]

## 2.10 $\beta$ -Galaktozidaz ile İlgili Önceki Çalışmalar

Yapılan literatür çalışmasında,  $\beta$ -galaktozidaz ile ilgili bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiş halde verilmiştir.

(Ansari ve Husain' in 2010) yılında yaptıkları çalışmada; *Aspergillus* kaynaklı  $\beta$ -

galaktozidaz immobilize edilmiştir. Çözünür ve immobilize enzim aynı optimum pH' ı göstermiştir (pH 4.6). Doğal enzimin bir aylık saklama koşulu sonrasında aktivitesinin %63' ü kalırken, immobilize edilmiş enzim aynı şartlar altında aktivitesinin %93' ünü korumuştur. Immobilize edilmiş enzim 60°C 'de kesikli proseste laktoz hidrolizi için 50°C' ye kıyasla daha yüksek verim göstermiştir [33], [38].

**(Ansari ve Husain' in 2009)** yılında yaptıkları çalışmada; *Aspergillus oryzae* kaynaklı  $\beta$ -galaktozidaz enzimi özellikle kazandırılmış kalsiyum aljinat yüzeyinde immobilize edilmiştir. Immobilize edilmiş  $\beta$ -galaktozidaz' ın maksimum aktivitesi 60°C' de görülmüş olup yaklaşık olarak serbest enzimden 10°C daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Immobilize edilmiş  $\beta$ -galaktozidaz ısı, üre, MgCl<sub>2</sub> ve CaCl<sub>2</sub>'e karşı normal enzime göre daha yüksek kararlılık göstermiştir. Serbest enzimde MgCl<sub>2</sub>' ün %3' ün üzerinde olduğunda enzim aktivitesinde düşüş gözlenirken, immobilize edilmiş enzim aktivitesinde MgCl<sub>2</sub>' ün %5' e arttırılmasıyla artış gözlenmiştir. 37°C 'deki bir saatlik inkübasyon sonucunda, %5' lik CaCl<sub>2</sub>, %5 galaktoz ve 4 M üre varlığında immobilize edilmiş  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi sırasıyla %61, %50, %43 olarak kalmıştır. Immobilize edilmiş  $\beta$ -galaktozidaz normal enzime göre süttten veya peynir altı suyundan kesikli proseste laktozun hidrolizlenmesinde daha çok üstünlük göstermiştir; immobilize enzim peynir altı suyunda laktozu 3 saatte %89 hidrolizlemiş, sütte ise 4 saatte %79 hidrolizlemiştir. 4°C' lik saklama koşulu altında 2 ay sonunda enzimin %61' i orijinal aktivitesinde kalmış, çözünebilir enzim ise aynı şartlar altında sadece %37'sini başlangıç aktivitesinde göstermiştir [28], [39].

**(Ansari ve Husain' in 2009)** yılında yaptıkları çalışmada; kalsiyum aljinat ile tutuklanmış  $\beta$ -galaktozidaz preparatı, süt ve peynir altı suyundan laktozun hidrolizi için kesikli proseste ve dolgulu yatak kolonda kullanılmıştır. 32°C' lik sıcaklık ve değişik akış oranları altında yapılan incelemelerde kalsiyum aljinat ile tutuklanmış  $\beta$ -galaktozidaz enzimi serbest  $\beta$ -galaktozidaz enzimi ile kıyaslandığında kesikli proseste laktoz hidrolizinin daha verimli olduğu görülmüştür; sütte %77, peynir altı suyunda %86 [28], [40].

**(Demirhan' in 2007)** yılında yaptığı çalışmada; alternatif bir metot olarak ultrasonikasyonun sütteki laktozun hidroliz kinetiğine etkisi incelenmiştir. Sonikatörün frekans aralığı ve akustik gücü ile enzim stabilitesine etkisi çalışılmıştır. Hidroliz

reaksiyonları *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı ticari  $\beta$ -galaktozidaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimum çalışma şartları olan, 20 W akustik güç, %10 frekans aralığı ve 1 ml/L enzim konsantrasyonunda, ultrasonik uygulama %90 hidroliz derecesi ile sonuçlanmıştır. Enzim ise %25 oranında aktivite kaybetmiştir. Bu sonuçlar, sonikasyon uygulamasının sütteki laktozun hidrolizi için yararlı olduğunu göstermektedir. Kalan laktoz konsantrasyonu ve kalan enzim aktivitesi değerleri proses değişkenlerine bağlı olarak modellenmiştir. Uygulanan modellerin deneysel sonuçlar ile uyum içinde olduğu görülmüştür [33].

**(Kim vd. , 2004)** yılında yapılan çalışmada; *Kluyveromyces lactis* kaynaklı  $\beta$ -galaktozidaz enzimi kullanılarak yapılan laktoz hidrolizinin, Michaelis-Menten kinetiğine uymadığı görülmüştür. Yeni bir kinetik modeli oluşturmak amacıyla, galaktoz ve glikozun  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Düşük galaktoz ve laktoz konsantrasyonlarında galaktoz, inhibitor etkisi göstermiştir. Buna karşılık, galaktozun (50 mM'den yüksek) ve laktozun (100 mM'den yüksek) yüksek konsantrasyonlarında, galaktoz  $\beta$ -galaktozidaz'ın aktivitesini inhibe etmiştir. 50 mM'dan düşük glikoz konsantrasyonlarında reaksiyon hızının artışı gözlenmiştir ve optimum hidroliz değeri yaklaşık %87 olarak belirlenmiştir. Hidroliz reaksiyonlarında *Kluyveromyces lactis* kaynaklı  $\beta$ -galaktozidaz enzimi için glikoz ve laktozun konsantrasyonuna bağlı bir model oluşturulmuştur. *Kluyveromyces lactis* kaynaklı  $\beta$ -galaktozidaz enzimi kullanılarak yapılan hidroliz işleminde zamana bağlı reaksiyonlardan elde edilen laktoz konsantrasyon değerlerinin, oluşturulan yeni bir modelle açıklanabildiği ileri sürülmüştür [33], [41].

**(Numanoğlu ve Sungur' un 2004)** yılında yaptığı çalışmada; hücre dışı enzim üreten hücrelerin direkt olarak immobilize edilebildiği, fakat hücre içi enzim üreten hücrelerin öncelikle hücre geçirgenliklerinin artırılması gerektiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, *Kluyveromyces lactis* (ATTC 8583) kaynaklı  $\beta$ -galaktozidaz enzimi kullanılmıştır.  $\beta$ -Galaktozidaz enzimi hücre içi bir enzim olduğundan; geçirgen hale getirilmiş ölü hücreler, gluteraldehit kullanılarak jelatin içerisinde immobilize edilmiştir. İki kimyasal, bir fiziksel proses ile test edilmiştir. Kimyasal metotlarda toksitlenme oranları daha yüksek olduğundan, fiziksel metodun daha uygun olduğuna karar verilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, serbest hücrelere oranla immobilize hücrelerin aktivitesinin

%30 oranında daha fazla olduğu gözlenmiştir [33], [42].

**(Vasiljevic ve Jelen' in 2002)** yılında yaptığı çalışmada;  $\beta$ -galaktozidaz kaynağı olarak kullanılan *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842'nin üreme ortamında pH'ı ayarlamak için NaOH, KOH ve NH<sub>4</sub>OH gibi üç farklı nötralleştirici kullanılmıştır. Süt için laktoz hidroliz kinetikleri ile enzimin aktivite değerleri incelenmiştir. NH<sub>4</sub>OH kullanımının NaOH, KOH kullanımına kıyasla enzim aktivitesini oldukça arttırdığı tespit edilmiştir. Sütteki laktoz hidrolizi için Michaelis-Menten modeline ait K<sub>cat</sub> ve K<sub>m</sub> katsayıları %1 (hacim/hacim) enzim konsantrasyonu için hesaplanmıştır. Laktoz hidroliz hızının başlangıçtaki enzim aktivitesi ve sıcaklığa bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. En yüksek laktoz hidroliz hızı 65°C için elde edilmiş; ancak, 1-1.5 saat sonunda enzimin deaktive olduğu belirlenmiştir. HPLC peptit haritalama yöntemi kullanılarak tayin edilen aktivitenin 20-37°C arasındaki sıcaklıklar için daha yüksek olduğu gözlenmiştir [33], [43].

**(Zarate vd. , 2000)** yılında yapılan çalışmada; süt ürünlerinde bulunan *Propionibacteria*'da bulunan safranin büyüme, hücre membran geçirgenliği ve  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Oksijal içeren ortamda farklı davranış gösteren, safra tolereli ve safra toleresiz olarak adlandırılan iki grup kültür gözlenmiştir. Safra tolereli kültürlerde %0.15 ve %0.30 oksijal içeren büyüme ortamında,  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Oksijal içeren fosfat tamponunda inkübe edilen tüm kültürlerde  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. Bu kültürlerin membran geçirgenlikleri, daha fazla substratın hücre içine girerek,  $\beta$ -galaktozidaz tarafından hidrolizlenmelerine olanak sağlayan safra tarafınca arttırılmıştır. Safra varlığında artan enzim sentezi gösteren oksijalli ortam içindeki kültürlerden elde edilen, hücre içermeyen ekstraktlarda daha yüksek spesifik aktiviteye rastlanmıştır. Ayrıca enzim aktivitesi Na taurokolat ve NaCl ile arttırılmıştır. Tüm bu çalışmalar ışığında *Propionibacteria*'nın safra tolereli kültürlerinin, membran geçirgenliğini arttırarak yüksek enzim aktivitesi gösterdiği ve büyüme süresince enzim sentezini arttırdıkları gözlenmiş, safra toleresiz kültürlerin ise safra içeren ortamda büyüme göstermeyerek geçirgen olmadıkları sonucuna ulaşılmıştır. Safra toleresiz kültürler uzun süre safraya maruz kaldıklarında ise  $\beta$ -galaktozidazın inhibe olduğu tespit edilmiştir [5], [44].

**(Szczodrak'ın 2000)** yılında yaptığı çalışmada; *Kluyveromyces fragilis* kaynaklı, %90'dan yüksek aktivitede tutuklanmış ve hidrojen bağları modifiye edilmiş, doğal  $\beta$ -galaktozidaz enzimi gözenekli cam üzerinde immobilize edilmiştir. Yüksek katalitik aktivite, geniş pH aralığındaki stabilite ve serbest kalan enzimlerin aktivitesini koruduğu sıcaklık aralığı incelenmiştir. Aynı zamanda, sıvı fazdaki enzimlerin, optimum pH aralığındaki (pH=6-7) ve optimum sıcaklık aralığındaki (35-50°C) değişimleri gözlemlenmiştir. Hem kesikli proseste, hem de geri döngülü dolgulu yatak biyoreaktörde; peynir altı suyunun içindeki yüksek verimlilikteki laktozun hidrolizi gerçekleştirilmiştir [33], [45].

### ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Suda çözünen ve çözültide serbest hareket edebilen enzim moleküllerinin; suda çözünmeyen reaktif polimer taşıyıcıya bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorblanarak bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanarak ve polimer matrikste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketinin sınırlandırılmasına “immobilizasyon” denir. Enzim immobilizasyonunda amaç, yalnızca enzimi istenilen anda reaksiyon ortamından uzaklaştırmayı sağlamak değildir. Immobilizasyon sonucu enzimatik aktivitede çok önemli bir düşme de olmamalıdır. Bu nedenle immobilizasyon çok yumuşak koşullarda gerçekleştirilmeli ve işlem sırasında enzim aktif merkezleri rahatsız edilmemelidir. Bu durum özellikle enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent bağlanması ile söz konusu olur [1], [13].

#### 3.1 İmmobilizasyonun Tarihçesi

1916 yılında Nelsen ve Griffin, odun kömürü üzerine adsorbe edilmiş maya invertaz enziminin sukrozun hidrolizini katalizleyebildiğini gözlemlemişlerdir. Bu gelişmenin ardından fizyolojik olarak aktif proteinlerin kovalent bağlanma ile çeşitli taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu konusunda çok sayıda rapor yayınlanmıştır. Bütün bu çalışmalara rağmen 1953 yılında Grubhofer ve Schleith'in karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz gibi enzimleri kovalent bağlanma metoduyla diazolanmış poliaminostiren reçinesi üzerine immobilize etmelerine kadar immobilizasyon pratik olarak kullanılmamıştır. Daha sonra, 1956 yılında katalaz enziminin DEAE-selüloz üzerine iyonik bağlanmayla immobilizasyonu, 1963 yılında tripsin, papain, amilaz ve

ribonükleazın, tutuklama yöntemiyle poliakrilamit jel içerisine immobilizasyonu, 1964 yılında karbosipeptidaz A enziminin glutraldehitle çapraz bağlanması ve karbonik anhidraz enziminin mikrokapsüllenmesi, 1971 yılında ise amiloglukozidaz içeren lipozomların hazırlanması çalışmaları yapılmıştır.

1969 yılında fungal amino açilaz enzimini DEAE Sephadex üzerine iyonik bağlanma metodu ile immobilize eden Chibata ve arkadaşları, immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarında başarılı olan ilk kişilerdir. 1973 yılında da Chibata ve arkadaşları mikrobiyel hücrelerin immobilizasyonunun ilk endüstriyel uygulamalarını gerçekleştirmişlerdir. Yüksek aktiviteye sahip aspartaz içeren *Escherichia coli* hücrelerinin poliakrilamit jel içine tutuklanmasını sağlayarak, amonyum fumarattan L-aspartat üretmişlerdir [46], [47].

### **3.2 Immobilizasyonun Avantajları**

İmmobilizasyon işlemiyle bir katıya tutundurulmuş enzimin, çözelti içerisindeki bir enzime göre bir çok avantajı bulunmaktadır [16]:

1. Enzim bir çok kere kullanılabilir ve bu da maliyeti düşürmektedir.
2. Enzimin ortamdaki uzaklaştırılması sonucu reaksiyonun hızlı bir şekilde durdurulması sağlanabilmektedir.
3. Oluşan ürünlerde enzim kalıntıları bulunmamaktadır (Özellikle gıda ve ilaç sektörleri için enzimin kirletici içermemesi çok önemlidir).
4. Enzimin kararlılığı artmaktadır.
5. Enzimin ortamdaki ayrılması kolaylaşmaktadır.
6. Sürekli sistemde çalışabilmektedir.
7. Ürünün kolayca ayrılması sağlanmaktadır.
8. Atık sıvı miktarı azalmaktadır.
9. Bazı durumlarda enzimin aktivitesi artmaktadır.
10. Enzimin yarılanma ömrü uzamaktadır [48], [49].

Enzim immobilizasyonunun bütün avantajlarına rağmen endüstriyel uygulamaları aşağıdaki nedenlerden dolayı sınırlanmaktadır:

1. Çözülebilir enzimlerin maliyetinin daha düşük olması.
2. Geleneksel yöntemlerin değiştirilmek istenmemesi.
3. Kurulmuş prosesleri değiştirmek için yeni yatırımlara gerek duyulması.
4. İmmobilizasyon işleminde kullanılacak taşıyıcının maliyeti.
5. Sistemin performansı [49].

### **3.3 İmmobilizasyon Parametreleri**

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

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

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

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

Bazı durumlarda uygun bir miktarda boşluk yaratıcı ajan olarak bilinen kimyasalların kullanılması taşıyıcıyı immobilizasyona elverişli hale getirerek enzimi korur ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Enzime belli bir miktarda pasif ve ucuz bir proteinin adsorbe edilmesi enzim immobilizasyonundaki koruyucu ön aşamalardan biridir [13], [50].

### **3.4 İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılar ve İstenilen Özellikleri**

Enzim immobilizasyonun da doğal ve sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Bir taşıyıcıda hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli (poröz) yapı, mekanik stabilite ve uygun partikül formu, kimyasal ve termal stabilite, mikroorganizmalara karşı dirençlilik, ucuzluk, zehirsizlik, rejenere olabilme gibi özellikler aranır.

Enzim immobilizasyonun da kullanılan taşıyıcılar şunlardır:

#### **Anorganik Taşıyıcılar**

Kil, cam, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, titandioksit, zirkonyumdioksit, nikeloksit, pomza taşı, aktif karbon, metaller, metal oksitler.

#### **Doğal polimerler**

Selüloz, nişasta, dekstran, agar ve agaroz, karagenan, kollajen, kitin ve kitosan, jelatin, albümin ve ipek.

#### **Sentetik Polimerler**

Polistren türevleri, poliakrilamid, naylon, vinil ve alil polimerler, iyon değiştirici reçineler, maleik anhidrit polimerleri [51].

Canlı taşıyıcı olarak proteinler, biyokütle (bakteriler) gösterilebilir [13].

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan taşıyıcılarda aranan özellikler maddeler halinde gösterilebilir:

1. Proteinlere karşı yüksek ilgi,
2. Kimyasal modifikasyonlar ve enzimle direkt olarak reaksiyona girebilmesi için gerekli fonksiyonel grupların varlığı,
3. Hidrofiliklik ( suya karşı hidrofobik, proteine karşı hidrofilik olmak),

4. Yenilenebilirlik,
5. Mekanik kararlılık,
6. Seçilen biyotransformasyon için farklı geometrik şekillerde ve istenilen yüzey alanlarında hazırlanabilme kolaylığı,
7. Geniş yüzey alanı,
8. Kimyasal kararlılığının yüksek olması,
9. Uygun tanecik çapı / boyutu (0.2-1 mm / 30-60 nm),
10. İyon değiştirebilme kapasitesinin yüksek olması,
11. Şişme kabiliyetinin düşük olması
12. Mikrobiyel kararlılığının yüksek olması,
13. insan ve çevre sağlığına zarar vermemesi,
14. Elastikiyetinin yeterli olması,
15. Maliyetinin düşük olması,
16. Doğal ortamlara zarar vermeyecek maddelere indirgenebilmesidir [13], [50], [52].

#### **3.4.1 Bentonit**

Smektit gruptan bir kil mineralidir ve esas olarak montmorillonitten oluşmuştur. Smektit kil minerali suyu veya organik molekülleri emdiğinden Şişer ve aynı zamanda önemli bir iyon değiştiricidir. Bentonit 1000 ürünün üretiminde kullanılır, bağlayıcı olarak refrakter üretiminde kullanılmakta malzemenin mukavemetini, yoğrulma ve biçimlenme özelliğini arttırmaktadır [53].

Volkanik kül veya tuf gibi camsı volkanik malzemenin kimyasal ayrışması ve bozuşması ile ortaya çıkan yaklaşık 2 mikron boyutunda oldukça küçük kristaller halindeki kil minerallerinden (başlıca montmorillonit) oluşan ve büyük oranda koloidal silisten meydana gelen bentonit yumuşak, şekillenebilir, gözenekli ve açık renkli bir kildir.

Bentonitler, içerdikleri değişebilir nitelikteki sodyum ve kalsiyum iyonlarına göre; yüksek Şişme özelliğine sahip sodyum bentonit, karışık bentonit (sodyum ve

kalsiyumlu) ve düşük şişme kapasiteli kalsiyum bentonit olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır.

Sahip oldukları doğal özelliklerine bağlı olarak yukarıdaki gibi sınıflandırılan bentonitler niteliklerini artırmak için asit, soda, organik ve inorganik bileşikler gibi katkı maddeleri ile iyon değiştirme reaksiyonlarına sokularak “katkılı bentonit” veya “aktif bentonit” olarak adlandırılırlar. Kalsiyum bentoniti su ile temasta kendi hacminin 2–3 katı kadar şişer ancak bu oran sodyum bentonitinde 8–10 kata kadar ulaşmaktadır [51].

### 3.4.1.1 Bentonitin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Spesifik özgül ağırlığı kuru bazda 1.7-2.8 g/cm<sup>3</sup> arasında değişen bentonitlerin öğütülmüş sıkıştırılmış yığın yoğunlukları 0.8-1.1 g/cm<sup>3</sup>'e kadar inmektedir. Bentonitin su içerisine konduğunda şişmesi ve jelleşme göstermesi suyu absorbe etmesinden kaynaklanmakta olup, bentonitler şişen bentonit (Na-bentonit), şişmeyen bentonit (Ca-bentonit), karışık bentonit olarak üçe ayrılmaktadır.

Kullanım alanları ise başlıca;

Döküm kumu ve paketleme, sondajlarda, gıda sanayisinde;

- Berraklaştırma (bira, şarap, meyve suları)
- Ağartma işlemlerinde (yağ sektöründe)

kağıt, lastik, gübre sanayisinde, yangın söndürücülerde, boya, ilaç ve seramik sanayisinde ve katalizör olarak kullanılır.

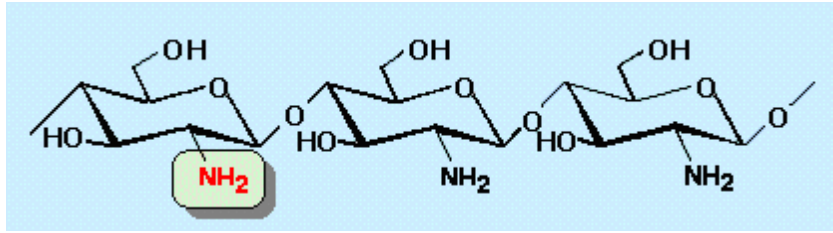
Kil minerallerinin bir çeşidi olan bentonitin genel kimyasal formülü; (Na,Ca)(Al,Mg)<sub>6</sub>(Si<sub>4</sub>O)<sub>3</sub>(OH)<sub>6</sub>.H<sub>2</sub>O 'dur.

Birim kristal yapıda meydana gelen bazı yer almalar nedeni ile montmorillonit içerisindeki farklı değerli atomlar yer değiştirmektedir. Tetrahedral katmandaki silisyum alüminyum tarafından yer değiştirebilir. Yer değiştirme artı yük eksikliğine neden olur ki bu eksiklik birimler arasına girmiş değişebilir iyonlarla giderilmektedir (genellikle Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup>). Birim tabakalar arasındaki bağların zayıf olması nedeniyle tabaka aralarına değişik iyonlar, organik moleküller ve su girerek bentonitlere adsorpsiyon özelliği kazandırır [51].

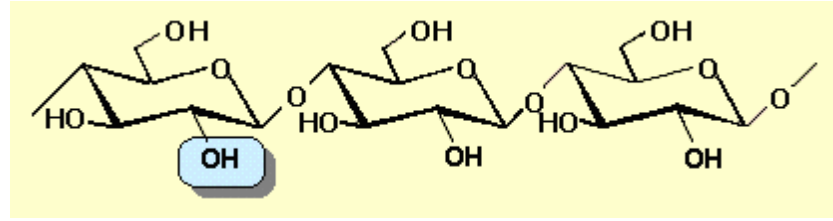
### 3.4.2 Kitosan (Çitosan)

Kitosan, kitinden türetilen modifiye bir polisakkarittir, kitinin deasetilasyonu ile üretilmektedir. Kitosan  $\alpha$ -(1-4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz ve  $\alpha$ -(1-4)-2-asetamino-2-deoksi-D-glukopiranoz birimlerinden oluşan ikili lineer bir heteropolisakkarittir. Kitosan yapı olarak selüloza çok benzemektedir; selülozun ikinci karbonundaki hidroksil grubunun amin grubuyla yer değiştirmiş şeklidir, yani kitosan kitinde olduğu gibi çift bağlı karbon atomlarına sahip değildir.

Aşağıdaki şekillerde selüloz ve kitosaanın kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 3.1 Kitosaanın kimyasal yapısı [16]

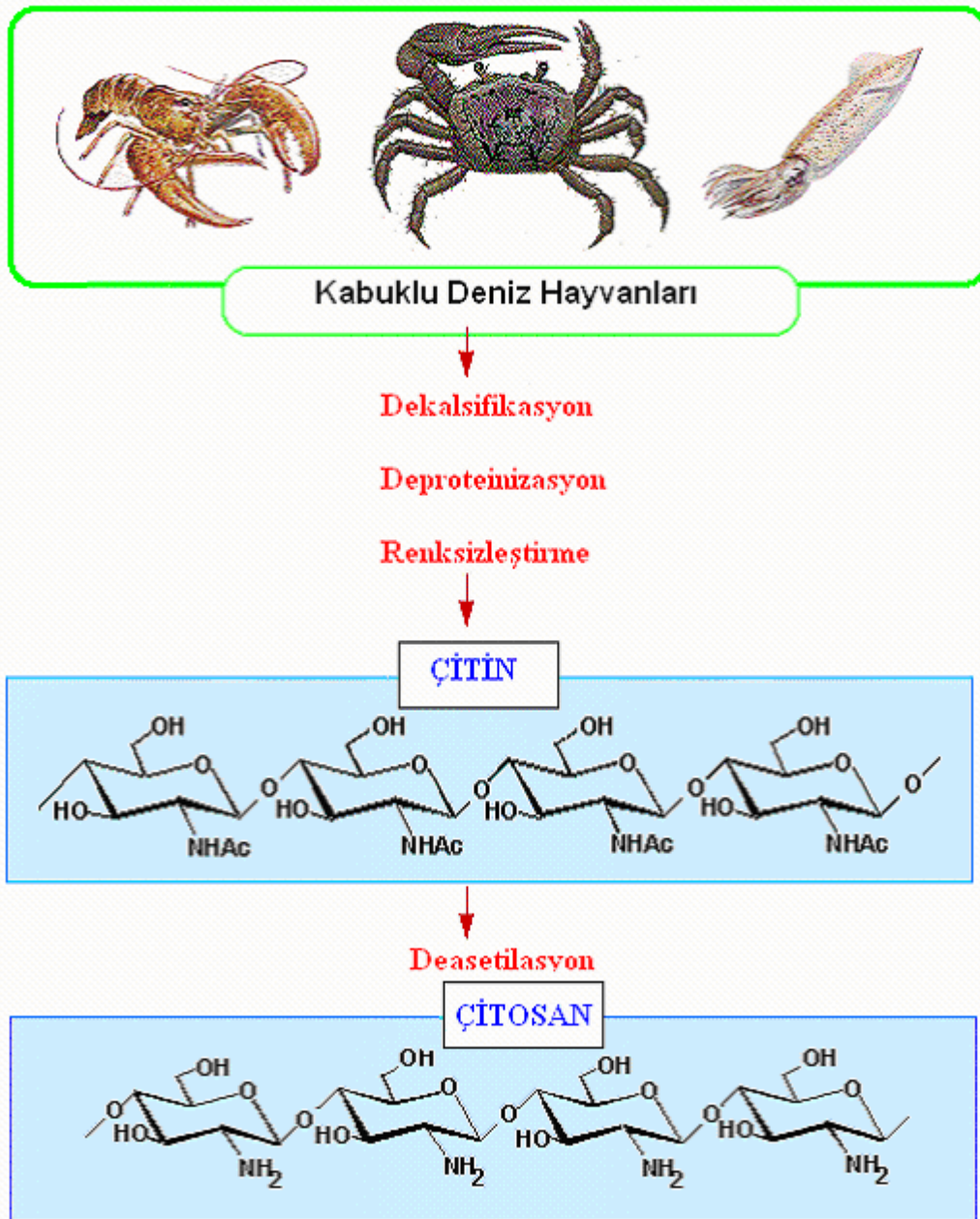


Şekil 3.2 Selülozun kimyasal yapısı [16]

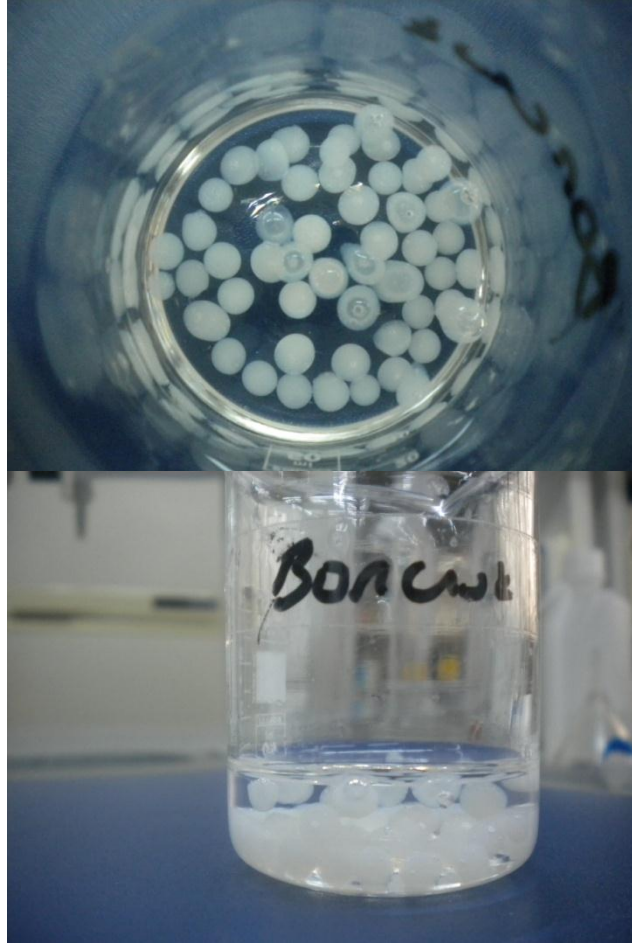
Kitosan, biyoteknolojide enzim immobilizasyonunun yanında, hücre immobilizasyonunda, protein ayırmada, hücre geri kazanımında ve kromatografik uygulamalarda da kullanılmaktadır. Ayrıca, gıda sanayinde boya maddelerinin ayrılmasında, renk stabilizasyonunda ve hayvan yemi katkısı olarak kullanılmaktadır. Atık su arıtmada metal iyonlarının ayrılmasını sağlamakta, tarımda gübrelemede kullanılmaktadır. Medikal uygulamalarda bandajlarda, kontak lenslerde, cilt yanıklarında, kanda kolesterol düzeyinin belirlenmesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ek olarak, kozmetik sektöründe, nemlendiricilerde, el, yüz, vücut krem ve losyonlarında kitosandan yararlanılmaktadır [16], [54].

