

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

106224

MUCOR MİEHEİ RENNİNİN
VE
MUCOR MİEHEİ RENNİN-DEKSTRAN
KONJUGATLARININ SPEKTROFLUOROMETRİK
YÖNTEMLE İNCELENMESİ

Kimyager Neşe ATACI

FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

106224

Huriye

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Huriye KUZU (KARŞILAYAN)

Y. Huriye

Prof. Dr. Mehmet Mustafaev Akdeste

Doç. Dr. Nüket Öcal

İSTANBUL, 2001

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	iv
KISALTMA LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
2. TEORİK KISIM.....	2
2.1 Genel Bilgi	2
2.2 Peynir Üretimi	3
2.2.1 Sütün Özellikleri.....	3
2.2.2 Peynir Eldesi	6
2.2.3 Peynir Eldesinde Kullanılan Proteazlar	8
2.3 Mucor <i>miehei</i> Rennet (EC 3.4.23.6).....	9
2.4 Polimer-Protein Kompleksleri.....	11
2.5 Floresans Spektroskopisi.....	11
2.5.1 Ayna Görüntüsü Kuralı.....	12
2.5.2 Stokes Kanunu.....	13
2.5.3 Floresans Ömrü ve Kuantum Verimi.....	14
2.6 “Time-Resolved” Floresans	15
2.7 Protein Molekülünün Floresans Özelliklerinden Yararlanılarak İncelenmesi	16
2.8 Elektroforez.....	18
2.8.1 Poliakrilamid Jeller.....	19
2.9 Protein Elektroforezi.....	19
2.9.1 Doğal Şartlarda Poliakrilamid Jel Elektroforezi	19
2.9.1.1 Sürekli Bölge Elektroforezi (CZE).....	19
2.9.2 Denatüre Edici Koşullar Altında Elektroforezi.....	20
2.9.2.1 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-Page).....	20
3. DENEYSEL KISIM	21
3.1 Materyal ve Yöntem	21
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	21
3.1.2 Kullanılan Maddeler	22
3.2 Termolabil Enzim Eldesi İçin Yapılan Ön Çalışma	23
3.2.1 Deneğin Yapılışı.....	23
3.3 Aldehitik Dekstran Sülfat-Mucor <i>miehei</i> Rennet Konjugatının Hazırlanması.....	23
3.3.1 Kullanılan Çözeltiler.....	23
3.3.2 Deneğin Yapılışı.....	24
3.4 Mucor <i>miehei</i> Rennetin Özelliklerinin İncelenmesi	25

3.4.1	Aktivite Tayini	25
3.4.1.1	Kullanılan Çözeltiler.....	25
3.4.2	Termal Aktivite Tayini	26
3.5	Mucor <i>miehei</i> Rennetin ve Polimer Konjugatlarının Farklı pH'lardaki Tampon Çözeltilerde Değişen Sıcaklıklarda Floresans Özelliklerinin İncelenmesi	26
3.5.1	Örneğin Hazırlanması	26
3.5.1.1	“Steady State” Floresans Spektroskopisi	27
3.5.2	Örneğin Hazırlanması	27
3.5.2.1	“Time Master” Floresans Spektroskopisi	28
3.5.3	Örneğin Hazırlanması	28
3.5.3.1	“Time Master” Floresans Spektroskopisi	28
3.6	Mucor <i>miehei</i> Rennetin Doğal ve SDS Page Elektroforezi	29
3.6.1	Farklı pH'larda Tek Jel Kullanılarak Yapılan Doğal Elektroforez	29
3.6.1.1	pH: 8.8 Tamponu Kullanılarak Yapılan Doğal Elektroforez	29
3.6.1.1.1	Kullanılan Çözeltiler.....	29
3.6.1.1.2	Deneyin Yapılışı.....	30
3.6.1.2	pH:4.0 Ortamında Yapılan Doğal Elektroforez	31
3.6.1.3	pH:5.5 Ortamında Yapılan Doğal Elektroforez	31
3.6.2	Mucor <i>miehei</i> Rennetin Denatüre Edici Koşullarda Elektroforezi (SDS–Page).....	32
3.6.2.1	Kullanılan Çözeltiler.....	32
3.6.2.2	Deneyin Yapılışı.....	33
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
	KAYNAKLAR.....	44
	EKLER.....	47
Ek 1	DeneySEL Çalışma Sonuçları	47
	ÖZGEÇMİŞ	113

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
γ	Gamma
λ	Dalga boyu
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
s	Saniye
ns	Nanosaniye
ϕ	Kuantum verimi
pI	İzoelektrik nokta
M_w	Moleküler ağırlık
pK	Disosiasyon sabiti



KISALTMA LİSTESİ

TR	Time Resolved
E.C.	Enzyme Classification
DNA	Deoksiribo nükleik asit
MCA	Milk Clotting Activity
PA	Proteolitic Activity
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-Page	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid jel elektroforezi
TRES	Time Resolved Emission Spectrum
TEMED	N,N,N',N'- Tetra Metilen Diamin
CZE	Continuous Zone Electrophoresis
LA	Laktik Asit
Asp	Aspartik asit
Thr	Treonin
Arg	Arginin
Cyc	Sitozin
Ala	Alanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Glu	Glutamik asit
Met	Metiyonin
Val	Valin
Phe	Fenil alanin
His	Histidin
Arg	Arginin
Trp	Triptofan
Lys	Lizin
Ile	İzolösin
Leu	Lösin
Tyr	Tirozin
Gly	Glisin
Ala ₂₉	29 tane alanin amino asidi

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Laktoz molekülü.....	6
Şekil 2.2	Kazein miselleri ve kimozinin kazeini hidrolizi.....	9
Şekil 2.3	Jablonski diyagramı.....	12
Şekil 2.4	Fluoresans emisyonunda ayna görüntüsü.....	13
Şekil 2.5	Uyarılmayı takiben zaman aralıkları ile alınan spektrumlar.....	16
Şekil 2.6	Aromatik amino asitlerin absorpsiyon spektrumları.....	17
Şekil 2.7	Aromatik amino asitlerin fluoresans emisyon spektrumları.....	17
Şekil 3.1	NaIO ₄ ile yükseltgenmiş dekstran molekülü.....	24

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1	Süt proteinleri.....	4
Çizelge 2.2	Kazein çeşitleri ve özellikleri.....	5
Çizelge 3.1	Mucor <i>miehei</i> rennetin aktivite tayininde kullanılan tampon çözeltileri.....	26
Çizelge 3.2	Mucor <i>miehei</i> rennetin steady state spektrometresinde fluoresans özelliklerinin incelenmesinde kullanılan tampon çözeltileri.....	27
Çizelge 3.3	Mucor <i>miehei</i> rennetin time resolved spektrometresinde fluoresans özelliklerinin incelenmesinde kullanılan tampon çözeltileri.....	28



ÖNSÖZ

Tez çalışma konumu belirleyen çalışmanın uygulanmasını yönlendiren ve değerlendirilmesini sağlayan , her konuda bilgilendiren ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Huriye KUZU'ya sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezinin Genetik Mühendisliği Bölümü İmmunoloji laboratuvarının imkanlarından yararlanmamızı sağlayan , değerli vaktini bize ayıran, bizi bilgisi ve tecrübesiyle yönlendiren değerli hocam Prof.Dr.Mehmet Mustafaev AKDESTE ve eşi Zeynep AKDESTE'ye sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Genetik Mühendisliği Bölümü saygıdeğer hocası Prof. Dr. Alexander. P. Demchenko'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımcı olan TÜBİTAK Marmara Araştırma MerkezininGenetik Mühendisliği Bölümü İmmunoloji laboratuvarı çalışanlarından Msc. Miroslava Demchenko 'ya, teknisyen Gazi TURGUT'a, Marmara Ünivertesı Biyokimya anabilimdalı Başkan Doç.Dr Ayşe OGAN'a , teşekkür ederim.

Ayrıca okul hayatım ve tez çalışmam sırasında bana hem maddi hem manevi desteklerini esirgemeyen aileme sevgimi ve saygılarımı belirtmeyi bir borç bilirim.

ÖZET

Mucor *miehei* rennet (EC 3.4.2.3.) katalizlemede etkili olan iki adet aspartat bulunduran bir aspartik proteinazdır. Bu enzim molekülü oldukça fazla sayıda glukoz molekülünü bağlı bulundurmaktadır ve termostabilitesi yüksektir. Mucor *miehei* rennet süt proteinlerinin koagülasyonunu, bunun sonucu olarak pıhtı (teleme) oluşumunu sağlamaktadır.

Bu çalışmada ön inceleme olarak Mucor *miehei* rennetin H₂O₂ ile yükseltgenmesi çalışıldı. “Steady state” ve “Time Master” spektrofloreometreler kullanılarak enzimin fluoresans özellikleri belirlendi. Farklı pH ve sıcaklıklarda enzim çözeltilerinin fluoresans spektrumları kaydedildi. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı belirlendi. Safsızlık kontrolü ve enzimin elektroforezdeki davranışını belirlemek üzere örneğe SDS ve doğal poliakrilamid jel elektroforez yöntemleri uygulandı.

Enzim / dekstran mol oranı 10, 20, 30 alınarak Mucor *miehei* rennetin yükseltgenmiş durumdaki dekstrana bağlanması sağlandı. Elde edilen enzim - polimer konjugatları yukarıda belirtilen yöntemlerle incelendi. PH : 5-7 aralığında enzim – polimer konjugatlarının enzime göre daha aktif olduğu belirlendi. Konjugatların “Time Master” spektiofluorometre ile belirlenen fluoresans özelliklerinin de enzimle elde edilenden daha farklı olduğu görüldü.

Anahtar Kelime: Mucor miehei rennet, aspartik proteaz, fluoresans, konjugat, dekstran

ABSTRACT

Mucor miehei rennet is an aspartic proteinase (EC 3.4.2.3.) and contains two catalytically essential aspartate residues. The molecule of this enzyme is highly glycosylated and exhibits high thermostability. Mucor miehei rennet promote milk protein coagulation, which results in the formation of curd in cheesemaking.

In the present of work, first the oxidation of Mucor miehei rennet with H₂O₂ was studied. The fluoresans characteristics of the enzyme were investigated using “seady-state “and “time master” spectrofluorometers. The fluoresans spectra of the enzyme solutions in different pH and temperatures were recorded. The optimum activity pH range of the enzyme was determined. SDS and naturel polycrylamide gel electrophoresis techniques were applied for the determination of impurities and electrphoretic behavior of the enzyme.

The coupling of Mucor miehei rennet oxidized dextran was performed using 10, 20, 30 mol ratios (enzyme/dextran). The obtained enzyme-polymer conjugates were analyzed with the method mentioned above. Enzyme – polymer conjugates were more active then the enzyme at pH 5-7. The fluorescence characteristics of conjugates recorded with “time-master” spectrofluorometer were also different.

Keywords: Mucor miehei rennet, fluorescence, aspartic proteinase, conjugate, dextran

1.GİRİŞ

Peynir eldesinde sütün koagülasyonunu sağlamak üzere kullanılan enzimler rennet olarak adlandırılmaktadır. Rennet hayvanlardan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Eskiden genç danaların 4. midesinden elde edilen % 75-95 kimozin ve%5-25 pepsin bulunduran karışım peynir elde etmek üzere tercih edilmekteydi. 1960'lardan sonra oldukça zahmetli ve pahalı yöntemlerle bu belirtilen kaynaktan elde edilen enzim ihtiyacı karşılayamaz duruma geldi. Son yıllarda peynir üretiminde mikrobial rennetler, özellikle *Mucor miehei* rennet yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada başlangıçta ön çalışma olarak ticari *Mucor miehei* rennetin H_2O_2 ile yükseltgenerek termolabil özellik kazanması kısaca incelendi. Satın alınan % 8,5 protein ve % 91,5 tuz içeren saf *Mucor miehei* rennetin özelliklerini belirlemek üzere deneysel çalışmalar yapıldı. Saf enzimin pH: 5-7 arasında aktivite gösterdiği maksimum aktivitenin pH:5'te olduğu gözlemlendi. Daha düşük pH değerlerinde sütün proteinleri kendiliğinden çöktüğü için *Mucor miehei* rennetin koagülasyon etkisi gözlenemedi. SDS ve farklı pH'larda poliakrilamid jel elektroforezi uygulanarak enzimin davranışları belirlendi. "Stedy state" ve "Time-Master" spektrofloreometreler kullanılarak, molekülünde bulunan üç adet triptofan vasıtasıyla enzimin fluoresans karakteristikleri belirlendi.

Yükseltgenmiş dekstran ile enzim/polimer mol oranı 10, 20, 30 alınarak *Mucor miehei* rennet-dekstran konjugatları elde edildi. Bu konjugatların tuz içeren ve dializlenmiş örneklerinde aktivite tayinleri yapıldı. Konjugatlarda enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu, özellikle mol oranı 30 alınan örnekte pıhtı oluşum süresinin epeyce kısa olduğu gözlemlendi. Farklı pH ve sıcaklıklarda "Time-Master" spektrofloreometre ile kaydedilen "time resolved" emisyon spektrumları ve bozunma grafiklerinden hesaplanan fluoresans ömrü değerlerinin saf enzim ile elde edilenden farklı olduğu belirlendi.

2. TEORİK KISIM

2.1 Genel Bilgi

Enzimler, biyokimyasal katalizörler olarak davranırlar. Kendilerinde hiçbir değişim olmadan diğer maddelerde spesifik kimyasal değişimlere neden olurlar. Enzimlerin moleküldeki spesifik kimyasal bağlara etki etmesi, arzu edilen bileşiklerin üretiminin kontrol edilebilir durumda olmasını sağlar. Enzimler protein olduklarından dolayı, yüksek sıcaklıkta inaktif hale gelirler, İnaktive oldukları kesin sıcaklık enzime göre değişir ve spesifik bir işlem için doğru enzim seçiminin yapılması gerektiği zaman önemli bir hal alır. Çoğu durumlarda amaç yüksek sıcaklık süresince enzimin aktivitesini sürdürmektir, diğer bir taraftanda üretim bittiğinde enzimi tam olarak inaktive etmektir. Reaksiyonun ilerlemesi için optimum sıcaklık sınırlarının olması gerektiğinin yanısıra enzimlerde de aktif oldukları optimum pH sınırları vardır , ki buda enzimin elde edildiği kaynağa göre farklılık gösterir.

Peynir endüstrisinde sütün koagülasyonunu kontrol etmesi için kullanılan herhangi bir enzime işaret etmek istendiğinde “rennet” terimi kullanılmaktadır .Hayvan ve mikrobial kaynaklardan elde edilmektedir. Çok eskiye dayalı olarak peynir üretiminde diğer hayvanlardan elde edilen rennetler göre dana’dan alınan rennet tercih edilmiş, sebebi de peynirde en iyi tat , doku ve verimi sağlamış olmasıdır (Pszczola, 1989).

Dana renneti, genç danaların karınlarının 4. bölgesinden ekstrakte edilir. Tipik olarak iki enzim içerir. Kimozin (%75-95) ve pepsine (%5-25) olmak üzere. Kimozine yunancadaki gastric liquid denen mideye ait sıvı anlamına gelen “chyme”den türemiştir. İngilizcede ise kimozin'e (rennetten türetilmiş olarak) renin denilmektedir. Kimozin (EC.3.4.23.4) pepsine göre daha yüksek spesifitede sütü pıhtılaştırma aktivitesine sahiptir ve kazeinin oldukça küçük bir kısmını kırarak sütün koagülasyonunu katalizlemektedir. Pepsin ise spesifik olmayan proteolitik aktivitesinden dolayı tüm protein ağını zayıflatır, bu protein ağı süt yağını sıkıştırır ve peynir veriminin düşmesine neden olur.

Peynir üretiminin artması ile dünyada dana rennetine olan ihtiyaç giderek artmıştır. 1960’lardan sonra genç hayvanların etlerinde mevcut olan dana karınları peynir üreticilerine yeterli gelmemeye başladı (Barach, 1985) . Buna karşılık daha yaşı danalar kullanılamazdı, çünkü yaşlanmış hayvanların karınlarından alınan rennet'te kimosin düzeyi düşmekte pepsin düzeyi ise

artmaktadır (Walstra ve Jennings 1984) . Daha yüksek düzeyde kimozin içeren rennet peynir yapımında daha fazla fonksiyon göstereceği için daha yaşlı danaların kullanımı etkili olmaz. Başka bir yaşlı hayvan eti de yüksek pepsin düzeyinden dolayı kullanılamaz. Örneğin yetişkin bovine rennetinde %70-99 bovine pepsine ve %1-30 kimosin bulunur.

Bu durum peynir üreticilerini endüstride kullanılmak üzere rennet elde etmenin farklı yollarını aramaya zorlamıştır. Çözümlerden biri dana etinden elde edilen renini domuzun midesinde ekstre edilerek elde edilen porcine pepsin ile %50 oranında karıştırılarak kullanılmasıdır. Diğer bir yenilik ise 60'lı yıllardaki ilk başarılı mikrobiyal rennet üretimidir (Pszczola, 1989).

Rennetin altı tane major tipi mevcuttur. Bunlardan üçü hayvan kaynaklı olan Dana, sığır ve domuzda elde edilen rennet. Mikrobiyal olanlar ise *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* ve *Mucor pusillus*'dan elde edilen rennettir. Son zamanlarda rekombinant DNA tekniği ile bilim adamları dana karnından alınan kimozinin üretiminden sorumlu geni izole ederek bunları. *E.Coli* bakterisi , *Klyveromyces marxianus* mayasının suşu *lactis* ve *Asprgillus niger* mantarının suşu *awamori* mikrobiyal kimozinin üretimi için uygun olan mikroorganizmalardan elde etmeyi başardılar .Ancak rekombinant DNA tekniği ile elde edilen enzimler üzerinde henüz araştırmalar devam etmektedir.

2.2 Peynir Üretimi

2.2.1 Sütün Özellikleri

Süt doğada bulunan besin değeri yüksek bir gıda maddesidir. Türlerine göre farklılıklar göstermekle birlikte hemen tüm süt çeşitleri vitaminler (genellikle thiamin, riboflavin, pantotenik asit ve A, B₂ ve D vitaminleri) , mineraller (kalsiyum, potasyum, sodyum, fosfor ve eser metaller), proteinler (çoğunlukta kazein), karbohidratlar (genellikle laktoz) ve lipidler (yağlar) içermektedir. Sütteki tek önemli noksanlığın demir ve vitamin C içermemesi olduğu belirtilmektedir. Belirtilen maddelerin süt içindeki miktarları türlere göre geniş ölçüde farklılıklar göstermektedir. Örneğin inek sütü %87,1 su , %3,4 protein, %3,9 yağ, %4,9 karbohidrat ve %0,7 mineral içermektedir. İnek sütü ve keçi sütü oldukça benzer özellikler

göstermektedir. İnsan sütünde bulunan protein ve mineral miktarının inek ve keçi sütünde olanın yarısından daha az olduğu belirtilirken, şeker içeriğinin 1,5 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir. At sütünde diğer sültere kıyasla protein ve yağ miktarı oldukça düşük değerdedir. Renkgeyiği sütünde ise protein, mineral ve yağ miktarı yüksektir ve az miktarda karbohidrat bulunmaktadır.

Tüm sülter mikron büyüklüğünde kürecikler (globuller) şeklinde dağılmış halde yaklaşık %3,9 oranında yağ içermektedir. Yağ emülsiyonları globullerin yüzeylerinde absorbe olan fosfolipidler ve protein kompleksleri tarafından stabilize edilmektedirler. Yağ globulleri sudan daha hafif olduğundan, bunlar sulu fazda yükselerek sütün yüzeyinde biraraya gelirler. Yağda çözünen Vitamin A ve D kremada yoğunlaşmış durumdadır.

Sütte Kazein, β -laktoglobulin ve α -laktalbumin olmak üzere başlıca üç tür protein bulunmaktadır. Bunların üçü de globüler proteindir Globüler proteinler kompakt halde küresel yapıda kalmaya eğilim gösterirler ve fibroz proteinlerine göre kolloidal süspansiyon şeklinde suda daha kolay çözünebilirler. Vücut için gerekli tüm esas aminoasitleri içermesinden dolayı süt, özellikle protein kaynağı olarak önemli bir besin maddesidir. Peynir eldesinde süt proteinlerinin ürün ve peynir suyunda dağılımı aşağıdaki tabloda verildiği gibidir.

Çizelge 2.1 Süt proteinleri

<u>Süt Proteinleri</u>	<u>% Total</u>	<u>% Peynir suyu(Whey)</u>
Kazein	17	
β -lactoglobulin	10	58
α -lactalbumin	2	13
İmmunoglobulinler	2	12
Serum albumin	1	6
Minor proteinler	2	12

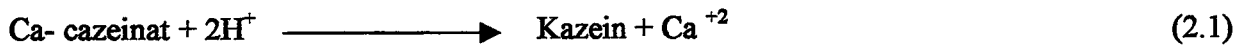
Sütteki esas protein olan kazein bir fosfoproteindir. Fosfat grupları aminoasidlerin yan zincirlerindeki bazı hidroksil gruplarına bağlanarak fosfo protein yapısı oluşturmaktadır. Kazein , sütte kalsiyum kazeinat tuzu şeklinde bulunmaktadır. Kazein molekül ağırlığı ve içerdiği fosfor grupları miktarı farklı ola üç tür proteinin karışımıdır. Bu türler, özellikleri ve içerdiği bazı grupların oranları aşağıdaki tabloda verildiği gibidir.

Çizelge 2.2 Kazein çeşitleri ve özellikleri

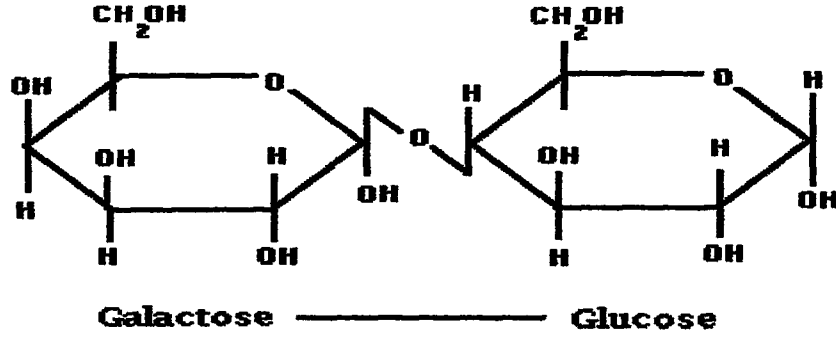
<u>Kazeinler</u>	<u>%</u>	<u>Mol başına P</u>	<u>Mol başına SH</u>	<u>Mol başına S-S</u>	<u>M_w</u>	<u>pK</u>
α_1 -Kazein	45-55	8	0	0	23,500	4,6
β -Kazein	25-35	5	0	0	24,000	5,0
Kappa Kazein	8-15	1	0	1	19,000	3,7-4,2
Gamma Kazein	3-7	1	0	0	20,000	5,8

Alfa ve beta kazeinin molekül ağırlığı 25.000 dolayındadır ve bunlar sırasıyla molekül başına 9 ile 4-5 kadar fosfat grubu bulundurmaktadırlar. Her ikisi de suda çözünme özelliğine sahiptir. Molekül ağırlığı 8.000 dolayında olan kappa kazein 1-2 fosfat grubuna sahiptir. Kappa kazein misellerin oluşumunu sağlayarak diğer iki türün suda çözünmesinden de sorumludur .

Kalsiyum kazeinatın izoelektrik noktası pI: 4,6 'dır. Bu protein pH'sı 4,6'dan daha az olan sulu ortamda çözünmez. Sütün pH'sı 6,6 olduğundan, kazein bu ortamda negatif yüklüdür ve tuzu şeklinde çözülmüş durumdadır.Eğer süte asit ilave edilirse, kazein misellerinin yüzeyindeki negatif yük nötralize olur (fosfat gruplarının protonlaşması sonucu) ve nötral protein çöker, kalsiyum iyonları ise çözeltide kalır. Bu işlem, süt kesildiği zaman meydana gelmektedir.



Yağlar ve proteinler çöktürülerek süttten uzaklaştırıldığında, sulu ortamda çözünmeyen karbohidratlar ise peynir altı suyunda (whey) kalmaktadır. Sütteki esas karbohidrat laktozdur. Laktoz [4-O-(β -D-galaktopiranoz)] memeliler tarafından sentez edilen tek karbohidrattır. Bu karbohidrat bir molekül D-glukoz ve bir molekül D-galaktozun 1- 4 glikozidik bağıyla birleşmesinden oluşmakta ve 'mammary gland'de sentez edilmektedir.



Şekil 2.1 Laktöz Molekülü

2.2.2 Peynir Eldesi

Peynir sütün pıhtılaştırılıp peyniraltı suyunun ayrılmasından sonra, pıhtının değişik şekillerde işlenmesiyle elde edilen bir süt ürünüdür. Sütün pıhtılaştırılması, peynir yapımında en önemli aşamalarından birisi olup, bu aşamada elde edilen pıhtının reolojik ve biyokimyasal nitelikleri, elde edilecek peynirin özelliklerini ve verimini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle kaliteli peynir üretiminde sütün pıhtılaştırılması aşaması önem taşımaktadır.

Sütün pıhtılaştırılması iki farklı yöntemle gerçekleştirilir.

1- Asid ile pıhtılaştırılma

2-Enzim etkisiyle pıhtılaştırılma

Birinci yöntemle sütün pıhtılaştırılması , sütü ya kendi halinde bir süre bekleterek , yada süte laktik kültür, asid ve laktonlardan birinin ilavesiyle pH değerini düşürerek gerçekleştirilebilir. Bu yöntemde izoelektrik noktanın (pH:4,6) üzerinde bir pH'da pıhtılaşma yapıldığında ısıl işlemde yararlanır (sütün %0.25 LA'da 82° C de pıhtılaşması gibi). Bu yöntemle kazeinin izoelektrik noktasında ya da buna yakın bir pH'da elde edilen pıhtılar taneli ve esnek olmayan bir yapı göstermektedirler.Bu tür uygulama enzimle pıhtılaştırmaya göre, oldukça sınırlı olarak kullanılmaktadır (Scott, 1981; Fox, 1987).

İkinci yöntemde sütün pıhtılaştırılması proteolitik enzimlerin etkisi ile sağlanmaktadır. Bu enzim preparatları Peynir Mayası olarak da adlandırılmaktadır. Peynir mayaları κ -kazeini, Para - κ -kazein ve makropeptide parçalayarak sütün pıhtılaşmasını gerçekleştirmektedirler (Schwimmer, 1981).

Peynir üretiminde standardize ve pastörize edilen süt, seçilen mayalanma sıcaklığına kadar soğutulur. Uygulanan mayalanma sıcaklığı genellikle 20°C 'nin üzerinde ve 40°C 'nin altındadır. En fazla uygulanan ise 30°C dolayında mayalanmadır. Çünkü $21-27^{\circ}\text{C}$ 'ler arasında elde edilen pıhtı yumuşak ve jelimsi, 30°C 'de elde edilen sıkı ve kesim sırasında küçük parçalar haline getirilmesi zor nitelikte, $33-36^{\circ}\text{C}$ 'ler arasında elde edilenler ise sert ve lastiksi özelliktedir (Scott, 1981). Mayalama sıcaklığına getirilen süte bazı maddeler ilave edilmektedir. Bunlar içerisinde özellikle kalsiyum klorür (CaCl_2) ve 'starter' kültürleri önemlidir. Peynir mayasından önce süte katılan kalsiyum klorür pıhtılaşmayı kolaylaştırmaktadır. Fazla miktarda kullanılan kalsiyum klorür ise pıhtılaşma açısından bir yarar sağlamadığı gibi, acı tat oluşmasına da neden olmaktadır. Starter kültürünün mayalama aşamasındaki temel işlevi ise asid oluşturmaktır. Sütün mayalama sıcaklığına soğutulmasından hemen sonra ilave edilen starter kültürleri, öngörülen süre içinde sütün asidliğini belirli bir düzeye yükselterek ön olgunlaşmasını gerçekleştirirler. PH'nın düşürülmesi pıhtı oluşum süresini ve pıhtı formasyonunu olumlu yönde etkilemektedir. Ancak belirli bir değerin altına düşmemesi gerekir. Çünkü, mayalanma sırasında ortamın asid düzeyi yükseldikçe, elde edilen pıhtı da asid pıhtı niteliğini almaktadır. Enzimlerin etkisiyle sütün koagülasyonu sonucu oluşan pıhtı peynir çeşidine uygun büyüklüklerde kesildikten sonra karıştırılıp tuzlanarak kalıplara aktarılmakta, burada belirli bir süre kendi halinde süzülükten sonra baskıya alınarak süzme tamamlanmaktadır.

