ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Yakup AKKOÇ

GLUKOAMİLAZ VE GLUKOZ İZOMERAZIN ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARI OLUŞTURULARAK BİRLİKTE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2016

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUKOAMİLAZ VE GLUKOZ İZOMERAZIN ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARI OLUŞTURULARAK BİRLİKTE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Yakup AKKOÇ

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 05/01/2016 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....	.....	.....
Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL	Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ	Prof. Dr. Nuray GÜZELER
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE
.....	.....	
Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ	Doç. Dr. Mustafa Kemal SANGÜN	
ÜYE	ÜYE	

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2013D23

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

GLUKOAMİLAZ VE GLUKOZ İZOMERAZIN ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARI OLUŞTURULARAK BİRLİKTE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

YAKUP AKKOÇ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİMDALI

Danışman : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Yıl: 2015 Sayfa:98
Jüri : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof. Dr. Nuray GÜZELER
: Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ
: Doç. Dr. Mustafa Kemal SANGÜN

Bu çalışmada, glukoamilaz (GA) ve glukoz izomeraz (Gİ) enzimleri çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) oluşturma yöntemiyle birlikte immobilize (ko-immobilizasyon) edilmişlerdir. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit ve poliglutaraldehit kullanılmıştır. [Bmim] [CI], [Bmim] [PF_6], [Bmim][AOc],[Amim] [CI], [Emim] [CI] ve [Dmim] [CI] İyonik sıvıları içinde hem serbest (GA+Gİ) hem de birlikte immobilize edilerek (GA+Gİ) nişastanın hidrolizi araştırılmiş ve maksimum aktivite 1-bütil-3-metilimidazolyum klorür [Bmim][CI]'de gözlenmiştir. [Bmim][CI] içindeki hidrolitik aktivitenin 100 mM pH 7 fosfat tamponu kullanılan ortama göre yaklaşık 2 kat yüksek olduğu belirlenmiştir. 20 kullanımdan sonra kombi CLEA (GA+Gİ)'nın başlangıç aktivitesinin %23'ünü koruduğu belirlenmiştir. Kombi CLEA (GA+Gİ) 5 ˚C ve 25 ˚C'de 4 hafta depolanma süresi sonunda sırasıyla başlangıç aktivitesinin %78 ve %61'ni korumuştur.

Anahtar Kelimeler: Glukoamilaz, glukoz izomeraz, CLEA, ko-immobilizasyonu, iyonik sıvılar

ABSTRACT

PhD THESIS

CO-IMMOBLIZATION OF GLUCOAMYLASE AND GLUCOSE ISOMERASE AS CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATE AND ITS CHARACTERIZATION

YAKUP AKKOÇ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Year: 2015 Pages: 98
Jury : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof. Dr. Nuray GÜZELLER
: Assoc.Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ
: Assoc. Prof. Dr. Mustafa Kemal SANGÜN

In this study, glucoamylase (GA) and glucose isomerase (GI) were co-immobilized as cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEA(GA+GI)). Glutaraldehyde and polyglutaraldehyde were used as cross-linking agents. The hydrolysis of starch using different combination of two free enzymes (GA+GI) and combi CLEA (GA+GI) in ionic liquids ([Bmim][CI], [Bmim][PF6], [Bmim][AOc],[Amim][CI], [Emim][CI], [Dmim][CI]) was investigated and the maximum activity was observed in [Bmim][CI]. The hydrolytic activities in [Bmim][CI] was determined about 2-fold higher than the activities in buffer medium (100 mM, pH 7 phosphate buffer). After 12 reuses, the residual activity of combi CLEA (GA+GI) was about 23% of its initial activity. Combi CLEA (GA+GI) was protected 78% and 61% of its original activity at 5 ˚C and 25 ˚C respectively for four weeks.

Keywords: Glucoamylase, glucose isomerase, CLEA, co-immobilization, ionic liquids

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan her türlü yardımlarıyla tez çalışmamın bu seviyeye gelmesinde büyük emeği olan değerli hocam Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL, bu tez çalışmasında bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım, Prof. Dr. Ramazan BİLGİN ve Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e;

Bana sabırla yardım eden, benden bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen takıldığım konularla ilgili çekinmeden fikirlerine danışabildiğim hocam Doç. Dr. Deniz YILDIRIM'a;

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım üretken ve azimli ekip arkadaşlarım Ali TOPRAK, Ersin AKGÖLLÜ, Dilek ALAGÖZ, Özlem ALPTEKİN, Özge ÖZDEMİR, Gözde ERGÖÇEN, Özge GÖNGÖR'e;

Son olarak tüm ömrüm boyunca ve bu çalışma sırasında bana destek olan bugün bulunduğum yere gelmemi sağlayan her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGE DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ X
SİMGELER VE KISALTMALAR XIV
1. GİRİŞ 1
1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri 2
1.1.1. Çözünen Formda İmmobilizasyon Yöntemleri 3
1.1.2. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri 4
1.1.2.1. Tutuklama Yöntemleri 4
1.1.2.2. Bağlanma 5
1.1.2.2.(1). Enzim Kopolimerizasyonu 5
1.1.2.2.(2). Taşıyıcı Bağlanma 5
1.1.2.2.(3). Çapraz Bağlanma 7
1.1.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması 9
1.2. Nano Teknoloji 10
1.2.1. Nanopartikül 12
1.2.1.1. Manyetik Nanopartiküller 12
1.3. İyonik Sıvılar 12
1.3.1. İyonik Sıvıların Özelikleri 13
1.3.1.1. Erime Noktası 13
1.3.1.2. Buhar Basıncı 14
1.3.1.3. Termal Kararlılık 14
1.3.1.4. Çözünürlük 14
1.3.1.5. Yoğunluk 14
1.3.1.6. Viskozite 14
1.3.2. İyonik Sıvıların Kullanıldığı Alanlar 15