Kabuklu deniz hayvanlarının atıklarından çitosan üretmek için öncelikle seyreltik sulu HCl çözeltisi kullanılarak dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Ardından

seyreltik NaOH çözeltisiyle deproteinizasyon yapılarak çitin (kitin) elde edilmektedir, ancak elde edilen çitin renginin giderilebilmesi için % 0.5'lik  $KMnO_4$  sulu çözeltisi ve oksalik asit sulu çözeltisi ya da güneş ışığı kullanılarak renksizleştirme işlemi yapılmaktadır. Böylece çitin üretimi gerçekleştirilmektedir. Kitinin % 40-50' lik NaOH çözeltisi kullanılarak sıcak ortamda deasetilasyonu ile de kitosan üretilmektedir. Kabuklu deniz hayvanlarından çitin ve kitosan üretim prosesi aşağıdaki şekilde görülmektedir.



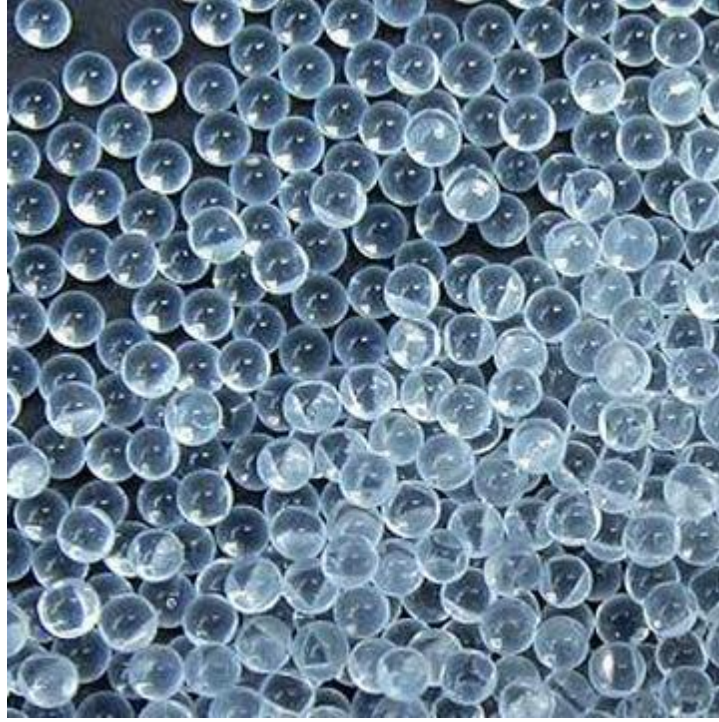
Şekil 3.3 Kabuklu deniz hayvanlarından kitin ve kitosan üretimi [16]



Şekil 3.4 Deneysel çalışmada oluşturulan kitosan boncuklar

### 3.4.3 Cam Boncuk

Gözenekleri kontrollü cam boncuklar (CPG) % 96 SiO<sub>2</sub>, % 3 B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> % 1 Na<sub>2</sub>O ve eser miktarda Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve diğer metal oksitlerini içermektedir. CPG mekanik etkilere ve yüksek basınca karşı çok dayanıklı, termal kararlılığı yüksek, organik çözücülere, asidik ve bazik koşullara karşı dayanıklı, farklı gözenek büyüklüklerinde bulunabilen inorganik bir destek materyalidir [3]. Şekil 3.5' de cam boncukların mikroskop görüntüleri görülmektedir.

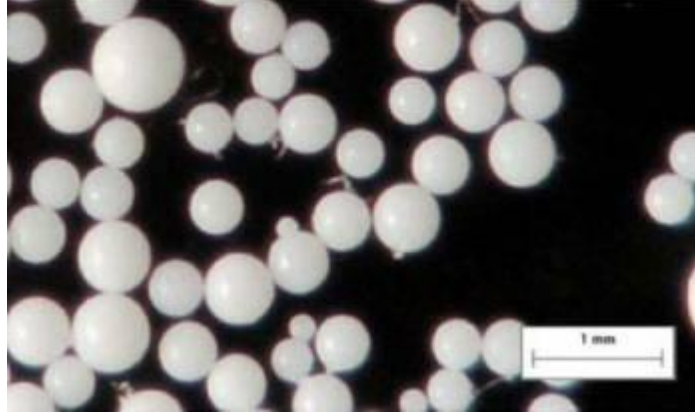


Şekil 3.5 Cam boncuk mikroskop görüntüsü [56]

#### **3.4.4 Amberlit**

Organik esaslı sentetik amberlit reçineleri elde edilişleri ve kullanılışları bakımından, iyon değiştirici ve adsorban olarak iki ana grupta toplanırlar. İyon değiştirici özelliğe sahip olanlar arasında amberlit C6-400, IRA-900, IRC-718 gibi reçineler sayılabilir. Adsorban özelliğe sahip reçineler arasında ise amberlit XAD-2,-4,-7,-8,-11,-16 ve XAD-1180 gibi polimerik reçineler sayılabilir [13], [57].

Şekil 3.6'da görüldüğü gibi, amberlit XAD reçineleri geniş yüzey alanlı, büyük ve homojen dağılımlı gözeneğe sahip, çapraz bağlı kopolimerlerdir. Organik çözücülere, asidik ve bazik ortamlara karşı kararlı olmaları nedeniyle adsorban olarak kullanılan silikajelle karşılaştırılabilir. Ayrıca eluent olarak, organik maddelerin yanı sıra asidik veya bazik çözeltilerin kullanılabilmesi gibi üstünlükleri vardır [13], [57].



Şekil 3.6 Amberlit-XAD reçinelerinin mikroskop görüntüsü [56]

### 3.4.5 Silika

Silisyum, yeryüzünde en çok bulunan elementlerden biridir. Doğada siliksat asidi ( $m\text{SiO}_2.n\text{H}_2\text{O}$ ) ve tuzları halinde bulunur. Silisyum dioksit ( $\text{SiO}_2$ ) ise doğada kum ve kuartz şeklinde bulunur. Silika 3 ana kristal formundadır. En çok mineral kuartz formunda bulunur. Fakat bu cevher aynı zamanda kristobolit ve tridimit halindedir. Bu cevherler sıcaklığa ve kimyasal etkilere karşı çok dayanıklıdır [58].

#### 3.4.5.1 Silika Jel

Silika jel geniş gözenek çapında, amorf yüksek kısmı basınç altında yüksek nem adsorbsiyon kapasitesine sahip silisyumdioksittir. Ağırlıkça % 35'inden ve % 42'sinden fazla nem tutma özelliğine sahiptir. Madde nemle beraber renk değiştirir.

Silika jelin kullanım alanları:

- Renk değiştiren ( indikatörlü ) silika jeller özellikle trafolarında, yağ tanklarında ve kimyasal tankların nefesliklerinde kullanılmaktadır.
- Endüstriyel hava kurutma sistemleri,
- İstenmeyen gazların uzaklaştırılmasında,
- Rutubet istenmeyen her tür ortamda,
- İlaçlarda,
- Gıda ürünlerinin korunmasında,
- Elektronik malzemelerin korunmasında,
- Hassas birçok malzemenin kuru ve güvenli saklanması,
- Tank depolama sahalarında,

- Laboratuvarlarda ( Desikatörler, U boruları, kurutma kolonları) [58].

### 3.4.6 Hidroksiapatit

Hidroksiapatit dişlerin mine ve dentin tabakasında, kemiklerde bulunan kimyasal formülü  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  olan kalsiyum tuzudur. Doğada elmastan sonra bilinen en sert moleküldür. Biyoaktif yapıda bir biyomateryaldir. Tatsız ve kokusuzdur. Organik çözücülerde çözünmez, asit çözücüler hariç inorganik çözücülerde de çözünmez [59].

Diş kemiğe sertliğini kazandıran maddedir. Hidroksiapatit moleküllerinin mikroskopik parçaları formlarına birlikte kristalize olabilirler [60].

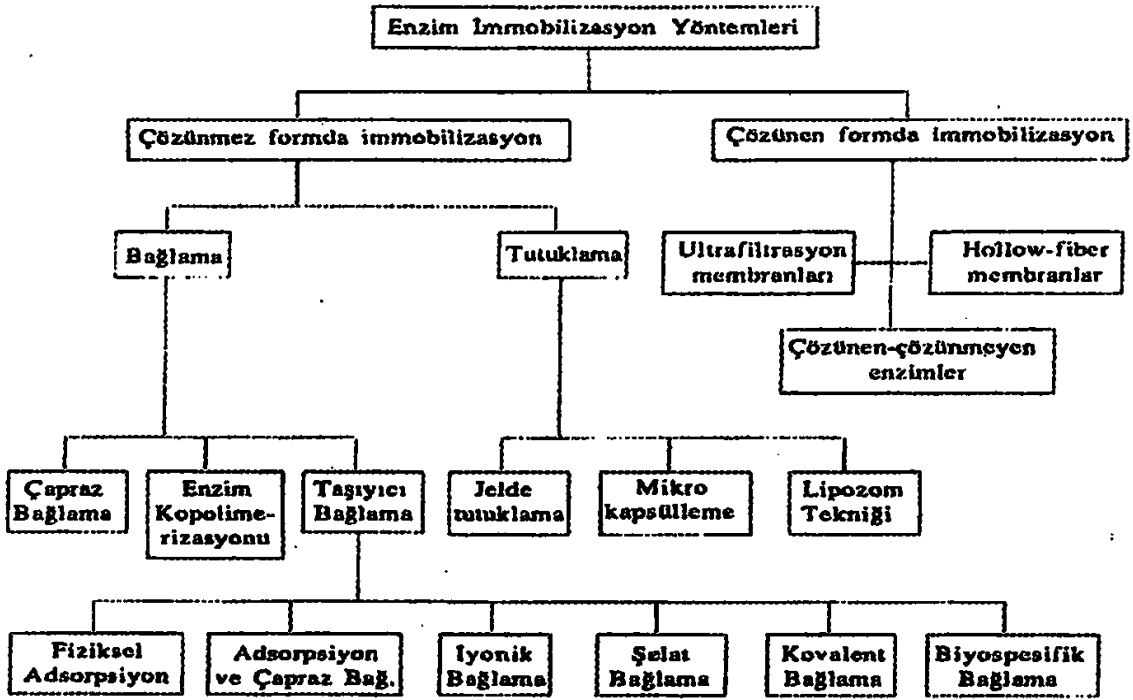
$Na_2HPO_4$  konsantrasyonu kullanılarak hidroksiapatit bileşiminin ve oluşumunun kinetikleri önemli ölçüde artar. Hidroksiapatitin su içinde ve  $Na_2HPO_4$  çözeltisi içindeki oluşum hızları incelendiğinde;  $Na_2HPO_4$  çözeltisi içindeki oluşum hızının daha yüksek verimle gerçekleştiği bilinmektedir [61].

### 3.5 İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında ve immobilizasyondan sonra enzimin aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise; ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Uygun immobilizasyon yönteminin seçiminde dört ana kriter göz önüne alınmalıdır:

- Güvenilirlik,
- Maliyet,
- Aktivitenin korunması
- Kararlılık.

Enzim immobilizasyonunda enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir [63]. Aşağıdaki tabloda immobilizasyon yöntemleri şematize edilmiştir ( Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Immobilizasyon yöntemleri [1]

### 1) Kimyasal yöntemler

a) Kovalent bağlama

b) Çapraz bağlama

### 2) Fiziksel yöntemler

a) Adsorpsiyon ile immobilizasyon

b) Hapsetme ile immobilizasyon

-Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi

-Kafes tipi hapsetme yöntemi

#### 3.5.1 Kimyasal Immobilizasyon Yöntemleri

Kimyasal bağlama yönteminde suda çözünmeyen fonksiyonlu polimer ile enzim molekülü arasında kovalent bağ oluşumuna dayanır. Bu yöntemler çoğunlukla tersinmezdir yani serbest enzimin yeniden geri kazanılması mümkün değildir.

Kimyasal yöntemle immobilize edilen enzimin, serbest haline göre farklı aktiviteye sahip olmasında, enzim ve destek maddesinden başka reaksiyon şartlarına da bağlıdır.

Elde edilen enzim destek sistemi, serbest enzime göre daha düşük katalitik etkinlik gösterebilir. Bu durumun büyük molekül ağırlıklı substratların ve makro moleküllerin sterik etkisinden ileri geldiği öne sürülmüştür.

### **3.5.1.1 Kovalent Bağlama**

Kovalent bağlama, genellikle enzim yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Enzim immobilizasyonunda, enzimin özellikleri, aktif ucunun yapısı, pH, sıcaklık ve organik çözücüler gibi faktörlerden dolayı sınırlı sayıda yöntem kullanılabilir.

Kovalent bağlama ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamak destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir. Destek maddesi; karboksil, hidroksil, amino gibi fonksiyonel gruplar taşımalıdır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak epiklor hidrin, karbodiimit, gibi çeşitli aktifleyici maddeler kullanılabilir [64].

Kovalent bağlama ile immobilizasyonun;

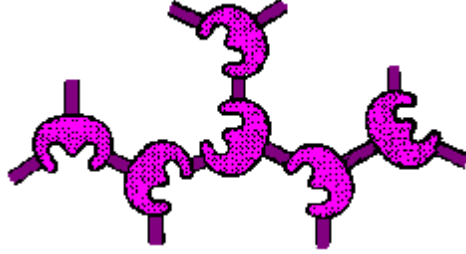
Avantajı: Enzim kaçısı yok, sürekli sistemlere uygulanabilir, optimizasyon var.

Dezavantajı: Rejenerasyon yok, enzim denatürasyonu olabilir, yanlış bağlanma olasılığı yüksektir [62].

### **3.5.1.2 Çapraz Bağlama**

Küçük moleküllü iki veya çok fonksiyonlu maddeler, enzim molekülleriyle aralarında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Molekül içi bağlanmalar yanında moleküller arası bağlanmalarda söz konusudur. Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve oluşturulması zordur. Enzim aktifliği; reaksiyon süresi, iyonik şiddet, pH, sıcaklık, çapraz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörler ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu yöntemin en önemli avantajı; tek bir işlemde enzimleri

immobilize etmek için çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Yöntemin dezavantajı ise moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki güçlüklerdir. Çapraz bağlanma reaksiyonu çok ılımlı şartlarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur [64].



Şekil 3.8 Çapraz bağlama [65]

Çapraz bağlamanın sağlanması için en çok kullanılan maddeler:

- glutaraldehit
- toluen
- diizosiyanat'tır.

Çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminin en büyük avantajı basit ve hızlı prosedürlerde immobilize enzimlerin sadece ajanın varlığında hazırlanabilmeleridir. Ayrıca bu yöntemin iki önemli dezavantajı da aşağıda belirtilmiştir.

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

2. Immobilizasyon için çapraz bağlama uygulanarak hazırlanan taşıyıcının jelatinimsi yapısı bir çok uygulamaya sınırlama getirmektedir.

Çapraz bağlama yöntemiyle iyi bir immobilizasyon gerçekleştirebilmek için gerekli optimum koşullar aşağıdaki özelliklere bağlıdır;

- Enzim konsantrasyonu ve yapısı,
- Çapraz bağlama için kullanılan ajanın konsantrasyonu ve yapısı,
- pH,
- İyonik kuvvet,

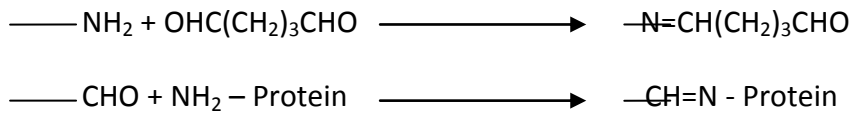
- Sıcaklık,
- Reaksiyon süresi'dir.

Proteinlerin kaçınılmaz olarak ana destek maddesi olarak davranmasından dolayı, enzimler kendi kendilerine çapraz bağlanabilirler, çapraz bağlanmış enzimler daha sonra çözünmeyen makro moleküller haline gelirler. Bu da verimin göreceli olarak düşmesine dolayısıyla maliyetin artmasına neden olur. Bu dezavantajından dolayı çapraz bağlamanın başka bir yöntemle beraber kullanılması en iyi seçimdir.

Taşıyıcıyı aktive etmekte en çok kullanılan yöntem amid ya da birincil amin içeren taşıyıcının glutaraldehit ile muamelesidir. Glutaraldehit direkt olarak taşıyıcıya ilave edilerek, aldehit son grubuyla reaksiyon elde edilir. Aldehit grubun birincil amin ile pH 3–10'da 4–12 saat ve 4–25 °C'de gerçekleşen bu reaksiyonu schiff bazı formasyonu ile devam eder. Schiff bazı formasyonu aşağıdaki gibidir;

- **Schiff Bazı Reaksiyonu**

Bu metot schiff bazı formasyonu yani aktive edilmiş taşıyıcının karbonil grubuyla enzimin serbest amino grubu arasında gerçekleşen aldimin bağla sağlanır (şekil 3.9). Birincil amino grubu içeren taşıyıcı glutaraldehit ile aktive edilir ve bu sayede aktif karbonil türevi elde edilir. Bunun ardından aldehit türevi proteinin serbest amino grubu ile reaksiyona girerek schiff bazı bağı meydana gelir. Bu metodun bir dezavantajı sulu ortamda geri dönüşümlü olmasıdır (özellikle düşük pH'larda). Bu ise imin bağlarının  $\text{NaBH}_4$  ile hidrojenasyonu sonucu stabil alkil amino grubu eldesiyle önlenir [13].



Şekil 3.9 Schiff bazı tepkimesi [3]

### 3.5.2 Fiziksel İmmobilizasyon Yöntemleri

Fiziksel yöntemler kovalent bağ oluşmasına dayanmayan, enzimin belirli bir yere tutturulmasını içerir. Enzim immobilizasyonu elektrostatik etkileşme, iyonik bağ oluşumu, enzimler arası etkileşme gibi belirli fiziksel kuvvetlere bağlı kalmaktadır.

İmmobilizasyon, enzimin destek maddesindeki mikro bölmeler içerisinde veya gözenekli membranlara tutturulmasıyla sağlanır. Bu yöntemin kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayrılan en önemli özelliği enzim molekülünün kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

### **3.5.2.1 Adsorbsiyon Yöntemiyle İmmobilizasyon**

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Adsorpsiyonun asıl amacı enzim immobilizasyonu olmayıp enzim saflaştırmaktır. Ancak son 20-25 yıldan beri suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonunda oldukça sık kullanıldığı görülmektedir.

Bu yöntem, suda çözünmeyen katı matriksin (adsorban) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkılarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyondan sorumlu kuvvetler; hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir. İyonik bağlanma ile immobilizasyon proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karşıt yükleri arasındaki çekim kuvvetlerine dayanır. Enzim ile adsorban (destek maddesi) arasındaki zayıf bağlardan dolayı adsorplanan enzimin kullanım esnasında taşıyıcıdan uzaklaşması bir dezavantajdır. Bu yöntemde enzim aktifliğini büyük ölçüde korur. Adsorpsiyon ile immobilizasyonun tersinir olması bu destek maddesinin ve enzimin başka amaçlar için tekrar kullanımını sağlar [64].

Yöntem yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkayarak uzaklaştırılması temeline dayanır. İşlemin basit olması, ılımlı koşullarda gerçekleşmesi, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi, bir yandan immobilizasyon gerçekleşirken diğer yandan enzim saflaştırmasına olanak vermesi açısından adsorbsiyon yöntemi oldukça avantajlı bir yöntemdir. Fakat optimal koşulların sağlanması güç olduğu ve desorbsiyon sonucu enzimin reaksiyon ortamına serbest hale geçerek ürünleri kirlettiği için sakıncalıdır [63]. Adsorbsiyon yöntemiyle immobilizasyon gösterimi şekil 3.10' da gösterilmiştir.



Şekil 3.10 Adsorbsiyon yöntemiyle immobilizasyon [65]

### 3.5.2.2 Hapsetme Yöntemiyle İmmobilizasyon

Bu metot polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesine dayanır. Polimerik matriks yapısının, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeterli derecede sıkı olması gerekir. Bu metot her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için çok genel kullanılabilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Hapsetme metodu mikrokapsül ve kafes tipi olmak üzere iki gruba ayrılır.

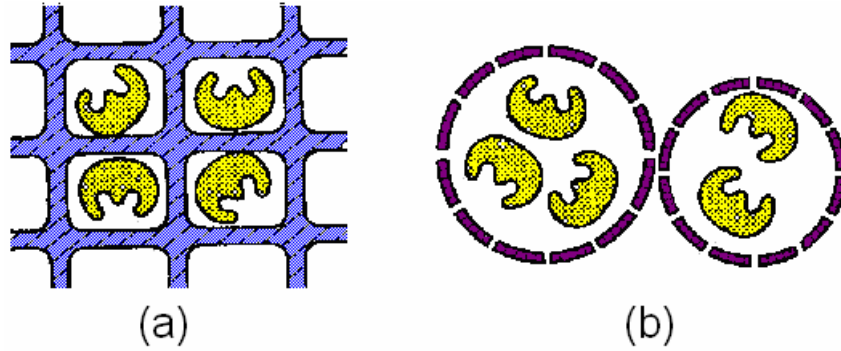
#### Mikrokapsül ile Hapsetme Metodu

Mikrokapsül ile hapsetme metodu, gözenekleri 10-1000 µm çaplı, yarı geçirgen membranlar içinde enzim moleküllerinin hapsedilmesine dayanır. Yarı geçirgen membran, büyük protein ve enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürünlerin serbestçe girip çıkmasına izin verir.

Yarı geçirgen mikrokapsüllerin hazırlanmasında iki genel metot uygulanmaktadır. Bunlardan birincisi koagülasyona dayalı olup kimyasal bir reaksiyon içermeyen basit bir yöntemdir. Faz ayrımı polimerizasyonu diye adlandırılır. Çözücü içinde enzim ve membran maddesi çözülür ve bu çözelti, mikro damlacıklar halinde çöktürücü maddeye ilave edilir. Tekniğin spesifik olmayışı ve basitliğinden dolayı bu yöntem bütün enzimlere uygulanabilmektedir.

Diğer mikrokapsülleme metodu, kimyasal özellik taşıyan ara yüzey polimerizasyon metodudur. Bu metot da çöktürücü madde içinde enzim çözeltisinin mikro damlacıkları hazırlanır. İki sıvının birleşme noktalarında polimerleşme görülür. Yarı geçirgen mikrokapsül membranı iyi bilinen poliamid sistemi ile yapılır ve çok çeşitli diaminlerle, diasit halojenürleri kullanılarak amid kopolimerleri elde edilir. Bu yarı geçirgen mikrokapsül membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır.

Mikrokapsülleme ile hapsetme yönteminde herhangi bir modifikasyon olmadığından enzim aktivitesi serbest enzim aktivitesine çok yakındır. Bu yöntemin dezavantajları; mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein konsantrasyonuna gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler için sınırlı olmasıdır [63].



Şekil 3.11 Kafes tipi (a) ve mikrokapsül ile hapsetme (b) [65]

### **Kafes Tipi Hapsetme Metodu**

Bu yöntem; yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağları arasında tutuklanmakta ve böylece çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir. Kafes tipi immobilizasyonda; çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanabilsin ama substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına engel olmasın. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substratın enzim aktif merkezlerine ulaşmasını engellemekle kalmayıp enzimin zincir yapısını da zorlayıp aktivite kaybına neden olabilir. Bu oran enzime ve taşıyıcıya bağlı olarak değişir. Bu yöntemle immobilize edilecek enzimin substratının küçük moleküllü olması gerekir.

Bu yöntemin avantajları:

- Çok kolay kullanılabiliyor olması,
- Gerçek bir fiziksel yöntem olması,
- Çok az miktar enzim ile gerçekleşmesi,
- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama ve UV ışınlarının enzim yapısını ve aktifliğini kimyasal proseslerden daha az etkilemesi,
- Ortamdaki çapraz bağlayıcı ve monomer derişimini değiştirmek suretiyle farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafes üretebilmesi,
- Polimerleşmenin genelde hem kolay hem de hızlı bir şekilde gerçekleşmesidir.

Yöntemin dezavantajları ise; immobilizasyon işleminde, jel oluşumu sırasında yürüyebilecek kimyasal olayların ve reaksiyon sıcaklığının enzimi inaktif hale getirmesi olasılığının bulunmasıdır. Ayrıca çapraz bağlı polimerin ağ örgüsünden enzimin sızma ihtimali de vardır [63], [64].

### **3.5.2.3 İyonik Bağlanma Yöntemiyle İmmobilizasyon**

Enzim immobilizasyonunda kullanılmakta olan bu yöntem enzimin suda çözünmeyen ve iyon değiştirici kalıntıları içeren bir taşıyıcıya iyonik bağlanması esasına dayanmaktadır. Uygulanmasının kolay olması, taşıyıcının yenilenebilir olması ve enzimin modifiye olmaması yöntemin kullanımını arttıran özelliklerdir. İyonik bağlanma metodunda kullanılan taşıyıcılar;

- organik (selüloz, dekstran)
- inorganik (silika) destek maddeler
- iyon değiştirici kalıntılarında türeyen iyon değiştiricilerdir.

Genellikle taşıyıcı olarak iyon değiştirici merkezleri bulunan polisakkaritler ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Taşıyıcılar, iyon değiştirici kalıntılarına bağlı olarak anyonik veya katyonik değiştirici olarak isimlendirilirler.

Fiziksel adsorpsiyonda olduğu gibi iyonik bağlanmada da immobilizasyon işlemi kolaylıkla gerçekleşmektedir. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetleri fiziksel adsorpsiyonda olduğundan daha kuvvetli ancak kovalent bağlanmada olduğundan

daha zayıftır. Bu nedenle de enzimin taşıyıcıdan sızma olasılığı vardır. Bu durum genelde iyonik kuvvetin yüksek olduğu substrat çözeltilerine ya da pH değişimlerine neden olmaktadır. İyonik bağlanmada operasyon koşulları kovalent bağlanmadakine göre daha hafiftir, enzimin konformasyonunda ve aktif merkezindeki değişiklik azdır. Bu nedenle genellikle immobilize edilen enzimin aktivitesi yüksek olmaktadır [13].

### 3.6 $\beta$ -Galaktozidaz İmmobilizasyonu Üzerine Yapılan Son Yıllardaki Çalışmalar

$\beta$ -Galaktozidaz immobilizasyonu üzerine yapılan son yıllardaki çalışmalar Çizelge 3.1' de özet halinde gösterilmiştir.