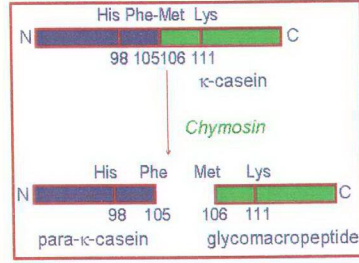
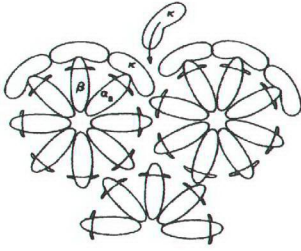
Peynir elde edildikten sonra tüketimine kadar geçen sürede peynirin tadı, kokusu, rengi, ve yapısında değişimler meydana gelmektedir ve bu aşama peynirin olgunlaşması olarak adlandırılmaktadır. Bu aşamada enzimlerin ve mikroorganizmaların (bakteri, küf, mayaların) faaliyetleri sonucu su kaybı, laktozun fermentasyonu, proteinlerin ve süt yağının parçalanması gibi olaylar meydana gelmektedir ve sonuçta peynir kendine özgü nitelikleri kazanmaktadır (Demirci, 1996).

2.2.2 Peynir Eldesinde Kullanılan Proteazlar

Peynir elde edilmesinde kullanılan proteazlar (proteinazlar) aspartik proteinaz (EC .3.4.23) olarak bilinen enzim sınıfına girmektedirler. Bu enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri pH aralığı 1.5-5.0 olup, aktif merkezleri iki aspartik asid artığı bulundurmaktadır. (Voynick ve Fruton, 1971 ; Dagleish , 1982) Aspartik proteinaz enzimlerinin çoğu yapı ve sekuans homologudurlar (Smith ve Yada , 1991).

Bu enzimlerin peynir yapımında başarılı sonuç vermesi, sadece sütü pıhtılaştırma özelliklerine bağlı değildir. Peynir üretiminde yer alan enzimlerin proteolitik özellikleri de önem taşımaktadır. (Dagleish 1982) .Aspartik proteazlar bu konu edilen aktiviteleri ile ilgili olarak farklılıklar göstermektedirler. Örneğin kimozinin proteolitik aktivitesine oranla sütü pıhtılaştırma aktivitesi (MCA/PA) daha yüksek iken , domuz(porcine) pepsininde bu oran daha düşük değerdedir. Aktif merkezlerinde aspartik asid içermeyen tripsin, α -kimotripsin, papain gibi proteazların sütü pıhtılaştırma aktiviteleri, proteolitik aktivitelerine oranla oldukça düşüktür. Aynı grupta yer alan bu enzimlerin aktiviteleri arasındaki farklılıklar konformasyonlarındaki değişikliklerden ileri gelmektedir (Yada ve Nakai, 1986).

Aspartik proteinazlar, sütte bulunan kazein misellerinin dış yüzeyinde yer alan kappa-kazein moleküllerindeki fenil alanin(105)-metiyonin (106) bağıını hidrolizleyerek pıhtı oluşumuna yol açarlar. Kimozin çok spesifik olarak kapa kazeinin bu bağıını hidrolizlemektedir (Visser vd., 1987; Abdel Malak, 1992 ;Turhan ve Mutlu, 1997) . Örneğin mikrobial rennetlerin kazein hidrolizindeki etkisi bu belirtilen bağa çok spesifik değildir ve bu da peynir eldesinde ürünün kalitesini etkilemektedir.



Şekil 2.2 Kazein Miselleri ve Kimozinin Kazeini Hidrolizi

Carlson deneysel çalışmalarında, kappa-kazeinin %65'ten fazlası hidrolizlendiğinde pıhtı oluşumunun gerçekleştiğini göstermiştir. Green ve çalışma grubu da elektron mikroskobu ile yaptıkları incelemelerde benzer sonucu elde etmişlerdir (Van Hooydonk ve Walstra, 1987).

2.3 *Mucor miehei* Rennet (EC 3.4.23.6)

Fungal rennetin üretiminde kullanılan *Mucor miehei* suşunun özelliği üretilen enzimin aminoasit kompozisyonunda ve molekül ağırlığında etkilidir (Smith ve Yada, 1991). Sadece *Mucor miehei* CBS 370.65 ve NRRL 3169 suşlarından elde edilen fungal rennetlerde amino asit kompozisyonları benzerdir, ancak molekül ağırlıkları farklıdır. *Mucor miehei*'e ait birkaç suş belgelenmiştir. Bunlar Dutch suşu CBS 370.65 (Ottensen ve Rickert, 1970; Rickert ve Elliot, 1973), Wallerstein suşu NRRL 3420 (Sternberg, 1971), "Cuban" suşu (Rickert ve Mc Bride – Warren, 1975) şeklinde sıralanabilir ve Rapidase proteinase da NRRL 3169 suşundan (Lagrange vd., 1980) elde edilmektedir. Rickert ve Elliot'a göre, *Mucor miehei*'nin CBS 370.65 suşundan olan Aspartik proteazın amino asit kompozisyonu Asp₄₇, Thr₃₂, Ser₃₈, Glu₂₅, Pro₁₉, Gly₃₇, Ala₂₉, Cys₄, Val₂₇, Met₆, Ile₂₀, Leu₂₁, Tyr₂₁, Phe₂₂, Lys₁₀, His₂, Arg₇, Trp₃ şeklindedir. Lagrange ve arkadaşlarına göre ise bu yapı; Asp₃₉, Thr₂₂, Ser₂₄, Glu₂₆, Pro₁₄, Gly₃₇, Ala₂₉, Cys₂, Val₂₆, Met₈, Ile₁₈, Leu₂₀, Tyr₁₂, Phe₁₇, Lys₁₁, His₂, Arg₇, Trp₃ tarzındadır (Smith ve Yada,

1991; Brown vd., 1990). *Mucor miehei*'nin NRRL 3420 suşundan olan aspartik proteazın amino asit kompozisyonu da; Asp₄₂, Thr₁₈, Ser₂₅, Glu₁₅, Ala₂₂, Cyc₄, Val₁₆, ½(Cys)₄, Met₅, Ile₁₁, Leu₁₄, Tyr₁₃, Phe₁₄, Orn₁, Lys₈, His₂, Arg₄, Trp₃ (NH₃)₃₉ olarak ifade edilmektedir (Sternberg, 1971).

Literatürlerde *Mucor miehei* proteinazın izoelektrik noktası 3,9 ya da 4,1 olarak verilmektedir (Brown vd., 1990). SDS-page elektroforez ile elde edilen sonuçlara göre bu enzimin molekül ağırlığı ise 44.000 veya 34.000 olarak hesaplanmıştır (Brown vd., 1990). *Mucor miehei rennet* yaklaşık olarak %6'sı mannoz kompleksi şeklinde olan karbohidrat içeriğine sahiptir (Ottesen ve Rickert, 1970). Yapıya bağlı karbohidratın proteolitik aktivitelere karşı proteini koruduğu, üç boyutlu yapısını stabilize ettiği ve böylece enzimin aktif kalma süresini arttırdığı düşünülmektedir (Berger vd., 1982). Moleküllerin sekonder yapıları fazla miktarda β -Sheet ve daha az oranda α -heliks yapısı içermektedir (Yada ve Nakai, 1985). *Mucor* kaynaklı enzimlerin termal direnci hayvanlardan elde edilen kimoza göre oldukça fazladır ancak MCA/PA oranı daha düşüktür. Bu durum araştırmacıları fungal rennetleri modifiye etmeye yönlendirmiştir (Smith ve Yada, 1991).

Peynir üretiminde kullanılan rennetin yaklaşık %60'ı aktif olarak peynir altı suyunda (whey) kalmaktadır (Holmes ve Ernstrom, 1973). *Mucor miehei* mantarından elde edilen rennet, kimoza göre çok daha fazla termal stabilite göstermektedir. *Mucor miehei rennet* peynir eldesinde kullanılan enzimler arasında ısıya en dirençli olanıdır. Peynir suyunda bulunan sıcaklığa en dayanıklı protein ise α -lactalbumindir (Lyster, 1970) Bu protein *mucor miehei rennet*e göre çok daha termalstabilidir. Peynir suyunun yan ürün olarak değerlendirilmesi, örneğin bazı gıda maddelerinin üretiminde kullanılması nedeniyle, bazı olumsuzluklara yol açtığından içinde kalan proteazların inaktive edilmesi önemlidir. Sıcaklığa bağlı olarak, yani ısıtma ile sağlanan inaktivasyon bütün proteazlar için benzer etki göstermektedir ve bu etki pH'dan bağımsızdır. Ancak termal inaktivasyon prosesinin hızı pH'ya duyarlıdır. Düşük pH'larda termal inaktivasyona karşı direnç artmaktadır. % 50 oranında rennet ve pepsin içeren karışım sıcaklık etkisiyle, *Mucor miehei* ve *Mucor pusillus*a göre çok daha kolay inaktive olmaktadır (Hyslop vd., 1979).

2.4 Polimer-Protein Kompleksleri

Kimyasal enzimolojinin en önemli sorunlarından biri enzimlerin stabilleşmesi ile ilgili bilimsel prensiplerin araştırılmasıdır. Bu problemin çözülmesi tıpta, kimyasal teknolojide, gıda sanayiinde analitik amaçlar v.b. gibi geniş pratik uygulaması olan stabil enzim preparatlarının oluşturulması açısından önemlidir. Bu sahadaki araştırmaların çoğu, termostabil protein (enzimler) sentezlemeye yönelmiştir. Enzimlerin stabilleştirme yöntemlerinin bulunmasıyla güncel bir problem olan bioorganik katalizörlerin üretimi sağlanacaktır. Enzimin stabillendirilmesi probleminin çözüm yollarından biri polimerlerden yararlanmaktır. Sentetik polimerler protein partikülleriyle kompleks oluşturarak enzim molekülü yüzeyinde tek başlarına mikro örtü oluşturabilirler (Mustafaev.M.I, 1996)

2.5 Fluoresans Spektroskopisi

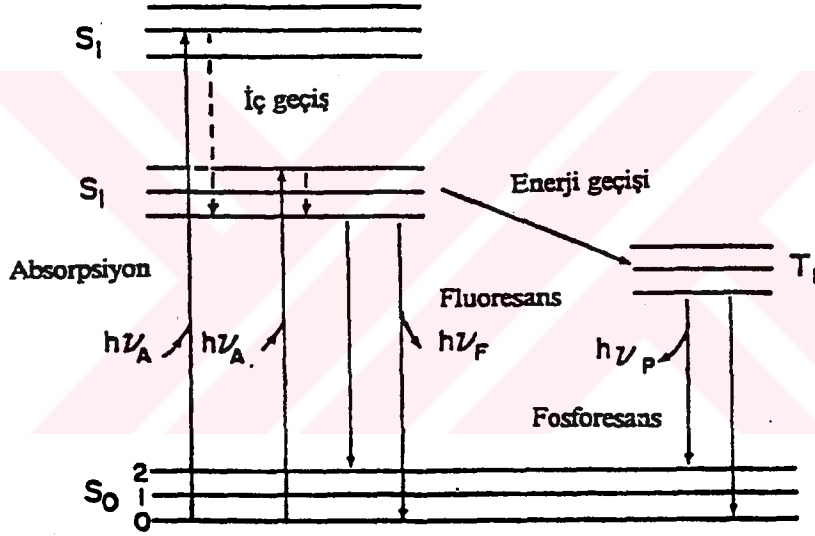
Bir molekülün enerjisi, elektronik(E_e), vibrasyonel(E_v) ve rotasyonel(E_r) enerjilerin toplamından oluşmaktadır. Her bir elektronik enerji seviyesi bir seri vibrasyonel seviye bulundurmaktadır. Vibrasyonel seviyeler de birbirine oldukça yakın olarak yer alan rotasyonel seviyeler içermektedir. Genel bir kural olarak, oda sıcaklığında moleküllerin çoğunun temel elektronik halin en düşük vibrasyonel seviyelerinde bulunduğu kabul edilmektedir. Moleküler orbitalde spinleri antiparalel olarak yerleşmiş elektron çiftinin durumu singlet hal olarak adlandırılır. Bu elektronların spinlerinin paralel olduğu durum ise triplet hal şeklinde ifade edilmektedir.

Işık enerjisi absorplandığında temel hal S_0 ' dan yukarı doğru enerji geçişleri meydana gelmektedir. Absorpsiyon spektrumunda birbirine çok yakın olarak yer alan rotasyonel seviyeler arası geçişler algılanamaz. Bazı moleküllerde vibrasyonel seviyelerin yerleşimi çok karmaşık değildir. Bu moleküllerdeki vibrasyonel seviyeler absorpsiyon spektrumunda bir seri maksimum noktası şeklinde izlenebilir.

Herhangi uyarılmış (excite) halin üst vibrasyonel seviyelerinde bulunan bir elektron, fazla vibrasyonel enerjisini çevresindeki moleküller ile çarpışma sırasında verebilir. Bu işlem vibrasyonel relaksasyon olarak adlandırılmaktadır. Bir molekülün, yüksek elektronik seviyenin düşük vibrasyonel seviyesinden, düşük elektronik seviyenin üst vibrasyonel seviyelerine geçişi ise "ıç geçiş" (vibrational relaxation) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.3). Kural olarak molekülün en düşük uyarılmış hali S_1 'in, en düşük vibrasyonel seviyesine geçişi gerçekleşir. S_1

uyarılmış halde kalma süresi (lifetime of S_1 state) 10^{-9} saniye dolayında iken daha üst seviyelerde 10^{-12} saniye kadar olmaktadır.

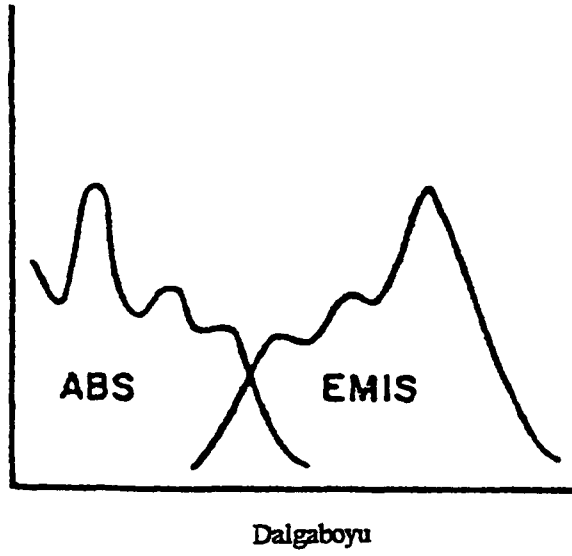
Uyarılmış singlet hal S_1 'in en düşük vibrasyonel seviyesinden temel hal S_0 'ın herhangi vibrasyonel-rotasyonel seviyelerine geçişte verilen emisyon fluoresans olarak adlandırılmaktadır. Triplet halden temel hale geçişte oluşan emisyon ise fosforesans denilmektedir(Şekil 2.3). Fluoresans maddenin uyarılmış halde kalma süresi fluoresans ömrü (lifetime) şeklinde isimlendirilir. Emisyonun yüksek hızda gerçekleştiği fluoresansta ömür 10^{-8} s-10ns kadardır. Fosforesansta emisyon fluoresansa göre daha uzun sürede gerçekleşmekte ve ömür milisaniye düzeyinde olmaktadır(Demchenko,2000; Lakowich,1986).



Şekil 2.3 Jablonski diyagramı

2.5.1 Ayna Görüntüsü Kuralı

Bir molekülün absorpsiyon spektrumunu elektronik olarak uyarılmış halin vibrasyonel seviyelerini yansıtmaktadır. Genellikle elektronik uyarma vibrasyonel seviyelerin yerleşim durumunu değiştirmeden, emisyon spektrumu molekülün absorpsiyon spektrumunun ayna görüntüsüne çok yakındır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Floresans emisyonunda ayna görüntüsü

2.5.2 Stokes Kanunu

Enerjide meydana gelen kayıp nedeniyle, floresansın dalga boyu uyarıcı ışığın dalga boyundan daima daha büyüktür. Kural olarak buhar fazındaki atomlar hariç, absorpsiyona göre emisyonunda daima daha düşük dalga boylarına doğru bir kayma izlenir. Bu durum ilk defa 1852 yılında Stokes tarafından izlendiği için 'Stokes shift' adını almıştır. Solvent etkisi ve uyarılmış halde gerçekleşen reaksiyonlar nedeniyle Stokes shift daha kapsamlı boyutta gerçekleşebilir (Demchenko, 2000; Lakowicz, 1986).

Polar çözücülerdeki indollerin floresans spektrumları Stokes shift'in orijini konusunda önemli bilgiler vermektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda, indol türevlerinin polaritesi farklı çözücülerde elde edilen floresans spektrumları, maksimum noktada meydana gelen Stokes shiftin çözücünün dielektrik sabiti ve kırılma indisi değerlerine bağlı olduğunu göstermektedir. (Gryczynski vd., 1975; Andrews vd., 1974; Sun ve Song, 1977; Kawski, 1974; Gladchenko ve Pikulik, 1967). Bu deneysel çalışmaların sonuçları, temel hale kıyasla eksite haldeki dipol momentte önemli ölçüde değişme meydana geldiğini göstermiştir.

Stokes shifti'nin, indol molekülleri çevresinde yer alan çözücü moleküllerinin yerleşim düzeninin eksite halde hızla değişerek farklı bir durum almasından ileri geldiği sonucuna varılmıştır (Szabo ve Rayner, 1979).

2.5.3 Fluoresans Ömrü ve Kuantum Verimi

Kuantum verimi birim zamanda, "steady-state" sistemde yayınlanan foton sayısının, absorplanan foton sayısına oranına denir. Hız sabitleri Γ ve k uyarılmış hali azaltır. Kuantum verimi,

$$Q = \Gamma / (\Gamma + k) \quad (2.2)$$

formülü ile ifade edilmektedir.

Fuoresans emisyonundaki duruma bezer örnek oluşturan radyoaktif bozunmada deaktivasyonun radyasyon hızı, radyoaktif bozunma hızından daha küçük ise ($k \ll \Gamma$) kuantum verimi 1'e yaklaşabilir. Hesaplamalarda kolaylık sağlaması açısından tüm olası bozunma prosesleri tek hız sabiti k ile ifade edilerek, tek bir grup olarak değerlendirilmektedir.

Fluoresans ömrü (lifetime) ise, molekülün uyarılmış halde kaldığı ortalama süredir. Genellikle bu süre 10ns dolayındadır. Ömür,

$$\tau = 1 / (\Gamma + k) \quad (2.3)$$

eşitliği ile verilmektedir.

Bazı moleküller $t = \tau$ anında fotonlarını yayarlar. Bir tek eksponensiyal bozunmada $t = \tau$ 'den önce molekülün %63 'ü ve $t > \tau$ anında da %37'si değişime uğramaktadır.

Fluoresans emisyonu gerçekleşirken, ışıma dışında iç geçişler v.b. ile enerji kayıpları meydana gelmediğinde hesaplanan fluoresans ömrüne 'intrinsic' fluoresans ömrü denir ve

$$\tau_0 = 1 / \Gamma \quad (2.4)$$

formülü ile ifade edilir. Kuntum verimi ile fluoresans ömrü arasındaki bağlantı ise

$$Q = \tau / \tau_0 \quad (2.5)$$

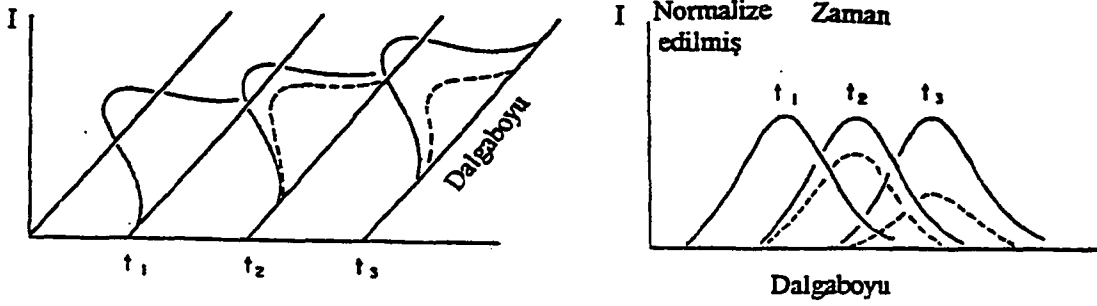
formülü ile verilmektedir(Lakowicz, 1986)

Kuantum verimi, oda sıcaklığındaki sıvı çözeltide son derece küçük değerdedir. Triplet halden singlet hale geçişler simetri nedeniyle engellenmiştir ve emisyon hızı yaklaşık 10^3 dak^{-1} veya daha küçük olmaktadır. k değeri yaklaşık 10^9 dak^{-1} olduğundan fosforesans kuantum verimi de oda sıcaklığında düşük değerdedir (Demchenko, 2000; Lakowich, 1986).

Triptofan ve triptofan türevlerinin floresans bozunmaları (decay) tek eksponensiyal kinetik tarzına uymaktadır. Triptofanın 20°C 'de floresans ömrü (lifetime) yaklaşık 3ns kadardır. Tek foton sayma floresans teknikleri (single photon counting fluorescence techniques) ile elde edilen sulu çözeltilerdeki triptofanın floresans bozunma grafiklerinden floresans ömrünün hesaplanmasında, iki eksponensiyal kinetikler kullanılmıştır. (Ranyer ve Szabo, 1978). Bu şekilde 335 nm'deki maksimum emisyon ile ilk lifetime 0,5 ns, 350 nm'deki maksimum ile diğer lifetime 3,1 dolayında bulunmuştur. Birden fazla triptofan içeren proteinlerde multi eksponensiyal kinetikler kullanılmaktadır ve bileşenlerin değeri dalga boyuna bağlıdır (Szabo ve Rayner, 1980).

2.6 "Time-Resolved" Floresans

Floresans maddelerin emisyon dalga boyundan başka bozunma süresi ile de karakterize edilebileceği düşünülmüştür. Belirli dalga boyunda ışık enerjisi ile çok kısa zaman aralığında uyarılan floresans maddenin verdiği emisyonun zamana bağlı olarak değişmesi, yani bozunma profili elde edilmektedir. Floresans madde uyarıldığında meydana gelen reaksiyonlar (fenol ve naftalde proton kaybı), yük transfer kompleksi oluşması (antrasen ve aminler arasında), solvent dipolar relaksasyonu, çözücüye karşı duyarlılık, bir çok maddenin emisyonunun 'pulse' ile uyarılmayı takiben, zamana bağlı olarak daha büyük dalga boylarına kaymasına sebep olur (Şekil 2.5). Bu belirtilen sebeplerle zamana bağlı olarak gerçekleşen kayma, zaman-ayırımı floresans spektrumu 'TRES-Time Resolved Emission Spectra' ile izlenebilir. TRES spektrumu uyarılma 'pulse'ünü takiben çeşitli zamanlarda alınarak elde edilmektedir. TRES ölçümleri makromoleküllerin şekil ve durumu hakkında önemli bilgiler vermektedir (Lakowicz, 1986).

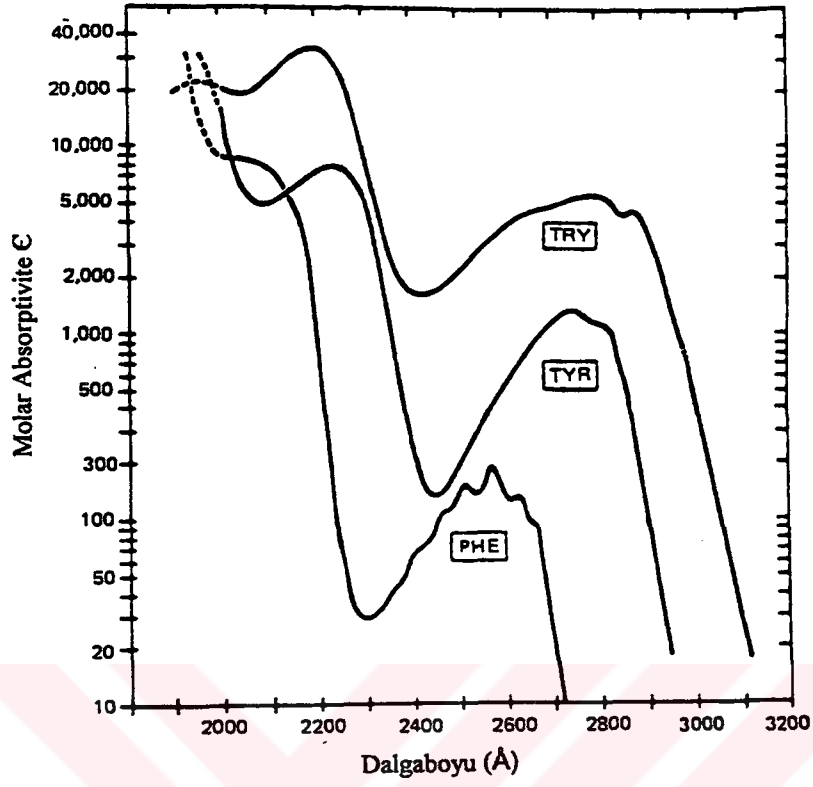


Şekil 2.5 Uyarılmayı takiben zaman aralıkları ile alınan spektrumlar

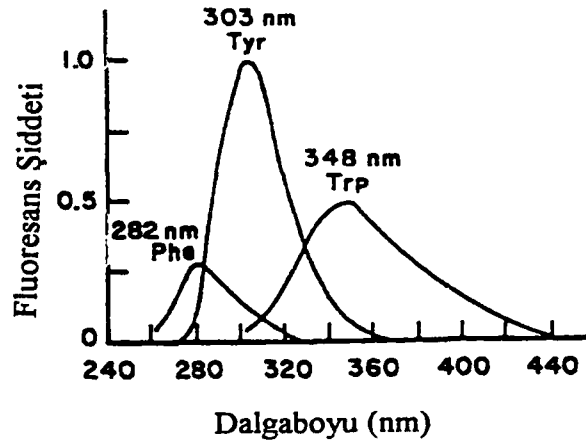
2.7 Protein Moleküllerinin Floresans Özelliklerinden Yararlanılarak İncelenmesi

Proteinlerin yapısında floresans veren üç aminoasid bulunmaktadır. Bunlar triptofan(trp) tirozin(tyr), ve fenil alanin(phe)'dir. Bu aminoasidlerin absorpsiyon spektrumları Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Ancak proteinlerde fenil alaninin kuantum verimi düşük değerde olduğundan, bu aminoasid artığından ileri gelen emisyon ihmal edilebilir olarak alınır. Floresans vermesi için proteinler genellikle 280nm dolayında dalga boyunda ışık ile uyarılmaktadırlar. Proteinlerin 280nm'de absorpsiyonu tirozin ve triptofan artıklarından ileri gelmektedir. Proteinlerde yalnızca triptofanın verdiği floresansı elde etmek için 290nm'den büyük dalga boyunda uyarma yapılmalıdır (Şekil 2.6, Şekil 2.7).

Floresans spektroskopisi protein molekülünün çözeltideki durumu hakkında bilgi vermektedir. Proteinlerin verdiği floresans çözeltilinin pH değeri, çözücünün dielektrik sabiti, sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir. Alınan floresans spektrumları, protein moleküllerinin substrat ile etkileşimi, elektron alışverişi, assosiasyon reaksiyonları, denatürasyon v.b. izlenmesine de olanak tanımaktadır(Lakowicz,1986).