Çizelge 3.1  $\beta$ -Galaktozidaz immobilizasyonu üzerine yapılan son yıllardaki çalışmalar

ÇALIŞMANIN ADI	ENZİM KAYNAĞI/TAŞIYICISI	SONUÇ VERİLERİ	KAYNAKLAR
Karışım bir matriks membran üzerine $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyonunun karakterizasyon ve optimizasyonu	<i>Kluyveromyces lactis</i> $\beta$ -galaktozidazı/ 500 $\mu$ m kalınlığında polisülfan ve zirkonyumdioksit kaplı membran	Km= 195,4 m $\mu$ Vmax= 17928 $\mu$ mol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> Optimum pH=7.0, optimum sıcaklık=25°C iken; 14 gün depolamanın sonunda immobilize $\beta$ -galaktozidaz başlangıç aktivitesinin %41' ini devam ettirmiştir.	(Peter vd.), (2011) [66].

Çizelge 3.1  $\beta$ -Galaktozidaz immobilizasyonu üzerine yapılan son yıllardaki çalışmalar (Devamı)

ÇALIŞMANIN ADI	ENZİM KAYNAĞI/TAŞIYICISI	SONUÇ VERİLERİ	KAYNAKLAR
Adsorbsiyon yöntemiyle ZnO nanopartikülleri üzerine $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyonu	<i>Aspergillus oryzae</i> $\beta$ -galaktozidazı/ ZnO ve ZnO nanopartikülleri	100 mg ZnO ve ZnO-nanopartikülleri üzerine adsorblanmış $\beta$ -galaktozidazın aktivitesi sırasıyla 355U ve 480U.  ZnO üzerine $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyon verimi %60 iken, ZnO-NP üzerine ise %85 verim bulunmuştur.  Optimum pH= 4.5, optimum sıcaklık 50°C.	(Quayyum vd.), (2011) [67].
$\beta$ -Galaktozidazın immobilizasyonu için biyobenzetimli jelatin kalıp kalsifikasyonu	<i>Kluyveromyces lactis</i> $\beta$ -galaktozidazı/ Aljinat kapsülleri ve aljinat-jelatin-kalsiyum fosfat (AGCaP) hibrid kapsülleri	Optimum pH=6.8, optimum sıcaklık 42°C.  30 gün depolamanın sonunda immobilize $\beta$ -galaktozidaz başlangıç aktivitesinin %90' ını devam ettirmiştir.  Aljinat üzerine $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyon verimi % 68,3 iken, AGCaP üzerine ise % 183,2 bulunmuştur.	(Qiuyun vd.), (2011) [68].

Çizelge 3.1  $\beta$ -Galaktozidaz immobilizasyonu üzerine yapılan son yıllardaki çalışmalar (Devamı)

ÇALIŞMANIN ADI	ENZİM KAYNAĞI/TAŞIYICISI	SONUÇ VERİLERİ	KAYNAKLAR
Laktoz intoleransı daha etkili tedavisi için silika jel matrikslerine $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyonu	<i>Kluyveromyces lactis</i> $\beta$ -galaktozidazı/ Silikajel	Optimum pH=7.5, optimum sıcaklık 50°C bulunmuştur. Protein miktarı cinsinden total ünite değeri 273U iken, Başlongıç spesifik aktivitesi 4097 U/ml olarak tespit edilmiştir.	<b>(Valentina vd.), (2010) [69]</b>
<i>Bacillus circulans</i> $\beta$ -galaktozidazının epoksi aktive edilmiş akrilik destekler üzerine adsorbsiyonu	<i>Bacillus circulans</i> $\beta$ -galaktozidazı/ Epoksi aktive edilmiş ayıboncuklar EC-EP ve EC-HFA	pH 8,5 ortamında 3-30 mg/g EC-EP jel üzerine enzim 48 saat inkübasyonun sonunda immobilize edilmiştir. Immobilizasyon verimi protein cinsinden %98-100, aktivite cinsinden %85-98 bulunmuştur. pH 8,5 ortamında 1,5-15 mg/g EC-HFA jel üzerine enzim 24 saat inkübasyonun sonunda immobilize edilerek immobilizasyon verimi %60' ların aşağısında bulundu. Yöntem adsorbsiyon ve kovalent bağlama yöntemleriyle geliştirilerek protein cinsinden immobilizasyon verimi %100, aktivite cinsinden ise %85-98	<b>(Pedro vd.) (2012) [70].</b>

Çizelge 3.1  $\beta$ -Galaktozidaz immobilizasyonu üzerine yapılan son yıllardaki çalışmalar (Devamı)

ÇALIŞMANIN ADI	ENZİM KAYNAĞI/TAŞIYICISI	SONUÇ VERİLERİ	KAYNAKLAR
Galaktooligosakkarit sentezi için manyetik polietilenimin aşılı nanokürelerin üzerine <i>K. fragilis</i> $\beta$ -galaktozidazının tersinir immobilizasyonu	<i>Kluyveromyces fragilis</i> / Polietilenimin ile aşılınmış manyetik poli (glisidil metakrilat-etilen glikol dimetakrilat-hidroksietil metakrilat) nanoküreler	Manyetik polietilenimin aşılı nanoküreler ile adsorbsiyon yöntemiyle immobilizasyonda, ticari iyon değiştirici DEAE' den daha yüksek adsorbsiyon kapasitesine sahiptir.20.Adsorbsiyon-desorbsiyon döngüsünün sonunda orijinal adsorbsiyon kapasitesinin %93'ünü korudu.	(Jian-Fu vd.) (2012) [71].

## BÖLÜM 4

### MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 4.1 Kullanılan Materyaller

##### 4.1.1 *Hypocrea Jecorina* QM9414

Çalışmada kullanılan mikroorganizma *Hypocrea jecorina* QM9414, Viyana Teknik Üniversitesi, Biyokimyasal Teknoloji ve Mikrobiyoloji Enstitüsü tarafından temin edildi.

##### 4.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler aşağıdaki Çizelge 4.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Kullanılan kimyasal maddeler

KİMYASAL	FİRMA/ KATALOG NUMARASI
Laktoz	Sigma/ L8783
Tween 20	Fluka/ 93780
Kazein pepton	Sigma/ P6588
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	Sigma/ M1880
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck/ 104871
Üre	Merck/ 108487
BSA (Sığır serum albümin)	Fluka/ 27815
BaCl <sub>2</sub>	Aldrich/ 21756527815

Çizelge 4.1 Kullanılan kimyasal maddeler (Devamı)

<b>KİMYASAL</b>	<b>FİRMA/ KATALOG NUMARASI</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fluka/ 09978
NaOH	Riedel/ 06203
o-Fosforik asit	Riedel/ 4107
ONPG	Sigma/ N1127-5G 015k5318
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck/ 100713
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	Riedel/ 04269
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	Riedel/ 04272
Sitrik asit. H <sub>2</sub> O	Riedel/ 27102
Etanol	Merck/ 100986
Coomassie Blue G-250	Sigma/ B0770
Diyaliz kesesi	Aldrich/ D9777-100FT
Metanol	Riedel/ 24229
Aseton	Merck/ 100014
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Riedel/ 13418
CaCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	Riedel/ 12022
Kitosan (düşük molekül ağırlıklı)	Fluka/ 50494
PEG 6000	Merck/ D85662
Amberlit XAD16	Sigma/ 115K0062
Cam boncuk (212-300 µm)	Sigma/ G9143
Cam boncuk (2mm)	Merck/ 104014
Bentonit	Sigma/ B3378
Selit	Fluka/ 22141

Çizelge 4.1 Kullanılan kimyasal maddeler (Devamı)

KİMYASAL	FİRMA/ KATALOG NUMARASI
Hidroksiapatit	Acros organics/ 371210
Silika	Merck/ 107736
Deniz kumu	Merck/ 107711
Kloroform	Merck/ 102431
HCl	Merck/ 100314
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	Merck/ 7758
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	Fluka/ 44944
FeCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	Fluka/ 44939
β-merkaptoetanol	Sigma/ M7154
AgNO <sub>3</sub>	Merck/ 138591
KI	Fluka/ 60339
EDTA	Merck/ 133546
NiCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich/ 339350
TritonX-100	Fluka/ 93426
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	Fluka/ 63072
Asetik asit	Merck/ 100063
Tween 80	Merck/ 1067657

#### 4.1.3 Kullanılan Cihazlar

- Sterilizasyon işlemi için; Certoklav LV18 marka masaüstü otoklav,
- Enzim indüksiyonunu sağlamak için; Sartorius marka Certomat IS UHK çalkalamalı inkübatör,
- Destile su eldesi için; GFL marka 2001/4 destile su cihazı,
- Kullanılan tampon ve çözeltilerin pH kontrolü için; Sartorius marka pH metre,

- Santrifüj için; SIGMA marka 3K 30 santrifüj,
- Enzim aktivite ve protein tayini için; Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spektrometre,
- Karıştırma işlemleri için; Chiltern Hotplate HS31 manyetik karıştırıcı,
- Kullanılan tampon, çözelti ve kültürlerin saklanması için; Bosch marka buzdolabı,
- Kullanılan taşıyıcıların enzimle muamalesinden sonra suyu uzaklaştırmak amacıyla, desikatörün içindeki havayı boşaltmak için; KnF Laboport N820FT.18 vakum pompası kullanılmıştır.

## 4.2 Metotlar

### 4.2.1 Kültür Ortamı

#### 4.2.1.1 Saf Kültür Ortamı

*Hypocrea jecorina* QM9414 %3,9 patates dekstroz-agar (PDA) içeren katı besiyeri üzerinde çoğaltıldı. 3,9 g PDA 100 mL distile suda çözüldü, 20 dakika 121°C' de serotoklavda steril edildi. Steril petri kaplarının 3' te 2sini kaplayacak şekilde petrilere döküldü ve soğumaya bırakıldı. Katı besiyerlerine saf kültürden alınan küçük miktarlar yerleştirildi. 30°C' de 5-8 gün inkübasyonu sağlandı. Bu şekilde çoğaltılan mikroorganizma, spor çözeltisi hazırlamak ve enzim üretim ortamına aşılama amacıyla kullanıldı. Bu şartlarda çoğaltılan mikroorganizmanın +4°C de 3 ay boyunca canlılığını koruduğu bilinmektedir.

#### 4.2.1.2 Spor Çözeltisinin Hazırlanması

Katı besiyerinin üzerinde üreyen mikroorganizmaları çözelti içine almak ve aşılama işleminde kullanmak için, sporlar dikkatli bir şekilde, 5 mL distile su ilave edilerek, ince uçlu steril bir spatül yardımıyla çözeltiliye alındı. Bu şekilde mililitrede  $5 \times 10^8$  spor içeren süspansiyon hazırlandı.

## 4.2.2 Enzim Üretim Ortamı

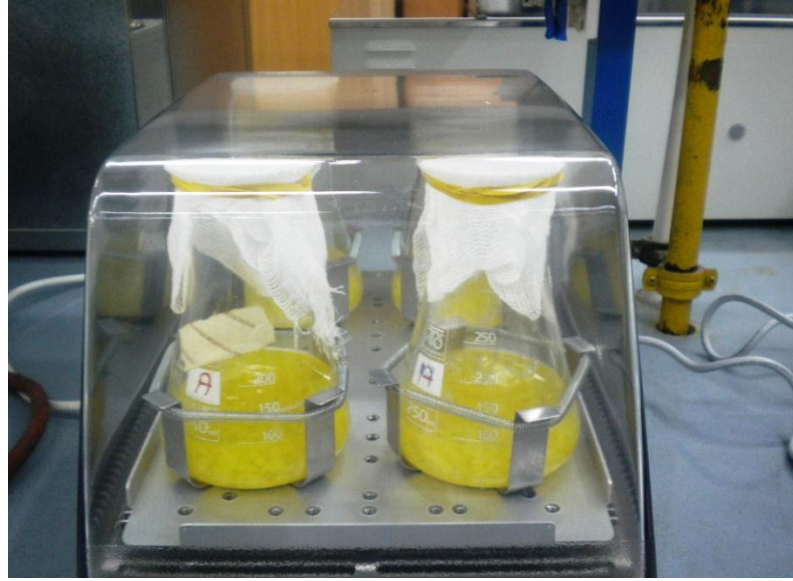
### 4.2.2.1 Sıvı Besiyerinin Bileşimi

Katı besiyerinde üreyen *H. jecorina* QM9414 suşlarının misel oluşturması için aşılacağı sıvı besiyeri ortamının bileşimi (g/L) : 2,8 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,3 g CaCl<sub>2</sub> 480 mL 100mM pH 5 olan sitrat tamponunda çözüldü. Elde edilen çözeltiye (g/L) olacak şekilde, 0.3 g üre, 0,5 g TW20, 1-2 g pepton, 10 g laktoz 20 mL eser element çözeltisi ilave edildi. Beherdeki tüm kimyasal maddeler çözülüp, 1000 mL hacimdeki balon jode tamamlandı. 1N NaOH ile 5'e ayarlı pH' sı kontrol edildi. 250 mL hacimdeki geniş boyunlu erlenlere 125'er mL olacak şekilde hazırlanan sıvı besiyeri aktarıldı. Erlenlerin ağızları gazlı bez ile kapatılarak 20 dakika 121°C'de sertoklavda sterilizasyonu gerçekleştirildi. Steril besiyerleri daha önce hazırlanan spor çözeltisi ile aşılama işlemini yapar yapmaz erlenlerin ağızları gazlı bezle tekrar kapatıldı. İnkübasyon için; 25°C sıcaklıkta ve 160 rpm çalkalama hızında 96 saat inkübasyonu inkübatöre yerleştirildi.

## 4.2.3 β-Galaktozidazın Kısmi Saflaştırılması

### 4.2.3.1 *H. jecorina*'dan Ekstrasellüler β-Galaktozidazın Eldesi

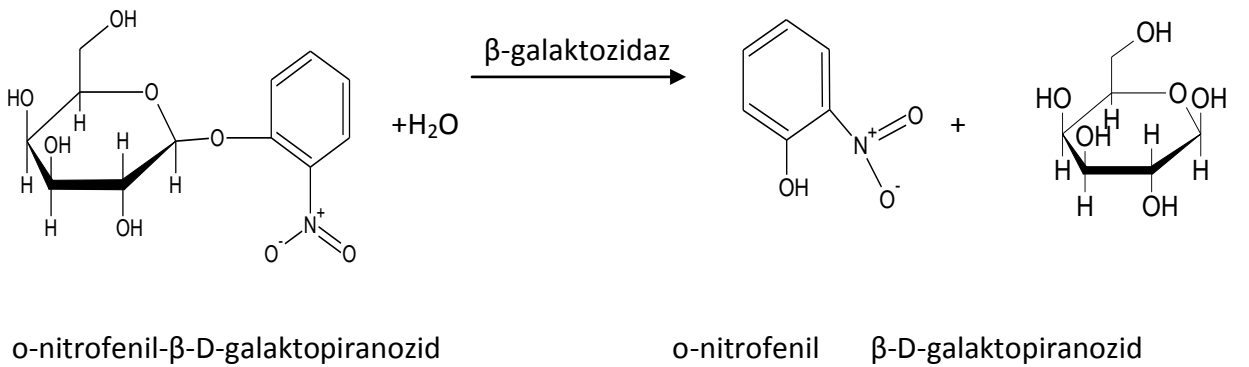
*H. jecorina* 'dan ekstrasellüler β-galaktozidaz üretimi için 96 saat boyunca enzimin üretim ortamında inkübasyon işlemi gerçekleştirilen *H.jecorina* miselleri, bu ortamla birlikte 50 mL hacimdeki santrifüj tüplerine dolduruldu. +4°C'de 10000 rpmde 1 saat santrifüjlendi, ve miseller vakum altında süzülerek ayırma işlemi kolaylaştırıldı. Elde edilen kültür sıvısında β-galaktozidaz aktivite ve protein miktar tayinleri yapıldı.



Şekil 4.1 Deneysel çalışmada *Hypocrea jecorina*' dan  $\beta$ -galaktozidazın ekstrasellüler üretimi

#### 4.2.3.2 $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitesinin Tayini

$\beta$ -galaktozidaz aktivitesi Fekete ve diğerleri tarafından (2002) kullanılan metoda göre, spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu yöntemde substrat olarak o-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid (ONPG) kullanıldı. ONPG'nin hidroliz reaksiyonu şekil 4.2' de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 ONPG'nin hidroliz tepkimesi

#### 4.2.3.3 Çözeltiler

**1. 0.1M Fosfat Tamponu ( pH 7.0 ):** 0,889g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 0,78g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O destile suda çözülerek balon jodede 100 mL'ye tamamlandı. 1N NaOH ile pH 7.0'e ayarlandı.

**2. 0.01M ONPG Çözeltisi:** 0,03013g ONPG fosfat tamponu ( pH 7.0 ) içinde çözülerek balon jodede 10 mL'ye tamamlanarak her kullanımdan önce taze olarak hazırlandı.

**3. 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Çözeltisi:** 10,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> distile suda çözülerek balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

Enzim aktivitesi "enzim ünitesi" (birimi) cinsinden verilir. Enzim ünitesi (IU) ; 25°C'de ve optimal şartlarda 1 µmol (10<sup>-6</sup> mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına denir. Bir dakikada 1 µmol ONP oluşumunu sağlayan enzim miktarıdır.

Bu yöntemde 0,5 mL örnek üzerine 0,3 mL substrat çözeltisi ve 0,2 ml distile su ilave edildi. Karışım 37°C'de 30 dakika inkübasyon için su banyosunda bekletildi. 2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Absorbans değerleri, 410 nm'de 1 mL kuvars küvet içinde spektrofotometrik olarak köre karşı okundu. Köre; 0,7 mL distile su içerisinde 0,3 mL ONPG çözeltisinin ilave edilmesi ile hazırlandı. Bu absorpsiyon değerinin o-nitrofenil (ONP) regresyon denkleminde uygulanmasıyla enzim tarafından bir dakikada açığa çıkarılan ONP miktarı µmol/dakika olarak belirlendi.

#### 4.2.4 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Bir ünite β-galaktozidaz aktivitesi (U); Standart koşullar altında bir dakikada 1 µmol ONPG'den ONP oluşmasını sağlayan enzim miktarıdır. Enzim aktivitesi total ünite olarak U/mL cinsinden ifade edildi.

Şekil 4.3' deki standart ONP eğrisi grafiği kullanılarak bulunan ONP konsantrasyonları (4.1) eşitliğinde yerine yazılıp hesaplandığında total ünite (U/mL) hesaplandı.

$$\text{Total Ünite (U/mL)} = [(\text{mg ONP} / \text{mL} \times 1000) / (\text{t} \times M_G)] \quad (4.1)$$

mg ONP / mL : örneklerin absorbanslarına karşılık gelen ONP miktarı

t : inkübasyon zamanı (30 dakika)

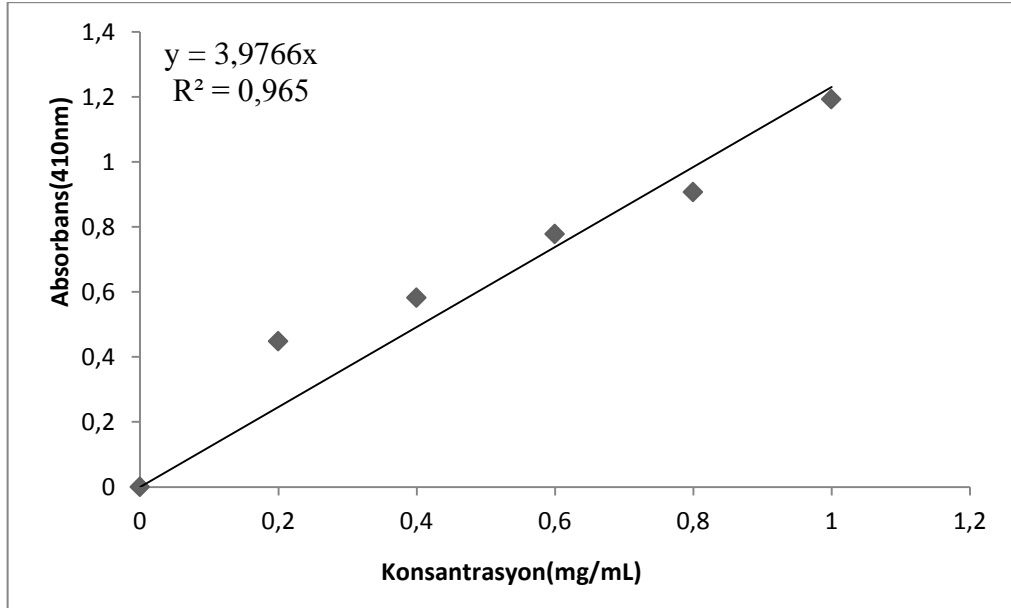
M<sub>G</sub> : serbest bırakılan ONP'nin ( 139,11 ) molekül ağırlığı (g/mol)

#### 4.2.4.1 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması

Total ünite değerleri mL'deki protein miktarına bölünerek spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Spesifik aktivite U/mg protein olarak verildi.

#### 4.2.4.2 ONP Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

Stok ONP çözeltisi mg/mL konsantrasyonda hazırlanarak bu stok çözülden 0,1-0,5 mg/mL aralığında değişen konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen farklı konsantrasyonlardaki ONP çözeltilerine enzim aktivite tayini için uygulanan yöntem uygulandı. Bu yöntemde 0,5 mL ONP çözeltisine 0,3 mL fosfat tamponu (pH 7.0) ve 0,2 mL distile su eklendi. Kör olarak 0,7 mL distile suya 0,3 mL fosfat tamponu (pH 7.0) eklenerek elde edilen çözelti kullanıldı. Yöntem her konsantrasyon için beş kez tekrarlandı ve beş ölçümün ortalamaları alındı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak regresyon denklemi hesaplandı ve standart eğri grafiği çizildi. Şekil 4.3'de ONP standart eğri grafiği verilmiştir.



Şekil 4.3 ONP standart eğri

#### 4.2.5 Protein Miktarının Belirlenmesi

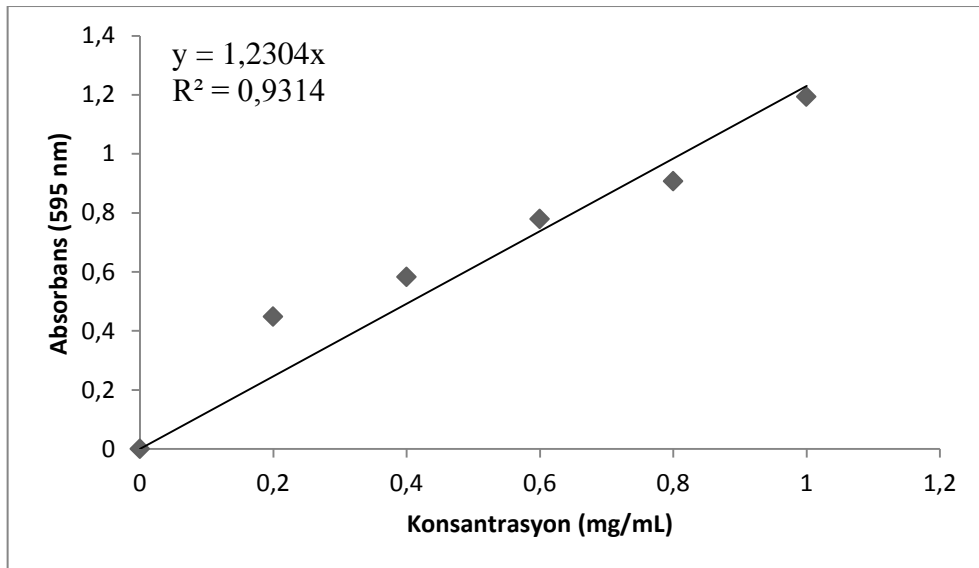
Sığır serum albumin ( BSA ) standart olarak kullanılarak Bradford (1976) yöntemine göre protein miktarının tayini yapıldı.

Bradford yönteminin uygulanması için renk reaktifi hazırlandı. Renk reaktifinin hazırlanışı: 10 mg Coomassie Blue G- 250, 5 mL %96 (v/v) etanolde çözüldükten sonra 10 mL %85 (v/v) o-fosforik asit eklendi. Distile su ile balon jode 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan reaktif 1 numaralı Whatman kağıdından süzüldü. Bu renk reaktifi koyu renkli cam bir şişede +4°C'de saklandı.

Protein miktarının belirlenmesi için; 2 mL renk reaktifi üzerine 20 µL proteini tayin edilecek örnekten eklendi, homojen şekilde karışımı sağlandı. Kör olarak 2 mL renk reaktifi üzerine 20 µL distile su eklendi. Elde edilen absorbans değerlerinin BSA ile çizilen standart grafiğe uygulanmasıyla, protein miktarı mg/mL olarak hesaplandı.

#### 4.2.5.1 Protein Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

mg/mL Konsantrasyonda stok BSA çözeltisi hazırlanarak bu stok çözülden uygun seyreltmeler yapılarak 0,2-1 mg/mL konsantrasyon aralığında çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen standart çözeltilere Bradford deneyi uygulandı. Deney beş kez tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak regresyon denklemi hesaplandı ve grafik çizildi. Şekil 4.4'de BSA standart eğri grafiği gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Protein standart eğrisi

#### **4.2.6 H. jecorina Hücrelerinden Hücre Dışı $\beta$ -Galaktozidaz Eldesi**

4.2.3.1'de anlatıldığı şekliyle elde edilen homojenatin enzim aktivitesi ve protein miktarı yine yukarıda anlatılan tayin yöntemleri ile belirlendi. Homojenatin derişiklendirilmesi için, ortamdaki su veya daha küçük moleküllerin uzaklaştırılması amacıyla protein çöktürmeleri ve diyaliz işlemleri uygulandı.

##### **4.2.6.1 Etilalkol Çöktürmesi**

10 mL ve 20 mL homojenata 5'er mL soğuk etilalkol, yavaş yavaş ilave edilerek +4°C'de, 3-4 saat karıştırıldı. Karışım bir gece +4°C'de bekletildikten sonra +4°C'de 10000 rpm'de 1 saat santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra, etilalkol çöktürmesi uygulanan her iki homojenatta da çökelti oluşumu gözlenmedi.

##### **4.2.6.2 Aseton Çöktürmesi**

10 mL homojenata 5 mL soğuk aseton, yavaş yavaş ilave edilerek +4°C'de, 3-4 saat karıştırıldı. Karışım bir gece +4°C'de bekletildikten sonra +4°C'de 10000 rpm'de 1 saat santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra, aseton çöktürmesi uygulanan homojenatta çökelti oluşumu gözlenmedi.

##### **4.2.6.3 *Hypocrea jecorina* $\beta$ -Galaktozidazını Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması**

*Hypocrea jecorina*  $\beta$ -galaktozidazını çöktürecek uygun  $(NH_4)_2SO_4$  konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, 25 mL'lik 9 adet behere, 5'er mL homojenat konuldu. Beheler +4°C'yi sağlamak amacıyla, buz banyosuna oturtuldu. Ortamdaki konsantrasyonu % 10' dan başlayarak %90'a kadar değişen konsantrasyonlarda toz amonyum sülfat azar azar ilave edilerek, düşük hızda manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojenatlar içindeki  $(NH_4)_2SO_4$  tamamen çözüldükten sonra 30 dakika daha karıştırılarak, ağızları kapatıldı ve +4°C'de bir gece bekletildi. Bir gece +4°C'de bekletilen behelerdeki homojenatlar +4°C'de 10000 rpm'de, 1 saat santrifüj edildi. Oluşan çökelti ve süpernatantlar ayrıldı. En uygun konsantrasyonun saptanması amacıyla, elde edilen çökelti 0,1 M sodyum fosfat tamponu pH 7.0 içerisine alındı, çökelti protein miktarları ve enzim aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen sonuçlardan *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazı için en

uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun % 60 olduğu saptandı.

#### **4.2.6.4 *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının %60 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi**

*Hypocrea jecorina*  $\beta$ -galaktozidazını çöktüren uygun  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  konsantrasyonunun %60 olduğu saptandıktan sonra, homojenata ortamdaki konsantrasyonu %60 olacak şekilde, toz amonyum sülfat azar azar ilave edilerek buz banyosu altında (+4°C) manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojenatlar içindeki amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra +4°C'de manyetik karıştırıcı ile 30 dakika daha karıştırılıp, ağızları kapatılarak bir gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün +4°C'de 10000 rpm'de, 1 saat santrifüj edildi. Oluşan çökelti ve süpernatant ayrıldıktan sonra süpernatant atıldı. Oluşan çökelti 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisine alınarak oluşan çözelti %60 amonyum sülfat kesiti olarak adlandırıldı. Oluşan çözeltinin  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı. Amonyum sülfatı uzaklaştırmak amacıyla %60 amonyum sülfat kesiti diyaliz kesesine (Sigma Aldrich/D-9777) alındı. Diyaliz +4°C'de distile suya karşı gerçekleştirildi. Manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve çözeltide sülfat iyonu kalmayınca kadar diyaliz işlemine devam edildi. Bu amaçla distile sudan 3-4 mL alınarak, aynı hacimde %1'lik  $\text{BaCl}_2$  çözeltisi eklendi, bulanıklık görülmemesi halinde diyaliz işlemine son verildi. Diyaliz işlemi tamamlandıktan sonra, diyaliz kesesinde çöken kısımları uzaklaştırmak amacıyla çözelti, +4°C'de 10000 rpm'de, 1 saat, santrifüj edildi. Santrifüj tüpünde üstte kalan berrak çözelti alındı ve diyalizat olarak adlandırıldı. Bu çözeltinin  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi ve protein miktarı tayin edildi. Bu işlem sonrasında uygun hacimlere ayrılarak -20 °C'de depolandı.

#### **4.2.6 Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -Galaktozidazın İmmobilizasyonu**

*H. jecorina'* dan kısmi saflaştırılan  $\beta$ -galaktozidaz cam boncuk, kitosan boncuk, PEG 6000 kaplı kitosan bocuklar, amberlit, bentonit, alümina, selit, hidroksi apatit, silika, deniz kumu taşıyıcıları üzerine immobilize edildi. İmmobilize edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktiviteleri ve total ünitelerinin korunmuş olmasına dikkat edilerek, en uygun yöntem belirlendi. En uygun immobilizasyon yöntemi belirlendikten sonra, bu immobilize  $\beta$ -galaktozidazın karakterizasyon çalışmaları yapılarak, kinetik özellikleri saptandı.

#### **4.2.7.1 $\beta$ -Galaktozidazın Adsorbsiyon Yöntemiyle İmmobilizasyonu**

Serbest  $\beta$ -galaktozidaz; cam boncuk, kitosan boncuk, PEG 6000 kaplı kitosan boncuklar, amberlit, bentonit, alümina, selit, hidroksi apatit, silika, deniz kumu üzerine adsorbe edildi.

#### **Cam Boncuk (212-300 $\mu$ m) Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu**

212-300  $\mu$ m  $\mathcal{C}$ apında olan cam boncuklardan 5 gram tartıldı. Bu boncuklar safsızlıklarından arındırılmak için 20-25 ml 4 M HCl ile 15 dakika boyunca karıştırıldı. Karıştırılan cam boncuklar asitten alınarak 2 L distile suda yıkandı. Yıkanan cam boncuklar, 120° C sıcaklığa getirilmiş olan etüvde 2 saat boyunca kurutuldu. Etüvden alınan cam boncuklar, 1:1 oranında hazırlanmış olan kloroform:etanol  $\mathcal{C}$ özücü sisteminden 25 ml hacminde kullanılarak, ikinci kez yıkandı. İkinci kez yıkanan cam boncuklar sıcaklığı 150° C' ye getirilmiş olan etüvde 40 dakika boyunca kurutuldu. Kurutulan cam boncukların sıcaklığının, oda sıcaklığı değerine inene kadar soğuması için beklenildi.

Safsızlıklarından arındırılmış olan 1 gram cam boncuk 0,1779 mg/ml protein içeren 2 ml enzim preparatı ile karıştırıcının en düşük ayarında 4 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Karıştırma işlemi sonlandıktan sonra, cam boncuklar enzimli  $\mathcal{C}$ özeltiden tamamen süzülerek, 10 ml 0,1 M Na-fosfat (pH 7.0) tamponunda yıkandı. Yıkama suyunda spesifik aktivite ve protein miktar tayinleri yapıldı. Yıkama suyundan tekrar süzülen cam boncuklar, vakumlu desikatörde +4° C' de bir gece boyunca kurutuldu. 24 saatin sonunda vakumlu desikatörden alınan immobilize cam boncuklarda protein ve spesifik aktivite tayinleri yapıldı, immobilizasyon verimleri hesaplandı.

#### **Cam Boncuk (2 mm) Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu**

2 mm  $\mathcal{C}$ apında olan cam boncuklardan 5 gram tartıldı. Bu boncuklar safsızlıklarından arındırılmak için 20-25 ml 4 M HCl ile 15 dakika boyunca karıştırıldı. Karıştırılan cam boncuklar asitten alınarak 2 L distile suda yıkandı. Yıkanan cam boncuklar, 120° C sıcaklığa getirilmiş olan etüvde 2 saat boyunca kurutuldu. Etüvden alınan cam boncuklar, 1:1 oranında hazırlanmış olan kloroform:etanol  $\mathcal{C}$ özücü sisteminden 25 ml hacminde kullanılarak, ikinci kez yıkandı. İkinci kez yıkanan cam boncuklar sıcaklığı 150°

C' ye getirilmiş olan etüvde 40 dakika boyunca kurutuldu. Kurutulan cam boncukların sıcaklığının, oda sıcaklığı değerine inene kadar soğuması için beklenildi.

Safsızlıklarından arındırılmış olan 1 gram cam boncuk 0,1779 mg/ml protein içeren 3 ml enzim preparatı ile karıştırıcının en düşük ayarında 4 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Karıştırma işlemi sonlandıktan sonra, cam boncuklar enzimli çözültiden tamamen süzülerek, 10 ml 0,1 M Na-fosfat (pH 7.0) tamponunda yıkandı. Yıkama suyunda spesifik aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Yıkama suyundan tekrar süzülen cam boncuklar, vakumlu desikatörde +4° C' de bir gece boyunca kurutuldu. 24 saatin sonunda vakumlu desikatörden alınan immobilize cam boncuklarda protein ve spesifik aktivite tayinleri yapıldı, immobilizasyon verimleri hesaplandı.

### **Kitosan Boncuklar Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu**

%1 (v/v) asetik asit çözültisinden 6 ml alınarak 0,2 gram kitosanın tamamen çözünmesi sağlandı. Tamamen çözüldüğüne emin olunan kitosan-asit çözültisi karıştırıcı üzerinden alındı. Hazırlanan metanol:NaOH:dH<sub>2</sub>O (10:10:10 ml) çözültisinden 10 ml alınarak, bu çözültiye asit-kitosan çözültisi damlalık yardımıyla damla damla eklendi. Asit-kitosan çözültisinin bulunduğu beherin çözülti yüzeyini boncuklar tamamen kapladıktan sonra, beher ara ara, 5-10 dakika hafif dairesel hareketlerle karıştırıldı. Boncukların oluşumu tamamlandıktan sonra, kitosan boncuklar 25-30 dakika çözülti içerisinde bekletildi. Bekleme süresinden sonra, oluşan kitosan boncuklar bu çözültiden süzülerek 20 ml saf su ile yıkandı, böylece kitosan boncuklar çözültiden gelebilecek safsızlıklardan arındırılmış olundu. Yıkama suyundan tamamen süzülen kitosan boncuklardan 15 tanesi alınarak, 0,2187 mg/ml protein içeren 1,5 ml enzim preparatı ile 25-30 dakika muamele edildi. Enzimle muamele edilen kitosan boncukların immobilize olması için, bir gece boyunca 4° C' de bekletildi. 24 saatin sonunda bu çözültiden alınarak protein ve spesifik aktivite tayinleri yapıldı. Kitosan boncuklar 10-15 ml saf su ile yıkandı. Yıkama sularında ve immobilize kitosan boncuklarda spesifik aktivite ve protein tayinleri yapıldı, immobilizasyon verimleri hesaplandı.

İmmobilize kitosan boncukların aktivite ölçümü için; iki adet boncuk, 1 ml ONPG çözültisinde 10 dakika kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda substrat çözültisinden alınan örnek ile enzim aktivite tayin yöntemi uygulandı.

İmmobilize kitosan boncukların protein miktarının belirlemek için bir adet boncuk, 1 ml Bradford çözeltisinde 10 dakika kadar inkübe edildikten sonra spektrofotometrik ölçümü yapıldı.

### **PEG 6000 Kaplı Kitosan Boncuklarına $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu**

%1 (v/v) asetik asit çözeltisinden 10 ml alınarak 0,8 gram kitosan ve 0,2 gram PEG 6000 (8:2) oranındaki tartımın tamamen çözülmesi sağlandı. Tamamen çözüldüğüne emin olunan kitosan-asit çözeltisi karıştırıcı üzerinden alındı. Hazırlanan metanol:NaOH:dH<sub>2</sub>O (10:10:10 ml) çözeltisinden 10 ml alınarak, bu çözeltiliye asit-kitosan çözeltisi damlalık yardımıyla damla damla eklendi. Asit- PEG 6000 kaplı kitosan çözeltisinin bulunduğu beherin çözelti yüzeyini boncuklar tamamen kapladıktan sonra, beher ara ara, 5-10 dakika hafif dairesel hareketlerle karıştırıldı. Boncukların oluşumu tamamlandıktan sonra, boncuklar 25-30 dakika çözelti içerisinde bekletildi. Bekleme süresinden sonra, oluşan boncuklar bu çözeltiliden süzülerek 20 ml saf su ile yıkandı, böylece PEG 6000 kaplı kitosan boncuklar çözeltiliden gelebilecek safsızlıklardan arındırılmış oldu. Yıkama suyundan tamamen süzülen boncuklardan 15 tanesi alınarak, 0,4300 mg/ml protein içeren 1,5 ml enzim preparatı ile 25-30 dakika muamele edildi. Enzimle muamele edilen boncukların immobilize olması için, bir gece boyunca 4° C' de bekletildi. 24 saatin sonunda bu çözeltiliden alınarak protein ve spesifik aktivite tayinleri yapıldı. Kitosan boncuklar 10-15 ml saf su ile yıkandı. Yıkama sularında ve immobilize kitosan boncuklarda spesifik aktivite ve protein tayinleri yapıldı, immobilizasyon verimleri hesaplandı.

İmmobilize kitosan boncukların aktivite ölçümü için; iki adet boncuk, 1 ml ONPG çözeltisinde 10 dakika kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda substrat çözeltisinden alınan örnek ile enzim aktivite tayin yöntemi uygulandı.

İmmobilize kitosan boncukların protein miktarlarını belirlemek için bir adet boncuk, 1 ml Bradford çözeltisinde 10 dakika kadar inkübe edildikten sonra spektrofotometrik ölçümü yapıldı.

Kitosan ve PEG 6000 (8:2) oranı dışında; (6:4) ve (7:3) oranlarında çalışıldı.

### **Amberlit-XAD16 Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu**

100 mg Amberlit-XAD16 0,2058 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı ile karıştırıcı üzerinde 2 saat boyunca muamele edildi. Amberlit-XAD16 ve enzim preparatı içeren bu karışım süzüldü. İmmobilize enzimi içeren amberlit +4° C' de donduruldu. Donmuş olan amberlit kristallerine bağlanmayan protein moleküllerini ortamdaki uzaklaştırmak için amberlit kristalleri su ile yıkandı, süzüldü.

Süzülen, yıkanan ve tekrar süzülen amberlit kristalleri bir gece boyunca vakumlu desikatörde +4° C'de buzdolabına yerleştirildi. Bu şekilde kurutulan, adsorbe enzim içeren amberlit kristallerinden 24 saat sonunda 10 mg tartıldı. Adsorbe enzim içeren 10 mg amberlit 1 ml substrat çözeltisi ile 10 dakika kadar inkübe edildikten sonra, dekantasyonu sağlandı. Enzim aktivite tayini ve protein tayini yöntemleri yapılarak, immobilizasyon verimleri hesaplandı.

### **Bentonit Üzerine $\beta$ -Galaktozidazın Adsorbsiyonu**

0,5 gram bentonit tartıldı ve 1,5 ml 0,3013 mg/ml protein içeren enzim preparatı ile 3 saat boyunca karıştırıcı üzerinde, karıştırıcının en düşük ayarında muamele edildi. Bir çeşit kil olan bentonit enzim çözeltisini emdi, dekantasyonu kolaylaştırmak için karışım ependorflara bölünerek 10000 rpm'de oda sıcaklığında 20 dakika santrifüj yapıldı. Dekantasyon sağlanarak süzme işlemi gerçekleşti, immobilize enzim içeren alt faz saf su ile yıkandı, süzüldü. Süzülen alt faz, bir gece boyunca +4°C' de buzdolabında bekletildi. 24 saatin sonunda, alt fazdan altı adet ependorfa 10' ar mg alınarak, üzerlerine 1 ml substrat çözeltisi eklendi, 10 dakika kadar oda sıcaklığında inkübasyonu sağlandı. İnkübe edilen adsorbe enzim içeren bentonit çözeltisinden %10, %20, %30, %40 ve %50 seyreltmeler yapılarak 10000 rpm, 25° C'de 20 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası elde edilen üst fazdan, enzim aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite ve protein miktar sonuçlarından immobilizasyon verimleri hesaplandı. İnkübasyonu sağlanan enzim içeren bentonit çözeltisinden hiç seyreltme işlemi gerçekleştirilmeden de, enzim aktivite ve protein tayini yapılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı.

### **Deniz Kumuna $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu**

5 gram deniz kumu tartıldı. Deniz kumu safsızlıklarından arındırılmak için 20-25 ml 4 M HCl ile 15 dakika boyunca karıştırıldı, asitten alınarak 2 L distile suda yıkandı. Yıkanan deniz kumu, 120° C sıcaklığa getirilmiş olan etüvde 2 saat boyunca kurutuldu. Etüvden alınan deniz kumu, 1:1 oranında hazırlanmış olan kloroform:etanol çözücü sisteminden 25 ml hacminde kullanılarak, ikinci kez yıkandı, sıcaklığı 150° C' ye getirilmiş olan etüvde 40 dakika boyunca kurutuldu. Kurutulan deniz kumu sıcaklığının, oda sıcaklığı değerine inene kadar soğuması için beklenildi.

Safsızlıklarından arındırılmış olan 0,1 gram deniz kumu tartıldı ve 0,3013 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı ile 3 saat boyunca karıştırıcının en düşük ayarında muamele edildi. İmmobilize edilmiş enzim çözeltisi dekante edilerek, saf su ile yıkandı, süzüldü. Adsorbe enzim içeren deniz kumu, +4° C' de bir gece boyunca vakum desikatöründe buzdolabında bekletildi. 24 saatin sonunda, immobilize deniz kumundan 10 mg alınarak 1 ml substrat çözeltisinde 10 dakika kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda spesifik aktivite ve protein tayin yöntemleri uygulanarak, immobilizasyon verimleri hesaplandı.

### **Silika Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu**

0,1 gram silika tartıldı ve 1,5 ml 0,3013 mg/ml protein içeren enzim preparatı ile 3 saat boyunca karıştırıcı üzerinde, karıştırıcının en düşük ayarında muamele edildi. Silika enzim çözeltisini emdi, dekantasyonu kolaylaştırmak için karışım ependorflara bölünerek 10000 rpmde oda sıcaklığında 20 dakika santrifüj yapıldı. Dekantasyon sağlanarak süzme işlemi gerçekleşti, immobilize enzim içeren alt faz saf su ile yıkandı, süzüldü. Süzülen alt faz, bir gece boyunca +4°C' de buzdolabında bekletildi. 24 saatin sonunda, alt fazdan altı adet ependorfa 10' ar mg alınarak, üzerlerine 1 ml substrat çözeltisi eklendi, 10 dakika kadar oda sıcaklığında inkübasyonu sağlandı. İnkübe edilen adsorbe enzim içeren silika çözeltisinden %10, %20, %30, %40 ve %50 seyreltmeler yapılarak 10000 rpm, 25° C' de 20 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası elde edilen üst fazdan, enzim aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite ve protein miktar sonuçlarından immobilizasyon verimleri hesaplandı. İnkübasyonu sağlanan enzim içeren silika çözeltisinden hiç seyreltme işlemi gerçekleştirilmeden de, enzim

aktivite ve protein tayini yapılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı.

### **Hidroksiapatit Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu**

100 mg Hidroksiapatit 0,2987 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı ile karıştırıcı üzerinde 2 saat boyunca muamele edildi. Hidroksiapatit ve enzim preparatı içeren bu karışım süzüldü. İmmobilize enzimi içeren hidroksiapatit +4° C' de donduruldu. Donmuş olan hidroksi apatite bağlanmayan protein moleküllerini ortamdan uzaklaştırmak için hidroksi apatit su ile yıkandı, süzüldü.

Süzülen, yıkanan ve tekrar süzülen hidroksiapatit bir gece boyunca vakumlu desikatörde +4° C'de buzdolabına yerleştirildi. Bu şekilde kurutulan, adsorbe enzim içeren hidroksiapatit 24 saat sonunda 10 mg tartıldı. Adsorbe enzim içeren 10 mg adsorban 1 ml substrat çözeltisi ile 10 dakika kadar inkübe edildikten sonra, dekantasyonu sağlandı. Enzim aktivite tayini ve protein tayini yöntemleri yapılarak, immobilizasyon verimleri hesaplandı.

### **Alümina Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu**

Adsorban olarak kullanılan alümina ile immobilizasyon işlemi yapılmadan önce , nem çekici özelliğinden dolayı; 5 gram alümina sıcaklığı 100° C' ye getirilmiş etüvde 2 saat boyunca kurutuldu. Kurutulan alümina sıcaklığının, oda sıcaklığı değerine inene kadar soğuması için beklenildi.

100 mg alümina tartıldı ve 0,2987 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı ile 3 saat boyunca muamele edildi. Karışımın içine 3 saat tamamlandıktan sonra, soğuk aseton 2-3 ml kadar ilave edildi, 1 saat daha karıştırılmaya devam edildi. Süzme işlemi yapılarak, alümina soğuk aseton ile yıkandı. Süzülüp yıkanan alümina, bir gece boyunca vakumlu desikatörde, +4°C 'de buzdolabında kuruması için bekletildi. 24 saatin sonunda, immobilize enzim içeren kurumuş olan alüminadan 10 mg tartılarak 1 ml substrat çözeltisine alındı. İmmobilize enzim çözeltisi ve yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı, immobilizasyon verimleri hesaplandı.

## **Selit Üzerine $\beta$ -Galaktozidaz Adsorbsiyonu**

0,5 gram silika tartıldı ve 1,5 ml 0,3317 mg/ml protein içeren enzim preparatı ile 3 saat boyunca karıştırıcı üzerinde, karıştırıcının en düşük ayarında muamale edildi. Dekantasyonu kolaylaştırmak için karışım ependorflara bölünerek 10000 rpm'de oda sıcaklığında 20 dakika santrifüj yapıldı. Dekantasyon sağlanarak süzme işlemi gerçekleşti, immobilize enzim içeren alt faz saf su ile yıkandı, süzüldü. Süzülen alt faz, bir gece boyunca +4°C' de buzdolabında bekletildi. 24 saatin sonunda, alt fazdan altı adet ependorfa 10' ar mg alınarak, üzerlerine 1 ml substrat çözeltisi eklendi, 10 dakika kadar oda sıcaklığında inkübasyonu sağlandı. İnkübe edilen adsorbe enzim içeren bentonit çözeltisinden %10, %20, %30, %40 ve %50 seyreltmeler yapılarak ve yapılmayarak 10000 rpm, 25° C'de 20 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası elde edilen üst fazdan, enzim aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite ve protein miktar sonuçlarından immobilizasyon verimleri hesaplandı.

### **4.2.8 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Kimyasal ve Fiziksel Karakterizasyonu**

#### **4.2.8.1 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitesine pH Etkisi**

Enzimatik reaksiyonun hızı ortamın pH' ına da bağlıdır. Ortam pH' sı enzimlerin yük durumunu dolayısıyla aktif merkezide etkilemektedir. Belirli bir pH değerinde enzimin katalitik etkisi maksimuma ulaşır, bu pH' a o enzimin "optimum pH' ı" denir [2].

İmmobilize  $\beta$ -galaktozidazın optimum pH değerini belirleyebilmek için; pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 olmak üzere sekiz adet tampon hazırlandı. pH 3, 4 ve 5 için 0,1 M Na-asetat tamponu, pH 6 ve 7 için 0,1 M Na-fosfat tamponu kullanılırken, pH 8, 9 ve 10 için 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanıldı. ONPG çözeltisi için hazırlanan tamponlardan kullanıldı. Oluşturulan sekiz adet ölçüm tüpleri için ayrı ayrı protein ve aktivite tayinleri yapıldı, total ünite ve spesifik aktivite değerleri hesaplandı.

#### **4.2.8.2 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi**

Bütün reaksiyonlar gibi enzimatik reaksiyonların hızı da sıcaklıkla artar. İn vitro enzim tepkimeleri daha çok 37-40°C arasında yapılır. Bu sıcaklıkta oda sıcaklığındakinden 4 kat fazla hızla cereyan eder. Ancak enzimlerde protein yapılı olduklarından ancak belirli

sıcaklığa kadar dayanıklıdır. Sıcaklığın fazla artması denatürasyona neden olur. Her enzim için birim zamanda maksimum substratın değişime uğratıldığı bir sıcaklık değeri vardır, buna; “optimum temperatur” denir [2].

İmmobilize  $\beta$ -galaktozidazın maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değeri kullanılarak, optimum sıcaklığı belirlendi. Optimum pH değeri kullanılarak, 20°C den 100°C 'ye kadar olan sıcaklıklarda oluşturulan dokuz ölçüm tüpü için ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı. Total ünite ve spesifik aktivite değerleri hesaplandı.

#### **4.2.8.3 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidaz Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi**

Enzimatik tepkimelerin hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Ancak her zaman lineer bir gidiş elde etmek mümkün olmayabilir. Çünkü enzimlerin çoğu iyonlaşabilen aktivatör ve inhibitör bulundurabilirler. Düşük konsantrasyonlarda enzimde dayanıksızdır. Bazı enzimatik tepkimelerin ürünleride tepkimeyi inhibe edici özellik gösterebilirler. Bu nedenle enzim konsantrasyonunun artması bile tepkimeyi hızlandıramaz. Substrat konsantrasyonu ise; enzimatik tepkimenin hızını belli bir değere kadar arttırır, sonrası doygunluğa erişildiğinden hız genellikle artmaz [2].

5mg/5 ml den başlamak üzere, 10, 15, 20, 25 mg ONPG tartılarak 5' er ml substrat çözeltileri hazırlandı. S değerleri ONPG çözeltilisinin konsantrasyon değerlerini gösterirken, V değerleri ait olduğu S değerlerindeki total ünite değerlerini göstermektedir. Grafiğin kesim noktalarının ters ifadesi alınarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı.

#### **4.2.8.4 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Termal Kararlılığı**

İmmobilize enzim için en elzem karakterizasyonlardan biridir. İmmobilize enzimin endüstriye uygunluğu, bu çalışmayla yüksek oranda doğru orantılıdır.

İmmobilize  $\beta$ -galaktozidazın termal kararlılığını değerlendirmek için, kısmi saflaştırılmış enzim 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C sıcaklıklarda yarım saat inkübe edilip, optimum pH ta aktivite yöntemi uygulandı. Yöntem inkübe sıcaklığı olan 37°C de 30 dakikada, 5' er dakikada bir ölçüm alınarak, her sıcaklık için aynı işlemler tekrarlandı, total ünite değerleri hesaplandı.

#### 4.2.8.5 Hazırlanan Kitosan Boncukların Boyutlarının Hesaplanması

Hazırlanan kitosan boncukların çaplarını ölçmek için 5 ml hacmindeki mezüre bir miktar su konuldu. Bilinen sayıda boncuk mezüre eklenerek, mezürün hacmindeki artış ölçüldü [13], [65]. Kitosan boncukların çaplarını hesaplamak için, aşağıdaki formül kullanıldı.

$$4/3 \cdot \pi \cdot r^3 \cdot \text{Boncuk sayısı} = \text{Hacimdeki artış (4.2)}$$

Boncukların yaklaşık ağırlıklarını ölçmek için ise, tampon çözeltisinde bekletilen boncuklardan bir tanesi alınıp, temiz bir kağıt üzerinde üzerindeki sulu fazı uzaklaştırmak için bekletildi, kurduğuna karar verildikten sonra tartımı gerçekleştirildi.

#### 4.2.8.6 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Depo Kararlılığı

Depo kararlılığı immobilize enzimlerin uygulamalarını ilgilendiren önemli bir parametre olup, enzimi uzun süre saklama durumunda aktivitesindeki kaybın bir ölçüsüdür. Depo kararlılığını belirlemek amacıyla, 4°C' de saklanan serbest ve immobilize enzimlerden belirli zaman aralıklarında örnekler alındı ve aktivitelerine bakılarak karar verildi [13], [66].

#### 4.2.9 Çeşitli İyon ve Bileşiklerin İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Aktivitesi Üzerine Etkileri

Çalışmada yüzey aktif maddelerin, organik ve anorganik bileşiklerin kitosan boncuk üzerine adsorbsiyon yöntemiyle immobilize edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesi üzerine etkileri incelendi.

Organik bileşiklerin immobilize  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesine etkisini incelemek için 20 mM'lık etilen-diamintetraasetikasit (EDTA), 2-iyodoasetamid, üre,  $\beta$ -merkaptolanol, formaldehit, üre ve %1'lik sığır serum albümini (BSA) gibi organik bileşiklerin sudaki çözeltileri hazırlandı.

+1, +2 ve +3 değerlikli bazı anorganik bileşiklerin immobilize  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Bu nedenle +1 değerlikli Na, K, Ag iyonlarının immobilize  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesi üzerine etkisini incelemek için; NaCl, KI ve AgNO<sub>3</sub> bileşiklerinin 20 mM'lık, +2 değerlikli Fe, Ca, Cu, Mg, Li, Ni, Co ve Pb iyonlarını immobilize  $\beta$ -

galaktozidazın aktivitesi üzerine etkisini incelemek için;  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  ' in 20 mM'lık, +3 değerlikli Fe iyonunun immobilize  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesi üzerine etkisini incelemek için ise;  $\text{FeCl}_3$ 'ün 20 mM'lık çözeltileri hazırlandı.

Yüzey aktif maddelerin immobilize  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesine etkisini incelemek için; Tween-80 ve Triton X-100 gibi deterjanların sudaki %1'lik çözeltileri hazırlandı.

Bu bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkilerini tayin etmek için 100  $\mu\text{l}$  bileşiklerin sulu çözeltilerinden alındı. Üzerine 400  $\mu\text{l}$  enzim çözeltisi, 300 $\mu\text{l}$  substrat ve 100 $\mu\text{l}$  saf su eklendi. Hazırlanan çözeltinin manyetik karıştırıcının en düşük ayarında inkübasyonu sağlandıktan sonra, 37°C'deki su banyosunda 30 dakika bekletildi. Yarım saatlik su banyosundaki inkübasyon sonunda örneklerin üzerlerine belirli hacimde  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisinden eklenerek 410 nm' de köre karşı absorbanları ölçüldü, spesifik aktiviteleri hesaplandı.

### SONUÇLAR VE ÖNERİLER

*H. jecorinadan* kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -galaktozidazın adsorbsiyon yöntemi ile immobilizasyonunun gerçekleştirildiği bu çalışmada; adsorban madde olarak cam boncuk, kitosan boncuk, PEG 6000 kaplı kitosan boncuk, deniz kumu, silika, amberlit, bentonit, hidroksiapatit, selit, alümina kullanıldı. İmmobilize olan  $\beta$ -galaktozidazın değerlendirilmesi amacıyla, protein miktarı, total ünite ve spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Hesaplanan spesifik aktivite ve total ünite değerleri neticesinde immobilizasyon verimleri hesaplandı.

Tüm adsorbanlar çalışılıp, son olarak immobilizasyon verimleri hesaplandıktan sonra sonucun en iyi olduğu çalışma seçildi. Sonucun en iyi olduğu çalışmanın immobilize  $\beta$ -galaktozidazı için karakterizasyon özellikleri incelendi, bu özellikler serbest  $\beta$ -galaktozidaz ile karşılaştırıldı.

#### 5.1 $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyon Yöntemiyle İmmobilizasyonu

Adsorbsiyonla enzim immobilizasyonu kolay olmakla birlikte optimum koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa, bu durumda desorbsiyon sonucu enzim serbest halde tepkime ortamına geçer ve ürünlerin kirlenmesine neden olur. Enzim desorbsiyonu, özellikle substrat konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda hiç istenmeyen bir durumdur [66], [12].