Şekil 2.6 Aromatik amino asitlerin absorpsiyon spektrumları



Şekil 2.7 Aromatik amino asitlerin fluoresans emisyon spektrumları

2.8 Elektroforez

Elektroforez terimi bir elektrik alanın etkisi altında yüklü bir partikülün göç etmesi olarak tanımlanabilir. Amino asitler, peptidler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler gibi önemli biyolojik moleküller iyonize olan gruplar içermektedirler ve böylece herhangi bir pH'da solüsyon içerisinde elektrikçe yüklü katyonlar (+) ve anyonlar (-) olarak bulunurlar. Bir elektrik alan etkisiyle bu yüklü partiküller net yüklerine bağımlı olarak katoda ve anoda doğru göç ederler. Elektriksel alanda göç hızları ve mobiliteleri; alanın şiddetine, moleküllerin net yüküne, büyüklüğüne, şekillerine ve moleküllerin hareket ettikleri ortamın iyonik şiddetine, viskozitesine ve sıcaklığına bağlıdır.

Elektroforez protein karışımının bileşenlerinin çözmek ve ayırmak için kullanılan ideal bir analitik yöntemdir. Proteinler izoelektrik noktalarında (pI) hariç diğer pH'larda yüklenirler, ve elektrik alanda yüklerinin yoğunluğuna bağlı olarak göç ederler. Genelde örnek bir destek maddesi üzerinde göç ederler. Bu matris kağıt, selüloz asetat, nişasta jel, agaroz veya poliakrilamid jel olabilir. İşlem sırasında ısı açığa çıkması sebebi ile olabilecek yayılmalar ve difüzyonun engellenmesi ve ayrılmış proteinlerin immobilizasyonunun zenginleştirilmesi, bu destek materyali tarafından sağlanır. Polyakrilamid jel elektroforezi yüksek ayırma kapasitesinden dolayı en çok tercih edilen yöntemdir. Proteinlerin ayrılması amacıyla bir çok elektroforez tekniği mevcuttur. Bunların temeli: boyut, net yük ve hidrofobiklik gibi üç ana özelliğin birinin veya üçünün kombinasyonuna dayanır. Doğal koşullarda elektroforez; genelde çözünür proteinlerin, biyolojik ve enzimatik özelliklerinin kaybolmadan analizlenmesinde kullanılır.

Buna karşın daha sert ve denatüre edici koşullar daha az çözünür proteinlerin analizinde kullanılır. Önemli bir prosedür olan, anyonik deterjan sodyum dodesil sülfat varlığında gerçekleştirilen Poliakrilamid jel elektroforezinde proteinler moleküler büyüklüğe göre karakterize edilirler. Protein saflaştırılmasındaki diğer önemli yöntem ise izoelektrik noktalara göre ayırım yapan izoelektrik fokuslamadır.

Protein saflaştırılmasında genel olarak Poliakrilamid jel Elektroforezi; protein saflığının kontrolü, fraksiyonlama, saf proteinin alt birim yapısının incelenmesi, molekül kütlesi tayini, izoelektrik nokta tayini, izoenzimlerin belirlenmesi v.b. kullanım alanlarına sahiptir. Elektroforetik metodların dikkate değer dezavantajı ise, diğer saflaştırma yöntemlerine göre daha

zaman alıcı olmasıdır. Ancak son yıllarda son derece popüler olan minyatür elektroforez sistemlerinin kullanımı ile bu problem aşılmıştır.

2.8.1 Poliakrilamid Jeller

Akrilamid monomerlerinin bir çapraz bağlayıcı ajanla polimerizasyonu sonucu meydana gelir. Poliakrilamid jelleri için kullanılan en çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajan N,N metilen bisakrilamid (Bis) tir. Akrilamid polimerizasyonu serbest radikal katalize bir örnektir. Reaksiyon , amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED) ile başlatılır. TEMED persülfat iyonunu katalizleyerek serbest radikal oluşumunu sağlar. Bu şekilde uzun uzun zincirli akrilamid , çaprazbağlı bisakrilamid ile birlikte yapılır. Akrilamid jeldeki gözenek boyutu akrilamid ve bisakrilamid'in konsantrasyonlarını değiştirerek ayarlanabilir. (%3-30 akrilamid konsantrasyonu aralığında) Düşük yüzdeli jeller büyük gözenek çapına, büyük yüzdeli jeller küçük gözenek çapına sahiptir.

2.9 Proteinlerin Elektroforezi

2.9.1 Doğal Şartlarda Poliakrilamid Jel Elektroforezi

2.9.1.1 Sürekli Bölge Elektroforezi (CZE)

Ayırma analizlenen proteinin yük ve boyut özellikleri temeline dayanır. Uygun jel konsantrasyonu proteinlerin boyutuna bağlı olarak seçilmelidir. Bu yöntemle proteinlerin aktiviteleri test edilebilir. Ancak bu sistem sadece çözünür proteinler ve elektroforez sırasında agregatlaşmayan proteinler için uygulanır. Tek homojen tampon sisteminde çalışılmaktadır, tampon ve pH seçiminde bir sınırlama yoktur. Ana avantajı jel hazırlanması ve elektroforez yönteminin hızlı ve basit olmasıdır. Ana dezavantajı ise, düşük ayırma kapasitesidir ve seyreltik örnek solüsyonlarının analizi için uygun değildir.

2.9.2 Denatüre Edici Koşullar Altında Elektroforez

2.9.2.1 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Poliakrilamid jel elektroforezinin en yaygın olarak kullanılanıdır ve proteinlerin karışımlarını analizlemek açısından önemlidir. Protein saflık kontrolünün bir ölçüsüdür ve protein boyutuna göre bir ayırım yapması sebebiyle bağıl molekül kütlesi tayininde kullanılır. SDS-PAGE 'e uygulanacak proteinlerin merkaptolanol ile disülfid bağları kırılır ve SDS ile denatüre edilir. Sodyum Dodesil sülfat anyonik bir deterjandır. Proteinlerin büyük kısmı gram protein başına 1.4 gr SDS-bağlar. Böylece polipeptid zincirlerin net yükü maskelenir ve negatif yüklü SDS molekülleri içeren bir seri oluşur. Negatif yüklü protein-SDS kompleksleri uzunluk başına aynı net yüke sahip oldukları için uygulanan elektrik alanda aynı mobilite ile molekül kütlelerine göre moleküler eleme prensibine göre anoda doğru ilerler. Küçük proteinler daha hızlı hareket ederken, jelin gözenek boyutuna bağlı olarak, büyük proteinler sürtünme etkisiyle daha yavaş hareket ederler. Saf bir protein SDS jel elektroforezinde tek bant verir. Ancak proteinin alt birimlerinin farklı farklı moleküler kütlede olması durumunda ise birden fazla bant görmek mümkündür. Ayrıca aynı ve benzer molekül kütlelerine sahip proteinler bu yöntemle ayrılamazlar. Bu yöntemin en ciddi dezavantajı elektroforez sonrasında proteinlerin enzimatik yada biyolojik aktivitelerini yitirmeleridir. Avantajı ise proteinlerin molekül kütlelerinin tayinine olanak sağlamasıdır.

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Materyal ve Yöntem

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- “Time Master” PTI C71 model spektroflore metre
- “Quanta Master” PTI model spektroflore metre
- Aktivite tayininde Clifton model su banyosu
- UV-Vis. Shimadzu Model 150 02 Spektrofotometre
- E-C 120Apparatus Corporation mini protein Elektroforezi
- Bio-Rad Power PAC 300 güç kaynağı
- Cyber Scan marka pH metre
- Cary 3 Bio UV-Visible Spektrofotometre
- Jel Kurutucu (Gel Drayer) EC 355 E-C Apparatus Corporation

3.1.2 Kullanılan Maddeler

Saf Mucor miehei Rennet	Sodyum hidroksit	Etil alkol
Ticari Mucor miehei rennet	Hidroklorik asit	N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED)
Sitrik Asit	%30'luk Hidrojen Peroksit	Tris
Asetik asit	Kalsiyum klorür	Potasyum hidrojen fosfat
Sodyum dihidrojen fosfat	Amonyum Persülfat	Dekstran sülfat
Agaroz	Glisin	Sodyum monohidrojen fosfat
Sodyum klorür	Potasyum dihidrojen fosfat	Sodyum Periyodat
Gliserol	β -Merkaptoetanol	
Bromfenol Blue	Yağsız Süt tozu (Pınar)	
Human Serum Albumin	Sodyum Dodesil Sülfat	
Sodyum hidrojen karbonat	Akrilamid	
Sodyum hidroksit	N,N'-Methylene-bis-akrilamid	

3.2. Termolabil Enzim Eldesi için Yapılan Ön Çalışma

3.2.1 Deneyin Yapılışı

Sanayide kullanılan yaklaşık 125.000 kuvvette *Mucor miehei* Rennetten alınan 100 ml örneğe belirli hacimlerde %30 'luk H_2O_2 ilave edildi. Başlıca metiyonin oksidasyonunun gerçekleştiği belirtilen reaksiyon her gün normal aktivite ve termal aktivite ölçümleri yapılarak izlendi (Coraelius ve Elkbart, 1982)

3.3 Aldehitik Dekstran Sülfat – *Mucor miehei* Rennet Konjugatının Hazırlanması

3.3.1 Kullanılan Çözeltiler

A) Tuzsuz Fosfat Tamponu (pH: 7,2)

52,2 gr K_2HPO_4 600 ml suda çözüldü, üzerine 600 ml suda çözülmüş 27,2 gr KH_2PO_4 ilave edildi ve karıştırıldı.

B) PBS Tamponu

8,4 gr NaCl'in 20 ml fosfat tamponu ve 980 ml destile suda çözünmesiyle hazırlandı.

C) Aldehitik Dekstran Sülfat Polimeri

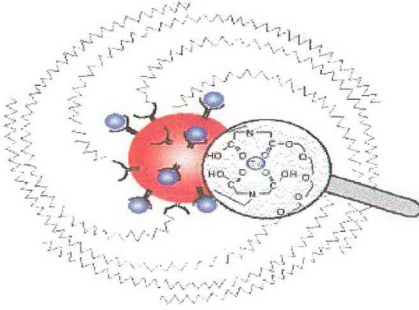
Dekstran sülfatın suda çözülmüş çözeltisine $NaIO_4$ ilave edildi. Karışım $20^{\circ}C$ 'de 5 saat karıştırıldı, ve sonra 24 saat dializ edilerek sentez işlemi tamamlandı.(Sacco vd.,1998)

D) Aldehitik Dekstran Sülfat Polimer Çözeltisi

2 mg polimerin 1 ml PBS tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

E) Enzim Çözeltisi (Stok)

0,09315 gr *Mucor miehei* renet 3 ml PBS tamponunda çözülerek hazırlandı .



Şekil 3.1 NaIO₄ ile yükseltgenmiş dekstran molekülü

3.3.2 Deneyin Yapılışı

$n_{\text{prot}} / n_{\text{poly}}$ oranı 10 ,20 ,30 alınarak, konjugat elde etmek üzere *Mucor miehei* rennetten ilave edilecek miktarlar (3.1) formülünden hesaplandı.

$$n_{\text{prot}} / n_{\text{poly}} = C_{\text{prot}} \times M_{\text{poly}} / C_{\text{poly}} \times M_{\text{prot}} \quad (3.1)$$

$$C_{\text{poly}} = 0,1 \text{ gr / ml}$$

$$M_{\text{poly}} = 500.000 \text{ Dalton}$$

$$M_{\text{rennet}} = 44.000 \text{ Dalton}$$

PH'sı 7 olan Polimer-protein karışımı bir gece + 4⁰C 'deki soğuk odada karıştırılarak bekletildi. Oluşan konjugatlar buzdolabı soğukluğunda(+4⁰C) korundu.

Konjugatların tuzsuz ortamdaki özelliklerini incelemek için konjugat örnekleri dializ membranına konuldu ve tuzsuz fosfat çözeltisine karşı dializ edildi(+ 4⁰C 'deki soğuk odada bir gece karıştırılarak bekletildi). Dializ edilmiş konjugat örnekleri buzdolabı soğukluğunda korundu.

3.4 Mucor *miehei* Rennetin Özelliklerinin İncelenmesi

3.4.1 Aktivite Tayini

Literatürde verilen yöntemlere göre, süt tozunun destile suda çözünmesi ile hazırlanan süt örneği 30 dakika karanlıkta bekletildi. Ticari enzim örneğinin 2 ml'si pH değeri 5.50 olan asetat tamponu ile 50 ml'ye seyreltildi. İki adet 250 ml süt örneği 32°C'lik su banyosunda termal dengeyi sağlamak üzere yaklaşık 10 dakika bekletildi. Süt örneklerine seyreltilen enzim örneğinden 5ml ilave edildi. Pihtının olduğu an gözlemlendi ve süre kaydedildi. Gerekli hesaplamalar yapılarak aktivite değerleri belirlendi. (Kokusho vd., 1976). Bu yöntem termolabil enzim eldesi için uygulanan işlemde önce, ve sonra da reaksiyonun gidişini izlemek üzere enzim örneklerine uygulandı. (MCU Assay, Valley Research Inc.)

Farklı pH'larda saf enzimin (%91,5 oranında NaCl içermektedir) ve dializlenmiş saf enzimin aktiviteleri de tayin edildi. Ayrıca sentez işleminde enzim/polimer mol oranı 10 ,20, 30 alınan enzim-dekstran konjugatlarının ve bunların dializlenmiş örneklerinin farklı pH 'larda aktiviteleri tayin edildi.

Bu denemelerde enzim, süt örneği ve CaCl₂ çözeltisi aynı pH'lardaki tampon çözeltilerde hazırlandı(Tablo 7.1). Farklı olarak, çok ufak hacimler kullanılmakla birlikte, pH 7'de hazırlanan konjugat örnekleri , herhangi pH ayarı yapılmadan belirli pH'daki süte eklendi. Süt proteinleri asidik ortamda, herhangi proteolitik enzim etkisi olmaksızın da çökelti oluşturabilmektedirler (Demirci, 1996). Bu nedenle enzim aktivitesine pH etkisini gözlemek üzere, bu proteinlerin çökelti oluşturduğu pH aralığı belirlendi.

3.4.1.1 Kullanılan Çözeltiler

- 66,23 g CaCl₂ 100 ml tamponda çözüldü. Bu çözeltiden 1.35 g tartılıp tamponla 1 lt 'ye seyreltildi. 110 g süt tozu belirtilen çözeltide çözüldü ve hazırlanan süt örneği karanlıkta 30 dakika bekletildi.
- 1 gr Mucor *miehei* rennet 25 ml tamponda çözüldü.

Çizelge 3.1 *Mucor miehei* rennetin aktivite tayininde kullanılan tampon çözeltiler

PH	Kullanılan Tampon
5.0	0.05 M Asetik Asit
5.5	0.05 M Asetik Asit
6.0	0.05 M NaH ₂ PO ₄
6.5	0.05 M NaH ₂ PO ₄
7.0	0.05 M NaH ₂ PO ₄

3.4.2 Termal Aktivite Tayini

Asetat tamponuyla seyreltilmiş ticari enzim örneği 65.6⁰C'deki su banyosuna konularak 15 dakika bekletildi. Bu örnekler tam 15 dakika sonra buz banyosunda 5 dakika bırakıldı. Yukarıda verilen yöntemde olduğu gibi pıhtı oluşum süresi gözlenerek, sıcaklık etkisine maruz bırakılan örneklerde aktivite tayini yapıldı. Böylece enzimin aktivitesine sıcaklığın etkisi görülmüş oldu.(Thermal Labile Assay, Valley Research Inc.)

3.5 *Mucor miehei* Rennetin ve Polimer Konjugatlarının Farklı pH'lardaki Tampon Çözeltilerde Değişen Sıcaklıklarda Floresans Özelliklerinin İncelenmesi

3.5.1 Örneğin Hazırlanması

0.2 gr saf *Mucor miehei* renneti 10 ml tamponda çözerek hazırlanan farklı pH'lardaki örneklerden 250 µl alıp üzerine 5ml tampon eklendi , pH 'sı kontrol edildi, gerektiğinde ayar için 0.1 N NaOH / 0.1 N HCl çözeltileri kullanıldı. Hacmi 10 ml 'ye tamamlanarak çözeltinin son pH'sı okundu.

Çizelge 3.2 *Mucor miehei* rennetin steady state spektrofotometresinde fluoresans özelliklerinin incelenmesinde kullanılan kullanılan tampon çözeltiler

Kullanılan Tampon Çözeltiler	pH Aralıkları
0.1 M Sitrik Asit	1 – 2.5
0.05 M Asetik Asit	3 – 5
0.05 M NaH ₂ PO ₄	6 – 8
0.05 M Tris	9

3.5.1.1 “Steady State” Fluoresans Spektroskopisi

Örnekler, seyrelmeyle absorpsiyonları 0.05 - 0.15 aralığına ayarlanarak ölçüm almaya uygun hale getirildi.. Uyarma dalga boyu hem 290 nm’ye hemde 300nm’ye ayarlanarak steady state fluoresans spektroskopisinde PH’sı 1.25 , 3.17, 5.49, 7.14, 9.11 olan enzim çözeltilerin 10 ile 65 ° C arası değişen sıcaklıklarda okunan steady state emisyon spektralarından , dalgaboyundaki kayma ve fluoresans şiddetindeki değişim okundu .

3.5.2 Örneğin Hazırlanması

1 gr saf *Mucor miehei* rennet 25 ml tamponda çözülür . Fluoresans ölçümü yapılacak örnekler bu enzim çözeltilisinden 400 µl alınıp 3600 µl’ ye aynı tamponla seyreltilerek hazırlanır ve pH’sı kontrol edilir.

Çizelge 3.3 *Mucor miehei* rennetin Time master spektrofotometresinde fluoresans özelliklerinin incelenmesinde kullanılan kullanılan tampon çözeltileri

Kullanılan Tampon Çözeltiler	Çalıştıkları pH Aralıkları
0.05 M Asetik Asit	3 –5
0.05 M NaH ₂ PO ₄	6 –8
0.05 M Tris	9

3.5.2.1 “Time – Master” Fluoresans Spektroskopisi

pH'sı 3 , 5 , 7 , 9 olan örneklerin 10 ile 65 °C arası değişen sıcaklıklarda uyarma dalga boyunu 297 nm'ye ayarlayarak “Time- Master” fluoresan spektroskopisinde time-resolved emisyon spektrumlarını aldık . Sıcaklık değişimine bağlı olarak maksimum dalga boyunu ve bu dalga boyuna karşılık gelen fluoresans şiddetini okuduk. Bozunma”decay” spektrumlarından uyarma dalga boyu 297 nm, emisyon dalga boyu ise time resolved spektrumlarda kaydedilen maksimum dalga boyuna ayarlanarak fluoresans ömürleri okundu.

3.5.3 Örneğin Hazırlanması

- 2,5 ml 10 oranlı konjugattan alınıp 0,5 ml tampondan ilave edildi ve pH'sı okundu.
- 1,25 ml 20 oranlı konjugattan alınıp 1,75 ml tampondan ilave edildi ve pH'sı okundu.
- 0,833 ml 30 oranlı konjugattan alınıp 2.167 ml tampondan ilave edildi ve pH'sı okundu. Konjugatlar Çizelge 3.3'teki tamponlarla farklı pH'larda hazırlandı.

3.5.3.1 “Time – Master” Fluoresans Spektroskopisi

pH değeri 3 , 5 , 7 , 9 dolayında olan konjugat örneklerin 10 ile 65 °C arası değişen sıcaklıklarda uyarma dalga boyunu 297 nm'ye alınarak time- resolved emisyon spektrumları kaydedildi. Sıcaklık değişimi ile birlikte maksimum dalga boyu ve bu dalga boyuna karşılık gelen fluoresans şiddeti okundu. Bozunma 'decay' spektrumlarından uyarma dalga boyu 297 nm ve emisyon dalga boyu ise time resolved spektrumlarında belirlenen maksimum dalga boyu olarak alındı ve fluoresans ömürleri hesaplandı.

3.6 *Mucor miehei* Rennetin Doğal ve SDS Elektroforezi

3.6.1 Farklı pH'larda Tek Jel Kullanarak Yapılan Doğal Elektroforez

3.6.1.1 pH 8,8 Tamponu Kullanılarak Yapılan Doğal Elektroforez

3.6.1.1.1 Kullanılan Çözeltiler

A) %30 Akrilamid/Bisakrilamid karışımı:

29g akrilamid ve 1g N,N'-Metilen-bis Akrilamid karıştırıldı ve 100ml destile suda çözüldü. Bu çözelti renkli şişede 4°C'de 30 gün saklanabilir.

B) 1.5 M Tris-HCl çözeltisi (pH:8.8):

18.1g Tris 100ml destile suda çözüldü. HCl ile pH'sı 8.8 ayarlandı. Bu çözelti 4°C'de saklanabilir.

C) 1M Tris-HCl çözeltisi (pH:6.8):

12.1g Tris 100 ml destile suda çözülerek pH'sı HCl ile 6.8 ayarlandı. Bu çözelti 4°C'de saklanabilir.

D) %10 Amonyum Persülfat (w/v):

0.1g Amonyum Persülfat 1 ml destile suda çözüldü.

E) Yükleme Tamponu (Sample Buffer):

1M Tris-HCl, pH 6.8	1.0 ml
Gliserin (Gliserol)	1.6 ml
%0.5 (w/v) 'bromfenol blue'	0.4 ml
destile su	5.0 ml

F) Yürütme Tamponu (Running Buffer):

45g Tris-base ve 216g glisin karıştırıldı, ve sonra bu karışım 3 litre destile suda çözüldü. Bu çözeltiden 600 ml alınıp 3 litreye tamamlandı.

G) *Mucor miehei* rennet enzim çözeltisi:

0.2 gr enzim 5ml destile suda çözülerek, elektroforez uygulanacak olan örnek çözelti hazırlandı.

H) Polimer-*Mucor miehei* rennet konjugat çözeltileri:

Hazırlama sırasında mol oranları 10, 20 ve 30 olarak alınan konjugatların çözeltilerinden 15µl elektroforez diskine uygulandı . Standart olarak ise 0,075 gr saf enzimin 15 ml PBS'teki çözeltisi kullanıldı.

3.6.1.1.2 Deneyin Yapılışı

Bu işlemde 3.6.1.1.1 bölümünde verilen çözeltiler kullanıldı. pH 8,8 olan tek bir jel hazırlandı.

%10 'luk 10 ml jelin hazırlanışı:

Destile su	4.1	ml
%30 Akrilamid karışımı	3.3	ml
1.5M Tris (pH 8.8)	2.5	ml
%10 Amonyum Persülfat	0.1	ml
TEMED	0.004	ml

Jel disk içine dökülerek kuyucuk tarağı yerleştirildi ve jelin polimerleşmesi için yaklaşık 30 dakika beklendi. Bundan sonra tarak çıkarıldı ve disk elektroforeze yerleştirildikten sonra üzerine hazırlanan yürütme tamponu ilave edildi. 15 µl yükleme tamponu ile 15µl enzim örneği karıştırıldıktan sonra kuyucuklara verildi. Hazırlık tamamlandıktan sonra akım uygulanarak yaklaşık 1 saat beklendi. Bu sürenin sonunda disk, elektroforezden çıkarılarak jel yıkandı ve boya çözeltisine konuldu. 50-60 °C'de 30 dakika beklendikten sonra 'destraining buffer'da bantlar gözlemlendi.

3.6.1.2 pH: 4 Ortamında Yapılan Doğal Elektroforez

3.6.1.1.1 bölümünde hazırlananlara(konjugat çözeltisi hariç) ilave olarak; 0,05M Asetik Asid çözeltisi (pH:4) hazırlandı.

PH:4 olan yükleme tamponu:

Daha önce hazırlanan yükleme tamponundan 1ml alındı ve 1ml asetik asid tamponu eklendikten sonra pH 4'e ayarlandı.

Yürütme Tamponu (Running Buffer):

14,4g glisin 1litre 0,05M asetik asid çözeltisinde çözülerek hazırlandı.

%10 'luk 10 ml jelin hazırlanışı:

Destile su	4,1 ml
%30 Akrilamid karışımı	3.3 ml
0,05M Asetik asid (pH 4)	2.5 ml
%10 Amonyum Persülfat	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

Elektroforez işlemi daha önce yapıldığı gibi tekrarlandı.

3.6.1.3 pH: 5,5 Ortamında Yapılan Doğal Elektroforez

3.6.1.1.1 bölümde belirlenen çözeltiler hazırlandı. (konjugat çözeltisi hariç) Ek olarak; 0,05M Asetik Asid çözeltisi de (pH:5,5) hazırlandı.

PH'sı 5,5 olan yükleme tamponu:

Yükleme tamponundan 1ml alınıp,1ml asetik asid tamponundan konuldu ve pH'sı 5,5'e ayarlandı.

Yürütme Tamponu (Running Buffer):

14,4g glisin 1litre 0,05M asetik asid çözeltisinde çözülerek hazırlandı.

%10 'luk 10 ml jelin hazırlanışı:

Destile su	4,1	ml
%30 Akrilamid karışımı	3.3	ml
0,05M Asetik asid (pH 5,5)	2.5	ml
%10 Amonyum Persülfat	0.1	ml
TEMED	0.004	ml

Elektroforez işlemi daha önce yapıldığı gibi tekrarlandı.

3.6.2 Mucor *miehei* Rennetin Denatüre Edici Koşullarda Elektroforezi (SDS-PAGE)

3.6.2.1 Kullanılan Çözeltiler

A)%30 Akrilamid/Bisakrilamid karışımı:

29g akrilamid ve 1g N,N'-Metilen-bis Akrilamid karıştırılıp 100ml destile suda çözüldü. Bu çözelti renkli şişede 4°C'de 30 gün saklanabilir.

B)1.5 M Tris-HCl çözeltisi (pH:8.8):

18.1g Tris 100ml destile suda çözüldü ve HCl ile pH'sı 8.8 ayarlandı. Bu çözelti 4°C'de saklanabilir.

C) 1M Tris-HCl çözeltisi (pH:6.8):

12.1g Tris 100 ml destile suda çözümlenerek pH'sı HCl ile 6.8 ayarlandı. Bu çözelti 4°C'de saklanabilir.

D) %10 SDS (w/v):

Sürekli karıştırarak 10g SDS 60 ml suda çözüldü ve destile su ile 100ml'e tamamlandı.

E) %10 Amonyum Persülfat (w/v):

0.1g Amonyum Persülfat 1 ml destile suda çözüldü. Bu çözelti her kullanmada taze olarak hazırlandı.

F)Yükleme Tamponu (Sample Buffer):

1M Tris-HCl,pH 6.8	1.0ml
Gliserol	1.6ml
%10 SDS	1.6ml
%0.5(w/v) 'bromfenol blu	0.4ml
β -merkaptoetanol	0.4ml
destile su	8.0ml

G) Yürütme Tamponu (Running Buffer):

45g Tris-base,15g SDS ve 216g glisin karıştırıldı ve 3 litre destile suda çözüldü. Bu çözültiden 600 ml alınıp 3 litreye tamamlandı.

H) Mucor *miehei* rennet enzimi:

0.4 gr enzim 5ml destile suda çözümlenerek elektroforez uygulanacak olan örnek çözelti hazırlandı.

3.6.2.2 Deneyin Yapılışı**A)%10 'luk 10 ml alt jelin hazırlanışı:**

%30 Akrilamid karışımı	3.3 ml
1.5M Tris (pH 8.8)	2.5 ml
%10 Amonyum Persülfat	0.1 ml
%10 SDS	0.1 ml
TEMED	0.004 ml
Destile su	4.0 ml

(TEMED en son eklenir)

B)%5'lik 5ml üst lejin hazırlanışı:

%30 Akrilamid karışımı	0,83 ml	
1.0M Tris (pH 6.8)	0,63 ml	
%10 SDS	0.05 ml	
%10 Amonyum Persülfat	0.05 ml	
Destile su	3.4 ml	
TEMED	0,005 ml	(TEMED en son konulur)

Alt jel ve üst jel disk içine dökülerek kuyucuk tarağı yerleştirilir ve jelin polimerleşmesi için yaklaşık 30 dakika beklenir. Sonra tarak çıkarılır ve disk elektroforeze yerleştirilip üzerine hazırlanan yürütme tamponu ilave edilir. 15µl yükleme tamponu ile 15µl enzim örneği karıştırılıp S-S bağlarını kırmak için birkaç dakika 95 °C'deki su banyosunda tutulur ve kuyucuklara verilir. Bir kuyuya da test olarak aynı şekilde hazırlanan BSA çözeltisi konur. Sonra akım uygulanarak yaklaşık 1 saat beklenir. Bu sürenin sonunda disk elektroforezden çıkarılarak jel yıkanır ve boya çözeltisine alınır. 50-60 °C'de 30 dakika beklendikten sonra 'destraining buffer'da bantlar gözlenir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Ön çalışmada, 125.000 kuvvetindeki ticari *Mucor miehei* rennetin 0,1 N NaOH ve 0,1N HCl ile pH'sı 5,2 ve 7,0'a ayarlanan çözeltilerine, önce 1lt enzim çözeltisine 150 ml %30'luk H₂O₂ olacak şekilde peroksit ilave edildi (Coraelius ve Elkbart, 1982). %30'luk H₂O₂ miktarını 2, 4, 5 ve 7,5 kat azaltarak denemeler yapıldı. H₂O₂'in metiyonin gruplarının metiyonin sülfokside yükseltgemesi esasına dayanan modifikasyon reaksiyonu +4⁰ C'de ortalama 10 gün takip edildi. Hergün enzim çözeltisinin pH'sı kontrol edildi, normal aktivite ve termal aktivite tayini yapıldı. Bu denemeler sonucu pH'sı 7 olan enzim çözeltisinin normal aktivitesinin pH'sı 5 olan enzim çözeltisine göre daha kararlı olduğu belirlendi. Termal aktivite iki pH'da da giderek düştü ve sıfırlandı. Böylece termolabile enzim elde edildi. Düşük H₂O₂ miktarlarında da aynı başarılı sonuçlar gözlemlendi. (Ek1, Şekil 1-10).

4.2 *Mucor miehei* rennet (Type II From *Mucor miehei* Sigma lot:60K1175) enziminin substratı kazein proteindir. Kazein proteininin izoelektrik noktası 4.6' dır. Çalışmamızda substrat olarak süt kazeinini kullanarak 32 °C 'de ve pH'sı 5, 5,5 , 6, 6,5, 7 olan ortamlarda (hem substrat hemde örnek ortamı aynı pH'da olmalıdır) enzimin pıhtı oluşturma süresinin tayini yapıldı. Ortamın pH'sı 5'ten küçük olduğu zaman çöken süt kazeinine asitliğin de etkisi olacağı için sadece enzimin etkisini gözlemlemek mümkün olmayacaktır. Bundan dolayı çalışmamızı pH:5'ten başlatıldı. pH: 5 ile 7 aralığında pıhtı oluşum süresi izlendi .pH arttıkça pıhtı oluşturma süresi de arttı , dolayısıyla enzimin aktivasyonunun azaldığı belirlendi. PH:5-7 aralığında dializ işlemi görmüş enzim örneklerinin aktivite tayini yapıldı.Dializ işlemi görmüş enzimde tuzlu enzime göre daha çabuk pıhtı oluşumu gözlemlendi. (Ek 1, Şekil 11) Dializ işlemi görmüş konjugat örneklerinde, mol oranı 30 alınan konjugatta pıhtı oluşumunda gecikme gözlemlendi. (Ek 1, Şekil 13) En iyi sonuç 20 oranlı konjugatta elde edildi. Dializ işlemi görmemiş konjugat örneklerinde ise en kısa sürede pıhtı 30 oranlı örnekte belirlendi. (Ek 1, Şekil 12)

4.3 *Mucor miehei* rennetin (Type II From *Mucor miehei* Sigma lot:60K1175) 0.1g / 10ml des.su, konsantrasyonlarındaki çözeltilerinin pH ile 0,01N NaOH sarfiyatı(ml) arasında çizilen titrasyon eğrisinden izoelektrik noktası (pI) ~ 6,8 olarak belirlendi . (Ek 1, Şekil 14).

4.4 Doğal şartlarda pH 4 , 5,5 , 8,8 olan ortamlarda PAGE Elektrofözezi yapıldı . SDS-PAGE elektrofözezi ile enzimin alt birimlerinin olup olmadığına bakıldı ve saflığı kontrol edildi. Literatüre göre Mucor miehei rennetin subünitesi bulunmamaktadır (Brown vd., 1990) ancak bizim çalışmada kullandığımız Type II From Mucor miehei Sigma üretimi (lot:60K1175) olan enzimin içinde %91,5 oranında NaCl tuzu bulunmaktadır.Bundan dolayı yaptığımız SDS- Page elektrofözezinde birden çok bant gözlemlendi. Doğal şartlardaki PAGE elektrofözezden elde edilen sonuçlara göre pH'sı 4, 5,5 olan ortamlara göre pH:8.8 olan ortamda enzim bantlarının jel üzerinde daha çok yol alması enzimde pozitif yüklü grupların daha çok olduğunu göstermektedir. Normal enzimde doğal PAGE elektrofözez uygulamasında en iyi yürüme pH:8.8 olan ortamda gerçekleştiğinden mol oranı 10,20,30 alınan konjugat örnekleri de bu pH'da yürütüldü. Elde edilen bantların jel üzerinde aldığı yol normal enzim ile aynı olurken bantlardaki renk yoğunluğunda farklılık gözlemlendi. Mol oranı 10 alınan konjugata ait bant en silik yani bağlanmamış protein oranı en düşük , mol oranı 30 olan konjugata ait bant ise en fazla renk yoğunluğu gösterdiğinden dolayı bağlanmamış protein oranına sahip olduğu belirlendi. (Ek 1, Şekil 15)

4.5 Farklı pH'lardaki tamponlar kullanılarak hazırlanan Mucor *miehei* rennet çözeltilerinin 10,20,30,32, 37,40,45,50,55,60,65°C sıcaklıklarda 'steady-state' spektroförometrede 290 ve 300 nm dalga boylarında uyarma ile emisyon spektrumları elde edildi. Alınan spektrumların maksimum noktalarındaki floresans şiddetleri ve bu noktaların bulunduğu dalga boyları okundu. Çözeltilerin pH değerleri ile floresans şiddetleri ve yine pH değerleri ile kaydedilen dalga boyları arasında grafikler çizildi. (Ek 1, Şekil 16,18, 20, 22). Ayrıca çözeltilerin sıcaklıkları ile floresans şiddetleri ve ek olarak bu sıcaklıklar ile maksimum noktaların bulunduğu dalga boyları arasında grafikler elde edildi (Ek 1, Şekil 17, 19, 21, 23).

4.5.1 Steady -State Spektroförometreden elde edilen sonuçlar;

Farklı sıcaklıklarda floresans şiddeti - pH grafiği :

290 nm dalga boyunda uyarma yapılarak elde edilen "steady state" emisyon spektrumlarında farklı sıcaklıklarda pH'nın artması ile birlikte floresans şiddetinin değişiminde düzenli bir seyir izlenmektedir. Floresans spektrumlarında maksimum nokta 45⁰C'ye kadar pH~3-4 dolayında iken bu sıcaklığın üzerinde pH:5-6 dolayına kaymaktadır. Maksimum noktadaki kayma 45⁰C'den

sonra yapıda konformasyonel değişimin başladığını göstermektedir. pH:7'de her sıcaklıkta floresans şiddeti minimum değerdedir. pH:7'den sonra giderek artan pH'yla birlikte hemen her sıcaklıkta tekrar floresans şiddetinde artma gözlenmiştir. pH:3-4 dolayında molekülde toplanma mevcuttur, molekülün dolayısıyla triptofanların suyla teması daha azdır (Chadborn.N vd.,1999). pH:7'de ise molekülde maksimum yayılmadan dolayı triptofanın suyla teması ve quencing etkisi maksimumdur. pH:7'den sonra artan pH'yla birlikte molekülde tekrar toplanma olmaktadır, böylece su ile temas ve quencing azalmaktadır.(Ek 1, Şekil 20) 300 nm dalga boyunda uyarma yapılarak elde edilen floresans spektrumlarında pH'ya bağlı olarak floresans şiddeti biraz daha düşük olmakla birlikte benzer gidiş izlemiştir.(Ek 1, Şekil 22)

Farklı pH'larda floresans şiddeti –sıcaklık grafiği:

290 nm dalga boyunda uyarma yapılarak elde edilen steady state emisyon spektrumlarında hemen her pH'da sıcaklığa bağlı olarak floresans şiddetinde düzenli bir azalma izlenmektedir.Fluoresans şiddetinde azalma sıcaklık arttıkça molekülde yayılmanın olduğunu ve suyla temasın arttığını dolayısıyla quenching etkisinde arttığını göstermektedir. pH:3'te 40°C'den sonra floresans şiddetindeki şiddetli, azalma konformasyonel değişimi göstermektedir (Chadborn.N vd.,1999). pH:5'te floresans şiddetinde düzenli bir azalma , pH:7' de düşük şiddetten başlayarak yavaş azalma ,pH:9'da yüksek şiddetten başlayarak yavaş bir azalma mevcuttur (Ek 1, Şekil 21). 300 nm 'de uyarma yapılarak elde edilen grafiklerde de benzer seyir gözlenmektedir. Ancak floresans şiddeti daha düşüktür (Ek 1, Şekil 23).

Farklı sıcaklıklarda maksimum dalga boyu - pH grafiği :

Uyarma Dalga boyu 290 nm olduğunda stedy state emisyon spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu hemen her sıcaklıkta pH:1-3 arası sola kaymaktadır (blue shift),yani molekül toplanmıştır ve suyla teması azdır. pH:5'ten sonra ise 50, 55, 60, 65°C'lerde hariç maksimum dalga boyu sağa kaymaktadır(red shift) ,yani molekül açılmakta ve suyla teması artmaktadır . 50, 55, 60, 65°C'de pH:5,5-7 arası maksimum dalga boyunda sağa kayma pH:7'den sonra ise tekrar sola kaymanın olması molekülde konformasyonel değişimin olduğunu göstermektedir (Ek 1, Şekil 16). 300 nm 'de uyarma yapılarak elde edilen grafikte de benzer seyir gözlenmektedir.(Ek 1, Şekil 18)

Farklı pH'larda maksimum dalga boyu - sıcaklık grafiği :

Uyarma dalga boyu 290 nm olduğunda stedy state emisyon spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu pH:3 ve pH:7'de 40 °C'den sonra keskin bir sağa kayma gösterdi ,yani molekül bu pH'larda yüksek sıcaklıklarda yayılmakta, dolayısıyla suyla teması artmaktadır. PH.1'de yavaş ve düzenli bir sağa kayma (red shift)ile molekülün suyla temasının olduğunu göstermektedir., pH:5 'te sağa kaymaya yönelik çok az bir değişim , pH:9'da ise 50 °C'den sonra sola kayma (red shift) molekülün yüksek sıcaklıkta toplandığını göstermektedir (Ek 1, Şekil 15) uyarma dalga boyu 300 nm olduğunda ise pH:3'te molekül yavaş ama sürekli bir sola kayma (blue shift) molekülün toplandığını ve suyla temasın azaldığını göstermektedir.Diğer pH'lar artan sıcaklığa bağlı olarak önemli bir değişim göstermemektedir (Ek 1, Şekil 17)

4.6 "Time Master" spektrofotometre kullanılarak, enzimin 297nm dalga boyunda uyarma yapılarak TRES spektrumları ve bozunma(decay) grafikleri alındı. TRES emisyonlarının maksimum noktasının bulunduğu dalga boylarında uyarma yapılarak elde edilen bozunma grafiklerinden fluoresans ömürleri (lifetime) hesaplandı. Çözeltilerin pH değerleri ile TRES spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu , fluoresans şiddetleri ve ayrıca fluoresans ömürleri arasında grafikler çizildi (Ek 1, Şekil 24, 25, 26). Çözeltilerin sıcaklık ile fluoresans şiddetleri, fluoresans ömürleri arasında ve ayrıca bu sıcaklıklar ile maksimum noktaların bulunduğu dalga boyları arasında grafikler elde edildi (Ek 1 ,Şekil 27, 28, 29).

4.6.1 'Time-Master' Spektrofotometreden Elde Edilen Sonuçlar ;

Farklı pH'larda fluoresans şiddeti – sıcaklık grafiği:

297 nm uyarma dalga boyunda TR-emisyon spektrumlarından elde edilen fluoresan şiddetinde sıcaklık arttıkça tüm pH'larda düzensiz bir azalma gözlemlendi. Sıcaklık arttıkça fluoresans şiddetindeki değişimin pH: 9'da en yüksek olduğu belirlendi. Genel olarak her pH'da molekülde toplanma ve sıcaklık arttıkça giderek açılma gözlenmektedir. (Ek 1 Şekil 27).

Farklı pH' larda Fluoresans ömrü–sıcaklık grafiği :

297 nm uyarma dalga boyunda bozunma spektrumlarından elde edilen fluoresans ömrü sıcaklık arttıkça tüm pH'larda düzensiz bir azalma gösterdi. PH:7'de 30 °C'de , pH:5'te 30-40 °C arasında pH:9'da 20-30 °C arasında maksimum floresans ömrü görülmektedir.Sıcaklık arttıkça fluoresans ömründe değişimin pH: 9'da en yüksek olduğu gözlemlendi. Genel olarak her pH'da sıcaklığın

artmasıyla floresans ömründeki düzensiz azalma molekülde açılma yani suyla temasın ve quenching etkisinin arttığını göstermektedir(Ek 1, Şekil 29).

Farklı pH'larda maksimum dalga boyu - sıcaklık grafiği:

297 nm uyarma dalga boyunda TR-emisyon spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu artan sıcaklıkla her pH'da sağa kayma (red shift) göstermekle birlikte kaymanın düzensiz olduğu gözlenmektedir. Sıcaklık arttıkça molekülde açılma olmaktadır, dolayısıyla suyla temas ve quenching etkisi artmaktadır (Ek 1, Şekil 25) .

Farklı sıcaklıklardaki floresans şiddeti - pH grafiği :

297 nm uyarma dalga boyunda TR-emisyon spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti pH arttıkça özellikle pH:7 ve 7'den sonra 50, 55, 60, 65 °C 'lerde azalma göstermiştir, yani molekül yayılmış ve triptofanların suyla teması artmıştır.Diğer sıcaklıklarda ise floresans şiddetinde artma bazik pH'da da devam etmiştir. PH:3-7 aralığında ise floresans şiddetinde her sıcaklıkta artma mevcuttur.Düşük pH'larda genelde molekül toplanma eğilimindedir. Dolayısıyla suyla temas azdır ve floresans şiddeti daha yüksektir (Ek 1, Şekil 26).

Farklı sıcaklıklardaki floresans ömrü - pH grafiği :

297 nm uyarma dalga boyunda bozunma spektrumlarından elde edilen floresans ömrü pH arttıkça 50, 55, 60, 65 °C 'lerde azalma göstermiştir, yani molekül yayılmış ve triptofanların suyla teması artmıştır. Diğer sıcaklıklarda ise floresans ömründe artma bazik pH'da da devam etmiştir. PH:3-7 aralığında ise düzensiz bir seyirle birlikte genelde molekül toplanma eğilimindedir(Chadborn.N vd.,1999). Dolayısıyla suyla temas azdır ve floresans ömrü yüksektir (Ek 1, Şekil 28).

Farklı sıcaklıklardaki maksimum dalga boyu - pH grafiği :

297 nm uyarma dalga boyunda TR-emisyon spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu düzensiz bir seyir izlemektedir.37, 40, 45, 50, 55, 60, 65 °C sıcaklıklarda yaklaşık pH:3 - 4,5 arası sola kayma(blue shift) gözlenmektedir yani molekül toplanmıştır (Chadborn.N vd.,1999). pH:4,5-6 arası dalga boyundaki artış sağa kaymayı (blue shift) doğrulamaktadır. Molekül yayılmıştır ,triptofanların suyla teması artmıştır.10, 20, 30,32 °C sıcaklıklarda ise düşük pH'larda molekülde yayılma , yüksek pH'larda ises molekülde toplanma gözlenmektedir (Ek 1, Şekil 24).

4.6.2 Mol Oranı 10, 20, 30 Olarak Alınan Enzim/Dekstran Konjugatlarının “Time-Master” Spektrofluorometre ile elde edilen Floresans sonuçları:

4.6.2.1 Mol oranı 30 olan konjugat için

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki maksimum dalga boyu değişim grafiği:

Maksimum dalga boyu sıcaklık arttıkça çok az bir değişim göstermektedir. Ph arttıkça maksimum dalga boyunda sağa kayma (redshift) gözlenmekte yani molekül açılmakta ve suyla temas oranı artmaktadır (Ek 1, Şekil 54, 55).

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki Floresans şiddeti değişim grafiği:

Hemen her pH'da sıcaklık arttıkça floresans şiddeti azalmaktadır. PH arttıkça ise floresans şiddetinde genel olarak artmaya yönelik bir seyir izlenmektedir. 10 °C ve 32 °C'lerde daha keskin bir azalma gözlenmektedir (Ek 1, Şekil 56, 57).

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki Floresans ömrü değişim grafiği:

Floresans ömrü sıcaklık arttıkça pH: 5 ve 6' da azalma, pH: 3 ve 8'de artma göstermektedir. PH arttıkça 40, 45, 50, 55 °C'lerde artma, düşük sıcaklıklarda ise azalma göstermektedir. (Ek 1 Şekil 58, 59).

4.6.2.2 Mol Oranı 20 Olan Konjugat İçin

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki maksimum dalga boyu değişim grafiği:

Maksimum dalga boyu 40 °C'lik sıcaklıkta hariç diğer tüm sıcaklıklarda pH arttıkça sağa kayma (redshift) pH 8'den sonra sola kayma göstermiştir yani molekül önce açılmış sonra toplanmıştır (Ek 1, Şekil 42, 43).

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki floresans şiddeti değişim grafiği:

Genel seyir olarak pH arttıkça floresans şiddetinde keskin bir artma sadece 20 °C'de gözlenirken, diğer sıcaklıklarda pH arttıkça floresans şiddeti daha yavaş bir artma göstermektedir (Ek 1, Şekil 44, 45).

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki floresans ömrü değişim grafiği:

Sıcaklık arttıkça her pH'da floresans ömründe değişken bir seyir gözlenmekte. pH 7'de sıcaklık arttıkça floresans ömrü giderek azalmakta diğer pH'larda ise artma-azalma şeklinde seyir izlenmektedir_(Ek 1, Şekil 46, 47).

4.6.2.3 Mol Oranı 10 Olan Konjugat İçin**Farklı sıcaklık ve pH'lardaki maksimum dalga boyu değişim grafiği:**

Genel olarak maksimum dalga boyu pH arttıkça sağa kaymıştır yani molekülün açılmasıyla suyla teması artmıştır (Ek 1, Şekil 30, 31).

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki floresans şiddeti değişim grafiği:

Floresans şiddeti bazik ortamda en yüksek maksimuma ulaşmaktadır. Sıcaklığın artmasıyla floresans şiddetindeki azalma maksimum dalga boyundaki değişimi doğrulamaktadır (Ek 1, Şekil 32, 33).

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki floresans ömrü değişim grafiği:

Floresans ömrü sıcaklık arttıkça tüm pH'larda dalgalı bir seyirle azalma göstermektedir (Ek 1, Şekil 34, 35).

4.6.3 Mol Oranı 10, 20, 30 Olarak Alınan Dializli Enzim/Dekstran Konjugatlarının "Time-Master" Spektrofluorometre ile elde edilen Floresans sonuçları:**4.6.3.1 Mol Oranı 30 Olan Dializli Konjugat İçin****Farklı sıcaklık ve pH'lardaki maksimum dalga boyu değişim grafiği:**

Maksimum dalga boyu pH 3-5.5 arası her sıcaklıkta sağa kaymakta (redshift), pH 5.5-7 arasında sola kaymakta (blueshift), sonra tekrar hafif bir sağa kayma göstermektedir. Genel olarak dalgalı bir seyir izlenmektedir (Ek 1, Şekil 60, 61).

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki floresans şiddeti değişim grafiği:

Floresans şiddeti sıcaklık arttıkça dalgalı bir seyirle azalma göstermektedir (Ek 1, Şekil 62, 63).

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki fluoresans ömrü değişim grafiği:

Fluoresans ömrü hem her pH, hem de her sıcaklıkta artmakla birlikte çok az bir değişim göstermektedir (Ek 1, Şekil 64, 65).

4.6.3.2 Mol Oranı 20 Olan Dializli Konjugat İçin**Farklı sıcaklık ve pH'lardaki maksimum dalga boyu değişim grafiği:**

Dalga boyu sıcaklık arttıkça azalma-artma şeklinde bir seyir göstermekle birlikte molekülde sola kayma (blueshift) mevcuttur, yani molekülün suyla teması azalmakta molekül toplanmaktadır (Chadborn.N vd.,1999), (Ek 1, Şekil 48, 49).

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki fluoresans şiddeti ve fluoresans ömrü değişim grafiği:

Fluoresans şiddetinde sıcaklık arttıkça hızlı bir azalma mevcuttur. Fluoresans ömründe ise genel seyir olarak değişken bir azalma gözlenmektedir (Ek 1, Şekil 50, 51, 52, 53).

4.6.3.3 Mol Oranı 10 Olan Dializli Konjugat İçin**Farklı sıcaklık ve pH'lardaki maksimum dalga boyu değişim grafiği:**

Maksimum dalga boyu pH arttıkça önce artmakta, bazik alanda ise azalmaktadır. Sıcaklık arttıkça maksimum dalga boyu giderek artmakta yani sağa kayma (redshift) izlenmektedir (Ek 1, Şekil36, 37).

Farklı sıcaklık ve pH'lardaki fluoresans şiddeti ve fluoresans ömrü değişim grafiği:

Fluoresans şiddeti bazik ortamda yüksek değerlerdeyken, sıcaklığın artmasıyla giderek azalmaktadır (Ek 1, Şekil 38, 39). Fluoresans ömrü asidik pH'larda bazik pH'ya göre çok daha yüksek değerlerde olup genel olarak değişken bir seyir göstermektedir (Ek 1, Şekil 40, 41).

İncelenen *Mucor miehei* rennet enzimi üç adet triptofan içermektedir. Ortamın pH'sı ya da sıcaklığı değiştiğinde molekülün aldığı forma bağlı olarak, bu amino asitlerin bulunacağı konuma göre floresans spektrumlarında farklılıklar olması beklenir. Hazırlanan *Mucor miehei* rennet çözeltilerinde triptofan floresansı esas alınarak, steady-state ve time-master spektrofloreometre ile elde edilen sonuçların birbirini desteklediği görüldü.



KAYNAKLAR

Abdel Malak. A.C., (1992), "Calf Chymosin as a Catalyst of Peptide Synthesis", *Biochem.J.*, 288: 941-943.

Barach, J., (1985), "What's New in Genetic Engineering of Dairy Starter Cultures and Dairy Enzymes", 39(10):73.

Berger, E.G., Buddecke, E., Kamerling, J.P., Kobata, A., Paulson, J.C. ve Veliegenthart, J.R.G., (1982), "Structure, biosynthesis, and functions of glycoprotein glycans", *Experientia*, 38:1129.

Brown, D.E., Wynne, G.M., Clarke, J.A. ve Yada, Y.R., (1990), "Purification of Two Fungal aspartic Proteinases Using Fast Protein Liquid Chromatography", *Agric.Biol.Chem.*, 54(6):1563-1565.

Chadborn. N., Brynt, J., O'Shea, P., (1999) "Ligand -dependent Conformational of Serum Albumin Revealed by Tryptophan Fluorescence Quenching", *Biophysical Journal*, 76:2198-2207.

Dalgleish, D.G., (1982), "Developments in Dairy Chemistry-1", Fox, P.F., Ed., *Applied Science*, New York 157-187.

Demchenko, A.P. (1996), *Ultraviolet Spectroscopy of Proteins*. Springer Verlag, Heidelberg.

Demirci, M., (1996), "Her Yönüyle Peynir", Hasan Yayıncılık, İstanbul.

Dennis A. Cornelius ve Elkbart, Ind. (1982), "Process For Decreasing The Thermal Stability of Microbial Rennet", United States Patent No:4,348,482

Fox, P.F., (1987), "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology", Elsevier Applied Science Publisher, London and New York.

Fox, P.F., (1987), "General and Molecular Aspects of Rennets", Elsevier Applied Science Publisher, London and New York.

Harris, E.L.V. ve Angal, S. (1989), *Protein Purification Methods a Partical Approach*, Oxford University Press.

Holmes, D.G. ve Ernstrom, A.C., (1973), "Distribution of Milk-Clotting Enzymes between Curd and Whey, and their Survival During Cheddar Cheese Making", *J.Dairy. Sci.*, 56:622 (Abstr)

Hyslop, D.B., Swanson, A.M. ve Lund, D.B., (1979), "Heat Inactivation of Milk-Clotting Enzymes at Different pH", *Journal of Dairy Science*, 62(8):1227-1232.

Lagrange, A., Paquet, D. ve Alais, C., (1980), "Comparative Study of two *Mucor miehei* Acid Proteinase. Purification and some Molecular Properties", *Int.J.Biochem*, 11:347.

Lakowicz, J.R. (1986), *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York.

Lyster, R.L.J., (1970), "The Denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in heated milk", Dairy.Res.37:233.

Mustafaev.M.I., (1996), "Biyopolimerler" Marmara Araştırma Merkezi ,Gebze.

Ottesen, M. ve Rickert, W., (1970), "The Isolation and Partial Characterization of an Acid Protease Produced by *Mucor miehei* ", Compt.Rend. Trav. Lab. Calsberg, 37:301.

Pszczola, E.D., (1989), "Rennet containing %100 Chymosin Increases Cheese Quality and Yield", Food Technology, 84-89.

Rickert, W.S. ve McBride-Waren, P.A., (1975), "Acid Proteases From Species of *mucor* II. Partial Characterization of Acid Protease Produced by a Strain of *Mucor miehei* Isolated in Cuba ", Can.J.Biochem.53:269.

Schwimmer, S. (1981), Source Book of Food Enzymology, the Avi Publishing Company Inc. Westport, Connecticut.

Scoot, R., (1981), "Cheesemaking Practice", Vol.2., Applied Science Publisher , London..

Smith, J.L. ve Yada, R.Y., (1991), "Characterization of Two Aspartyl Proteinases from a Commercial Fungal (*Mucor miehei*) Rennet", Can.Inst.Food.Sci. Technol.J., 24(1/2):48-56.

Sternberg, M.Z., (1971), "Crystalline Milk-Clotting Protease from *Mucor miehei* and Some of its Properties", Journal of Dairy Science, 54(2):159-167.

Sven B-J, Palle.S, Peter E , (1986), "Method For thermal Destabilization of Microbial Rennet", United states Patent No:4,591,565

Turhan .M., Mutlu.M., (1997), "Kinetics of κ -casein/chymosin hydrolysis", Milchwissenschaft, 52(10):559-563

Van Hooydonk A.C.M. ve Walstra.P., (1987), "A Consistent Model for the Clotting of Milk by Rennet ; a Reply to a Comment", Neth.Milk.Dairy.J., 41:293-295.

Voynick, I.M. ve Fruton, J.S., (1971), Proc. Natl.Acad.Sci. USA, 68, 257-258.

Visser.S., Slangen.J., ve Van Rooijen , (1987), "Peptide Substrate for Chymosin (Rennin)", Biochem . J., 244:553-558.

Yada, Y.R. ve Nakai, S., (1986), "Use of Principal Component Analysis to Study the Relationship between Physical/Chemical Properties and the Milk-Clotting to Proteolytic Activity Ratio of Some Aspartyl Proteinases", J.Agric.Food Chem.,34:675-679.