Enzim ile taşıyıcı arasında tersinir bir yüzey etkileşimi gerçekleşmektedir. Adsorpsiyon, en basit ve uygun taşıyıcı kullanıldığı durumlarda ucuz bir immobilizasyon yöntemidir. Adsorbsiyon yönteminde enzim veya taşıyıcıda kimyasal değişim gerçekleşmemektedir.

Bu anlamda adsorpsiyon işlemi doğal biyolojik membranlarda oluşan duruma çok benzemekte ve bu tür sistemlerin modellenmesinde de kullanılmaktadır [16, 17, 18].

$\beta$ -galaktozidaz 212-300  $\mu\text{m}$  ve 2 mm boyutlarındaki cam boncuk üzerine, kitosan boncuk, PEG 6000 kaplı kitosan boncuk, amberlit, bentonit, deniz kumu, silika, hidroksi apatit, alümina ve selit üzerine immobilize edildi.

### **5.1.1 212-300 $\mu\text{m}$ Boyutundaki Cam Boncuk Üzerine *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının İmmobilizasyonu**

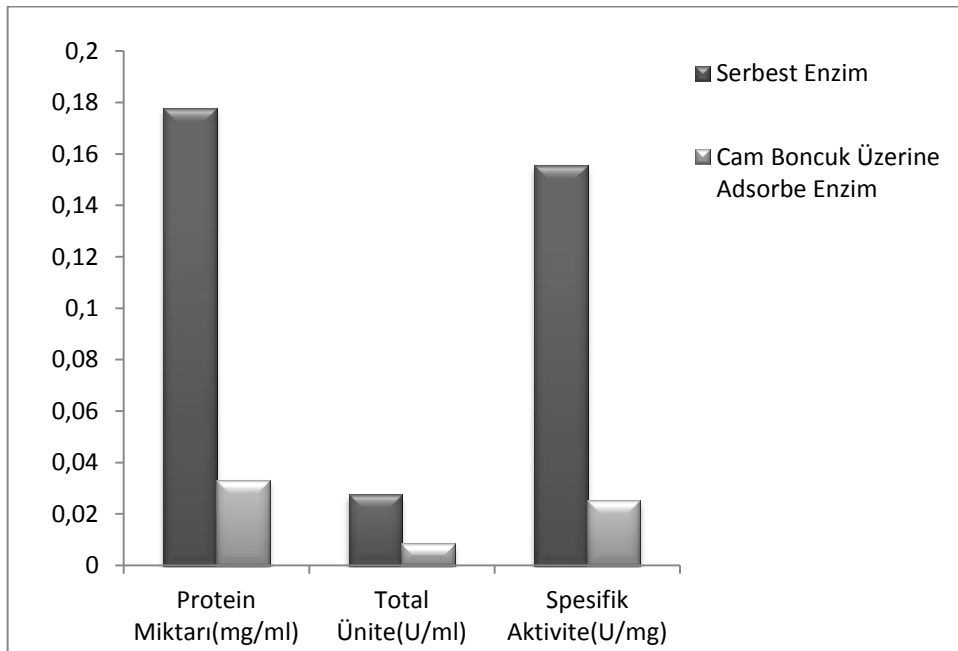
$\beta$ -Galaktozidazın 212-300  $\mu\text{m}$  boyutundaki cam boncuk üzerine adsorpsiyonu sonucunda elde edilen total ünite ve spesifik aktivite değerlerinin, serbest enzimin spesifik aktivite ve total ünite değerlerinden oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.1). İmmobilize  $\beta$ -galaktozidaz ile serbest  $\beta$ -galaktozidazın protein miktarları karşılaştırıldığında; immobilize enzimin % protein miktarı cinsinden verimi, % spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimine yakın değerlerde olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde 212-300  $\mu\text{m}$  boyutundaki cam boncuk üzerine  $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyon çalışması, enzimin aktivitesinin düştüğünü, istenilen verimin sağlanamadığını göstermiştir.

Adsorpsiyon işleminde bağlanma hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleriyle gerçekleştiğinden; adsorpsiyonun enzim üzerindeki bozucu etkisi kimyasal bağlanmaya göre çok daha azdır. Yani, enzim veya taşıyıcıda kimyasal değişim gerçekleşmemektedir. Bu durumda immobilize enzimin serbest enzime göre oldukça düşük aktivite gösterme sebebi; işlem sırasında enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetleri zayıf olduğundan adsorplanmış enzim taşıyıcıdan sızmış olabilir, ikinci bir gerekçe olarak da cam boncukların boyutunun oldukça küçük olması (212-300  $\mu\text{m}$ ) sebebiyle; yüzeye tutunma istenilen düzeyde sağlanamamış olabilir.

Çizelge 5.1 Cam boncuk üzerine (212-300 µm) adsorbe edilmiş β-galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Cam Boncuk (212-300 µm boyutunda) Üzerine Adsorbsiyon	0,033	8,36.10 <sup>-3</sup>	0,0253	16,28	18,55
Serbest Enzim	0,1779	0,0276	0,1554	-	-

212-300 µm boyutundaki cam boncuk üzerine β-galaktozidazın immobilizasyon çalışması için spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi %16,28 bulunurken, protein cinsinden immobilizasyon verimi %18,55 olarak bulunduğu çizelge 5.1' de gösterilmiştir.



Şekil 5.1 Cam boncuk üzerine (212-300 µm) immobilize edilen β-galaktozidazın ve serbest β-galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

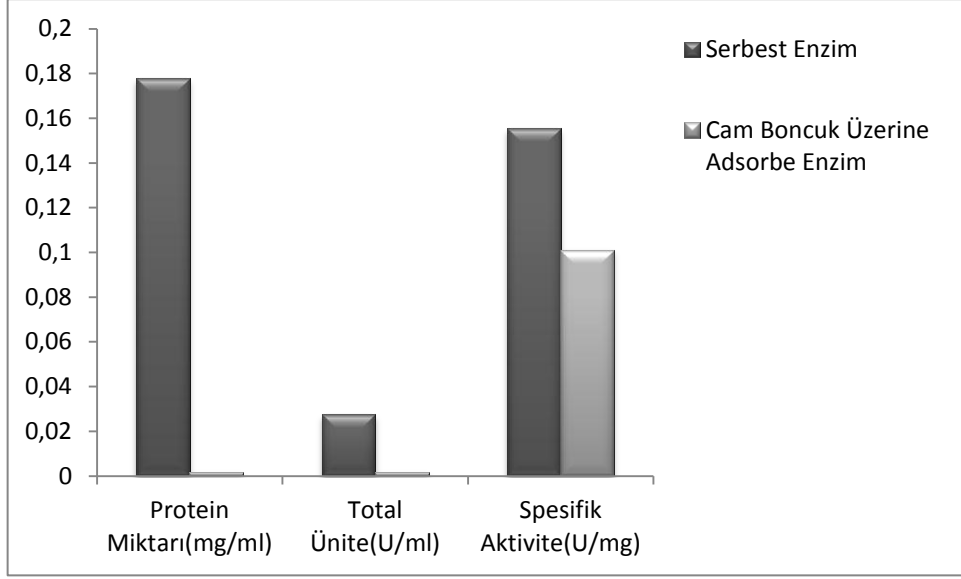
### 5.1.2 2mm Boyutundaki Cam Boncuk Üzerine *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu

$\beta$ -Galaktozidazın 2 mm boyutundaki cam boncuk üzerine adsorbsiyonu sonucunda elde edilen total ünite değerinin, serbest enzimin total ünite değerinden oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.2) . Fakat immobilize  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite değerinin serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite değeri arasında çok büyük bir fark olmadığı görüldü. Protein miktarları karşılaştırıldığında ise; spesifik aktivite kıyaslamasının tersi bir şekilde, immobilize  $\beta$ -galaktozidazın protein miktarı ile serbest  $\beta$ -galaktozidazın protein miktarı birbirlerinden çok farklı hesaplandı, bu durum immobilizasyon veriminin oldukça düşük eldesine sebebiyet verdi (Çizelge 5.2). Adsorpsiyon işleminde bağlanma hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleriyle gerçekleştiğinden; adsorpsiyonun enzim üzerindeki bozucu etkisi kimyasal bağlanmaya göre çok daha azdır. Yani, enzim veya taşıyıcıda kimyasal değişim gerçekleşmemektedir, çalışmada da 2mm boyutundaki cam boncuk üzerine immobilize olan  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesini koruduğu söylenebilir. Total ünite değerinin oldukça düşük çıkması; substratın enzimin aktif merkezine bağlanmasının iyi bir şekilde gerçekleşmediğinin kanıtı olarak gösterilebilir.

Çizelge 5.2 Cam boncuk üzerine (2mm) adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Cam Boncuk (2 mm boyutunda)Üzerine Adsorbsiyon	$1,83 \cdot 10^{-3}$	$1,83 \cdot 10^{-4}$	0,1011	65,05	1,028
Serbest Enzim	0,1779	0,0276	0,1554	-	-

2 mm boyutundaki cam boncuk üzerine  $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyon çalışması için spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi % 65,05 bulunurken, protein cinsinden immobilizasyon verimi %1,02 olarak bulunduğu çizelge 5.2' de gösterilmiştir.



Şekil 5.2 Cam boncuk üzerine (2 mm) immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

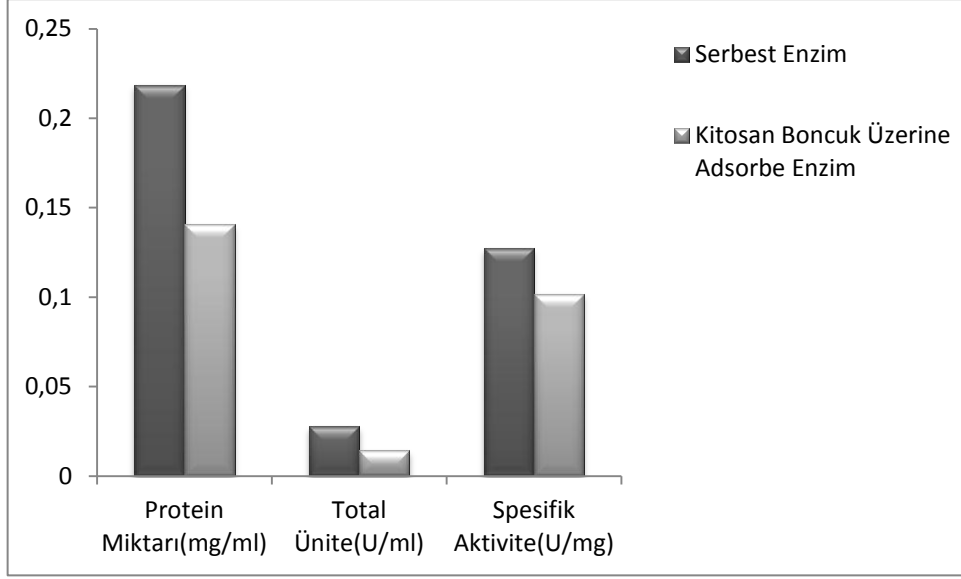
### 5.1.3 Kitosan Boncuk Üzerine *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu

$\beta$ -Galaktozidazın kitosan boncuk üzerine adsorbsiyonu sonucunda elde edilen total ünite ve spesifik aktivite değerleri, serbest enzimin spesifik aktivite ve total ünite değerlerine yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.2). Immobilize  $\beta$ -galaktozidaz ile serbest  $\beta$ -galaktozidazın protein miktarları karşılaştırıldığında; protein miktarı değerlerinin arasında da çok büyük bir fark olmadığı görülmüştür. Elde edilen immobilizasyon verimleri sonucunda da  $\beta$ -galaktozidazın adsorbsiyonu için kitosan iyi bir taşıyıcıdır denilebilir.  $\beta$ -galaktozidaz ve kitosan arasında bağlanmanın sağlandığı hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri gibi zayıf kuvvetlere rağmen; immobilize enzimin aktivitesinin serbest enzimin aktivitesine yakın bir değerde çıkması, işlem sırasında optimum adsorbsiyon koşullarının sağlanabildiğini göstermektedir. Ayrıca kitosanın yapısının,  $\beta$ -galaktozidazın yapısına biyouyumlu bir bağlanma sağladığı anlaşıldı.

Çizelge 5.3 Kitosan boncuk üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

<b>İmmobilizasyon Yöntemi</b>	<b>Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)</b>	<b>Enzimin Total Ünitesi (U/ml)</b>	<b>Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)</b>	<b>% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)</b>	<b>% Verim (Protein Cinsinden)</b>
<b>Kitosan Boncuk Üzerine Adsorbsiyon</b>	0,1404	0,0143	0,1018	80,03	64,19
<b>Serbest Enzim</b>	0,2187	0,0278	0,1272	-	-

Kitosan boncuk üzerine  $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyon çalışması için spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi % 80,03 bulunurken, protein cinsinden immobilizasyon verimi % 64,19 olarak bulunduğu çizelge 5.3' de gösterilmiştir. Çizelge 5.3' de de görüldüğü üzere immobilize enzimin total ünitesi yaklaşık olarak serbest enzimin total ünitesinin yarısı değerindedir, bu kıyaslama ile  $\beta$ -galaktozidazın kitosana tutunmasının ne derecede iyi gerçekleştiği ve enzimin aktif merkezinin bozunma olasılığının olmadığı söylenebilir.  $\beta$ -galaktozidazın kitosana tutunma derecesinin sağlamlığı, kitosan moleküllerinin enzimlerin amin ve karboksil gruplarını bağlama kabiliyetinden dolayı olduğu ileri sürülebilir. Kitinden üretilen modifiye bir polisakkarit olan kitosan selüloza benzeyen yapısı dolayısıyla sağlamlık ölçüsü yüksektir.  $\beta$ -Galaktozidazın immobilizasyonu sırasında ve sonrasında elastiki ve dayanıklı yapı özelliğini kaybetmediği için, immobilize  $\beta$ -galaktozidaz için kitosan adsorbanı üzerine karakterizasyon çalışması gerçekleştirildi.



Şekil 5.3 Kitosan boncuk üzerine immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

#### 5.1.4 PEG 6000 Kaplı Kitosan Boncuklara *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu

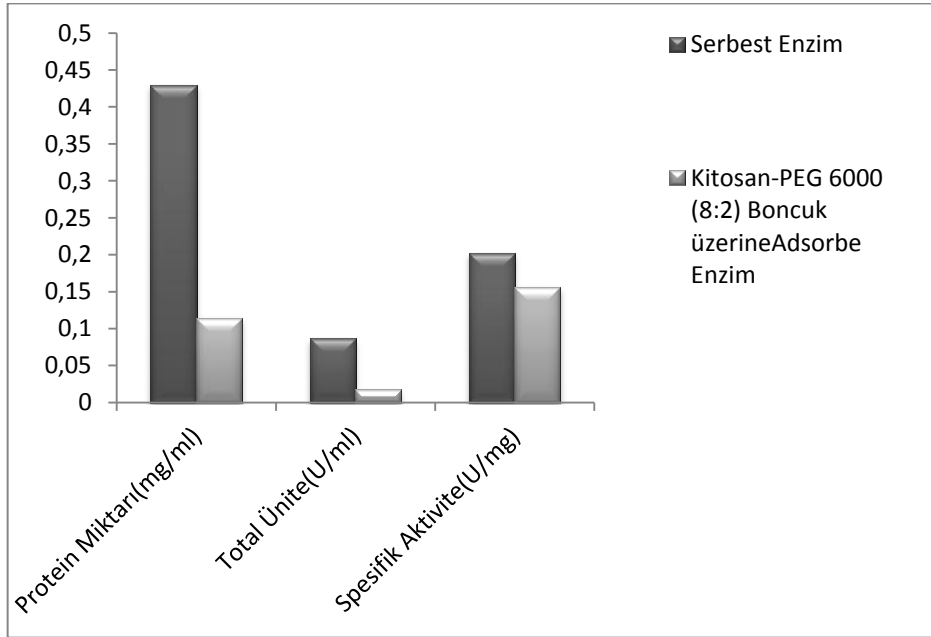
Kitosan-PEG 6000 (8:2) boncuk üzerine  $\beta$ -galaktozidazın adsorbsiyonu sonucunda spesifik aktivite değeri serbest enzimin spesifik aktivite değerine yakın bir değerde bulundu. Serbest enzim ve immobilize enzimin total ünite ve protein miktarı değerleri arasında belirgin bir fark gözlenmese de, çok yakın değerler gözlenmediği incelenmiştir (Çizelge 5.4).

Adsorpsiyon işleminde bağlanma hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleriyle gerçekleştiğinden; adsorpsiyonun enzim üzerindeki bozucu etkisi kimyasal bağlanmaya göre çok daha azdır. Çalışmada da kitosan-PEG 6000 (8:2) boncuk üzerine immobilize olan  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesini koruduğu söylenebilir. Kitosanı PEG 6000 ile kaplayıp, elektrostatik kuvveti arttırmaya çalışarak bağlanmanın etkisinin artırılması amaçlandı. Fakat total ünite değerinin oldukça düşük çıkması; enzimin aktif merkezine substratın bağlanmasının az olduğunu yada istenilen düzeyde gerçekleştirilemediğini düşündürebilir. Bağlanma enzimin aktif merkezi dışında bir bölgeden gerçekleşmiş olabilir.

Çizelge 5.4 Kitosan-PEG 6000 (8:2) boncuk üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Kitosan-PEG 6000 (8:2) Boncuk Üzerine Adsorbsiyon	0,1147	0,018	0,1567	77,38	26,67
Serbest Enzim	0,4300	0,0871	0,2025	-	-

Kitosan-PEG 6000 (8:2) boncuk üzerine  $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyon çalışması için spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi % 77,38 bulunurken, protein cinsinden immobilizasyon verimi % 26,67 olarak bulunduğu çizelge 5.4' de gösterilmiştir.



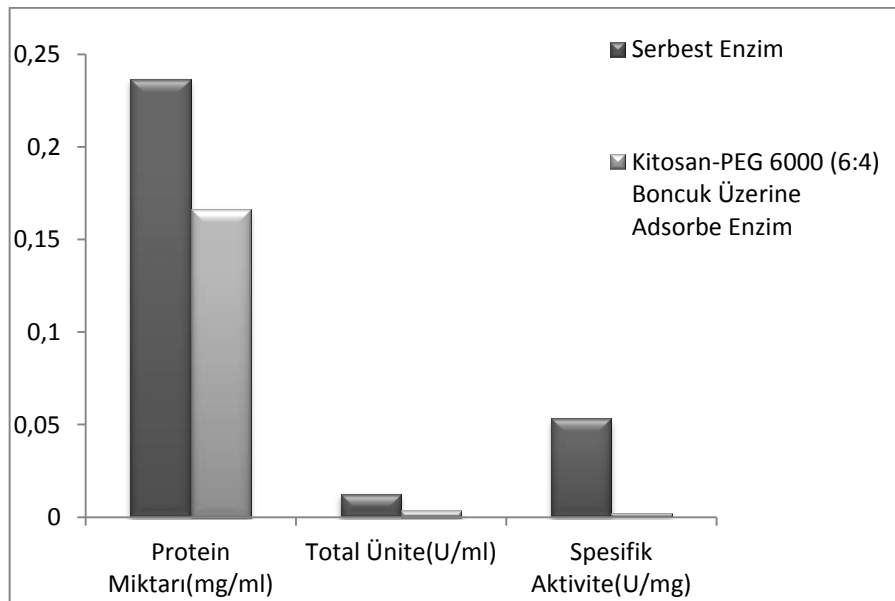
Şekil 5.4 Kitosan-PEG 6000 (8:2) boncuk üzerine immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

Kitosan-PEG 6000 karışımı için; (6:4) ve (7:3) oranları da çalışıldı. Bu oranlarda oluşturulan boncuklara immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve total ünite değerleri serbest enzime kıyasla oldukça düşük bulundu (Çizelge 5.5 ve 5.6).

Çizelge 5.5 Kitosan-PEG 6000 (6:4) boncuk üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Kitosan-PEG 6000 (6:4) Boncuk Üzerine Adsorbsiyon	0,1666	$3,5 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-3}$	4,0	70,0
Serbest Enzim	0,2369	0,0126	0,0535	-	-

Kitosan-PEG 6000 (6:4) boncuk üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite cinsinden % verimi 4,0 iken, protein cinsinden % verimi 70,0 olarak bulunduğu çizelge 5.5' de gösterilmiştir. % 4,0 kadar düşük bir immobilizasyon verimi için bağlanmanın gerçekleşmediği söylenebilir.

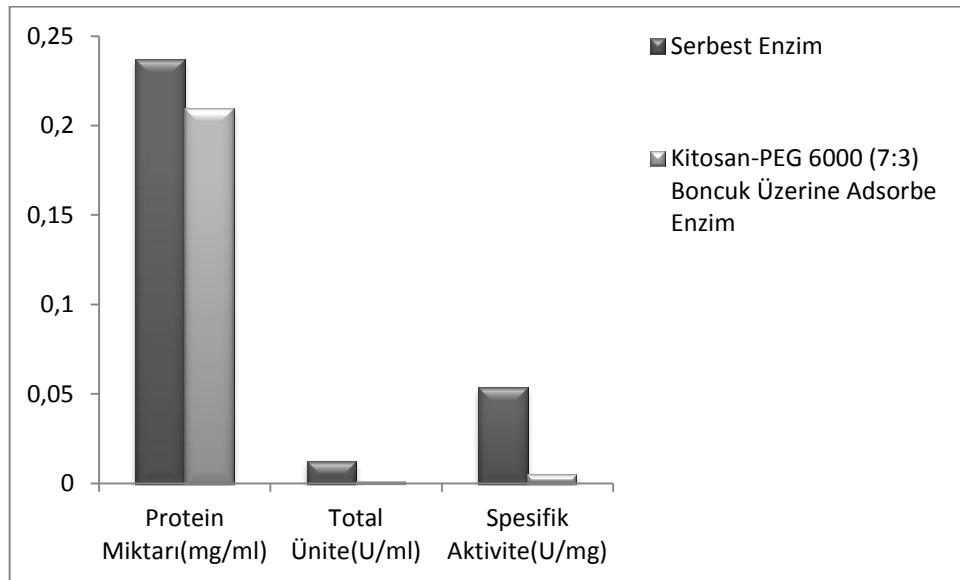


Şekil 5.5 Kitosan-PEG 6000 (6:4) boncuk üzerine immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 5.6 Kitosan-PEG 6000 (7:3) boncuk üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
<b>Kitosan-PEG 6000 (7:3) Boncuk Üzerine Adsorbsiyon</b>	0,2100	$1,05 \cdot 10^{-3}$	$5,02 \cdot 10^{-3}$	9,3	88,6
<b>Serbest Enzim</b>	0,2369	0,0126	0,0535	-	-

Kitosan-PEG 6000 (7:3) boncuk üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite cinsinden % verimi 9,3; kitosan-PEG 6000 (6:4) boncuk üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite cinsinden verimine kıyasla daha iyi sonuç verdiği bulundu (Çizelge 5.6). Bu % 9,3 spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi ve oldukça düşük total ünite değerinden dolayı immobilizasyonun gerçekleşemediği düşünüldü.



Şekil 5.6 Kitosan-PEG 6000 (7:3) boncuk üzerine immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

Kitosan-PEG 6000 (6:4) ve (7:3) oranlarının  $\beta$ -galaktozidazın adsorbsiyonu için uygun oranlar olmadığı kanısına varıldı. Serbest  $\beta$ -galaktozidaz ile immobilize  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve total ünite değerlerinin birbirlerinden çok farklı olduğu görüldü,

buna nazaran protein miktarları birbirlerine çok yakın değerler olarak bulundu. Adsorbsiyonun gerçekleşmediği enzimin oluşturulan boncuklara tutunmadan ortamda serbest bir şekilde kaldığı düşünülebilir.

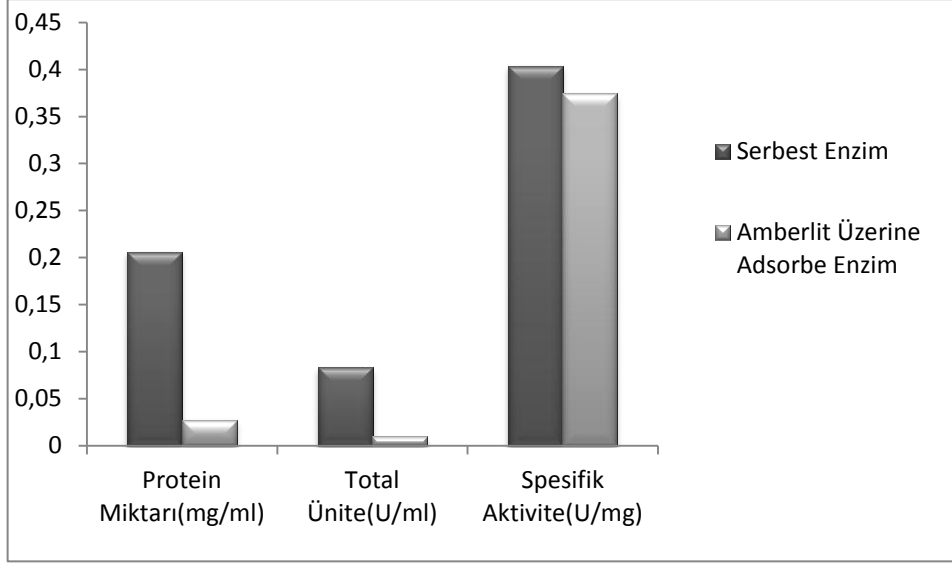
### 5.1.5 Amberlit-XAD16 Üzerine *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu

$\beta$ -Galaktozidazın amberlit-XAD16 üzerine adsorbsiyonu sonucunda elde edilen total ünite ve spesifik aktivite değerleri, serbest enzimin spesifik aktivite ve total ünite değerlerine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.7). İmmobilize  $\beta$ -galaktozidaz ile serbest  $\beta$ -galaktozidazın protein miktarları karşılaştırıldığında; oranların düşük olduğu gözlemlenmiştir. Amberlit-XAD16 üzerine  $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyon çalışmasında enzimin aktivitesinin istenilen verime yaklaştığı söylenebilir. Adsorpsiyon işleminde bağlanma hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleriyle gerçekleştiğinden; adsorpsiyonun enzim üzerindeki bozucu etkisi kimyasal bağlanmaya göre çok daha azdır. Yani, enzim veya taşıyıcıda kimyasal değişim gerçekleşmemektedir. Bu duruma dayalı olarak,  $\beta$ -galaktozidazın amberlit-XAD16 üzerine varsayılan bağlanma kuvvetleriyle bağlandığı düşünüldü.

Çizelge 5.7 Amberlit-XAD16 üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Amberlit-XAD16 Üzerine Adsorbsiyon	0,0275	0,0103	0,3745	92,7	13,3
Serbest Enzim	0,2058	0,0830	0,4037	-	-

Çizelge 5.7' de de görüldüğü üzere spesifik aktivite cinsinden % 92,7 verim sağlanmıştır. Spesifik aktivitesini neredeyse koruyan  $\beta$ -galaktozidaz için immobilizasyonun gerçekleştiği ortamın optimizasyon şartlarının sağlandığı ve bu en uygun koşulların immobilizasyon sonrasında korunduğu kanıtlandı. Geniş yüzey alanlı, büyük ve homojen dağılımlı gözeneğe sahip olan amberlit-XAD16'nın  $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyonu için uygun bir adsorban olduğu söylenebilir.