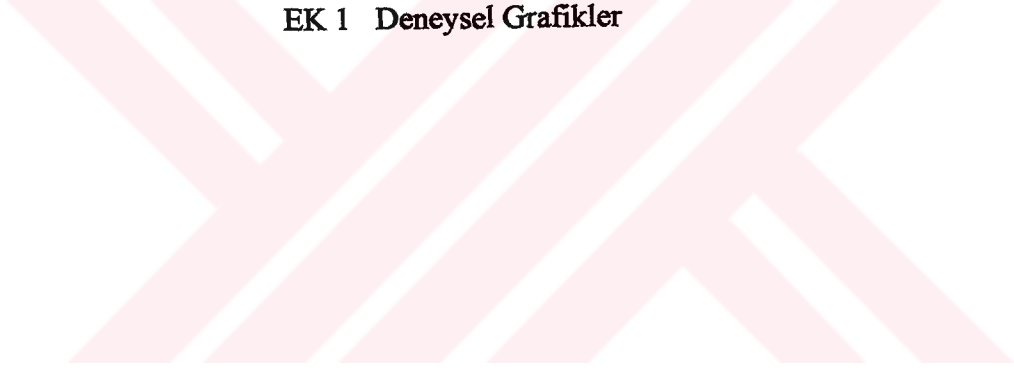
Yada, Y.R. ve Nakai, S., (1986), "Secondary Structure of Some Aspartyl Proteinases", Journal of Food Biochemistry, 10:155-183.

Yoshitaka K. , Susumu H. , Haruo M., Shinjiro I., "Process for Improving the Quality of Microbial Rennet", United States Patent No:3,950,221.



EKLER

EK 1 Deneysel Grafikler



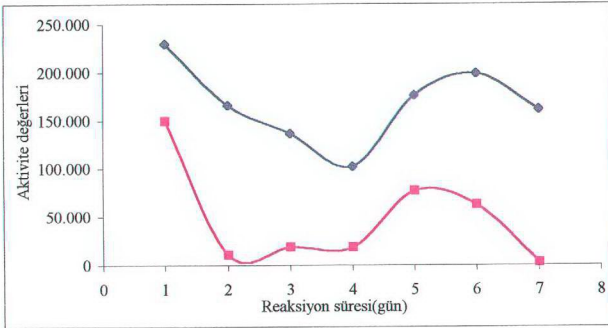
ÇALIŞMA KOŞULLARI

Enzim çözeltisinin pH'sı: 5,0

50 ml M.M.Rennet (125.000 kuvvet)

7,5 ml %30 H₂O₂(1lt'de 150 ml %30 H₂O₂)Reaksiyon +4^oC'de gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon süresi(gün)	<u>Aktivite</u>	<u>Termal Aktivite</u>		
	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri
1	38,9	229.756	64,0	149.414
2	53,9	165.724	881,3	10.850
3	65,4	136.596	510,0	18.750
4	87,4	102.260	244,8	18.723
5	50,7	176.178	123,7	77.329
6	45,0	198.611	153,3	62.365
7	55,3	161.531	3375,6	2.833
Standart M.m.Rennet	71,5	125.000	76,5	125.000



Şekil 1 Mucor miehei rennetin pH:5'te reaksiyon süresine bağlı normal aktivite ve termal aktivite değerleri

ÇALIŞMA KOŞULLARI

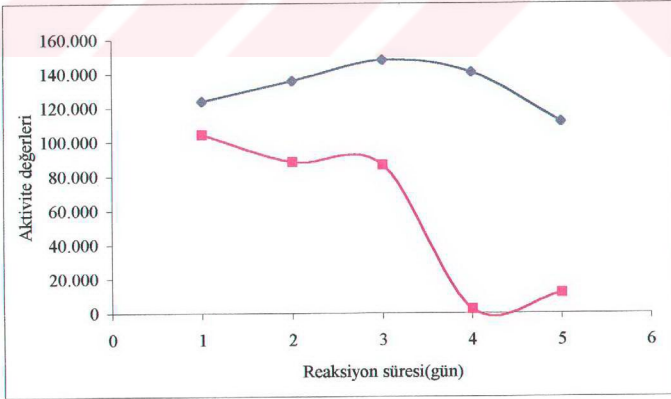
Enzim çözeltisinin pH'sı: 5,0

100 ml M.M.Rennet (125.000 kuvvet)

7,5ml %30 H₂O₂(1 lt 75 ml %30 H₂O₂)

Reaksiyon +4 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon süresi(gün)	<u>Aktivite</u>		<u>Termal Aktivite</u>	
	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri
1	46,0	123.913	61,5	104.268
2	42,0	135.714	72,5	88.448
3	38,5	148.052	74,0	86.655
4	40,5	140.741	2714,0	2.363
5	51,0	111.765	542,0	11.831
Standart M.m.Rennet	45,6	125.000	51,3	125000



Şekil 2 Mucor miehei rennetin pH:5'te reaksiyon süresine bağlı normal aktivite ve termal aktivite değerleri

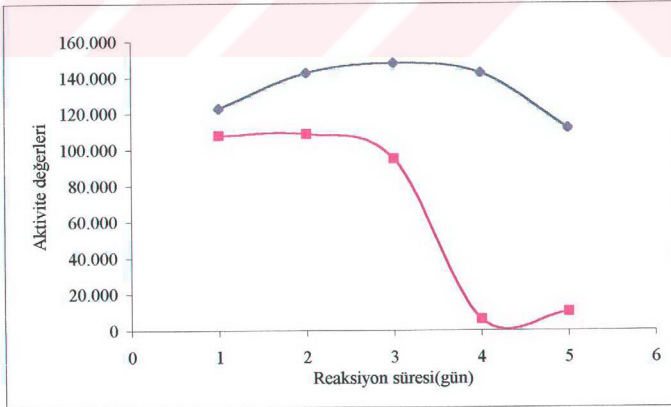
ÇALIŞMA KOŞULLARI

Enzim çözeltisinin pH'sı: 5,0

100 ml M.M.Rennet (125.000 kuvvet)

3,75ml %30 H₂O₂(1 lt'de 37.5ml %30 H₂O₂)Reaksiyon +4⁰C'de gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon süresi(gün)	Aktivite		Termal Aktivite	
	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri
1,0	46,5	122.581	59,5	107.773
2,0	40,0	142.500	59,0	108.686
3,0	38,5	148.052	67,5	95.000
4,0	40,0	142.500	1049,0	6.113
5,0	51,0	111.765	625,5	10.252
Standart M.m.Rennet	45,6	125.000	51,3	125.000



Şekil 3 Mucor miehei rennetin pH:5'te reaksiyon süresine bağlı normal aktivite ve termal aktivite değerleri

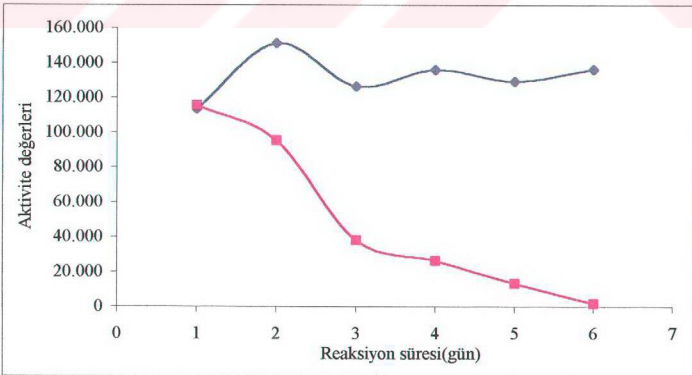
ÇALIŞMA KOŞULLARI

Enzim çözeltisinin pH'sı: 5,0

100 ml M.M.Rennet (125.000 kuvvet)

3 ml %30 H₂O₂(1lt'de 30 ml %30 H₂O₂)Reaksiyon +4⁰C'de gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon süresi(gün)	Aktivite		Termal Aktivite	
	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri
1	74,9	113.401	92,4	115.327
2	56,2	151.134	112,0	95.188
3	67,2	126.489	280,1	38.051
4	62,5	135.900	405,4	26.286
5	65,7	129.281	797,1	13.369
6	62,4	136.227	5825,0	1.829
Standart M.m.Rennet	68,0	125.000	85,3	125.000



Şekil 4 Mucor miehei rennetin pH:5'te reaksiyon süresine bağlı normal aktivite ve termal aktivite değerleri

ÇALIŞMA KOŞULLARI

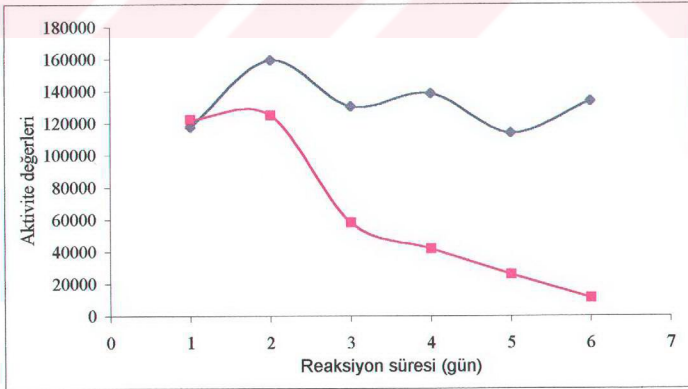
Enzim çözeltisinin pH

100 ml M.M.Rennet (125.000 kuvvet)

2 ml %30 H₂O₂(1 lt'de 20 ml %30 H₂O₂)

Reaksiyon +4°C'de gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon süresi(gün)	Aktivite		Termal Aktivite	
	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri
1	72,2	117.642	87,2	122.205
2	53,4	159.208	85,4	124.854
3	65,1	130.472	183,4	58.104
4	61,4	138.447	254,4	41.888
5	74,6	113.857	410,5	25.959
6	63,6	133.655	964,0	11.054
Standart M.m.Rennet	68,0	125.000	85,3	125.000



Şekil 5 Mucor miehei rennetin pH:5'te reaksiyon süresine bağlı normal aktivite ve termal aktivite değerleri

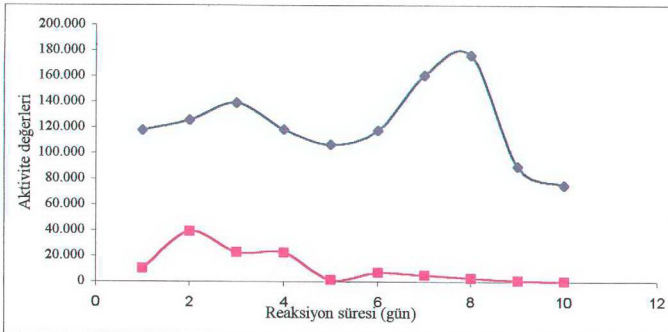
ÇALIŞMA KOŞULLARI

Enzim çözeltisinin pH'sı: 7,0

150 ml M.M.Rennet (125.000 kuvvet)

22,5 ml %30 H₂O₂(1lt'de 150 ml %30 H₂O₂)Reaksiyon +4⁰C'de gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon süresi(gün)	Aktivite		Termal Aktivite	
	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri
1	74,3	117.718	1147,3	10.089
2	69,7	125.610	298,0	38.842
3	63,0	138.889	510,5	22.674
4	74,0	118.243	516,3	22.418
5	82,0	106.707	9830,0	1.178
6	74,3	117.766	1635,0	7.080
7	54,5	160.550	2281,6	5.073
8	49,7	176.198	4420,7	2.618
9	97,7	89.597	15600,0	742
10	116,5	75.107	>10800	0,0
Standart M.m.Rennet	70,0	125.000	92,6	125.000



Şekil 6 *Mucor miehei* rennetin pH:7'de reaksiyon süresine bağlı normal aktivite ve termal aktivite değerleri

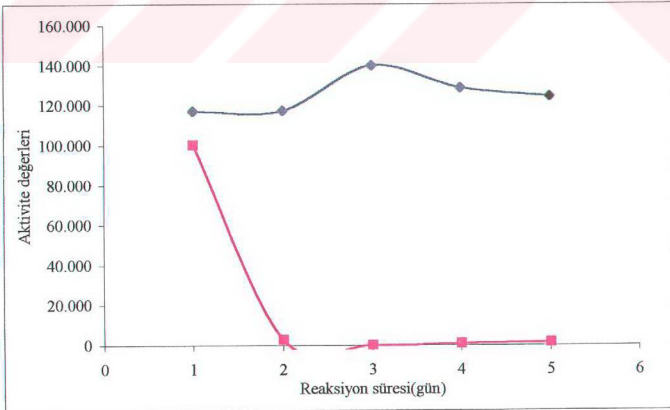
ÇALIŞMA KOŞULLARI

Enzim çözeltisinin pH'sı: 7,0

100 ml M.M.Rennet (125.000 kuvvet)

7,5 ml %30 H₂O₂(1lt'de 75 ml %30 H₂O₂)Reaksiyon +4⁰C'de gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon süresi(gün)	Aktivite		Termal Aktivite	
	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri
1	72,5	117.155	106,3	100.247
2	72,4	117.317	3793,3	2.809
3	60,8	139.815	>8100	0
4	66,0	128.693	13080,0	815
5	68,3	124.359	7127,0	1.495
Standart M.M.Rennet	68,0	125.000	85,3	125.000



Şekil 7 Mucor miehei rennetin pH: 7'de reaksiyon süresine bağlı normal aktivite ve termal aktivite değerleri

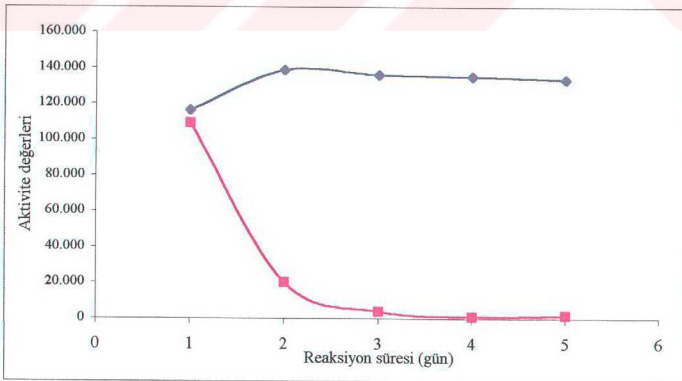
CALIŖMA KOŖULLARI

Enzim çözeltilisinin pH'sı: 7,0

100 ml M.M.Rennet (125.000 kuvvet)

37,5ml %30 H₂O₂(1lt'de 37,5 ml %30 H₂O₂)Reaksiyon +4⁰C'de gerçekteŖtirilmiŖtir.

Reaksiyon süresi(gün)	<u>Aktivite</u>		<u>Termal Aktivite</u>	
	Pıhtı oluŖum süresi(s)	Aktivite değeri	Pıhtı oluŖum süresi(s)	Aktivite değeri
1	73,0	116.353	97,8	108.960
2	61,3	138.673	528,7	20.157
3	62,4	136.118	2709,5	3.933
4	62,9	135.143	12180,0	875
5	63,7	133.445	6212,7	1.715
Standart M.m.Rennet	68,0	125.000	85,3	125.000



Şekil 8 Mucor miehei rennetin pH:7'de reaksiyon süresine bağlı normal aktivite ve termal aktivite değerleri

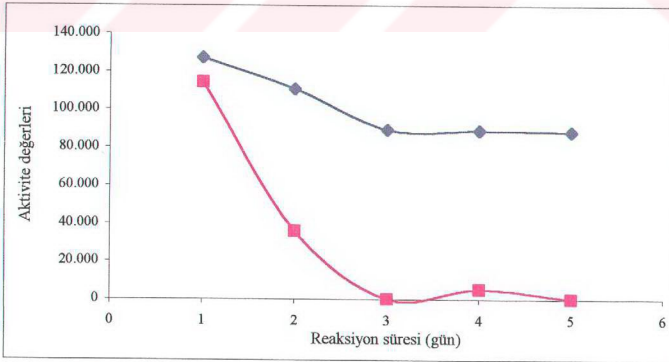
ÇALIŞMA KOŞULLARI

Enzim çözeltisinin pH'sı: 7,0

100 ml M.M.Rennet (125.000 kuvvet)

3ml %30 H₂O₂(1lt'de 30 ml %30 H₂O₂)Reaksiyon +4⁰C'de gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon süresi(gün)	Aktivite		Termal Aktivite	
	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri
1	55,7	127.244	66,1	114.307
2	64,0	110.742	211,2	35.748
3	79,5	89.207	>6300	0
4	79,8	88.816	1476,5	5.113
5	80,4	88.153	>6420	0
Standart M.m.Rennet	56,7	125.000	60,4	125.000



Şekil 9 Mucor miehei rennetin pH:7'de reaksiyon süresine bağlı normal aktivite ve termal aktivite değerleri

ÇALIŞMA KOŞULLARI

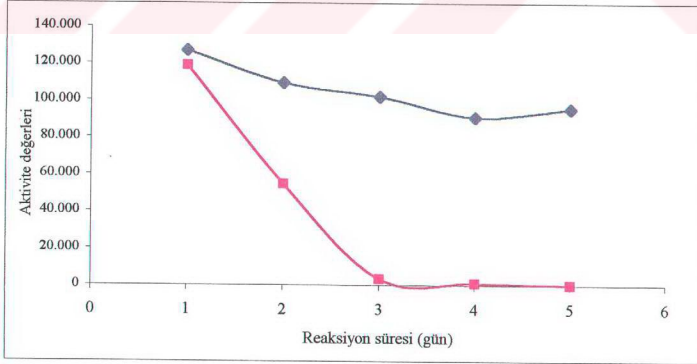
Enzim çözeltisinin pH'sı: 7,0

100 ml M.M.Rennet (125.000 kuvvet)

2ml %30 H₂O₂(1l'de 20 ml %30 H₂O₂)

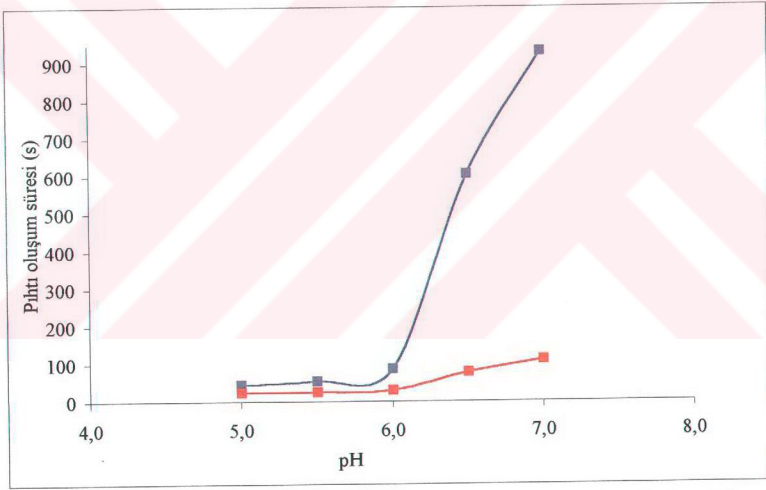
Reaksiyon +4°C'de gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon süresi(gün)	<u>Aktivite</u>		<u>Termal Aktivite</u>	
	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri	Pıhtı oluşum süresi(s)	Aktivite değeri
1	55,9	126.902	63,7	118.617
2	65,0	109.122	138,1	54.671
3	69,7	101.759	2366,0	3.191
4	78,1	90.807	7782,0	970
5	74,4	95.262	>4456	0
Standart M.m.Rennet	56,7	125.000	60,4	125.000



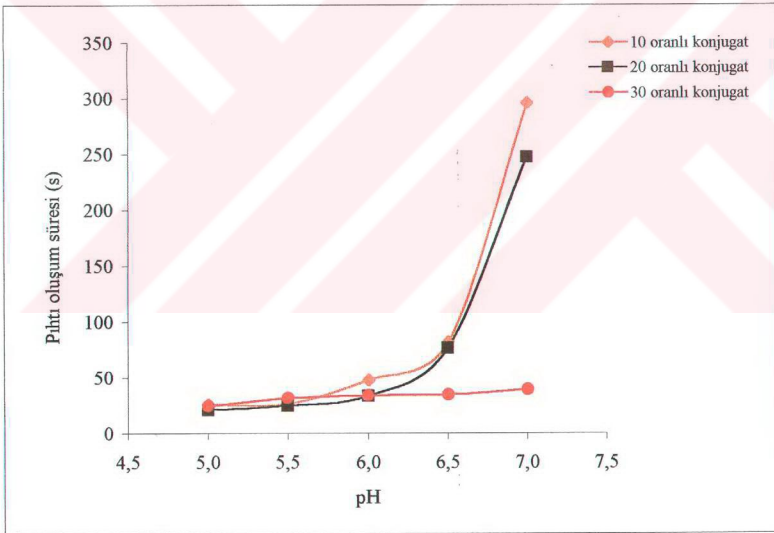
Şekil 10 Mucor miehei rennetin pH:7'de reaksiyon süresine bağlı normal aktivite ve termal aktivite değerleri

pH	Normal enzimde pıhtı oluşum süresi (s)	Dializli enzimde pıhtı oluşum süresi (s)
5,0	44,3	24,0
5,5	53,5	25,2
6,0	86,1	29,2
6,5	604,0	76,7
7,0	931,0	109,7



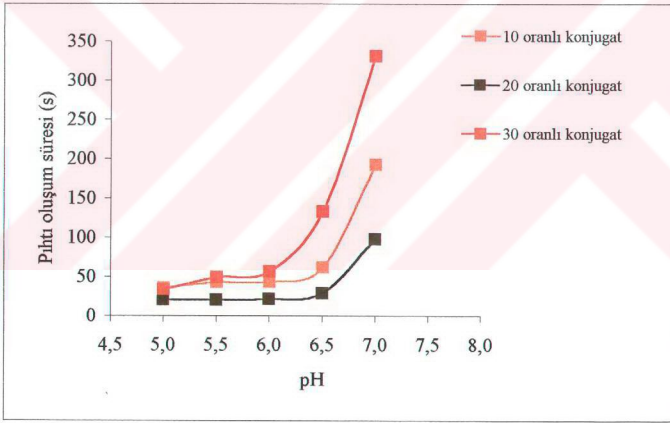
Şekil 11 Normal ve dializli *Mucor miehei* Rennetin pH' ya bağlı pıhtı oluşum süresi grafiği

pH	10oranlı konjugatta pıhtı oluşum süresi	20oranlı konjugatta pıhtı oluşum süresi	30oranlı konjugatta pıhtı oluşum süresi
5,0	26,1	21	24,4
5,5	26,5	24,8	31,7
6,0	47,7	33,6	34
6,5	81,4	76,4	34,6
7,0	295,95	247,6	39,2



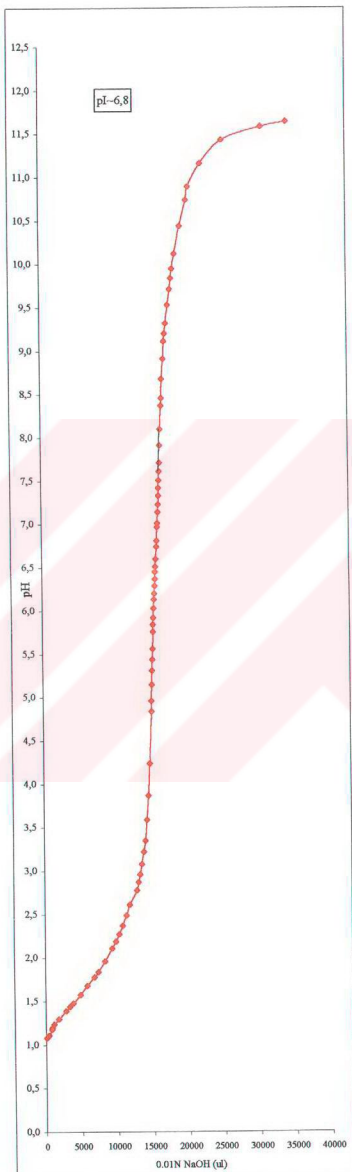
Şekil 12 Konjugat örneklerinin pH'ya bağlı pıhtı oluşum süresi grafiği

pH	Dializ edilmiş 10 oranlı konjugatta pıhtı oluşum süresi	Dializ edilmiş 20 oranlı konjugatta pıhtı oluşum süresi	Dializ edilmiş 30 oranlı konjugatta pıhtı oluşum süresi
5,0	35,1	20	33,2
5,5	43,1	20	49,1
6,0	43,5	21,4	56,2
6,5	61,9	28,9	132,7
7,0	192,8	97,8	330,9



Şekil 13 Dializli konjugat örneklerinin pH'ya bağlı pıhtı oluşum süresi grafikleri

0,01N NaOH (ul)	pH
50	1,08
350	1,11
750	1,18
850	1,20
1100	1,24
1750	1,30
2750	1,39
3250	1,44
3750	1,48
4750	1,58
5750	1,68
6750	1,78
7250	1,84
8250	1,96
9250	2,11
9750	2,19
10250	2,27
10750	2,37
11250	2,49
11750	2,61
12750	2,78
13000	2,87
13250	2,96
13500	3,08
13750	3,22
14000	3,35
14250	3,59
14500	3,87
14750	4,24
15000	4,84
15050	4,96
15100	5,15
15150	5,31
15200	5,44
15250	5,56
15300	5,76
15350	5,84
15400	5,92
15450	6,03
15500	6,13
15550	6,20
15600	6,29
15650	6,37
15700	6,45
15750	6,51
15800	6,60
15900	6,74
15950	6,81
16050	6,97
16100	7,01
16150	7,14
16200	7,23
16250	7,33
16300	7,42
16350	7,51
16400	7,61
16450	7,71
16500	7,91
16600	8,10
16750	8,37
16800	8,46
16900	8,68
17100	8,91
17250	9,11
17350	9,20
17500	9,32
17800	9,53
18100	9,71
18300	9,84
18500	9,95
18850	10,12
19600	10,44
20500	10,74
20800	10,89
22550	11,16
25550	11,43
31050	11,58
34550	11,64



Şekil 14 (0,1g / 10ml des.sa) Muor niçhei rennetin 0,01 N NaOH ile titrasyonu

Std R R R



Tablo 1 pH:4 ortamında

Std R R R



Tablo 2: pH: 5.5 ortamında

R R R Std



Tablo 3: SDS Page

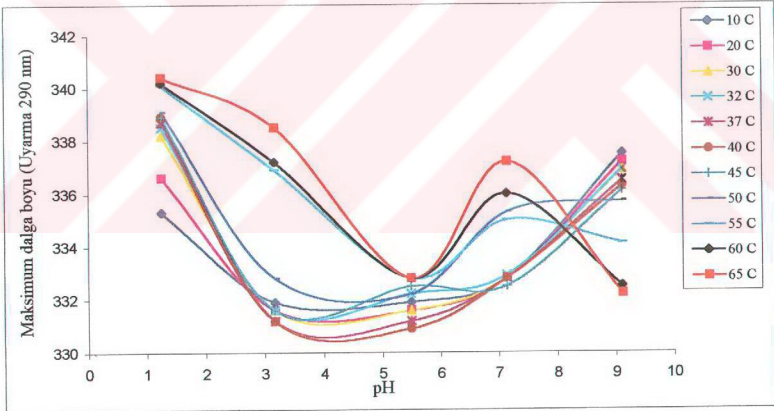
Std 10K 20K 30K R



Tablo 4: pH : 8.8 ortamında

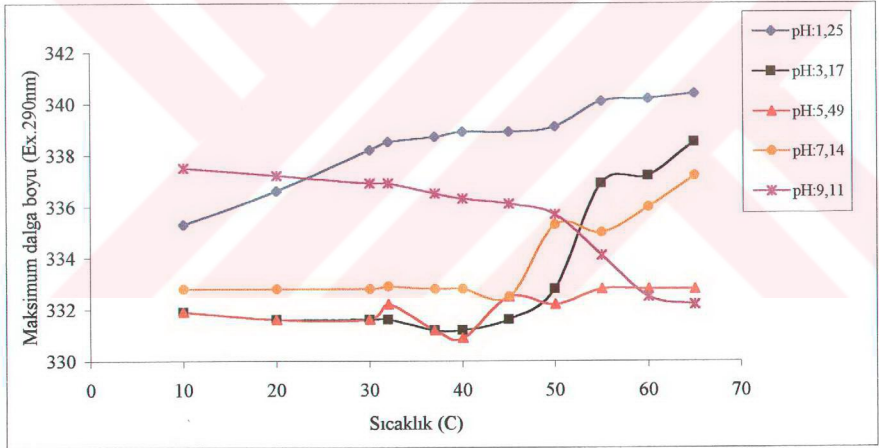
Şekil 15 Mucor miehei rennetin farklı pH'lardaki doğal ve SDS PAGE elektroforezi