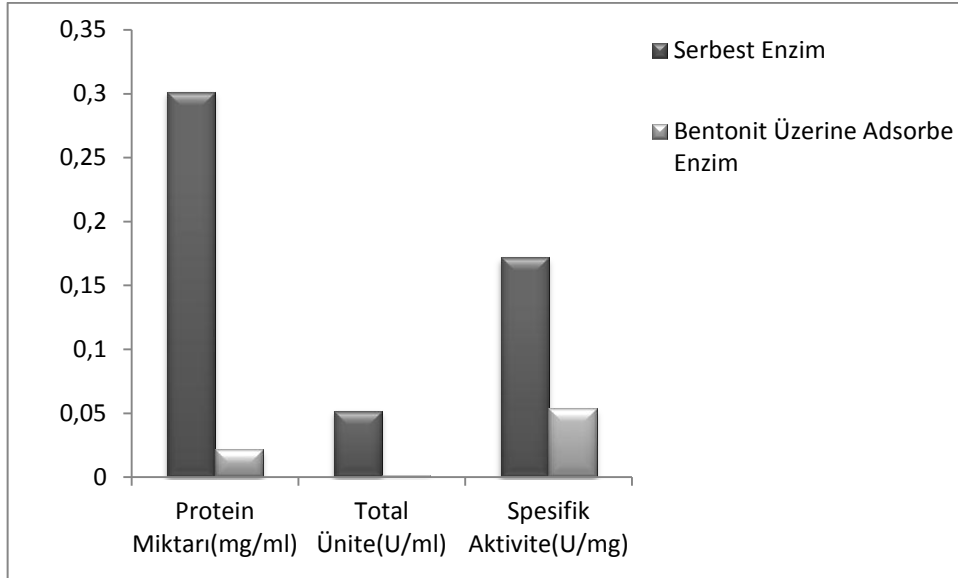
Şekil 5.7 Amberlit-XAD16 üzerine immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

#### 5.1.6 Bentonit Üzerine *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu

$\beta$ -Galaktozidazın bentonit üzerine adsorbsiyonu sonucunda tayin edilen spesifik aktivite, total ünite ve protein miktarı değerlerine bakıldığında; serbest  $\beta$ -galaktozidaz için aynı değerler arasında çok büyük bir fark olduğu gözlemlendi (Şekil 5.8). Bu durumda bentonitin  $\beta$ -galaktozidazın adsorbsiyonu için uygun bir adsorban olmadığı anlaşıldı. Çizelge 5.8' de gösterilen spesifik aktivite (% 31,17) ve protein miktarları (% 7,06) cinsinden hesaplanan % verimler immobilizasyon işlemi için yeterli olmadığı görüldü. Bir çeşit kil olan bentonitin biyoyumlu bir adsorban olduğu bilindiği için, düşük aktivite sebebi olarak, kilin kompoz yapısına zayıf bağlanma kuvvetlerinin üstün gelemediği düşünüldü. Ayrıca enzim çözeltilisini emme özelliğine sahip olan bentonitten immobilize  $\beta$ -galaktozidaz ürününü ayırmak kolay olmadığından, sağlıklı bir değerlendirme söz konusu değildir kanısına varıldı.

Çizelge 5.8 Bentonit üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Bentonit Üzerine Adsorbsiyon	0,0213	$1,14 \cdot 10^{-3}$	0,0535	31,17	7,06
Serbest Enzim	0,3013	0,0517	0,1716	-	-



Şekil 5.8 Bentonit üzerine immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

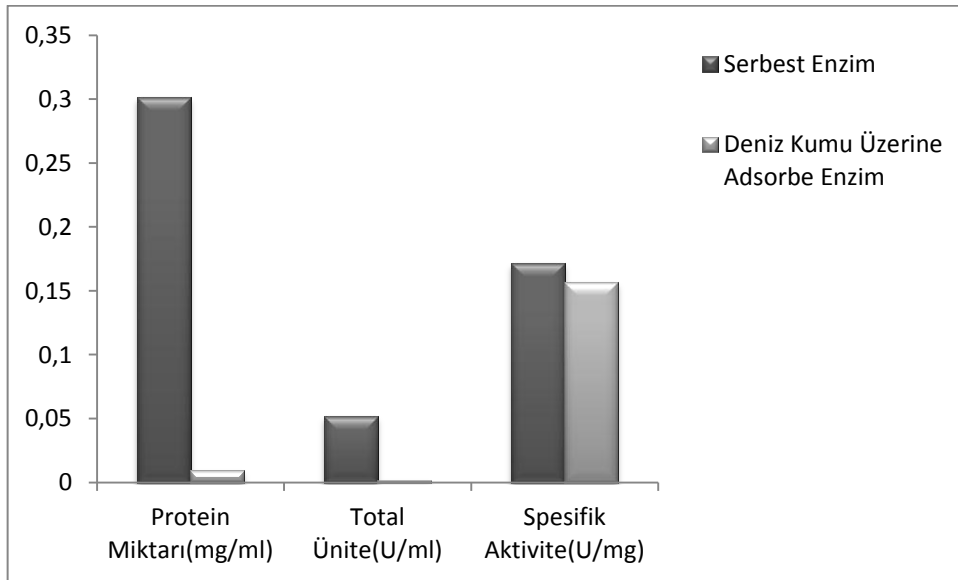
### 5.1.7 Deniz Kumu Üzerine *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu

Deniz kumu üzerine  $\beta$ -galaktozidazın adsorbsiyonu sonucunda spesifik aktivite değeri serbest enzimin spesifik aktivite değerine yakın bir değerde bulundu. Serbest enzim ve immobilize enzimin total ünite ve protein miktarı değerleri arasında belirgin bir fark gözlemlendi (Çizelge 5.9). Çizelge 5.9’da da görüldüğü üzere spesifik aktivite cinsinden % verim 91,4 iken, protein cinsinden % verim 3,18 olarak bulundu.

Çizelge 5.9 Deniz kumu üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Deniz Kumu Üzerine Adsorbsiyon	$9,6 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	0,1569	91,4	3,18
Serbest Enzim	0,3013	0,0517	0,1716	-	-

Adsorpsiyon işleminde bağlanma hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleriyle gerçekleştiğinden; adsorpsiyonun enzim üzerindeki bozucu etkisi kimyasal bağlanmaya göre çok daha azdır. Çalışmada da yapı formülünde  $\text{SiO}_2$  içeren deniz kumu üzerine immobilize olan  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesini koruduğu söylenebilir. Ortamın optimum koşulları sağlandığı, ve bu koşulları deniz kumu üzerine immobilize olan  $\beta$ -galaktozidazın koruduğu görüldü. Serbest enzime kıyasla oldukça düşük değerde hesaplanan total ünite değeri,  $\beta$ -galaktozidazın aktif merkezinin substratı ile dolu olmadığının göstergesi olabileceği düşünüldü.



Şekil 5.9 Deniz kumu üzerine immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

### 5.1.8 Silika Üzerine *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu

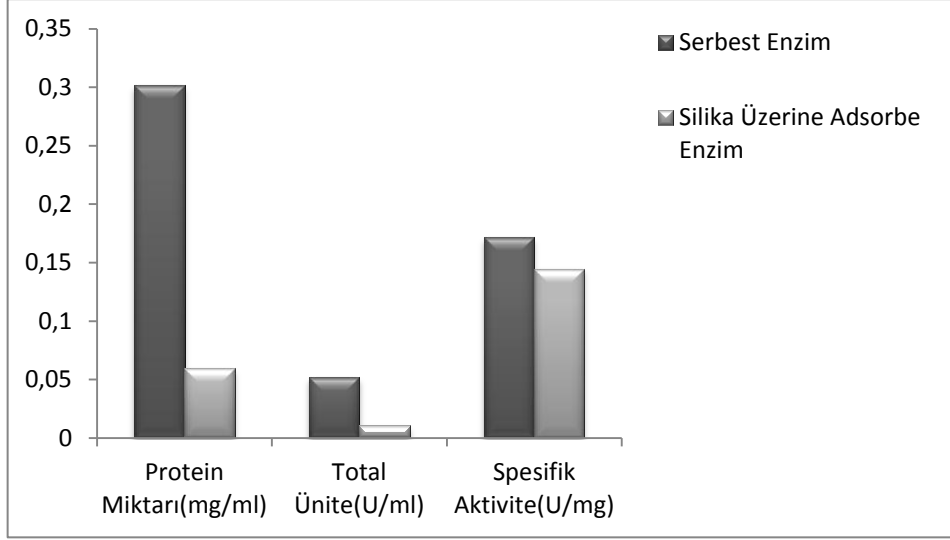
$\beta$ -Galaktozidazın silika üzerine adsorbsiyonu sonucunda elde edilen spesifik aktivite değerinin serbest enzimin spesifik aktivite değerine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.10). İmmobilize  $\beta$ -galaktozidaz ile serbest  $\beta$ -galaktozidazın protein miktarları karşılaştırıldığında; oranların düşük olduğu gözlemlenmiştir, total ünite değerleri arasında ise belirgin bir fark olmadığı hesaplandı. Silika üzerine  $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyon çalışmasında enzimin aktivitesinin istenilen verime yaklaştığı söylenebilir.

Çizelge 5.10 Silika üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Silika Üzerine Adsorbsiyon	0,0596	0,0103	0,1446	84,2	19,7
Serbest Enzim	0,3013	0,0517	0,1716	-	-

Şekil 5.10' da da görüldüğü üzere immobilize enzimin total ünitesinin serbest enzimin total ünitesinden çok düşük olması  $\beta$ -galaktozidazın aktif merkezinin substratı ile tam dolu olmadığı şeklinde düşünüldü. Ayrıca silikanın yapısı itibarıyla, enzim çözeltisinin içinde şişme kabiliyetinin fazla olması, immobilizasyon için istenmeyen bir adsorban olduğunu göstermiş oldu.

Spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi % 84,2 olarak hesaplanması, enzimin aktivasyonunu gerçekleştirmesi için gerekli olan optimum ortam koşullarının sağlandığını kanıtlamıştır.



Şekil 5.10 Silika üzerine immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

### 5.1.9 Hidroksiapatit Üzerine *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu

$\beta$ -Galaktozidazın hidroksiapatit üzerine adsorbsiyonu sonucunda elde edilen total ünite değerleri ve protein miktarları değerlerinin serbest enzimin aynı değerlerine kıyasla oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.11).

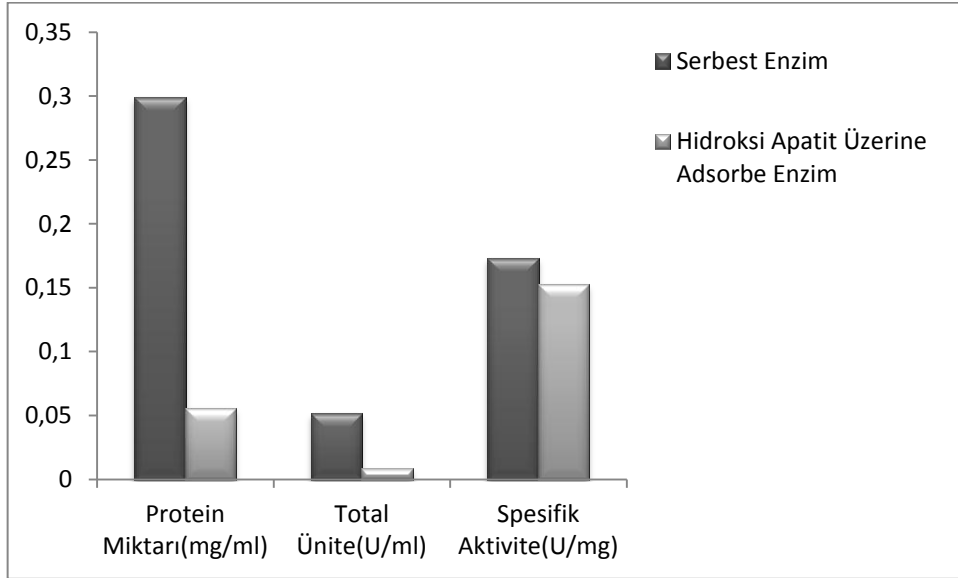
İmmobilize  $\beta$ -galaktozidazın % spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi % 88,0 bulundu. Bu veriler ışığında serbest enzimin immobilize olduktan sonra da aktivitesini koruduğu düşünüldü.

Çizelge 5.11 Hidroksiapatit üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Hidroksiapatit Üzerine Adsorbsiyon	0,0558	$8,5 \cdot 10^{-3}$	0,1523	88,0	18,6
Serbest Enzim	0,2987	0,0516	0,1727	-	-

Serbest enzime kıyasla total ünite değerinin düşük değerlerde çıkması biyoaktif yapıda bir biyomateryal olan hidroksiapatitin  $\beta$ -galaktozidaza bağlanma kuvvetlerinin zayıflığı gösterilebilir. Doğada elmadan sonra bilinen en sert molekül olan hidroksiapatit

bileşiminin oluşumu için gerekli olan kinetiklerinin, Na-fosfat tamponunun konsantrasyonu kullanılarak önemli ölçüde arttırıldığı çalışılmıştır [61]. Bu çalışma,  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesi için 0,1 N Na-fosfat tamponunda hazırlanan substrat çözeltisinin, hidroksi apatit adsorbani için uyumunu sağlamış olduğunu kanıtladı.



Şekil 5.11 Hidroksiapatit üzerine immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

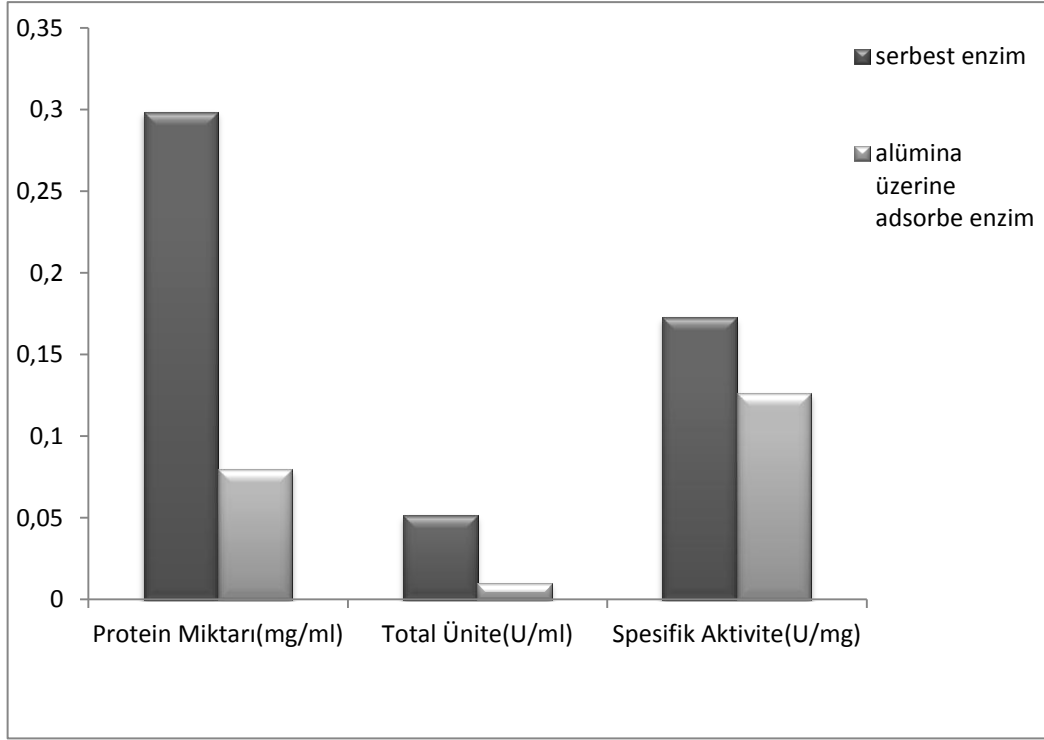
#### 5.1.10 Alümina Üzerine *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbsiyonu

$\beta$ -Galaktozidazın alümina üzerine adsorbsiyonu sonucunda tayin edilen spesifik aktivite, total ünite ve protein miktarı değerlerine bakıldığında; serbest  $\beta$ -galaktozidazın aynı değerleri arasında çok büyük bir fark olduğu gözlemlendi (Şekil 5.12). Bu durumda alüminanın  $\beta$ -galaktozidazın adsorbsiyonu için uygun bir adsorban olmadığı anlaşıldı.

Çizelge 5.12' de gösterilen spesifik aktivite (% 36,8) ve protein miktarları (%22,4) cinsinden hesaplanan % verimlerin immobilizasyon işlemi için yeterli olmadığı, immobilize  $\beta$ -galaktozidazın total ünite ve spesifik aktivite değerinin serbest enzimin aynı değerlerinin çok altında olduğu gözlemlendi. Bu durumun gerekçesi olarak; enzim alüminaya adsorbe olurken, alüminanın enzimi inhibe ederek, aktivite göstereceği katalitik bölgelerini inaktif ettiği kanısına varıldı.

Çizelge 5.12 Alümina üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Alümina Üzerine Adsorbisyon	0,0669	$4,38 \cdot 10^{-3}$	0,0636	36,8	22,4
Serbest Enzim	0,2987	0,0516	0,1727	-	-



Şekil 5.12 Alümina üzerine immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

### 5.1.11 Selit Üzerine *Hypocrea Jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının Adsorbisyonu

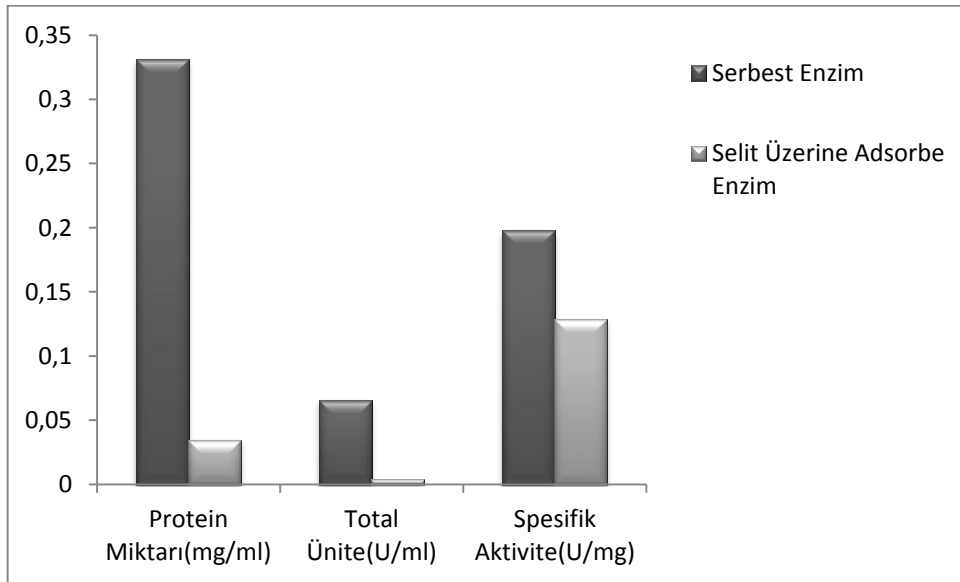
$\beta$ -Galaktozidazın selit üzerine adsorbisyonu sonucunda tayin edilen total ünite ve protein miktarı değerlerine bakıldığında; serbest  $\beta$ -galaktozidaz için aynı değerler arasında çok büyük bir fark olduğu gözlemlendi (Şekil 5.13). Serbest  $\beta$ -galaktozidaz ile immobilize  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite değerleri kıyaslandığında belirgin bir fark

olmadığı, enzimin immobilizasyon işlemi sırasında aktivitesini kısmende olsa koruduğu gösterildi.

Çizelge 5.13 Selit üzerine adsorbe edilmiş  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite ve protein cinsinden immobilizasyon verim yüzdeleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Selit Üzerine Adsorbsiyon	0,0348	$4,48 \cdot 10^{-3}$	0,1287	65,1	10,5
Serbest Enzim	0,3317	0,0655	0,1977	-	-

$\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi çizelge 5.13'de de görüldüğü üzere % 65,1 olarak hesaplandı. Kısmende olsa spesifik aktivite cinsinden iyi bir immobilizasyon verimi yakalandığı düşünülebilir. Enzim çözeltisiyle homojen karışımı çok kolay sağlanamayan selitten immobilize  $\beta$ -galaktozidaz ürününü ayırmakta kolay olmadığından, selitin  $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyonu için çok popüler bir adsorban olamayacağı olasılığı değerlendirildi.



Şekil 5.13 Selit üzerine immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın ve serbest  $\beta$ -galaktozidazın spesifik aktivite, protein ve total ünite değerlerinin karşılaştırılması

## 5.2 $\beta$ -Galaktozidaz için En Uygun Adsorbsiyon Yönteminin Belirlenmesi

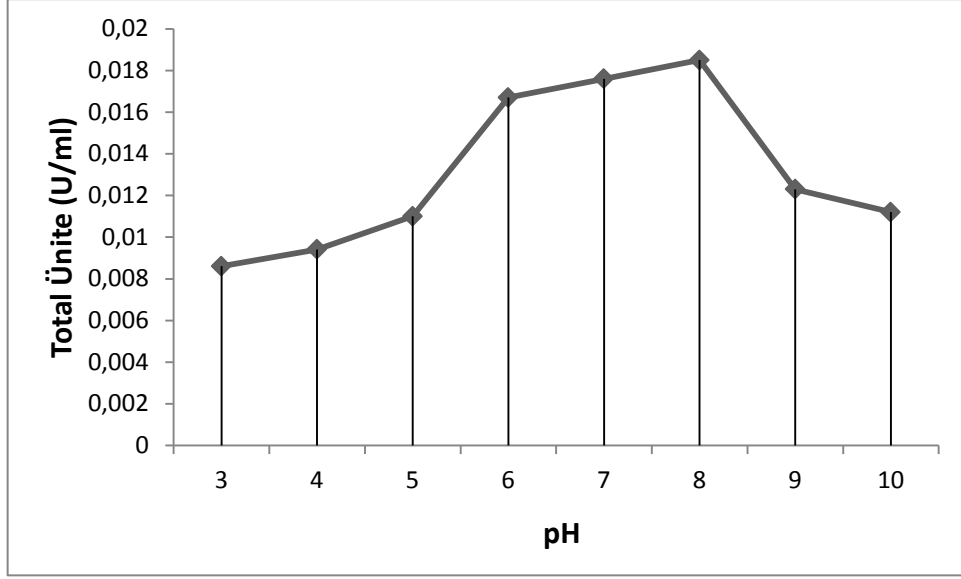
$\beta$ -Galaktozidazın farklı taşıyıcılar kullanılarak, adsorbsiyonun sağlandığı immobilizasyon çalışmaları; spesifik aktivite, total ünite ve protein değerleri açısından değerlendirildi. İmmobilize  $\beta$ -galaktozidaz için elde edilen total ünite, spesifik aktivite ve protein değerleri, kısmi saflaştırılmış serbest  $\beta$ -galaktozidazın aynı parametredeki değerleri ile kıyaslanarak; immobilizasyon verimleri hesaplandı. Spesifik aktivite ve protein değerleri açısından immobilizasyon verimleri göz önüne alınarak, % verimlerin kitosan boncuk üzerine gerçekleştirilen immobilizasyonda yüksek olması sebebiyle uygun bir yöntem olduğuna karar verildi. Ayrıca yüksek total ünite değeri, enzimin aktif merkezinde substratı ile bağlanma kuvvetlerini gerçekleştirdiğini gösterdi. Bazik ortamda oluşturulan kitosan boncukların immobilizasyon öncesinde, sırasında ve sonrasında yapılarını koruduklarının gözlemlenmesi, immobilizasyonda kullanılan taşıyıcılarda aranan mekanik kararlılık özelliğini sağladığını kanıtlar, yöntemin uygunluğuna karar vermemize yardımcı olan bu faktörde önemlidir. Kitosanın elastikiyetinin  $\beta$ -galaktozidazın adsorbsiyonu için yeterli olduğu görüldü, elastikiyetinin yeterli olması ve şişme kabiliyetinin düşük olması, yıkama işlemleri sırasında daha az çatlamalara uğramasını sağlamıştır. Bütün kıyaslamalar değerlendirildiğinde  $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyonu için en uygun yöntemin, kitosan boncuklar üzerine adsorbsiyon olduğuna karar verildi.

## 5.3 Kitosan Boncuklara İmmobilize Edilmiş $\beta$ -Galaktozidazın Kimyasal ve Fiziksel Özelliklerinin Belirlenip, Karakteristiğinin Saptanması

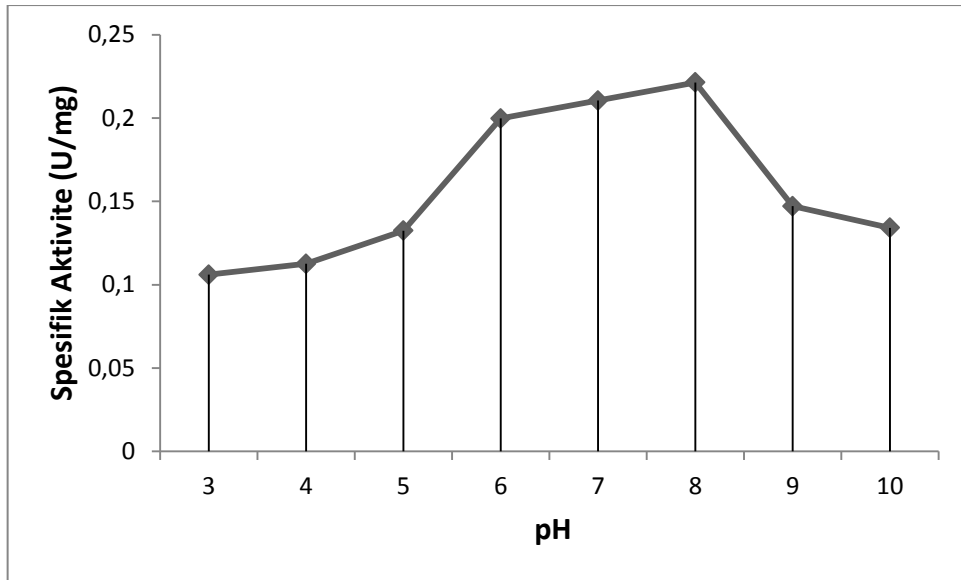
### 5.3.1 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Üzerine pH Etkisi

Biyokimyasal tepkimeler sulu ortamlarda gerçekleştiği için, pH biyokimyasal tepkimelerden sorumlu olan katalizörün iyon, yük durumunu etkileyen en önemli faktördür.

*Hypocrea jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının optimum pH' ı 7.0 olarak bulunmuştur [5]. Şekil 5.14 ve Şekil 5.15' te pH'ın immobilize  $\beta$ -galaktozidaz üzerine olan etkisi, total ünite ve spesifik aktivite cinsinden gösterildi. Deneysel değerlendirmeyi teorik açıdan gözlemleyebilmek, serbest  $\beta$ -galaktozidaz ile immobilize  $\beta$ -galaktozidazı mukayese edebilmek için; Şekil 5.16 ve Şekil 5.17' de de pH' ın serbest  $\beta$ -galaktozidaz üzerine olan etkisinde incelendi.