Sıcaklık	pH:3' te Maksimum dalga boyu	pH:5' te Maksimum dalga boyu	pH:7' de Maksimum dalga boyu	pH:9' da Maksimum dalga boyu
10	333	334,8	337	333
20	332	334,8	335	333
30	335	333,0	331	338
32	333	341,8	334	334
37	335	330,0	340	335
40	338	337,8	340	337
45	335	334,5	349	343
50	347	335,5	344	347
55	337	332,0	349	335
60	340	335,5	349	339
65	342	346,0	340	340



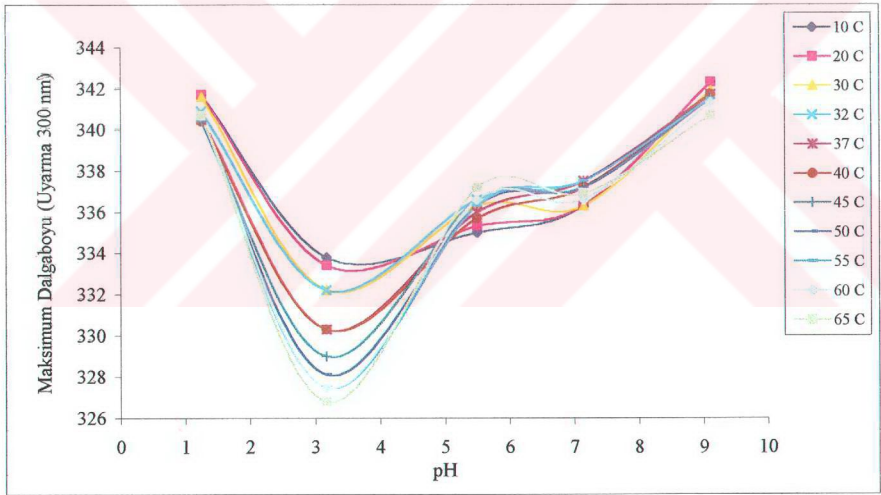
Şekil 16 Mucor michei rennetin değişen sıcaklıklarda, 290 nm uyarma dalga boyunda steady state emisyon spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin pH'ya göre değişimi

Sıcaklık	<u>pH:1,25'te</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:3,17'de</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:5,49'da</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:7,14'te</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:9,11'de</u> Maksimum dalga boyu
10	335	332	332	333	338
20	337	332	332	333	337
30	338	332	332	333	337
32	339	332	332	333	337
37	339	331	331	333	337
40	339	331	331	333	336
45	339	332	333	333	336
50	339	333	332	335	336
55	340	337	333	335	334
60	340	337	333	336	333
65	340	339	333	337	332



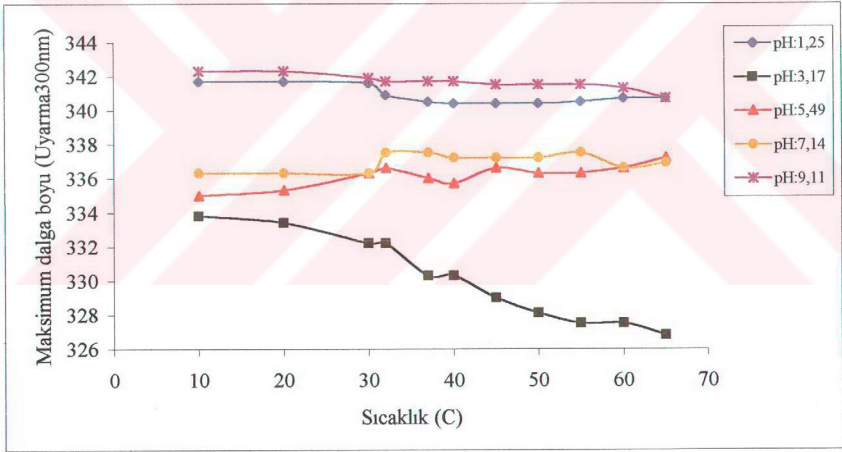
Şekil 17 Mucor miehei rennetin değişen pH' larda 290 nm uyarma dalga boyunda steady state emisyon spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:1,25'te</u>	<u>pH:3,17'de</u>	<u>pH:5,49'da</u>	<u>pH:7,14'te</u>	<u>pH:9,11'de</u>
	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu
10	342	334	335	336	342
20	342	333	335	336	342
30	342	332	336	336	342
32	341	332	337	338	342
37	341	330	336	338	342
40	340	330	336	337	342
45	340	329	337	337	342
50	340	328	336	337	342
55	341	328	336	338	342
60	341	328	337	337	341
65	341	327	337	337	341



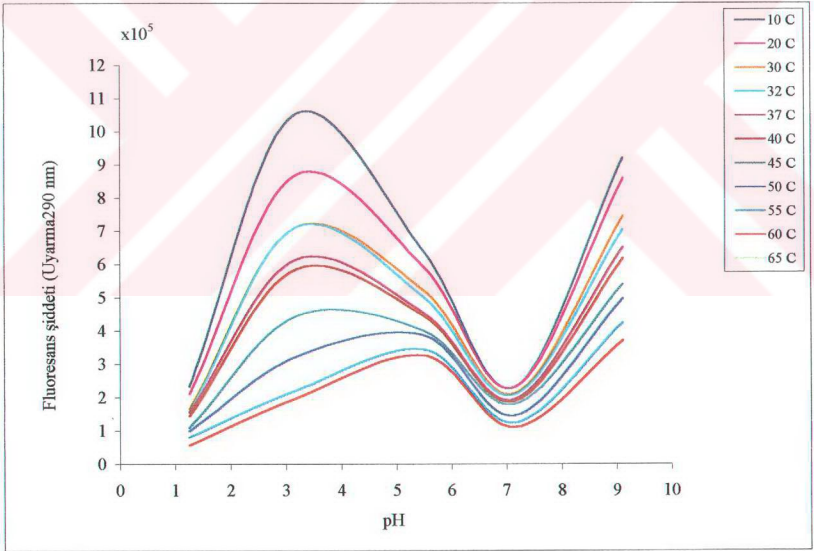
Şekil 18 *Mucor miehei* rennetin değişen sıcaklıklarda, 300 nm uyarma dalga boyunda steady state emisyon spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin pH'ya göre değişimi

Sıcaklık	<u>pH:1,25'te</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:3,17'de</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:5,49'da</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:7,14'te</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:9,11'de</u> Maksimum dalga boyu
10	342	334	335	336	342
20	342	333	335	336	342
30	342	332	336	336	342
32	341	332	337	338	342
37	341	330	336	338	342
40	340	330	336	337	342
45	340	329	337	337	342
50	340	328	336	337	342
55	341	328	336	338	342
60	341	328	337	337	341
65	341	327	337	337	341



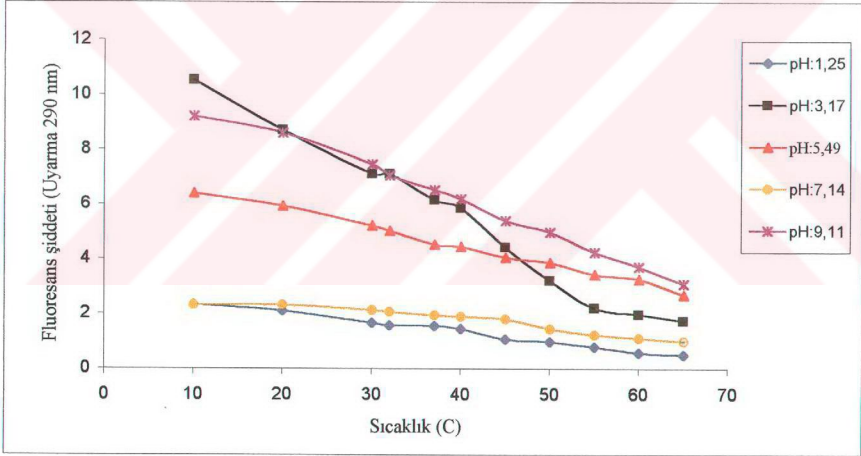
Şekil 19 *Mucor miehei* rennetin değişen pH' larında 300 nm uyarma dalga boyunda steady state emisyon spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:1,25'te</u>	<u>pH:3,17'de</u>	<u>pH:5,49'da</u>	<u>pH:7,14'te</u>	<u>pH:9,11'de</u>
	Fluoresans Şiddeti	Fluoresans Şiddeti	Fluoresans Şiddeti	Fluoresans Şiddeti	Fluoresans Şiddeti
10	2,3	10,5	6,4	2,3	3,1
20	2,1	8,7	5,9	2,3	3,7
30	1,7	7,1	5,2	2,1	4,2
32	1,6	7,1	5,0	2,1	5,0
37	1,6	6,1	4,5	2,0	5,4
40	1,4	5,9	4,4	1,9	6,2
45	1,1	4,4	4,0	1,8	6,5
50	1,0	3,2	3,9	1,5	7,0
55	0,8	2,2	3,4	1,2	7,4
60	0,6	2,0	3,3	1,1	8,6
65	0,5	1,7	2,7	1,0	9,2



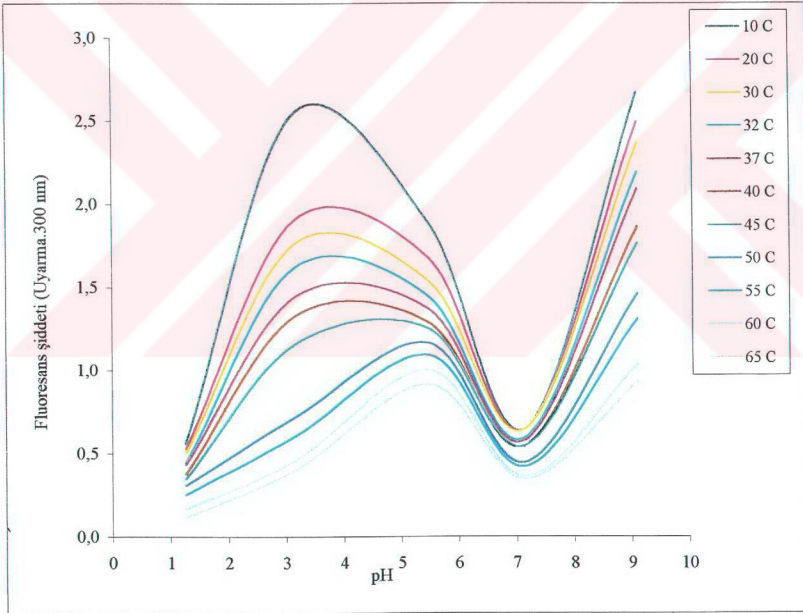
Şekil 20 *Mucor miehei* rennetin değişen sıcaklıklarda, 290 nm uyarma dalga boyunda steady state emisyon spektrumlarından elde edilen fluoresans şiddeti değerlerinin pH'ya göre değişimi

Sıcaklık	<u>pH:1,25'te</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:3,17'de</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:5,49'da</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:7,14'te</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:9,11'de</u> Fluoresans şiddeti
10	2,32	10,52	6,38	2,31	9,19
20	2,10	8,69	5,91	2,31	8,59
30	1,66	7,10	5,20	2,13	7,43
32	1,57	7,10	5,01	2,07	7,03
37	1,55	6,14	4,53	1,95	6,50
40	1,44	5,85	4,44	1,89	6,17
45	1,07	4,43	4,06	1,80	5,39
50	0,98	3,22	3,86	1,45	4,96
55	0,79	2,20	3,44	1,23	4,23
60	0,57	1,97	3,26	1,11	3,70
65	0,50	1,74	2,68	1,00	3,08



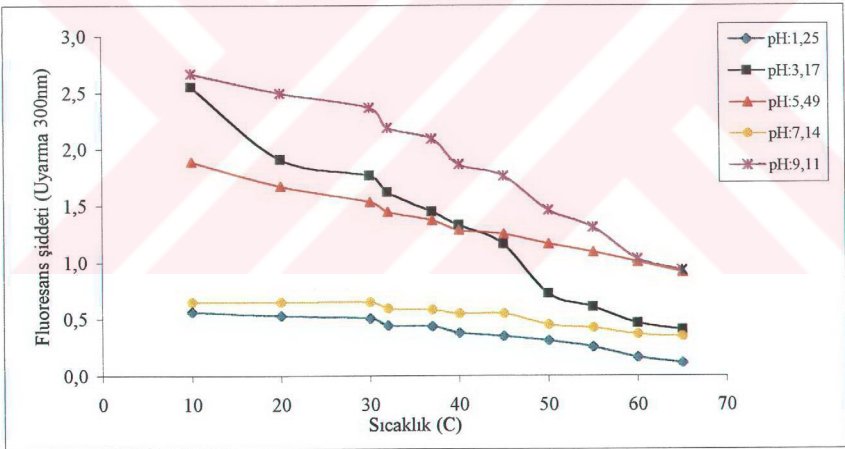
Şekil 21 Mucor miehei rennetin değişen pH' larda 290 nm uyarma dalga boyunda steady state emisyon spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:1,25'te Fluoresans şiddeti	pH:3,17'de Fluoresans şiddeti	pH:5,49'da Fluoresans şiddeti	pH:7,14'te Fluoresans şiddeti	pH:9,11'de Fluoresans şiddeti
10	0,6	2,6	1,9	0,7	2,7
20	0,5	1,9	1,7	0,7	2,5
30	0,5	1,8	1,5	0,7	2,4
32	0,4	1,6	1,5	0,6	2,2
37	0,4	1,5	1,4	0,6	2,1
40	0,4	1,3	1,3	0,6	1,9
45	0,4	1,2	1,3	0,6	1,8
50	0,3	0,7	1,2	0,5	1,5
55	0,3	0,6	1,1	0,4	1,3
60	0,2	0,5	1,0	0,4	1,0
65	0,1	0,4	0,9	0,4	0,9



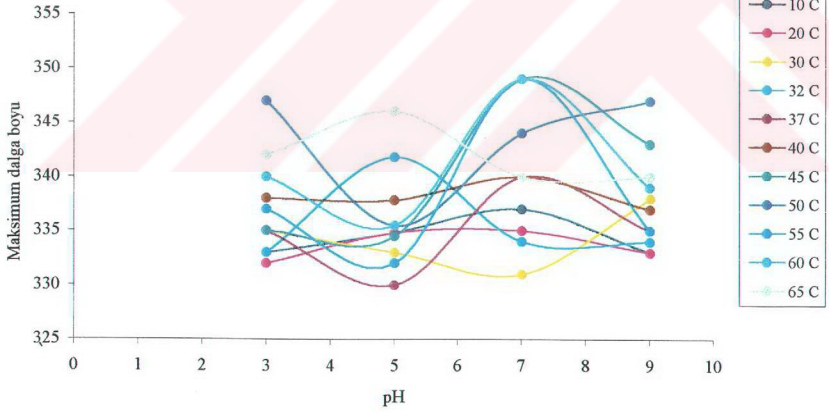
Şekil 22 Mucor miehei rennetin değişen sıcaklıklarda 300 nm uyarma dalga boyunda steady state emisyon spektrumlarından elde edilen fluoresans şiddeti değerlerinin pH'ya göre değişim grafiği

Sıcaklık	pH:1,25'te Fluoresans şiddeti	pH:3,17'de Fluoresans şiddeti	pH:5,49'da Fluoresans şiddeti	pH:7,14'te Fluoresans şiddeti	pH:9,11'de Fluoresans şiddeti
10	0,6	2,6	1,9	0,6	2,7
20	0,5	1,9	1,7	0,6	2,5
30	0,5	1,8	1,5	0,6	2,4
32	0,4	1,6	1,4	0,6	2,2
37	0,4	1,4	1,4	0,6	2,1
40	0,4	1,3	1,3	0,5	1,9
45	0,3	1,2	1,3	0,5	1,8
50	0,3	0,7	1,2	0,4	1,5
55	0,3	0,6	1,1	0,4	1,3
60	0,2	0,5	1,0	0,4	1,0
65	0,1	0,4	0,9	0,3	0,9



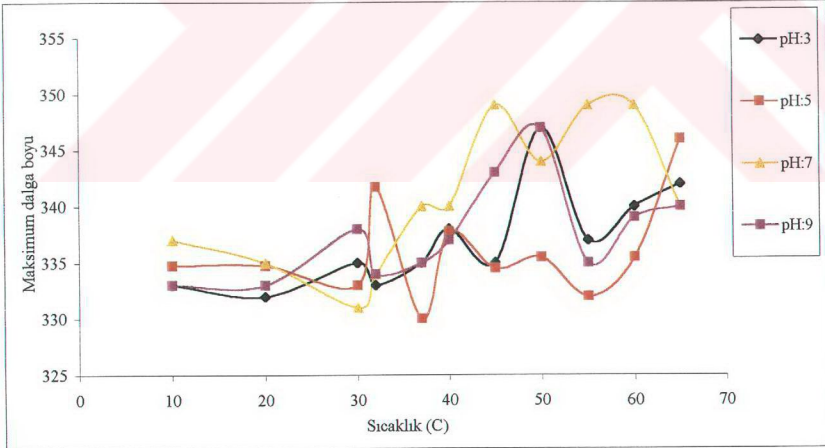
Şekil 23 Mucor miehei rennetin değişen pH' larda 300 nm uyarma dalga boyunda steady state emisyon spektrumlarından elde edilen fluoresans şiddeti değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3' te</u>	<u>pH:5' te</u>	<u>pH:7' de</u>	<u>pH:9' da</u>
	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu
10	333	335	337	333
20	332	335	335	333
30	335	333	331	338
32	333	342	334	334
37	335	330	340	335
40	338	338	340	337
45	335	335	349	343
50	347	336	344	347
55	337	332	349	335
60	340	336	349	339
65	342	346	340	340



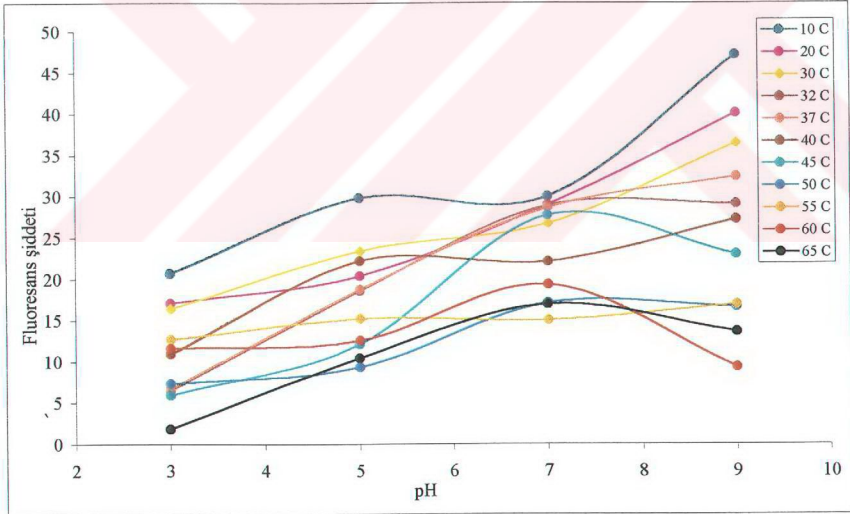
Şekil 24 *Mucor miehei* rennetin değişen sıcaklıklarda, 297 nm'de uyarma yapılarak TR-emisyon spektrumlarından elde edilen maksimum dalgaboyu değerlerini pH'yla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3' te</u>	<u>pH:5' te</u>	<u>pH:7' te</u>	<u>pH:9' te</u>
	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu
10	333	335	337	333
20	332	335	335	333
30	335	333	331	338
32	333	342	334	334
37	335	330	340	335
40	338	338	340	337
45	335	335	349	343
50	347	336	344	347
55	337	332	349	335
60	340	336	349	339
65	342	346	340	340



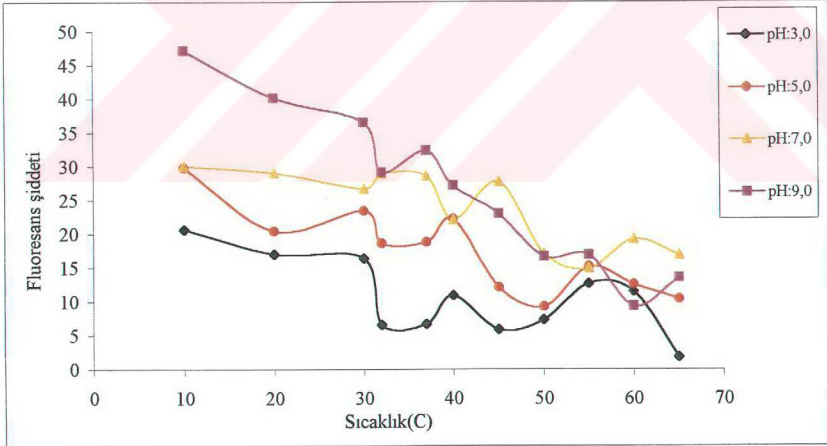
Şekil 25 Mucor miehei rennetin değişen pH' larda 297 nm uyarma dalga boyunda TR-emisyon spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3'te Fluoresans şiddeti	pH:5'te Fluoresans şiddeti	pH:7'de Fluoresans şiddeti	pH:9'da Fluoresans şiddeti
10	20,7	29,8	30,0	47,1
20	17,1	20,4	29,0	40,1
30	16,4	23,4	26,7	36,5
32	6,5	18,6	28,9	29,1
37	6,7	18,8	28,6	32,4
40	10,9	22,2	22,1	27,2
45	5,9	12,1	27,7	23,0
50	7,3	9,3	17,1	16,6
55	12,7	15,2	15,0	16,9
60	11,6	12,6	19,3	9,3
65	1,8	10,4	16,9	13,6



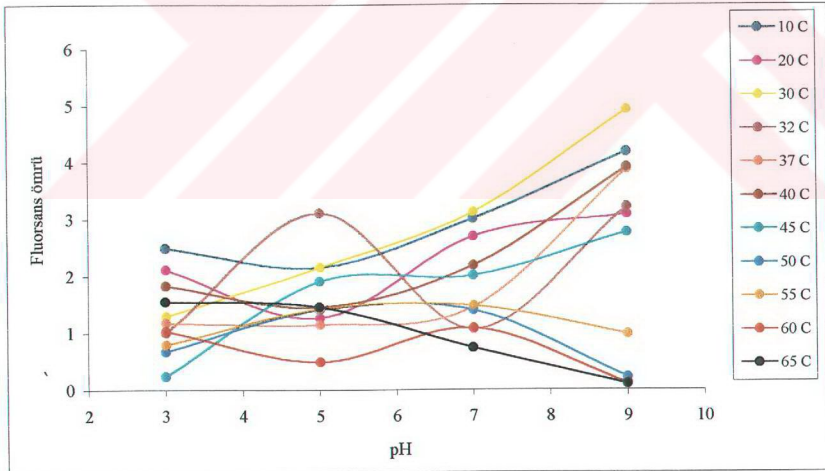
Şekil 26 *Mucor miehei* rennetin değişen sıcaklıklarda, 297 nm'de uyarma yapılarak TR-emisyon spektrumlarından elde edilen fluoresans şiddeti değerlerinin pH'yla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3' te Fluoresans şiddeti	pH:5' te Fluoresans şiddeti	pH:7' de Fluoresans şiddeti	pH:9' da Fluoresans şiddeti
10	20,7	29,8	30,0	47,1
20	17,1	20,4	29,0	40,1
30	16,4	23,4	26,7	36,5
32	6,5	18,6	28,9	29,1
37	6,7	18,8	28,6	32,4
40	10,9	22,2	22,1	27,2
45	5,9	12,1	27,7	23,0
50	7,3	9,3	17,1	16,6
55	12,7	15,2	15,0	16,9
60	11,6	12,6	19,3	9,3
65	1,8	10,4	16,9	13,6



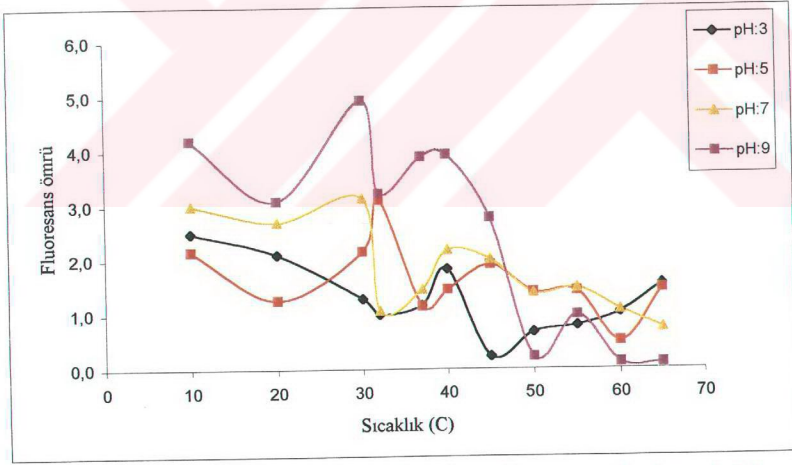
Şekil 27 *Mucor miehei* rennetin değişen pH' larda 297 nm uyarma dalga boyunda TR-emisyon spektrumlarından elde edilen fluoresans şiddeti değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3'te Fluoresans ömrü	pH:5'te Fluoresans ömrü	pH:7'de Fluoresans ömrü	pH:9'da Fluoresans ömrü
10	2,5	2,2	3,0	4,2
20	2,1	1,3	2,7	3,1
30	1,3	2,2	3,1	4,9
32	1,0	3,1	1,1	3,2
37	1,2	1,2	1,5	3,9
40	1,8	1,5	2,2	3,9
45	0,2	1,9	2,0	2,8
50	0,7	1,4	1,4	0,2
55	0,8	1,4	1,5	1,0
60	1,0	0,5	1,1	0,1
65	1,6	1,5	0,7	0,1



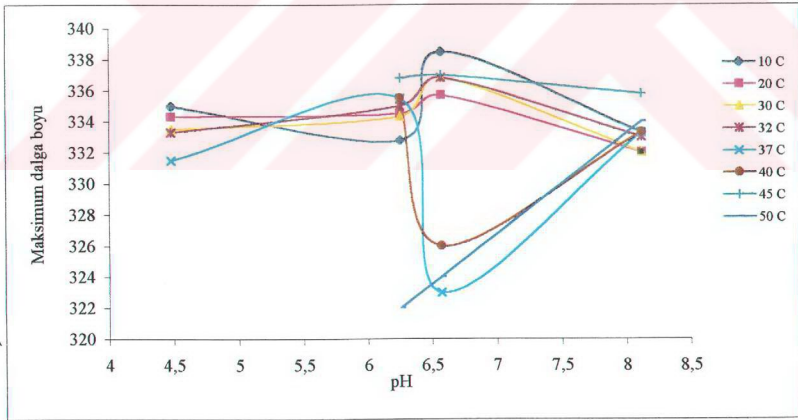
Şekil 28 *Mucor miehei* rennetin değişen sıcaklıklarda, 297 nm'de uyarma yapılarak TR-emisyon spektrumlarından elde edilen fluoresans ömrü değerlerinin pH'yla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3' te Fluoresans ömrü	pH:5' te Fluoresans ömrü	pH:7' de Fluoresans ömrü	pH:9' da Fluoresans ömrü
10	2,5	2,2	3,0	4,2
20	2,1	1,3	2,7	3,1
30	1,3	2,2	3,1	4,9
32	1,0	3,1	1,1	3,2
37	1,2	1,2	1,5	3,9
40	1,8	1,5	2,2	3,9
45	0,2	1,9	2,0	2,8
50	0,7	1,4	1,4	0,2
55	0,8	1,4	1,5	1,0
60	1,0	0,5	1,1	0,1
65	1,6	1,5	0,7	0,1



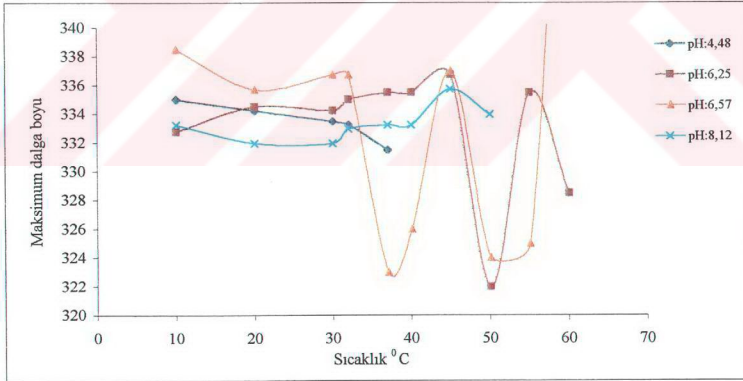
Şekil 29 *Mucor miehei* Rennetin değişen pH' larda 297 nm'de uyarma dalga boyunda TR emisyon spektrumlarından elde edilen fluoresans ömrü değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:4,48'de</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:6,25'te</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:6,57'de</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:8,12'de</u> Maksimum dalga boyu
10	335	333	339	333
20	334	335	336	332
30	334	334	337	332
32	333	335	337	333
37	332	336	323	333
40	...	336	326	333
45	...	337	337	336
50	...	322	324	334
55	...	336	325	...
60	...	329	364	...
65



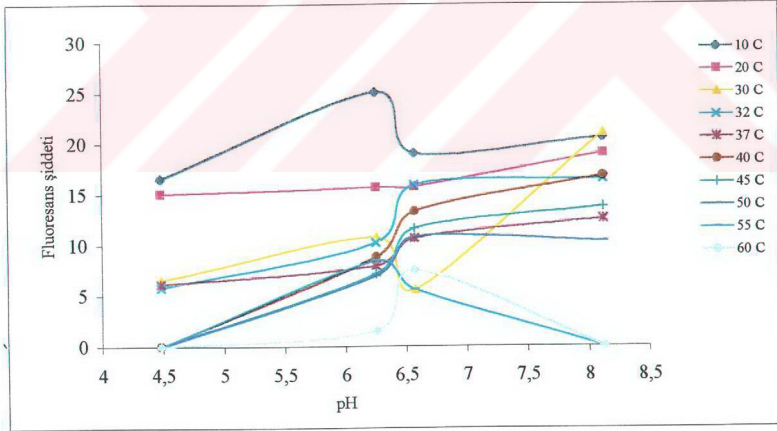
Şekil 30 10 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalgaboyu değerlerinin pH 'yla değişim grafi

Sıcaklık	pH:4,48'te	pH:6,25'te	pH:6,57'de	pH:8,12'de
	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu
10	335	333	339	333
20	334	335	336	332
30	334	334	337	332
32	333	335	337	333
37	332	336	323	333
40	...	336	326	333
45	...	337	337	336
50	...	322	324	334
55	...	336	325	...
60	...	329	364	...
65



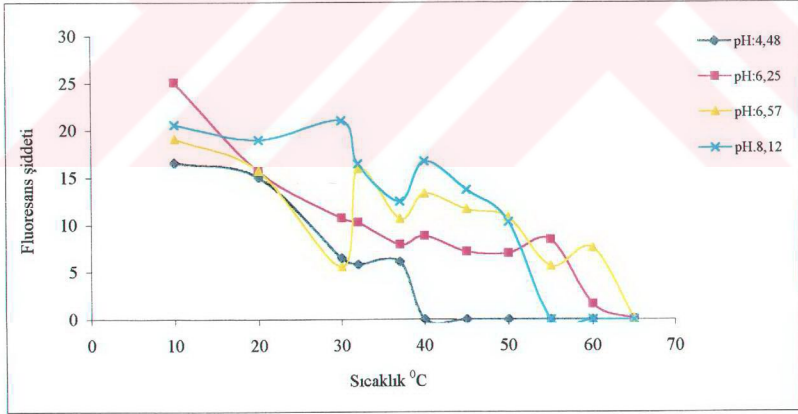
Şekil 31 10 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' lar da 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumundan okunan maksimum dalga boyu değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:4.48'de Fluoresans şiddeti	pH:6.25'te Fluoresans şiddeti	pH:6.57'de Fluoresans şiddeti	pH:8.12'de Fluoresans şiddeti
10	16,6	25,1	19,1	20,6
20	15,1	15,7	15,7	19,0
30	6,5	10,7	5,6	21,0
32	5,8	10,2	15,9	16,5
37	6,1	7,9	10,6	12,5
40	0,0	8,8	13,3	16,8
45	0,0	7,2	11,6	13,7
50	0,0	7,0	10,8	10,3
55	0,0	8,4	5,6	0,0
60	0,0	1,6	7,6	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



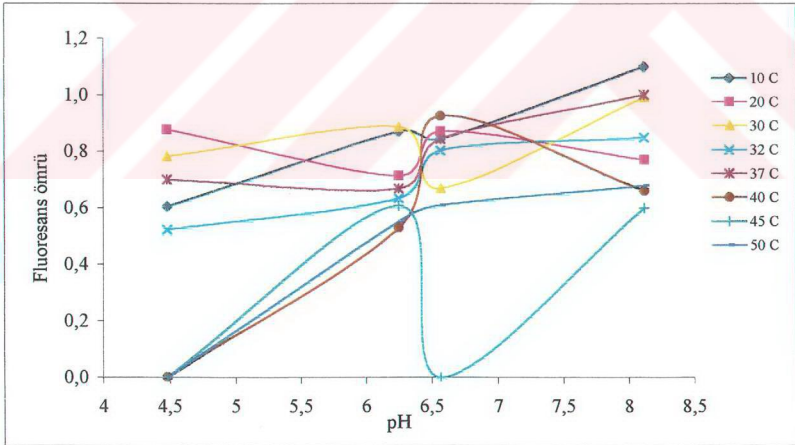
Şekil 32 10 oranlı M.m.rennet - dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans şiddeti değerlerinin pH'yla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:4,48'te Fluoresans şiddeti	pH:6,25'te Fluoresans şiddeti	pH:6,57'de Fluoresans şiddeti	pH:8,12'de Fluoresans şiddeti
10	16,6	25,1	19,1	20,6
20	15,1	15,7	15,7	19,0
30	6,5	10,7	5,6	21,0
32	5,8	10,2	15,9	16,5
37	6,1	7,9	10,6	12,5
40	0,0	8,8	13,3	16,8
45	0,0	7,2	11,6	13,7
50	0,0	7,0	10,8	10,3
55	0,0	8,4	5,6	0,0
60	0,0	1,6	7,6	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



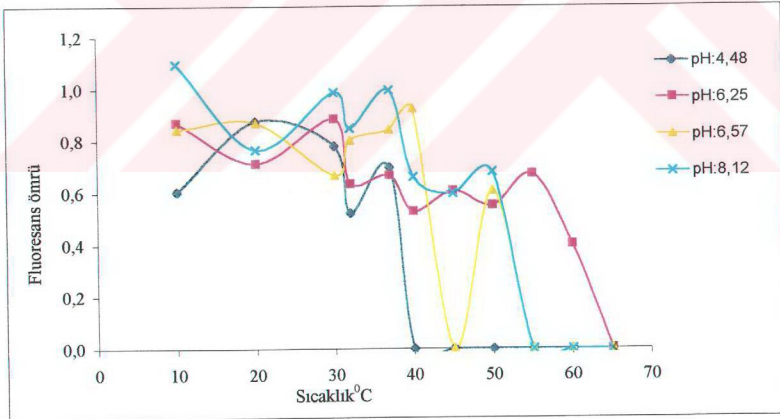
Şekil 33 10 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larında 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans şiddeti değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:4,48'de	pH:6,25'te	pH:6,57'de	pH:8,12'de
	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü
10	0,6	0,9	0,8	1,1
20	0,9	0,7	0,9	0,8
30	0,8	0,9	0,7	1,0
32	0,5	0,6	0,8	0,9
37	0,7	0,7	0,8	1,0
40	0,0	0,5	0,9	0,7
45	0,0	0,6	0,0	0,6
50	0,0	0,6	0,6	0,7
55	0,0	0,7	0,0	0,0
60	0,0	0,4	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



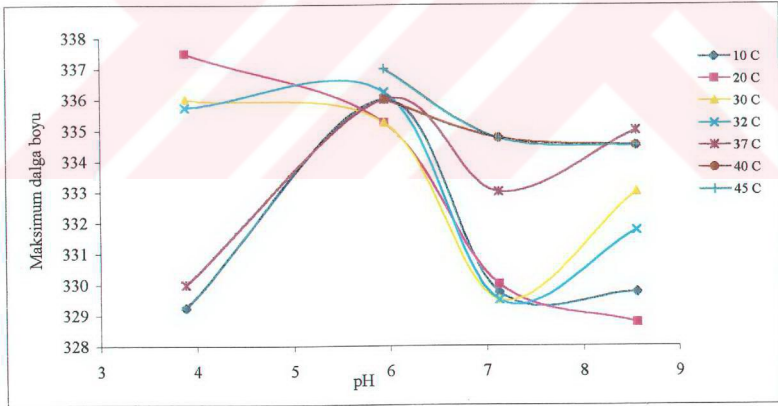
Şekil 34 10 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin pH 'yla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:4,48'te	pH:6,25'te	pH:6,57'de	pH:8,12'de
	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü
10	0,6	0,9	0,8	1,1
20	0,9	0,7	0,9	0,8
30	0,8	0,9	0,7	1,0
32	0,5	0,6	0,8	0,9
37	0,7	0,7	0,8	1,0
40	0,0	0,5	0,9	0,7
45	0,0	0,6	0,0	0,6
50	0,0	0,6	0,6	0,7
55	0,0	0,7	0,0	0,0
60	0,0	0,4	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



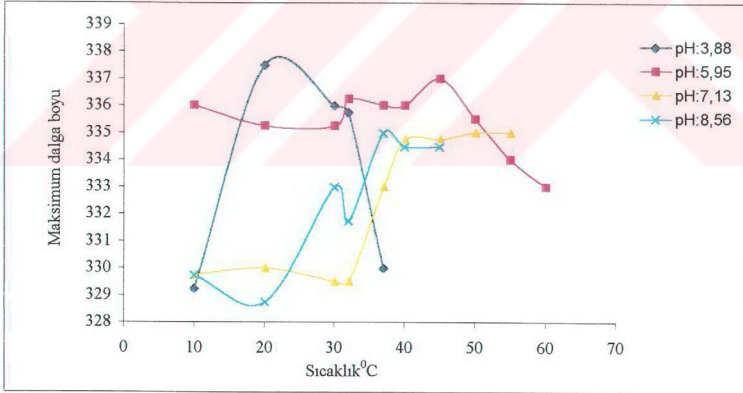
Şekil 35 10 oranlı enzim-dekstran konjugatının farklı pH' larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,88'de Maksimum dalga boyu	pH:5,95'te Maksimum dalga boyu	pH:7,13'te Maksimum dalga boyu	pH:8,56'da Maksimum dalga boyu
10	329	336	330	330
20	338	335	330	329
30	336	335	330	333
32	336	336	330	332
37	330	336	333	335
40	...	336	335	335
45	...	337	335	335
50	...	336	335	...
55	...	334	335	...
60	...	333
65



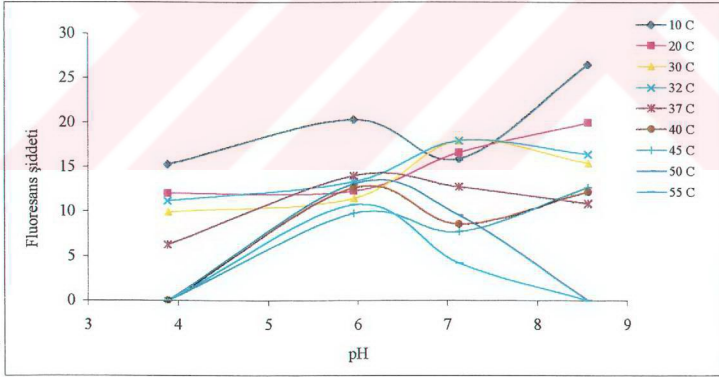
Şekil 36 Dializ edilmiş 10 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297nm'de uyarılma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalga boyunun pH ile değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3,88'de</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:5,95'te</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:7,13'te</u> Maksimum dalga boyu	<u>pH:8,56'da</u> Maksimum dalga boyu
10	329	336	330	330
20	338	335	330	329
30	336	335	330	333
32	336	336	330	332
37	330	336	333	335
40	...	336	335	335
45	...	337	335	335
50	...	336	335	...
55	...	334	335	...
60	...	333
65



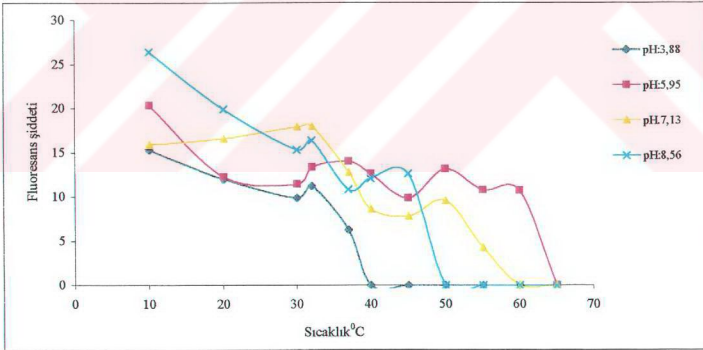
Şekil 37 Dializ edilmiş 10 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH'larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalga boyunun sıcaklık ile değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3.88'de</u>	<u>pH:5.95'te</u>	<u>pH:7.13'te</u>	<u>pH:8.56'da</u>
	Fluoresans şiddeti	Fluoresans şiddeti	Fluoresans şiddeti	Fluoresans şiddeti
10	15,3	20,3	15,9	26,5
20	12,0	12,3	16,6	20,0
30	9,9	11,5	17,9	15,4
32	11,2	13,4	18,0	16,4
37	6,3	14,0	12,7	10,9
40	0,0	12,6	8,6	12,1
45	0,0	9,8	7,8	12,7
50	0,0	13,1	9,6	0,0
55	0,0	10,8	4,2	0,0
60	0,0	10,7	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



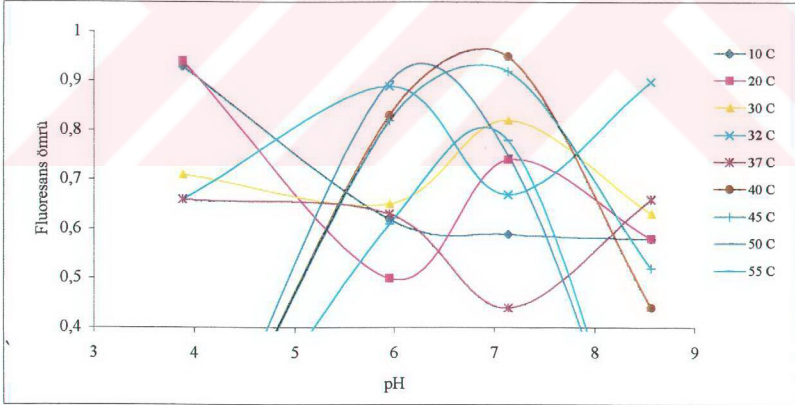
Şekil 38 Dializ edilmiş 10 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans şiddetinin pH ile değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,88'de F luoresans şiddeti	pH:5,95'te Fluoresans şiddeti	pH:7,13'te Fluoresans şiddeti	pH:8,56'da Fluoresans şiddeti
10	15,3	20,3	15,9	26,5
20	12,0	12,3	16,6	20,0
30	9,9	11,5	17,9	15,4
32	11,2	13,4	18,0	16,4
37	6,3	14,0	12,7	10,9
40	0,0	12,6	8,6	12,1
45	0,0	9,8	7,8	12,7
50	0,0	13,1	9,6	0,0
55	0,0	10,8	4,2	0,0
60	0,0	10,7	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



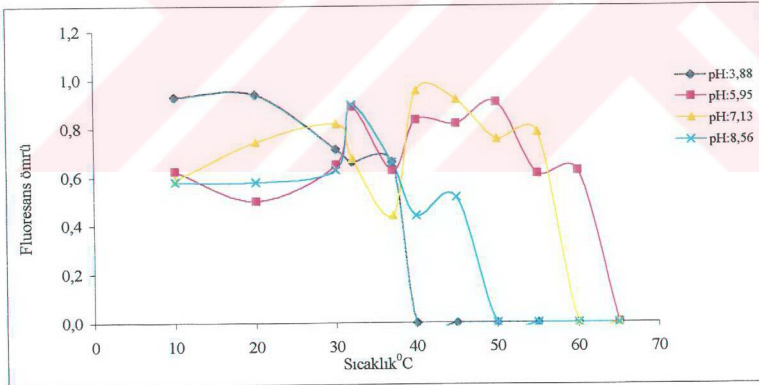
Şekil 39 Dializ edilmiş 10 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' lar da 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans şiddeti değerlerinin sıcaklık ile değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,88'de	pH:5,95'te	pH:7,13'te	pH:8,56'da
	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü
10	0,9	0,6	0,6	0,6
20	0,9	0,5	0,7	0,6
30	0,7	0,7	0,8	0,6
32	0,7	0,9	0,7	0,9
37	0,7	0,6	0,4	0,7
40	0,0	0,8	1,0	0,4
45	0,0	0,8	0,9	0,5
50	0,0	0,9	0,8	0,0
55	0,0	0,6	0,8	0,0
60	0,0	0,6	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



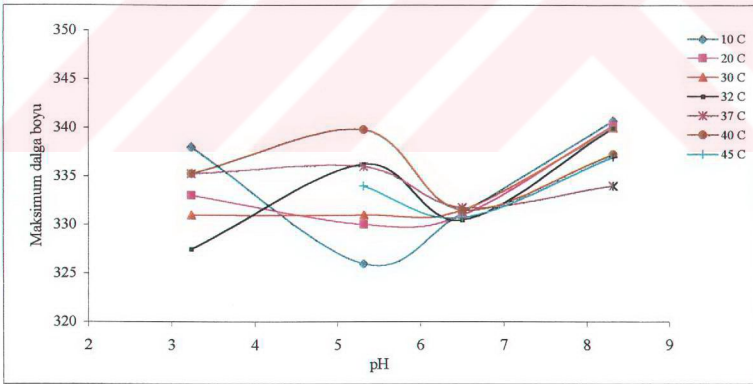
Şekil 40 Dializ edilmiş 10 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin pH ile değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3,88'de</u>	<u>pH:5,95'te</u>	<u>pH:7,13'te</u>	<u>pH:8,56'da</u>
	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü
10	0,9	0,6	0,6	0,6
20	0,9	0,5	0,7	0,6
30	0,7	0,7	0,8	0,6
32	0,7	0,9	0,7	0,9
37	0,7	0,6	0,4	0,7
40	0,0	0,8	1,0	0,4
45	0,0	0,8	0,9	0,5
50	0,0	0,9	0,8	0,0
55	0,0	0,6	0,8	0,0
60	0,0	0,6	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



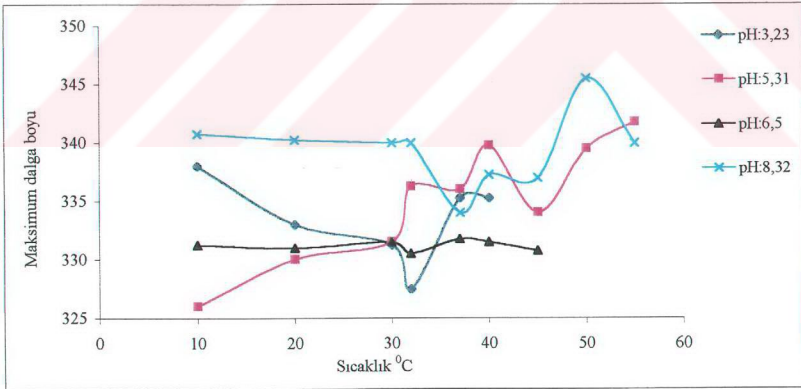
Şekil 41 Dialize edilmiş 10 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin sıcaklık ile değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3,23'te</u>	<u>pH:5,31'de</u>	<u>pH:6,50'de</u>	<u>pH:8,32'de</u>
	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu
10	338	326	331	341
20	333	330	331	340
30	331	332	332	340
32	328	336	331	340
37	335	336	332	334
40	335	340	332	337
45	...	334	331	337
50	...	340	...	346
55	...	342	...	340
60
65



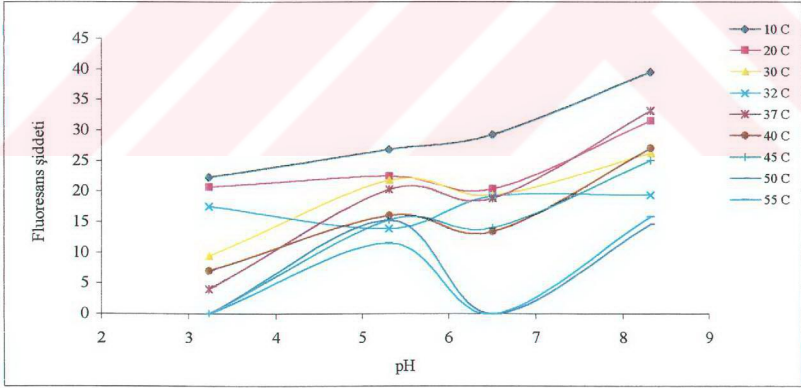
Şekil 42 20 oranlı M.m rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalga boyu değerlerinin pH 'yla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,23'teM aksimum dalga boyu	pH:5,31'de Maksimum dalga boyu	pH:6,50'de Maksimum dalga boyu	pH:8,32'de Maksimum dalga boyu
10	338	326	331	341
20	333	330	331	340
30	331	332	332	340
32	328	336	331	340
37	335	336	332	334
40	335	340	332	337
45	...	334	331	337
50	...	340	...	346
55	...	342	...	340
60
65



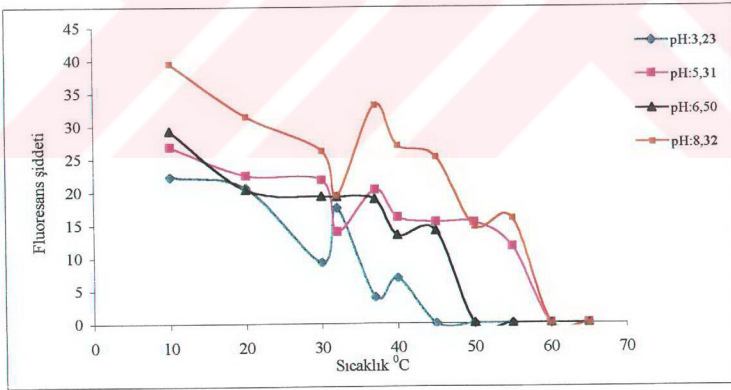
Şekil 43 20 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalga boyu değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3,23'te</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:5,31'de</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:6,50'de</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:8,32'de</u> Fluoresans şiddeti
10	22,3	26,9	29,3	39,5
20	20,6	22,5	20,4	31,5
30	9,3	21,8	19,3	26,3
32	17,6	13,9	19,3	19,5
37	4,0	20,3	18,8	33,2
40	7,0	16,1	13,4	27,0
45	0,0	15,4	14,1	25,3
50	0,0	15,3	0,0	14,7
55	0,0	11,6	0,0	15,9
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



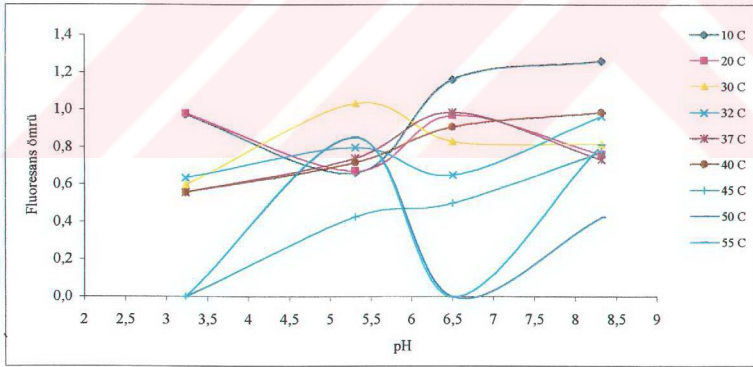
Şekil 44 20 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan floresans şiddeti değerlerinin pH'yla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,23'te Fluoresans şiddeti	pH:5,31'de Fluoresans şiddeti	pH:6,50'de Fluoresans şiddeti	pH:8,32'de Fluoresans şiddeti
10	22,3	26,9	29,3	39,5
20	20,6	22,5	20,4	31,5
30	9,3	21,8	19,3	26,3
32	17,6	13,9	19,3	19,5
37	4,0	20,3	18,8	33,2
40	7,0	16,1	13,4	27,0
45	0,0	15,4	14,1	25,3
50	0,0	15,3	0,0	14,7
55	0,0	11,6	0,0	15,9
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



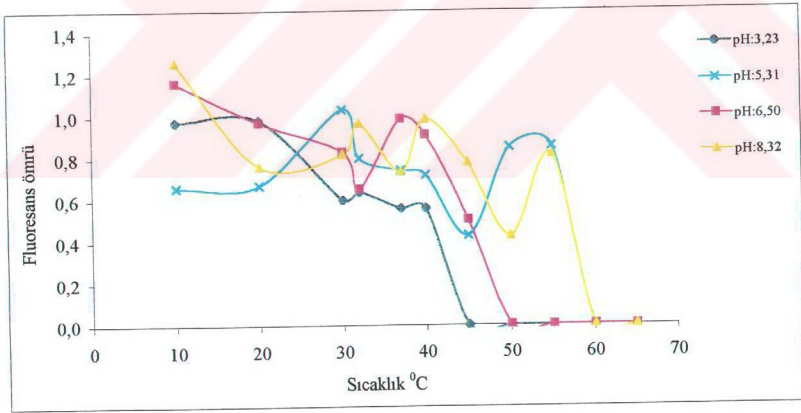
Şekil 45 20 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larında 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan floresans şiddeti değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,23'te Fluoresans ömrü	pH:5,31'de Fluoresans ömrü	pH:6,50'de Fluoresans ömrü	pH:8,32'de Fluoresans ömrü
10	1,0	0,7	1,2	1,3
20	1,0	0,7	1,0	0,8
30	0,6	1,0	0,8	0,8
32	0,6	0,8	0,7	1,0
37	0,6	0,7	1,0	0,7
40	0,6	0,7	0,9	1,0
45	0,0	0,4	0,5	0,8
50	0,0	0,9	0,0	0,4
55	0,0	0,9	0,0	0,8
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



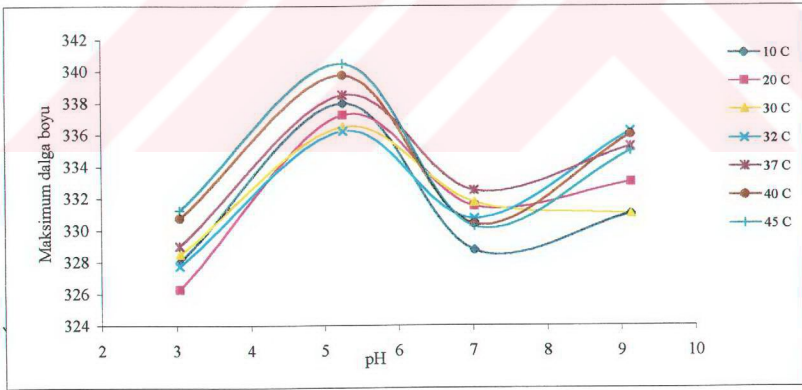
Şekil 46 20 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin pH 'yla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3.23'te	pH:5.31'de	pH:6.50'de	pH:8.32'de
	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü
10	1,0	0,7	1,2	1,3
20	1,0	0,7	1,0	0,8
30	0,6	1,0	0,8	0,8
32	0,6	0,8	0,7	1,0
37	0,6	0,7	1,0	0,7
40	0,6	0,7	0,9	1,0
45	0,0	0,4	0,5	0,8
50	0,0	0,9	0,0	0,4
55	0,0	0,9	0,0	0,8
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