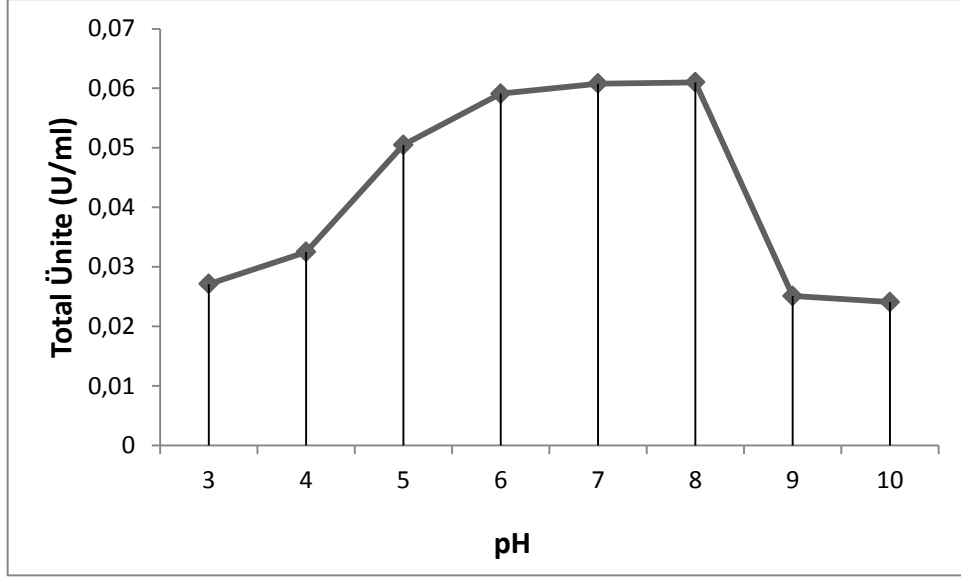


Şekil 5.14 Kitosan boncuklara adsorbe edilmiş immobilize  $\beta$ -galaktozidazın optimum pH' ı ve total ünite değerleri

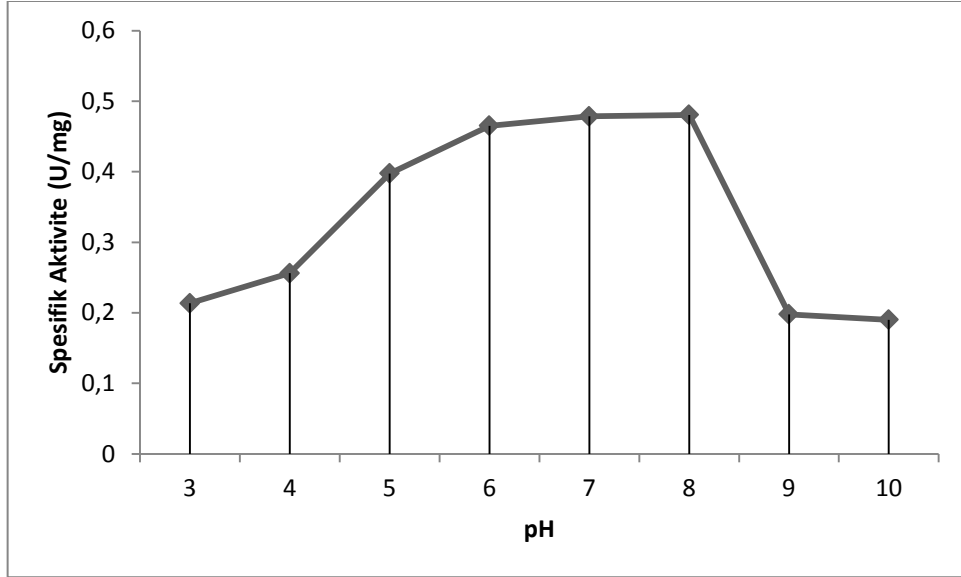


Şekil 5.15 Kitosan boncuklara adsorbe edilmiş immobilize  $\beta$ -galaktozidazın optimum pH' ı ve spesifik aktivite değerleri

Kitosan boncuklara immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın optimum pH' ı 8 olarak incelendi. pH 8 değerinde immobilize enzimin total ünite ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla; 0,0185 U/ml ve 0,2213 U/mg olarak hesaplandı.



Şekil 5.16 Serbest  $\beta$ -galaktozidazın optimum pH' ı ve total ünite değerleri



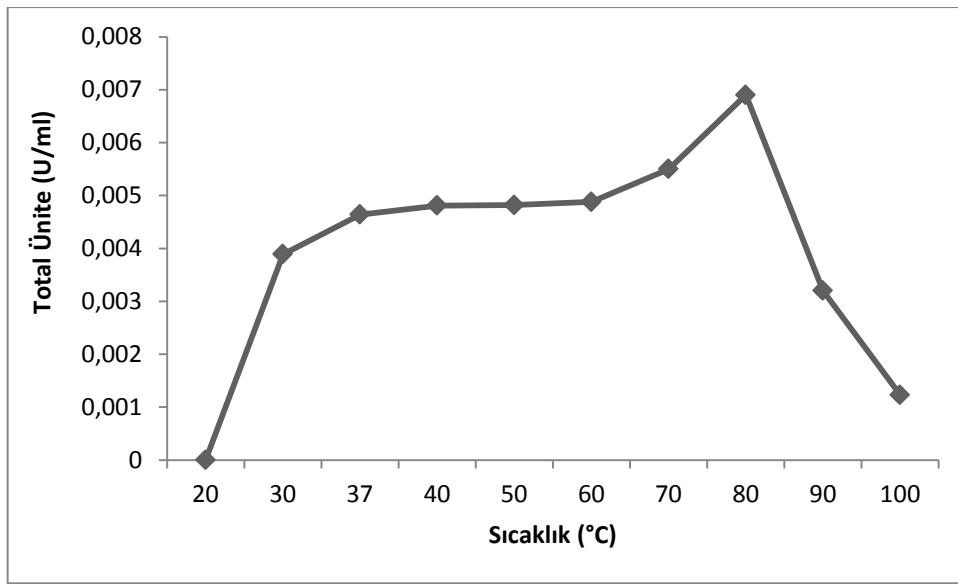
Şekil 5.17 Serbest  $\beta$ -galaktozidazın optimum pH' ı ve spesifik aktivite değerleri

Şekil 5.16 ve şekil 5.17' de de görüldüğü gibi, serbest  $\beta$ -galaktozidaz optimum pH' ını 7 ve 8 arasında bir değerde yakaladı. Literatür çalışmaları da optimum pH' ı 7 olarak doğrular niteliktedir [5]. pH 7 değerinde serbest  $\beta$ -galaktozidazın total ünite değeri 0,0610 U/ml, spesifik aktivite değeri 0,4805 U/mg olarak bulundu.

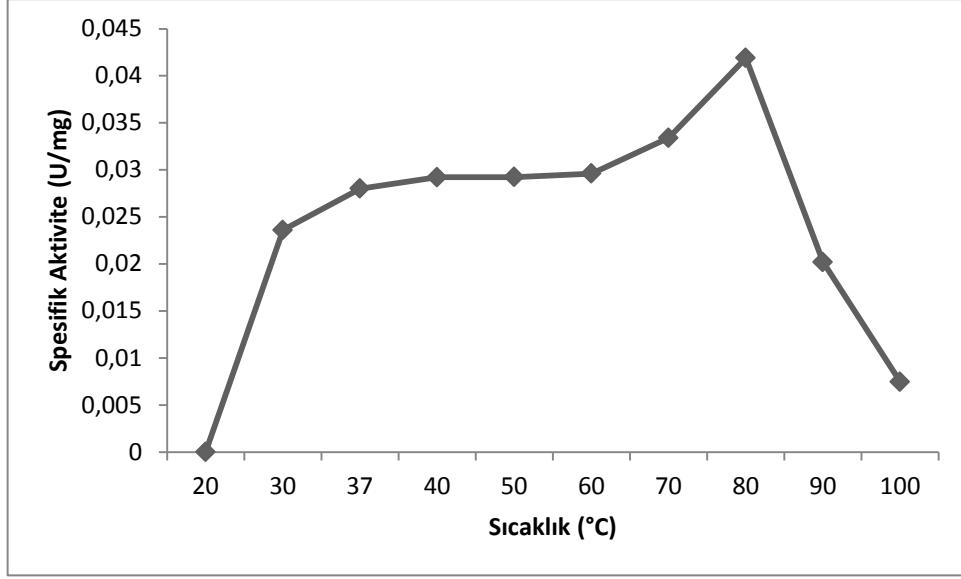
### 5.3.2 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim çalışmalarında birinci öncelik olan enzimin çalışabileceği en uygun pH olan optimum pH'ı belirledikten sonra, enzim substrat ilişkisini dolayısıyla enzimin aktivasyonunu önemli derecede etkileyen sıcaklık faktörü çalışılır. Serbest  $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklık aralığı 20-45°C bulunmuştur [5]. Şekil 5.18 ve 5.19' da sıcaklığın immobilize  $\beta$ -galaktozidaz üzerindeki etkisi gösterildi, bu etki total ünite ve spesifik aktivite cinsinden değerlendirildi.

Şekil 5.20 ve 5.21' de ise serbest  $\beta$ -galaktozidaz üzerine sıcaklığın etkisi incelendi.

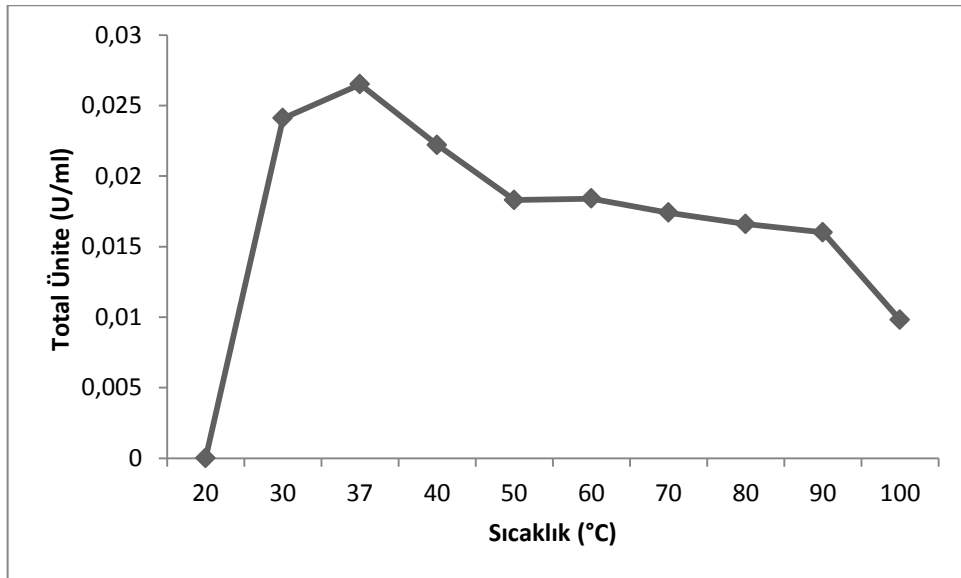


Şekil 5.18 Kitosan boncuklara adsorbe edilmiş immobilize  $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklığı ve total ünite değerleri

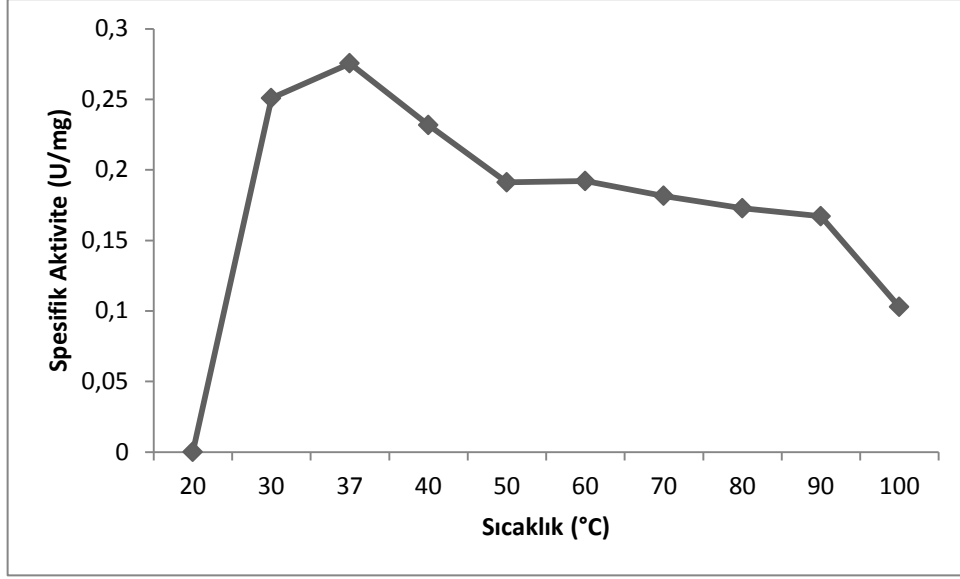


Şekil 5.19 Kitosan boncuklara adsorbe edilmiş immobilize  $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklığı ve spesifik aktivite değerleri

Kitosan boncuklara immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklığı 80°C olarak belirlendi. Bu sıcaklık değerinde immobilize enzimin total ünite ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla; 0,0695 U/ml ve 0,0422 U/mg olarak hesaplandı. Şekillerde de görüldüğü üzere, 20°C de aktivite göstermeyen immobilize enzim artan sıcaklıklarda düzgün bir parabolik eğri göstermiştir. Artan parabolik eğri grafiği, devam eden optimum sıcaklığı olan 80°C de aktiviteyi en yüksek değerinde göstermiştir.



Şekil 5.20 Serbest  $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklığı ve total ünite değerleri



Şekil 5.21 Serbest  $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklığı ve spesifik aktivite değerleri

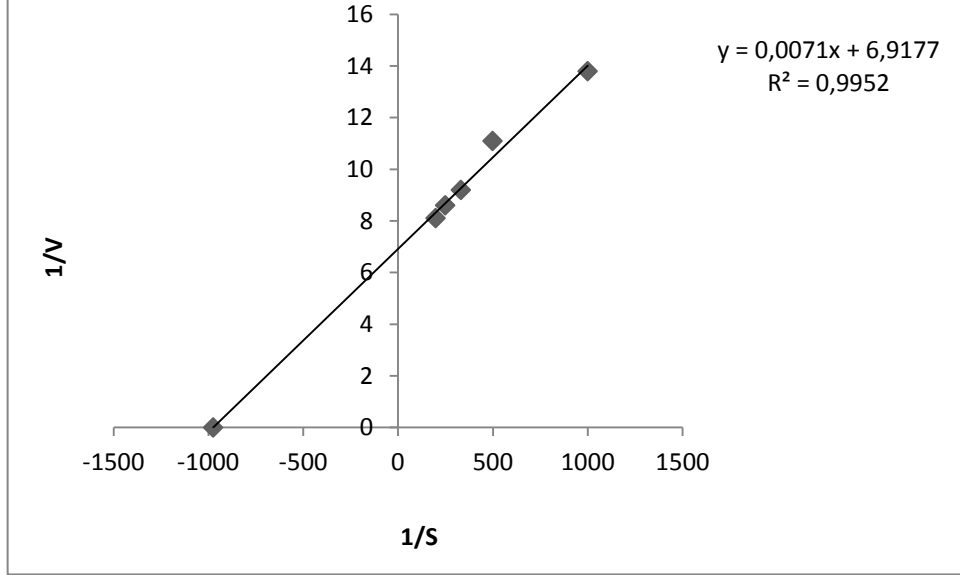
Serbest  $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklık değeri 37°C olarak belirlendi. Bu sıcaklık değerinde serbest  $\beta$ -galaktozidazın total ünite değeri 0,0265 U/ml, spesifik aktivite değeri 0,2754 U/mg olarak bulundu.

Şekil 5.18, 5.19 da yer alan sıcaklığın immobilize  $\beta$ -galaktozidazın üzerine olan etkisi grafikleri incelendiğinde optimum sıcaklığı 80°C olduğu görüldü. Şekil 5.20, 5.21 de gösterilen grafiklerde; sıcaklığın serbest enzim üzerindeki etkisi spesifik aktivite ve total ünite cinsinden göz önüne alınarak optimum sıcaklığın 37°C de seyrettiği bulundu. Bu durumda, bazik ortamda kitosan buncuklara adsorblanmış olan  $\beta$ -galaktozidazın aktivasyonunu devam ettirdiği sıcaklık serbest  $\beta$ -galaktozidaza göre çok daha fazladır. Immobilize  $\beta$ -galaktozidaz yüksek sıcaklıklarda bile aktivitesini korumuştur. Bu çalışma sonucundan yola çıkarak immobilizasyonun avantajlarından biri olan enzimin kararlılığını artırma parametresi başarıldı, bu şekilde yarılanma ömrü uzatıldı.

### 5.3.3 Immobilize $\beta$ -Galaktozidazın Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzimlerin substrat spesifikliği, aktif merkezin hacimsel boyutlarına, substrat bağlayan grupların üç boyut düzenlerine büyük ölçüde bağlıdır. Enzimatik tepkimenin hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Ancak her zaman lineer bir gidiş elde etmek mümkün olmayabilir. Çünkü enzimlerin bazıları iyonlaşabilen aktivatör (hızlandırıcı) ve inhibitör (yavaşlatıcı) bulundurabilirler. Düşük konsantrasyonlarda enzim de dayanıksızdır. Bazı enzim tepkimelerinin ürünleri de tepkimeyi inhibe edici özellik

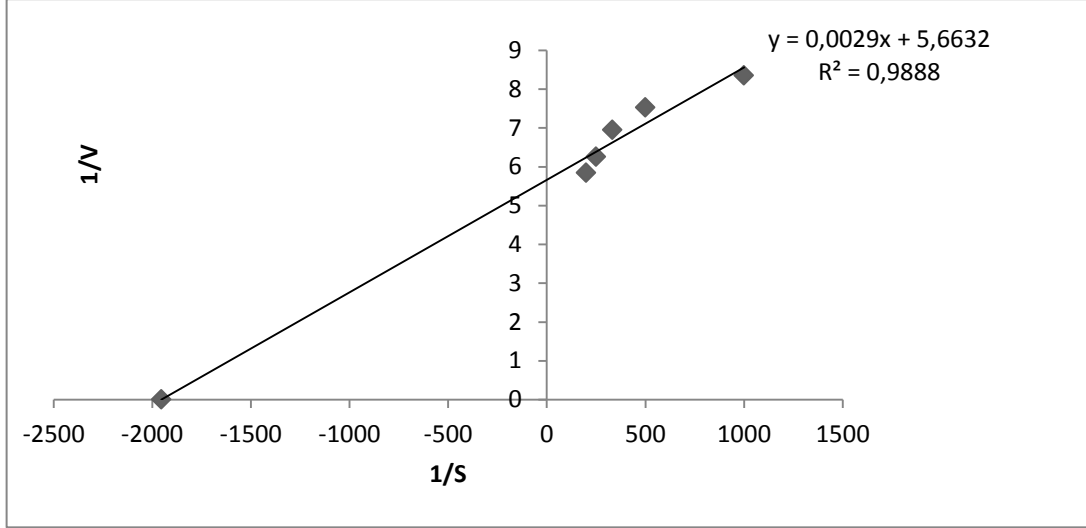
gösterebilirler. Bu nedenle enzim konsantrasyonunun artması bile tepkimeyi hızlandırmaz. Substrat konsantrasyonu ise enzimatik tepkimenin hızını bir yere kadar arttırır, sonra doygunluğa erişildiğinden hız genellikle artmaz sabit kalır [2]. Substrat konsantrasyonu immobilize enzimin farklı davranışlar gösterip, kinetiğini değiştiren önemli bir faktördür.



Şekil 5.22 Kitosan boncuklara immobilize  $\beta$ -galaktozidazın  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini içeren Lineweaver-Burk grafiği

İmmobilize  $\beta$ -galaktozidaz üzerine substrat konsantrasyonunun incelendiği Lineweaver-Burk grafiği şekil 5.22' de gösterildiği üzere  $1/S'$  e karşı  $1/V$  olarak çizildi. Bu grafikten elde edilen  $K_m$  değeri  $1,026 \cdot 10^{-3}$  g/ml,  $V_{max}$  değeri ise 0,1447 U/ml olarak hesaplandı. [ES] kompleksinin sağlamlık ölçüsü olarak düşünülen  $K_m$  değerinin küçük olması [ES] kompleksinde enzim ve substratın birbirine ne derecede yüksek ilgi duyduğunun bir kanıtıdır.

Serbest enzim üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini inceleyerek, immobilize enzim üzerine substrat konsantrasyonunun etkisinin değerlendirilmesi mukayese edildi.

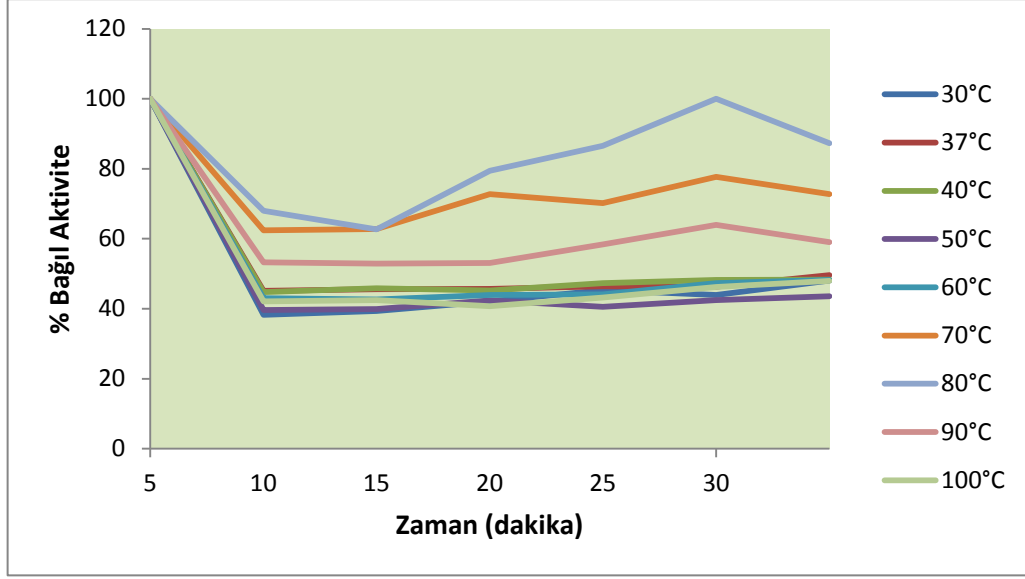


Şekil 5.23 Kitosan boncuklara serbest  $\beta$ -galaktozidazın  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini içeren Lineweaver-Burk grafiği

Serbest  $\beta$ -galaktozidaz üzerine substrat konsantrasyonunun incelendiği Lineweaver-Burk grafiği şekil 5.22' de gösterildiği üzere  $1/S'$  e karşı  $1/V$  olarak çizildi. Bu grafikten elde edilen  $K_m$  değeri  $5,12 \cdot 10^{-4}$  g/ml,  $V_{max}$  değeri ise 0,1763 U/ml olarak hesaplandı. İmmobilize  $\beta$ -galaktozidazın  $V_{max}$  değeri olan 0,1447 U/ml, serbest enzimin  $V_{max}$  değeri 0,1763 U/ml değerinin % 82,07' si olarak bulundu. Bu durumda serbest enzimin kinetiğinde, birim zamanda ürüne dönüştürülebilen substratın maksimum mol sayısı daha yüksek miktarda bulundu. % 82,07 oranı  $\beta$ -galaktozidazın kitosan boncuklara adsorbsiyonunun yüksek aktivite sağlayarak gerçekleştiğinin bir kanıtı olarak düşünüldü.

#### 5.3.4 İmmobilize $\beta$ -Galaktozidazın Termal Kararlılığı

Kitosan boncuklara immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidaz için termal kararlılık çalışmasında, 20°C - 100°C arasındaki sıcaklıklarda, sıcaklık değerleri onar onar arttırılarak enzim inkübe edildi, her inkübasyondan sonra yöntem sıcaklığında immobilize enzimin 5' er dakika arayla tekrar inkübasyonu sağlandı. 5-30 dakika arasında inkübe edilen her immobilize enzim için total ünite değerleri hesaplandı. Total ünite değerleri arasındaki en yüksek değer 100 kabul edildi ve bağıl aktiviteler incelendi.



Şekil 5.24 Kitosan boncuklara immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın termal kararlılığı

Kitosan boncuklara immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın termal kararlılığı 70°C, 80°C ve 90°C arasında bulundu. 80°C’ deki termal kararlılık çalışmasında 30.dakikada, çalışmaya başlamadan önce ölçülen total ünite değerinin %87,71’ ini göstermiştir. 100°C’ de 70, 80 ve 90°C’ lerde elde ettiği yüksek total ünite değerini koruyamadığı, bu oranın yaklaşık %30’ lara düştüğü incelendi. Başlangıç sıcaklıklarında ise (30°C-60°C) 5, 10 ve 15. dakikalarda immobilize enzim başlangıç total ünite değerinin % 35ini gösterirken, 20, 25, 30. dakikalarda ancak %38,6 ve %46,80’ inin koruduğu hesaplandı. Tüm sıcaklık çalışmalarında, süreyle birlikte total ünite değerlerinin arttığı söylenebilir. Bazı dakika aralıklarında fark sayılamayacak kadar düşüşte gözlenmesine rağmen Şekil 5.24’ te de gösterildiği gibi, 30-60°C arasındaki sıcaklık çalışmalarında dakikayla birlikte incelenen değerlerin birbirine çok yakın olduğu görüldü. Immobilize enzimin termal kararlılığının serbest enzime oranla daha yüksek olduğu kanısına varıldı.

### 5.3.5 Kitosan Boncukların Boyutlarının Hesaplanması

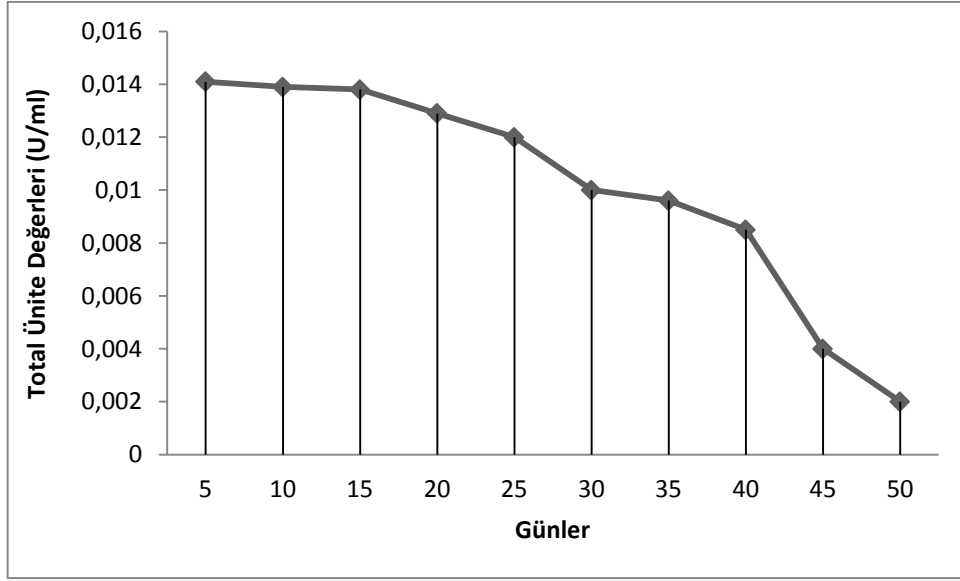
$\beta$ -galaktozidaz adsorpsiyonu yapılmış kitosan boncuklarda belirli sayıda alınarak, içerisinde belirli hacimde su bulunan 5 ml hacmindeki mezüre atıldı. Hacimde oluşan farklılıktan yararlanarak yarıçapları hesaplandı. ( $\pi=3,14$ )

5 boncuğun hacimde yaptığı değişiklik 0,17 ml olarak ölçüldü. Materyal ve yöntem kısmında verilen denklemde (4.2) bu hacimsel artış yerine konularak bir boncuğun

yarıçapı (r) 0,201 cm, çapı da 0,402 cm olarak hesaplandı. Bir tane boncuğun yaklaşık ağırlığı ise; 31,1 mg olarak tartıldı.

### 5.3.6 İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı

Depo kararlılığı enzimin kullanılabilirliğinin, güvenliliğinin ne derecede önemli olduğunu gösteren bir çalışmadır. Şekil 5.25' te her 5 günde bir immobilize enzimin total ünite değerleri ölçülerek oluşturulan grafik gösterildi.



Şekil 5.25 Kitosan boncuklara adsorbe edilen immobilize  $\beta$ -galaktozidazın depo kararlılığı

5'er günlük ölçümler sonunda incelenen total ünite değerleri göz önüne alınarak, immobilize  $\beta$ -galaktozidazın 30 güne kadar kararlılığını koruyarak depolanabileceği düşünülebilir. Şekil 5.25' te de görüldüğü gibi, 35. günden itibaren total ünite değerlerinde önemli bir düşüş gözlemlendi, sayısal değerlere bakıldığında 45. gündeki total ünite değeri 40. gündeki değerin yarısı, aynı şekilde 50. gündeki total ünite değeri 45. gündeki değerin yarısı niteliğindedir. 40. günün sonunda ilk günkü total ünite değerinin %60, 28' ini koruduğu, bu değer 45. gün sonunda %28, 36' ya düştüğü belirlendi. 50. günün sonunda başlangıç total ünite değerinin %14,18 ini devam ettirdiği, ancak 50. günden sonra hızlı bir düşüş göstererek depo kararlılığını kaybettiği hesaplamalardan yola çıkarak, kanıtlanmış oldu.

#### 5.4 İmmobilize *Hypocrea jecorina* $\beta$ -Galaktozidazının Aktivitesi Üzerine Çeşitli İyon ve Bileşiklerin Etkisi

Kitosan boncuklara adsorbsiyon yolu ile immobilize edilen  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesi üzerine çeşitli iyon ve bileşiklerin etkileri Çizelge 5.14' te gösterilmiştir. Aktivite değerlendirilmesi total ünite cinsinden yapılmıştır.

$\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+1}$  iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde %100' ü aşan bir aktivasyonunun görüldüğü saptandı.  $\text{Pb}^{+2}$  ve  $\text{Fe}^{+3}$  iyonlarının ise  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesi üzerinde sırasıyla % 7,30 ve % 15,20 oranında bir aktivite artışı yaşattığı gözlemlendi.  $\text{Fe}^{+2}$  iyonunun  $\text{Fe}^{+3}$  iyonuna nazaran enzimin aktivitesini % 45,6 oranında inhibe ettiği sonucu hesaplandı.

Triton X-100 yüzey aktif maddesi immobilize  $\beta$ -galaktozidazın aktivasyonunu % 100 'ün üzerinde arttırırken, TW 80 yüzey aktif maddesinin ise; enzimin aktivitesini %99,3 oranında arttırdığı incelendi.

EDTA kimyasal ajanının enzimin aktivitesini %9,44 oranında arttırdığı gözlenirken,  $\beta$ -merkaptobetanol kullanıldığında ise, enzimin aktivite göstermediği görüldü. BSA kimyasal ajanı kullanılarak ölçülen immobilize  $\beta$ -galaktozidaz' ın aktivitesinde %66,9 oranında bir artış gerçekleşti, böylece aktivasyon etkiyi görmemizi sağladı.

Çizelge 5.14 *Hypocrea jecorina* immobilize  $\beta$ -galaktozidazının aktivitesi üzerine çeşitli iyon ve bileşiklerin etkisi

Madde	Konsantrasyon	Aktivite	% Aktivasyon	% İnhibisyon
Kontrol		100	0	
$\text{CH}_3\text{COOPb}$	20 mM	107,30	7,30	-
2-İyodoasetamid	20 mM	20,12	-	79,88
NaCl	20 mM	19,43	-	80,57
$\text{CoCl}_2$	20 mM	261,3	161,3	-
Üre	20 mM	17,51	-	82,49

Çizelge 5.14 *Hypocrea jecorina* immobilize  $\beta$ -galaktozidazının aktivitesi üzerine çeşitli iyon ve bileşiklerin etkisi (Devamı)

Madde	Konsantrasyon	Aktivite	% Aktivasyon	% İnhibisyon
CuSO <sub>4</sub>	20 mM	311,5	215,5	-
FeCl <sub>3</sub>	20 mM	115,2	15,2	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 mM	40,60	-	59,4
CaCl <sub>2</sub>	20 mM	25,23	-	74,77
$\beta$ - merkuptoetanol	20 mM	Negatif aktivite	-	-
AgNO <sub>3</sub>	20 mM	351,6	251,6	-
Formaldehit	20 mM	11,77	-	88,23
FeCl <sub>2</sub>	20 mM	54,40	-	45,6
KI	20 mM	7,30	-	92,7
EDTA	20 mM	9,56	9,44	9,44
NiCl <sub>2</sub>	20 mM	9,80	-	90,2
Triton X-100	% 1	366,9	266,9	-
BSA	% 1	33,06	66,9	-
MgCl <sub>2</sub>	20 mM	14,15	-	85,85
TW 80	% 1	6,67	99,3	-

### TARTIŞMALAR

$\beta$ -galaktozidaz ( $\beta$ -D-galaktozid galaktohidrolaz, laktaz,  $\beta$ -laktozidaz)  $\beta$ -D-galaktozil grupları içeren oligosakkaritleri hidroliz edebildiği gibi galaktozil kalıntılarının bir molekülden diğer moleküle aktarılmasını sağlayarak transferaz aktivitesi de gösteren bir glikozidazdır. Farklı kaynaklardan elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz;  $\beta$ -(1→4)-galaktozid bağı içeren bileşiklerin yapı aydınlatılmasında, laktoz intoleransı olan bebeklerin bu durumlarının giderilmesinde ve gıda sanayiinde peynir üretimi başta olmak üzere geniş kullanım alanı olan bir enzimdir [5].

*Hypocrea jecorina* küf mantarından kısmi saflaştırılmış  $\beta$ -galaktozidazın literatürde immobilizasyonu ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Daha önceki çalışmalarda farklı kaynaklardan elde edilen  $\beta$ -galaktozidazın immobilizasyonu çalışmaları mevcuttur.

Bu çalışmada *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının farklı taşıyıcı materyallere adsorbsiyon yöntemiyle immobilizasyonu gerçekleştirilerek, immobilize enzimin protein miktarı, total ünitesi ve spesifik aktivitesi hesaplandı. Immobilizasyon verimleri hesaplanarak, taşıyıcı ve enzim arasındaki ilişki değerlendirildi. *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının immobilizasyonunu adsorbsiyon yöntemiyle gerçekleştirmek için en uygun taşıyıcı belirlendi. Belirlenen immobilizasyon yöntemi; kitosan boncuklar üzerine  $\beta$ -galaktozidaz adsorbsiyonudur.

Kitosan boncuklara immobilize edilen enzimin karakterizasyon çalışması gerçekleştirildi. Karakterizasyon çalışmasında immobilize  $\beta$ -galaktozidazın optimum pH'ı, optimum sıcaklığı saptandı. Immobilize  $\beta$ -galaktozidazın üzerine substrat

konsantrasyonunun etkisi, ve immobilize  $\beta$ -galaktozidazın termal kararlılığı incelendi. Immobilize enzimin depo kararlılığı bulundu, çeşitli taşıyıcı ve iyonların immobilize  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Oluşturulan kitosan boncukların boyutları ve ağırlığı saptandı.

Optimum pH' ın belirlenmesi çalışmasında; *Hypocrea jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının optimum pH' ı 7.0 olarak bulunmuştur [5]. Deneysel çalışmada da serbest  $\beta$ -galaktozidazın optimum pH' ı 7.0 olarak bulundu, Şekil 5.16 ve Şekil 5.17' de gösterilmiştir. Immobilize *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının optimum pH' ı ise 8.0 olarak saptandı. Bu sonuca göre immobilize *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının çalışabildiği en uygun pH'ın serbest haline oranla daha bazik olduğu görüldü. Immobilize enzimin optimum pH' ındaki total ünite değeri 0,0185 U/ml iken, spesifik aktivite değeri ise; 0,2213 U/mg olarak hesaplandı.

Optimum sıcaklığın belirlenmesi çalışmasında; Serbest  $\beta$ -galaktozidazın optimum sıcaklık aralığı 20-45°C bulunmuştur [5]. Deneysel çalışmada da serbest  $\beta$ -galaktozidazın optimum pH' ı 37°C olarak bulundu, Şekil 5.20 ve Şekil 5.21' de sırasıyla total ünite ve spesifik aktivite değerleri cinsinden serbest  $\beta$ -galaktozidaz üzerine sıcaklığın etkisi gösterilmiştir. Serbest enzimin optimum sıcaklığındaki total ünite değeri 0,0265 U/ml iken, spesifik aktivite değeri ise; 0,2754 U/mg olarak hesaplandı. Immobilize *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının optimum sıcaklığı ise 80°C olarak saptandı. Bu sonuca göre immobilize *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının çalışabildiği en uygun sıcaklık olan 80°C, serbest *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının çalışabildiği en uygun sıcaklıktan oldukça yüksektir. Bu sonuçla beraber immobilize *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazı; yüksek sıcaklıkla birlikte enzimin 3. yapısında meydana gelebilecek olan bozulma denilen denatürasyona karşı daha dayanıklıdır kanısına varıldı. Endüstride istenilen yüksek sıcaklıklara, kitosan boncuklara adsorbsiyon yöntemiyle immobilize edilen *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının uygun olduğu görüldü. Immobilize enzimin optimum sıcaklığındaki total ünite değeri 0,0069 U/ml iken, spesifik aktivite değeri ise; 0,0419 U/mg olarak hesaplandı.

Kitosan boncuklara adsorbe edilen *H. jecorina* immobilize  $\beta$ -galaktozidazının substratı olan ONPG konsantrasyonuna ilgisi incelendiğinde;  $K_m=1,026 \cdot 10^{-3}$  g/ml,  $V_{max}=0,1447$  U/ml olarak hesaplandı. [ES] kompleksinin sağlamlık ölçüsü olarak düşünülen  $K_m$

değerinin, küçük olması [ES] kompleksinde enzim ve substratın birbirine olan affinitesinin yüksek olduğunu göstermiş oldu. Serbest  $\beta$ -galaktozidaz üzerine substrat konsantrasyonunun incelendiği Linewear-Burk grafiği Şekil 5.22' de gösterildiği üzere  $1/S'$  e karşı  $1/V$  olarak çizildi. Bu grafikten elde edilen  $K_m$  değeri  $5,12 \cdot 10^{-4}$  g/ml,  $V_{max}$  değeri ise 0,1763 U/ml olarak hesaplandı. İmmobilize  $\beta$ -galaktozidazın  $V_{max}$  değeri olan 0,1447 U/ml, serbest enzimin  $V_{max}$  değeri 0,1763 U/ml değerinin % 82,07' si olarak bulundu. Bu durumda serbest enzimin kinetiğinde, birim zamanda ürüne dönüştürülebilen substratın maksimum mol sayısı daha yüksek miktarda bulundu. %82,07 oranı  $\beta$ -galaktozidazın kitosan boncuklara adsorbsiyonunun yüksek aktivite sağlayarak gerçekleştiğinin bir kanıtı olarak düşünüldü.

Kitosan boncuklara adsorbe edilen *H. jecorina* immobilize  $\beta$ -galaktozidazının termal kararlılığının  $70^\circ\text{C}$  ve  $80^\circ\text{C}$ ' de yüksek olduğu bulundu. Adsorbe  $\beta$ -galaktozidazının termal kararlılığı  $80^\circ\text{C}$  olarak belirlendi. Serbest  $\beta$ -galaktozidazın termal kararlılık aralığı  $20-45^\circ\text{C}$  bulunmuştur [5].  $80^\circ\text{C}$ ' deki termal kararlılık çalışmasında 30.dakikada, başlangıçta ölçülen total ünite değerinin %87,3' ünü gösterdi,  $70^\circ\text{C}$ ' de  $80^\circ\text{C}$ ' deki %87,3 oranındaki total ünite değerinin % 72,8' ini koruduğu incelendi,  $90^\circ\text{C}$ ' de ise; bu oranın %59,2' ye düştüğü gözlemlendi. Bazı dakika aralıklarında fark sayılamayacak kadar düşüşte gözlenmesine rağmen Şekil 5.24' te de gösterildiği gibi,  $30-60^\circ\text{C}$  arasındaki sıcaklık çalışmalarında dakikayla birlikte incelenen değerlerin birbirine çok yakın olduğu görüldü. Başlangıç sıcaklıklarında ise ( $30^\circ\text{C}-60^\circ\text{C}$ ) 5, 10 ve 15. dakikalarda immobilize enzim başlangıç total ünite değerinin % 35ini gösterirken, 20, 25, 30. dakikalarda ancak %38,6 ve %46,80' inin koruduğu hesaplandı. Bu sonuçlara göre; kitosan boncuklar üzerine immobilizasyonu gerçekleştiren  $\beta$ -galaktozidazın serbest formuna göre daha termostabil olduğu saptandı.

İmmobilize  $\beta$ -galaktozidazın depo kararlılığının saptanması için yapılan çalışmada; 5'er günlük ölçümler sonunda incelenen total ünite değerleri göz önüne alınarak, immobilize  $\beta$ -galaktozidazın 35 güne kadar kararlılığını koruyarak depolanabileceği gösterildi. Şekil 5.25' te de görüldüğü gibi, 35. günden itibaren total ünite değerlerinde önemli bir düşüş gözlemlendi, sayısal değerlere bakıldığında 45. gündeki total ünite değeri 40. gündeki değerinin yarısı, aynı şekilde 50. gündeki total ünite değeri 45. gündeki değerinin yarısı niteliğindedir. 40. günün sonunda ilk günkü total ünite değerinin %60,

28' ini koruduğu, bu değerin 45. gün sonunda %28, 36' ya düştüğü belirlendi. 50. günün sonunda başlangıç total ünite değerinin %14,18 ini devam ettirdiği, ancak 50. günden sonra hızlı bir düşüş göstererek depo kararlılığını kaybettiği hesaplamalardan yola çıkarak, kanıtlanmış oldu.

İmmobilize *Hypocrea jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının aktivitesi üzerine çeşitli iyon ve bileşiklerin etkisi çalışmasında;  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+1}$  iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde %100'  aşan bir aktivasyonunun görüldüğü saptandı.  $\text{Pb}^{+2}$  ve  $\text{Fe}^{+3}$  iyonlarının ise  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesi üzerinde sırasıyla % 7,30 ve % 15,20 oranında bir aktivite artışı yaşattığı gözlemlendi.  $\text{Fe}^{+2}$  iyonunun  $\text{Fe}^{+3}$  iyonuna nazaran enzimin aktivitesini %45,6 oranında inhibe ettiği sonucu hesaplandı.

Triton X-100 yüzey aktif maddesi immobilize  $\beta$ -galaktozidazın aktivasyonunu % 100 'n üzerinde arttırırken, TW 80 yüzey aktif maddesinin ise; enzimin aktivitesini %99,3 oranında arttırdığı incelendi.

EDTA kimyasal ajanının enzimin aktivitesini %9,44 oranında arttırdığı gözlenirken,  $\beta$ -merkaptetanol kullanıldığında ise, enzimin aktivite göstermediği görüldü. BSA kimyasal ajanı kullanılarak ölçülen immobilize  $\beta$ -galaktozidaz' ın aktivitesinde %66,9 oranında bir artış gerçekleşti, böylece aktivasyon etkiyi görmemizi sağladı. İmmobilize *Hypocrea jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının aktivitesi üzerine çeşitli iyon ve bileşiklerin etkisi çalışmasında kullanılan kimyasal maddelerin yaklaşık yarısı immobilize *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının aktivasyonunu sağladı. Triton X-100,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$  kimyasallarının immobilize  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesini %100' n üzerinde arttırdığı gözlemlendi, ayrıca TW 80 kimyasal ajanının immobilize  $\beta$ -galaktozidazın aktivitesini %99,3 oranında arttırarak %100'e yakın bir değerde incelendiği bulundu.

Oluşturulan kitosan boncukların boyutları ve ağırlığı sırasıyla; yarıçapı (r) 0,201 cm, çapı da 0,402 cm ve ağırlığı 31,1 mg olarak saptandı.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde; *Hypocrea jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının immobilize formunun serbest formuna kıyasla daha yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterdiği görüldü, bu sonuç; immobilize  $\beta$ -galaktozidazın termal stabilitesinin yüksek olduğunu gösterdi. Endüstride yüksek sıcaklıktaki enzim kararlılığı; yarılanma sresinin uzadığını gösterir. Endüstride *Hypocrea jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının immobilize formu

kullanılarak, enzimin kullanılacağı alanda (süt, peynir endüstrisi gibi) kararlılığı sağlanmış olacaktır. Yüksek sıcaklıkla birlikte sağlanan yüksek kararlılık, enzimin yarılanma ömrünü uzattığından, sanayide istenilen en önemli parametrelerden biri olan zamandan tasarruf gerçekleştirilmiş olacaktır, böylece kısa zamanda istenilen verimin sağlandığı çalışmada maliyette düşüş gerçekleşecektir. Bu veriler ve değerlendirmeler *H. jecorina*  $\beta$ -galaktozidazının immobilize formunun endüstride kullanılabilirliğini kanıtlar niteliktedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Telefoncu, A., (1997). Enzimoloji, Yüksek Lisans Yaz Okulu Ders Notları, Kuşadası, Aydın.
- [2] Sağıroğlu, A., (2008). Temel Biyokimya I-II, Edirne.
- [3] Özçömlekçi, E., (2006). Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyonunda Optimum şartların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. , Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [4] Alagöz, D., (2007).  $\beta$ -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, Adana.
- [5] Altaş Kıymaz, N., (2007). *Hypocrea jecorina* QM9414 Kültürlerinde Beta Galaktozidazın Karakterizasyonu ve Kısmi Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [6] Özyılmaz, G., (2005). Glukoz Oksidaz ve Katalazın Ayrı Ayrı ve Birlikte İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [7] Tübitak Marmara Araştırma Enstitüsü, (1985). Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin' in Yeri, Yayın No:10, Gebze-Kocaeli.
- [8] Yağar, H. , (2010). Biyoteknoloji Ders Notları, Edirne.
- [9] Öztürk Aydoğmuş F., (2006). Pseudomonas Türlerinde Lipaz Üretimi ve Bazı Kültürel Parametrelerin Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- [10] Altınışik, M., Enzim Sınıfları, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>, 15.09.2011
- [11] İnönü Üniversitesi, Enzimlerin Sınıflandırılması, <http://medicine.inonu.edu.tr/iutf/tfdersler/BK/Temel/enzklas/index.html>, 11.05.2012
- [12]Türkiyede Enzim Üretimi, [http://www.gençmevtoo.net/publ/bilim\\_teknoloji/biyoteknoloji/enzim\\_uretimi/108-1-0-525](http://www.gençmevtoo.net/publ/bilim_teknoloji/biyoteknoloji/enzim_uretimi/108-1-0-525), 03.01.2012.

- [13] Ulutürk, C., (2011). Pullulananın Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, , Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [14] *H.Jecorina* QM9414, [www.biomedcentral/1471-2164/9/327](http://www.biomedcentral/1471-2164/9/327), 07.01.2012.
- [15] Why Sequence *Trichoderma reesei*,  
<http://www.igi.doe.gov/sequencing/why/2998.html>, 14.02.2012.
- [16] Kasavi, C., (2006). Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [17] Gürkök, S., Söyler, B. ve Ögel, Z.B., (2008). “*Aspergillus fumigatus* Alfa-Galaktozidaz Enziminin *Aspergillus soja* Elde Heterolog İfadesi ve Osmotik Stresin Etkisi”, Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- [18] Puchart, V., ve Biely, P. (2005). “Glycosylation of Internal Sugar Residues of Oligosaccharides Catalyzed by  $\alpha$ -Galactosidase from *A.fumigatus*”, *Biochim et Biophys Acta*. 1726: 206-216.
- [19] Redkar, R.J., Herzog, R.W., ve Singd N.K., (1998). “Transcriptional Activation of the *A.nidulans* *gpdA* Promoter by Osmotic signals”, *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 2229-22231.
- [20] TPE, (2003). Kompleks Karışımlarda Galaktoz İçeren Oligosakkaritlerin Yüksek Sıcaklıklardaki Hidrolizi İçin Metotlar, TPE, Ankara.
- [21] Yanini, S., Sandra, Van R., Wim, D., Ludo, D. ve Winnie, D., (2011). “Characterization and Optimization of  $\beta$ -galaktosidase İmmobilization Process on a Mixed-matrix Membran”, *Enzyme and Microbial Technology*, 8281: 9.
- [22] Aynacı, G., (2009). (Aminoetil) Polistirene Takılı Schiff Bazı ve O’ nun Ni(II) Kompleksinin Sentezi, Karakterizasyonu ve  $\beta$ -Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyon Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [23] Merritt, E.A., ve Bacon, D.J., (1997). “Raster 3D: Photorealistic Molecular Graphics”, *Methods Enzymoloji*, 277: 505-524.
- [24] Lartillot, S., (1993). “Immobilization of Lactase an Silica gel: Study of Lactase Hydrolysis Wing the İmmobilized Material”, *Biochemical Education*, 21(3): 157-159.
- [25] Baze, H., Moulin, G., ve Galzy, P., (1987). “Uptake of Galactose and *Kluveramyces lactis*, Biochemical Characteristic and Attempted Genetical Analysis”, *Journal General Microbiology*, 133: 15-23.
- [26] Öcal, B.L., (2007). Polivinil (Alkol)-Kalsiyum Aljinat, Poli (N-izopropilakrilamit)-Kalsiyum Aljinat Kürelerine  $\beta$ -Galaktosidaz İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [27] Kraulis, P.J., (1991). “MOLSCRIPT: a program to produce both detailde and schematic plots of protein structures”, *Journal Appl. Crystallog*, 24:946-950.

- [28] Akgül, F.B., (2010).  $\beta$ -Galaktosidase Enzimi ile Yağsız Sütte Laktoz Hidrolizinin İncelenmesi ve Modellenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [29] Ullman, A., (2001). "Escherichia Coli Lactose Operan, Encyclopedia of Life Science.
- [30] Casteren, W.H.M., Eirmermann, M., Broek, L.A.M., Vincken, J.P., Schols, H.A. ve Voragen A.G.J., (2000). "Purification and Characterisation of a  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with Activity Towards (modified) Exopolysaccharides from *Latococcus lactis subsp. Cremoris* B39 and B891", Carbohydrate Research, 329:75-85.
- [31] Champe, P.C. ve Harvey, R.A., (1997). Lipincotts' Illustrated reviews, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- [32] Uyanık, A., (2008). Beta-galaktosidaz Enziminin Mikrobiyal Hücrelerden İzolasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [33] Demirhan, E., (2007). Peynir Altı Suyundan Elde Edilen Laktozun Enzimatik Hidrolizinin İncelenmesi ve Modellenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [34] Süt Alerjisi, <http://www.gidacilar.net/sutun-tanimi-ve-bilesimi/laktoz-alerjisi-1001.html>, 22.03.2012
- [35] Kılıç, İ.H., (2000). 0-6 Yaş Grubu Çocuklarda Rotavirus Sıklığının Araştırılması ve Bu Enfeksiyonun Laktoz İntoleransı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- [36] Yıldırım, N., (2011). Laktozu İndirgenmiş Yoğurt Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [37] Francesc, C., Anna, A., Maite, C., Purificacian, R. ve Juan, R.M., (2010). "Subjective Perception of Lactose Intolerance Does Not Always İndicate Lactose Malabsorption", Clinical Gastroenterology and Hepatology, 8: 581-586.
- [38] Ansari, S. A. ve Husain, Q., (2010). "Lactose Hydrolysis by  $\beta$ -Galactosidase İmmobilized on Concanavalin A-cellulose in Batch and Continuous Mode", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 63: 68-74.
- [39] Haider, T. ve Husain, Q., (2009). "İmmobilization of  $\beta$ -Galactosidase by Bioaffinity Adsorption on Concanavalin A Layered Calcium Alginate-Starch Hybrid Beads for The Hydrolysis of Lactose Whey/Milk", International Dairy Journal, 19: 172-177.
- [40] Haider, T. ve Husain, Q., (2009). "Hydrolysis of Milk/Whey Lactose by  $\beta$ -Galactosidase: A Comparative Study of Stirred Batch Process and Packed Bed Reactor Prepared With Calcium Alginate Entrapped Enzyme", Chemical Engineering and Processing, 48: 576-580.
- [41] Kim, C. S., Ji, E. ve Oh, D., (2004), "A New Kinetic Model of Recombinant  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for Both Hydrolysis and Transgalactosylation Reactions", Biochemical and Biophysical Research Communications, 316: 738-743.

- [42] Numanoğlu, Y. ve Sungur, S., (2004), “ $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* Cell Disruption and Enzyme Immobilization Using a Cellulose-Gelatin Carrier System”, *Process Biochemistry*, 39: 703-709.
- [43] Vasiljevic, T. ve Jelen, P., (2002). “Lactose Hydrolysis in Milk as Affected by Neutralizers Used for the Preparation of Crude  $\beta$ -Galactosidase Extracts from *Lactobacillus bulgaricus* 11842”, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3: 175-184.
- [44] Zarate, G., Ganzalez, S., Chaia, A. P. ve Oliver, G., (2000). “Effect of Bile on the  $\beta$ -Galactosidase Activity of Dairy Propionibacteria”, *Dairy Science and Technology*, 80: 267-276.
- [45] Szczodrak, J., (2000). “Hydrolysis of Lactose in Whey Permeate by Immobilized  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*”, Department of Industrial Microbiology, Marie Curie-Sklodowska University, Akademicka 19,20-033 Lubnin, Poland, 10: 631-637.
- [46] Taşdelen, Ç., (2006). Proteaz Enziminin Fiziksel Adsorbsiyon, Kovalent ve İyonik Bağlanma Metotları ile İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [47] Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. ve Deshpande, V. V., (1998). “Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597-635.
- [48] Rens Search Rensselear Libraries, Immobilized Enzymes, <http://www.lib.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/Immob.html>, 27 Mayıs 2012.
- [49] Lizbon Teknik Üniversitesi, Enzim İmmobilizasyonu, <http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/enzymatic/appendix/immob.html>, 2004, 10 Haziran 2012.
- [50] Worsfold, P. J., (1995). “Classification and Chemical Characteristics of Immobilized Enzymes”, *Pure & Appl. Chem*, 67(4): 597-600.
- [51] Uruç, H., (2007). Katalaz Enziminin (E.C.1.11.1.6) Montmorillonit Analsim Kili Üzerine İmmobilizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- [52] Krajewska, B., (2004). “Application of Chitin- and Chitosan- Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review”, *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 126-139.
- [53] Kayır, Z. Y., (2007). “Endüstriyel Fırınlar ve Refrakter Sempozyumu”, 4 Mayıs 2007, Sakarya.
- [54] Preparation of Chitin and Chitosan, <http://dalwoo.com/chitosan/preparation.html>, 2005, 22 Kasım 2011.
- [55] Francisco, A. T. B., Amparo M., B., Cristina, G.V., Federico, F. Ve Francisco, T. L., (2007). A Comparative Study of Different Amberlite XAD Resins in Flavonoid Analysis, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.2800030407/abstract>, 19 Temmuz 2012.

- [56] Brazilian Journal of Chemical Engineering, Amberlit Reçinesi, [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010466322007000100002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010466322007000100002&script=sci_arttext), 24 Ağustos 2012.
- [57] Tokaloğlu, Ş., (1997). Sultansazlığı Su ve Sediment Örneklerinde Metal Türlemesi ve Faktör Analizi, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- [58] Ege Üniversitesi, Silika, [www.bati.ege.edu.tr/files/silika.ppt](http://www.bati.ege.edu.tr/files/silika.ppt), 29 Haziran 2012.
- [59] Wikipedia, Hidroksiapatit, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Hidroksiapatit>, 06 Ağustos 2012.
- [60] Hidroksiapatit, <http://www.medterm.com/script/main/art/asp.artickeley=7368>, 13 Temmuz 2012.
- [61] Mark, T. F. ve Paul, W. B., (1993). Effects of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> on hydroxyapatite formation, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.820270815/abstract>, 27 Ağustos 2012.
- [62] Bilen, Ç., (2009). Paraoksonaz Enziminin Glutaraldehit ile İmmobilizasyonu ve Bazı Ağır Metaller Karşı Afinitesinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- [63] Önal, S. T., (2000). Karpuz (*Citrullus vulgaris*) α-Galaktozidazının Doğal ve Sentetik Polimerlerde İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [64] Yahşi, A., (2005). Aljinat Jel Boncukları ve Poli (Akrilamid-ko-akrilik asit) Hidrojellerle Tirosinaz Enziminin Binari Yöntemiyle İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [65] Çoşkun, G., (2007). Glutatiyon-S-transferaz Enziminin Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [66] Peter, J., Yamini, S., Sandra, V., Wim, D., Ludo, D. ve Winnie, D., (2011). "Characterization and Optimization of β-Galactosidase Immobilization Process on A Mixed-matrix Membrane", Enzyme and Microbial Technology, 8281: 9.
- [67] Quayyum, H., Shakeel, A. A., Fahad, A. ve Ameer, A., (2011). "Immobilization of *Aspergillus oryzae* β-Galactosidase on Zinc Oxide Nanoparticles Via Simple Adsorption Mechanism", International Journal of Biological Macromolecules, 49: 37-43.
- [68] Qiuyun, S., Ruijin, Y., Xiao, H., Fayin, Y., Wenbin, Z. ve Wei, Z., (2011). "Gelatin-Templated Biomimetic Calcification for β-Galactosidase Immobilization", Process Chemistry, 46: 1565-1571.
- [69] Valentina, N., Michela, S. ve Elena, G., (2010). "β-Galactosidase Entrapment in Silica Gel Matrices for A More Effective Treatment of Lactose Intolerance", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 71: 10-15.
- [70] Pedro, T. ve Francisco, B. V., (2012). "Immobilization of β-Galactosidase from *Bacillus circulans* Onto Epoxy-activated Acrylic Supports", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 74: 230-235.

## ÖZGEÇMİŞ

---

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Fulya AYTAÇ  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 11 Eylül 1988, Şarköy  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-posta** : aytacfulya@hotmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lisans	Kimya	Trakya Üniversitesi	2010
Lise	Fen- Matematik	Bahçelievler Lisesi	2005