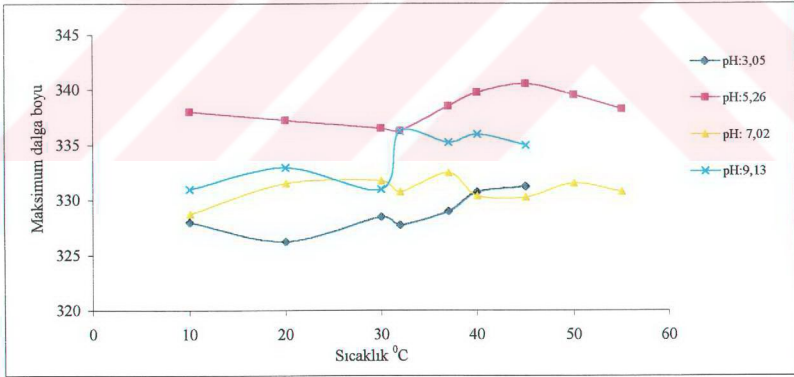
Şekil 47 20 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3.05'te	pH:5.26'da	pH:7.02'de	pH:9.13'te
	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu
10	328	338	329	331
20	326	337	332	333
30	329	337	332	331
32	328	336	331	336
37	329	339	333	335
40	331	340	330	336
45	331	341	330	335
50	...	340	332	...
55	...	338	331	...
60
65



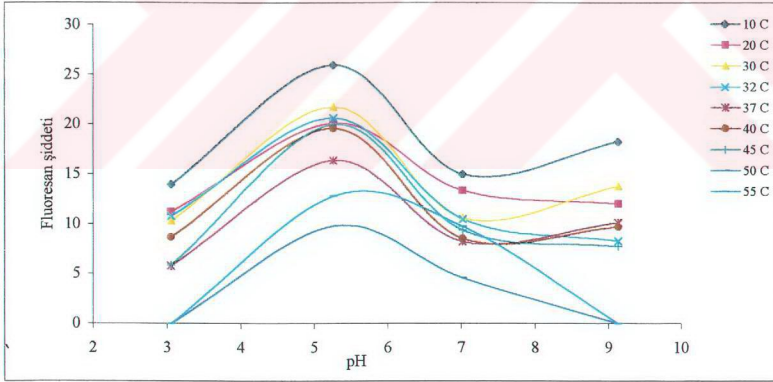
Şekil 48 Dializ edilmiş 20 oranlı M.m-rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalga boylarının pH'yla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,05'te Maksimum dalga boyu	pH:5,26'daM Maksimum dalga boyu	pH:7,02'de Maksimum dalga boyu	pH:9,13'te Maksimum dalga boyu
10	328	338	329	331
20	326	337	332	333
30	329	337	332	331
32	328	336	331	336
37	329	339	333	335
40	331	340	330	336
45	331	341	330	335
50	...	340	332	...
55	...	338	331	...
60
65



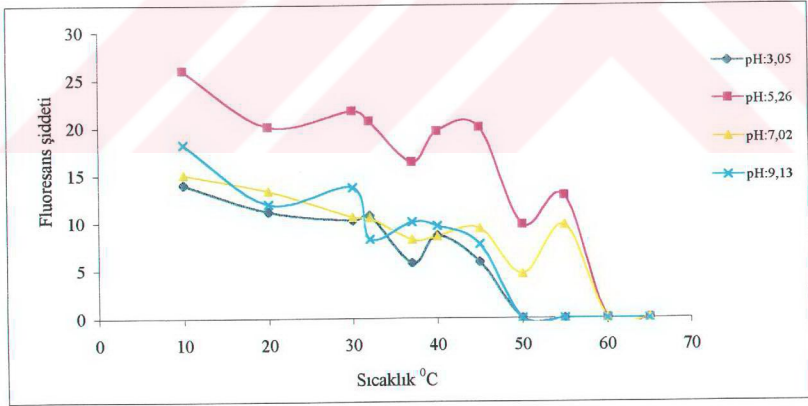
Şekil 49 Dializ edilmiş 20 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalga boylarının sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3,05'te</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:5,26'da</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:7,02'de</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:9,13'te</u> Fluoresans şiddeti
10	14,0	26,0	15,0	18,3
20	11,2	20,1	13,3	12,0
30	10,3	21,7	10,6	13,7
32	10,8	20,6	10,5	8,3
37	5,8	16,4	8,2	10,1
40	8,7	19,6	8,5	9,7
45	5,9	20,0	9,4	7,8
50	0,0	9,8	4,6	0,0
55	0,0	12,8	9,8	0,0
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



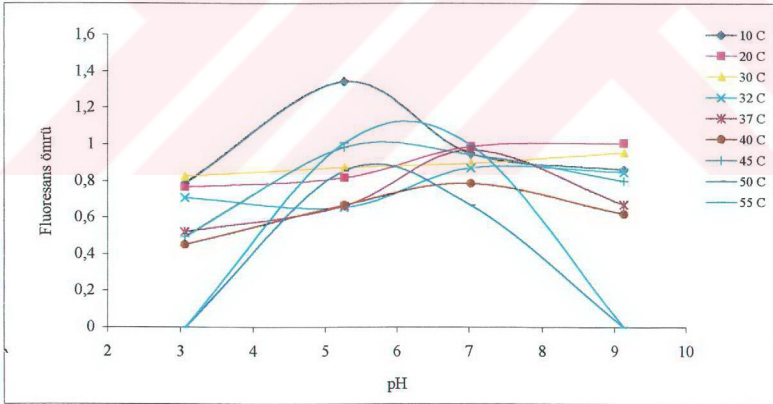
Şekil 50 Dialize edilmiş 20 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans şiddeti değerlerinin pH'yla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3,05'te</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:5,26'da</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:7,02'de</u> Fluoresans şiddeti	<u>pH:9,13'te</u> Fluoresans şiddeti
10	14,0	26,0	15,0	18,3
20	11,2	20,1	13,3	12,0
30	10,3	21,7	10,6	13,7
32	10,8	20,6	10,5	8,3
37	5,8	16,4	8,2	10,1
40	8,7	19,6	8,5	9,7
45	5,9	20,0	9,4	7,8
50	0,0	9,8	4,6	0,0
55	0,0	12,8	9,8	0,0
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



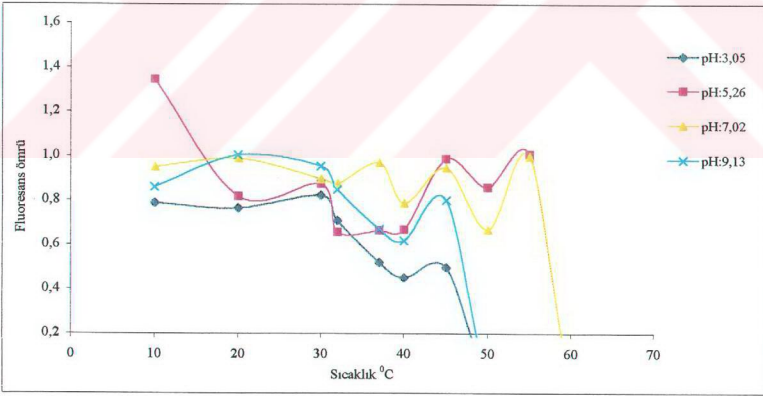
Şekil 51 Dializ edilmiş 20 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalga boylarının sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3.05'te</u>	<u>pH:5.26'da</u>	<u>pH:7.02'de</u>	<u>pH:9.13'te</u>
	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü
10	0,8	1,3	0,9	0,9
20	0,8	0,8	1,0	1,0
30	0,8	0,9	0,9	1,0
32	0,7	0,7	0,9	0,8
37	0,5	0,7	1,0	0,7
40	0,5	0,7	0,8	0,6
45	0,5	1,0	0,9	0,8
50	0,0	0,9	0,7	0,0
55	0,0	1,0	1,0	0,0
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



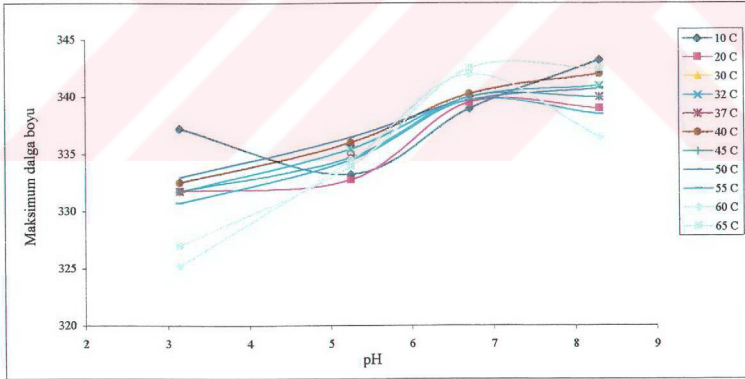
Şekil 52 Dializ edilmiş 20 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin pH'yla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,05'te Fluoresans ömrü	pH:5,26'da Fluoresans ömrü	pH:7,02'de Fluoresans ömrü	pH:9,13'te Fluoresans ömrü
10	0,8	1,3	0,9	0,9
20	0,8	0,8	1,0	1,0
30	0,8	0,9	0,9	1,0
32	0,7	0,7	0,9	0,8
37	0,5	0,7	1,0	0,7
40	0,5	0,7	0,8	0,6
45	0,5	1,0	0,9	0,8
50	0,0	0,9	0,7	0,0
55	0,0	1,0	1,0	0,0
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



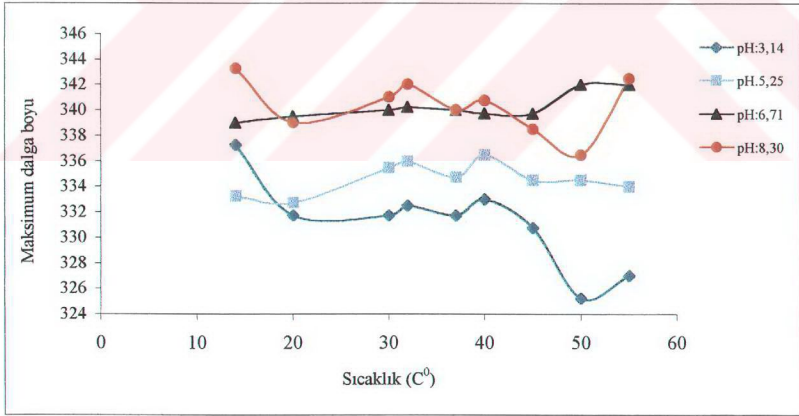
Şekil 53 Dializ edilmiş 20 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larda 297 nm'de uyarma ile elden edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3,14'te</u>	<u>pH:5,25'te</u>	<u>pH:6,71'de</u>	<u>pH:8,30'da</u>
	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu
14	337	333	339	343
20	332	333	340	339
30	332	336	340	341
32	333	336	340	342
37	332	335	340	340
40	333	337	340	341
45	331	335	340	339
50	325	335	342	337
55	327	334	342	343
60
65



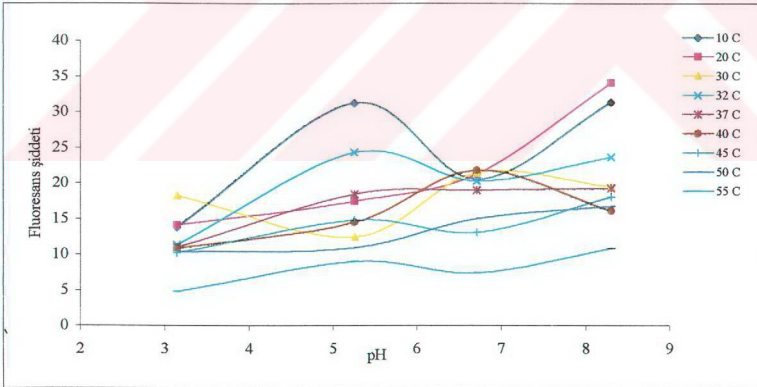
Şekil 54 30 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalga boyu değerlerinin pH'yla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3,14'te</u>	<u>pH:5,25'te</u>	<u>pH:6,71'de</u>	<u>pH:8,30'da</u>
	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu
14	337	333	339	343
20	332	333	340	339
30	332	336	340	341
32	333	336	340	342
37	332	335	340	340
40	333	337	340	341
45	331	335	340	339
50	325	335	342	337
55	327	334	342	343
60
65



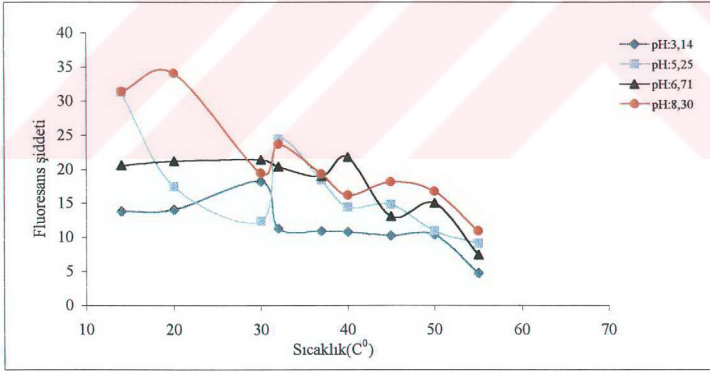
Şekil 55 30 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalga boylarının sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,14'te	pH:5,25'te	pH:6,71'de	pH:8,30'da
	Fluoresans şiddeti	Fluoresans şiddeti	Fluoresans şiddeti	Fluoresans şiddeti
14	13,9	31,3	20,6	31,4
20	14,1	17,4	21,2	34,1
30	18,2	12,4	21,4	19,4
32	11,3	24,4	20,4	23,7
37	10,9	18,4	19,0	19,3
40	10,9	14,5	21,8	16,1
45	10,3	14,8	13,1	18,1
50	10,4	10,9	15,0	16,7
55	4,8	9,1	7,5	10,9
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



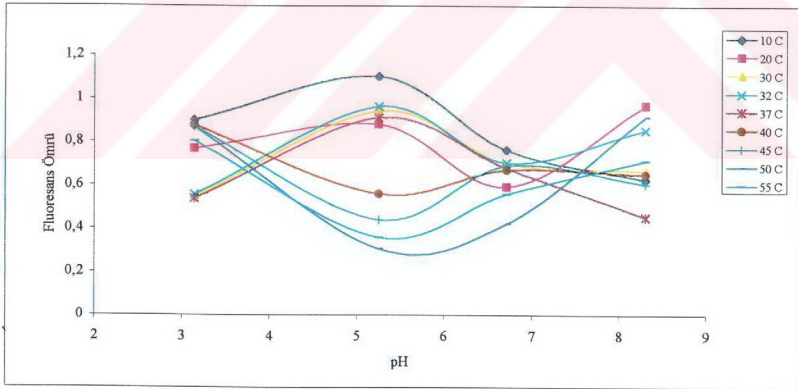
Şekil 56 30 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH'larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR emisyon spektrumlarından okunan fluoresans şiddeti değerlerinin pH'yla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,14'te Fluoresans şiddeti	pH:5,25'te Fluoresans şiddeti	pH:6,71'de Fluoresans şiddeti	pH:8,30'da Fluoresans şiddeti
14	13,9	31,3	20,6	31,4
20	14,1	17,4	21,2	34,1
30	18,2	12,4	21,4	19,4
32	11,3	24,4	20,4	23,7
37	10,9	18,4	19,0	19,3
40	10,9	14,5	21,8	16,1
45	10,3	14,8	13,1	18,1
50	10,4	10,9	15,0	16,7
55	4,8	9,1	7,5	10,9
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



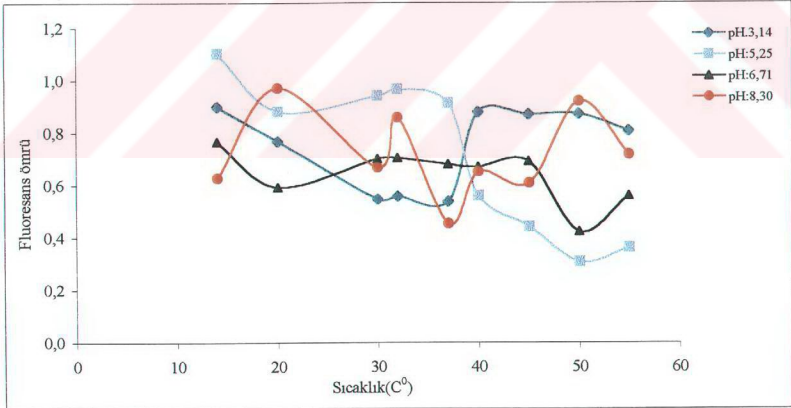
Şekil 57 30 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larında 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans şiddeti değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,14'te Fluoresans ömrü	pH:5,25'te Fluoresans ömrü	pH:6,71'de Fluoresans ömrü	pH:8,30'da Fluoresans ömrü
14	0,9	1,1	0,8	0,6
20	0,8	0,9	0,6	1,0
30	0,5	0,9	0,7	0,7
32	0,6	1,0	0,7	0,9
37	0,5	0,9	0,7	0,5
40	0,9	0,6	0,7	0,7
45	0,9	0,4	0,7	0,6
50	0,9	0,3	0,4	0,9
55	0,8	0,4	0,6	0,7
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



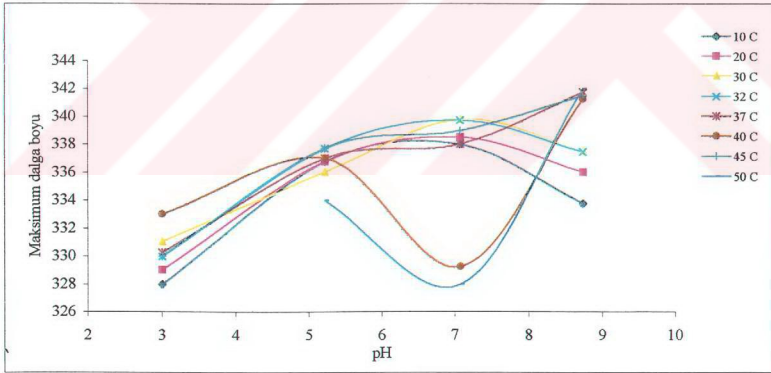
Şekil 58 30 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH'larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3,14'te</u> Fluoresans ömrü	<u>pH:5,25'te</u> Fluoresans ömrü	<u>pH:6,71'de</u> Fluoresans ömrü	<u>pH:8,30'da</u> Fluoresans ömrü
14	0,9	1,1	0,8	0,6
20	0,8	0,9	0,6	1,0
30	0,5	0,9	0,7	0,7
32	0,6	1,0	0,7	0,9
37	0,5	0,9	0,7	0,5
40	0,9	0,6	0,7	0,7
45	0,9	0,4	0,7	0,6
50	0,9	0,3	0,4	0,9
55	0,8	0,4	0,6	0,7
60	0,0	0,0	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



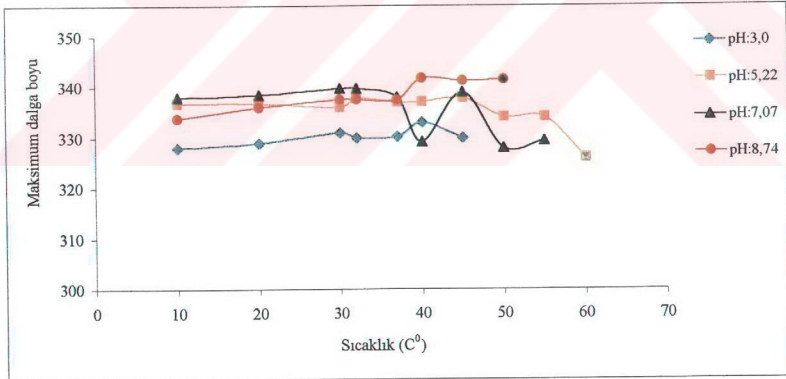
Şekil 59 30 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,0'te Maksimum dalga boyu	pH:5,22'de Maksimum dalga boyu	pH:7,07'de Maksimum dalga boyu	pH:8,74'te Maksimum dalga boyu
10	328	337	338	334
20	329	337	339	336
30	331	336	340	338
32	330	338	340	338
37	330	337	338	338
40	333	337	329	342
45	330	338	339	341
50	...	334	328	342
55	...	334	330	...
60	...	326
65



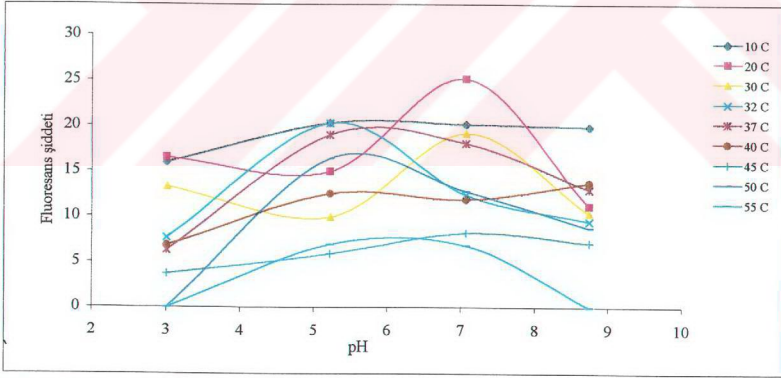
Şekil 60 Dializ edilmiş 30 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklıklarda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalga boylarının pH ile değişim grafiği

Sıcaklık	<u>pH:3,0'te</u>	<u>pH:5,22'de</u>	<u>pH:7,07'de</u>	<u>pH:8,74'te</u>
	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu	Maksimum dalga boyu
10	328	337	338	334
20	329	337	339	336
30	331	336	340	338
32	330	338	340	338
37	330	337	338	338
40	333	337	329	342
45	330	338	339	341
50	...	334	328	342
55	...	334	330	...
60	...	326
65



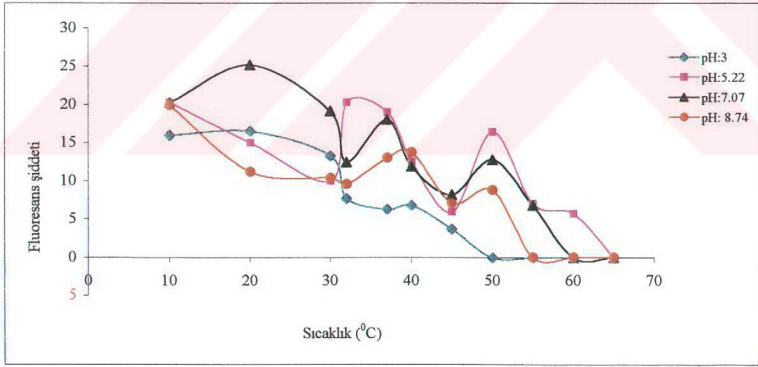
Şekil 61 Dializ edilmiş 30 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan maksimum dalga boyunun sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3.0'te Fluoresans şiddeti	pH:5.22'de Fluoresans şiddeti	pH:7.07'de Fluoresans şiddeti	pH:8.74'te Fluoresans şiddeti
10	16,0	20,3	20,2	19,9
20	16,5	15,0	25,2	11,1
30	13,3	9,9	19,1	10,3
32	7,7	20,3	12,4	9,5
37	6,3	19,0	18,1	13,0
40	6,8	12,5	11,9	13,7
45	3,7	5,9	8,2	7,1
50	0,0	16,4	12,8	8,7
55	0,0	7,0	6,8	0,0
60	0,0	5,7	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



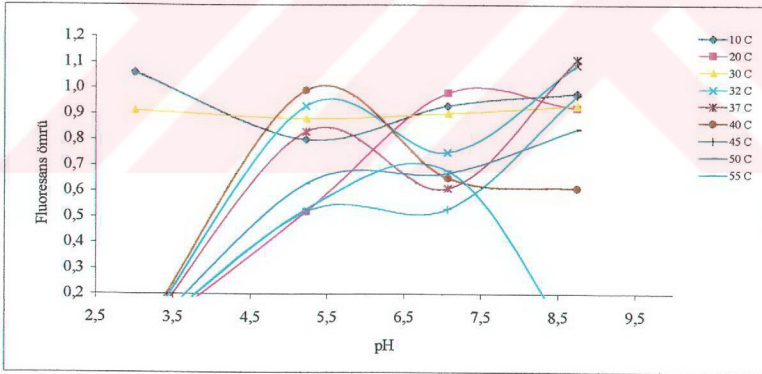
Şekil 62 Dializ edilmiş 30 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı sıcaklık larda 297 nm'de uyarına ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans şiddetinin pH ile değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,0'te Fluoresans şiddeti	pH:5,22'de Fluoresans şiddeti	pH:7,07'de Fluoresans şiddeti	pH:8,74'te Fluoresans şiddeti
10	16,0	20,3	20,2	19,9
20	16,5	15,0	25,2	11,1
30	13,3	9,9	19,1	10,3
32	7,7	20,3	12,4	9,5
37	6,3	19,0	18,1	13,0
40	6,8	12,5	11,9	13,7
45	3,7	5,9	8,2	7,1
50	0,0	16,4	12,8	8,7
55	0,0	7,0	6,8	0,0
60	0,0	5,7	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



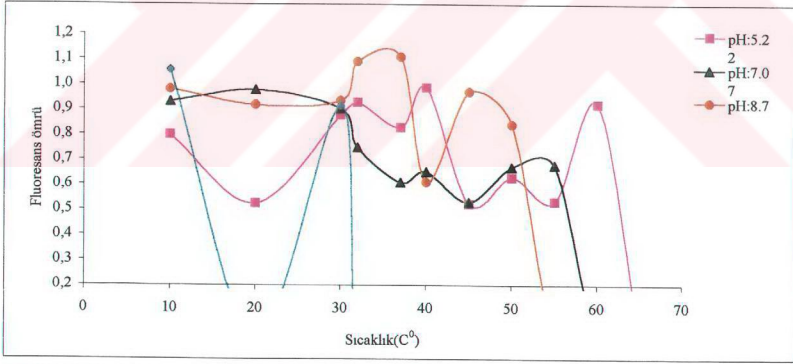
Şekil 63 Dializ edilmiş 30 oranlı M.m.rennet-dekstran konjugatının farklı pH' larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan floresans şiddeti değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,0'te	pH:5,22'de	pH:7,07'de	pH:8,74'te
	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü
10	1,1	0,8	0,9	1,0
20	0,0	0,5	1,0	0,9
30	0,9	0,9	0,9	0,9
32	0,0	0,9	0,7	1,1
37	0,0	0,8	0,6	1,1
40	0,0	1,0	0,7	0,6
45	0,0	0,5	0,5	1,0
50	0,0	0,6	0,7	0,8
55	0,0	0,5	0,7	0,0
60	0,0	0,9	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



Şekil 64 Dializ edilmiş 30 oranlı M.m.renet-dekstran konjugatının farklı sıcaklık larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin pH ile değişim grafiği

Sıcaklık	pH:3,0'te	pH:5,22'de	pH:7,07'de	pH:8,74'te
	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü	Fluoresans ömrü
10	1,1	0,8	0,9	1,0
20	0,0	0,5	1,0	0,9
30	0,9	0,9	0,9	0,9
32	0,0	0,9	0,7	1,1
37	0,0	0,8	0,6	1,1
40	0,0	1,0	0,7	0,6
45	0,0	0,5	0,5	1,0
50	0,0	0,6	0,7	0,8
55	0,0	0,5	0,7	0,0
60	0,0	0,9	0,0	0,0
65	0,0	0,0	0,0	0,0



Şekil 65 Dializ edilmiş 30 oranlı M.m rennet-dekstran konjugatının farklı pH larda 297 nm'de uyarma ile elde edilen TR-emisyon spektrumlarından okunan fluoresans ömrü değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	12.08.1976	
Doğum yeri	Üsküp/Makedonya	
Lise	1990-1993	Şehremini Lisesi
Lisans	1993-1997	Yıldız Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	1998-2001	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı
Çalıştığı kurumlar		
	1997-1998	Zorluteks Tekstil Ticaret ve Sanayii A.Ş
	1998-Devam ediyor	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalında Uzman kadrosunda görevli.