1.4. Glukoamilaz 16
1.4.1. Glukoamilazın Genel Özelikleri 16
1.4.2. Glukoamilazın Reaksiyon Mekanizması 17
1.4.3. Glukoamilazın Kullanım Alanları 19
1.5. Glukoz İzomeraz 20
1.5.1. Glukoz İzomerazın Genel Özelikleri 21
1.5.2. Glukoz İzomerazın Reaksiyon Mekanizması 22
1.5.3. Glukoz İzomerazın Kullanım Alanları 23
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 25
3. MATERYAL VE METOT 33
3.1. Materyal 33
3.2. Metot 33
3.2.1. Protein Tayini 33
3.2.2. Serbest Glukoamilazın Aktivitesinin Belirlenmesi 34
3.2.3. Serbest Glukoz İzomerazının Aktivitesinin Belirlenmesi 35
3.2.4. Kombi CLEA (GA+Gİ) Hazırlanması 35
3.2.5. Kombi CLEA(GA+Gİ)'nın Aktivite Tayini 36
3.2.6. Fruktoz Tayini 36
3.2.7. Kombi CLEA (GA+Gİ) Örneklerinin Hazırlanmasında İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu 37
3.2.8. Serbest Glukoamilaz, Glukoz İzomeraz ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'ın Karekterizasyonu 37
3.2.8.1. Serbest GA, Gİ ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Optimum pH'larının Belirlenmesi 37
3.2.8.2. Serbest GA, Gİ ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Optimum Tampon Derişimlerinin Belirlenmesi 38
3.2.8.3. Serbest GA, Gİ ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi 38
3.2.9. Serbest GA, Gİ ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Termal Kararlılığın Belirlenmesi 39

3.2.10. Serbest GA, Gİ ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Depolama Kararlılığın Belirlenmesi 39
3.2.11. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Tekrar Kullanım Kararlılığın Belirlenmesi 39
3.2.12. GA ve Gİ Enzimlerinin Ko-immobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu 40
3.2.13. İyonik Sıvılar İçinde Kombi CLEA (GA+Gİ) ile Fruktoz Üretimi 41
3.2.14. Poliglutaradehitin Sentezi 43
3.2.15. Poliglutaraldehit Kullanarak GA ve Gİ Enzimlerinin Kombi CLEA Olarak İmmobilizasyonu 43
3.2.16. Manyetik Nanopartikül Sentezi..... 44
3.2.17. Manyetik Nanopartiküllerin Kombi CLEA (GA+Gİ) İmmobilizasyonu İçin Hazırlanması..... 44
3.2.18. Manyetik Nanopartiküllerdeki Alkilamin Türevinin Glutaraldehit ile Aktifleştirilmesi 45
3.2.19. Manyetik Nanopartiküllerin Silanlama Sonrası ve Glutaraldehit ile Aktifleştirilmesi Sonrası Kalan Serbest Amino Gruplarının Tayini... 46
3.2.20. GA ve Gİ Enzimlerinin Glutaraldehit Üzerinden Manyetik Nanopartiküllere Kovalent Olarak Ko-immobilizasyonu..... 47
3.2.21. Manyetik Nanopartiküllerin Epiklorohidrin ile Aktifleştirilmesi 48
3.2.22. GA ve Gİ Enzimlerinin Epiklorohidrin Üzerinden Manyetik Nanopartiküllere Ko-immobilizasyonu 48
4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR 51
4.1. Bulgular..... 51
4.1.1. Serbest GA'nın Karakterizasyonu..... 51
4.1.2. Serbest Gİ'nin Karakterizasyonu 54
4.1.3. Kombi CLEA (Gİ+GA)'nın İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu..... 57
4.1.4. Serbest (GA+Gİ) ile Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Karşılaştırılması..... 62
4.1.5. Serbest (GA+Gİ) ve Kombi CLEA (GA+Gİ) ile Fruktoz Üretimi..... 66

4.1.6. Kombi CLEA (GA+Gİ) ve Serbest (GA+Gİ)'ın Aktivite Değerlerinin İyonik Sıvı Ortamına Bağlı Olarak Değişimi 66
4.1.7. Poliglutaraldehit Kullanarak GA ve Gİ'nin Kombi CLEA ile İmmobilizasyonu 70
4.1.8. MNP Kullanarak GA ve Gİ' Ko-immobilizasyonu 70
4.2. Tartışma 70
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 77
5.1. Sonuçlar 77
5.2. Öneriler 78
KAYNAKLAR 79
ÖZGEÇMİŞ 93
EKLER 94

ÇİZELGE DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması 10
Çizelge 1.2. *A. Niger* tarafından üretilen GA enzimlerinin değişik substratlara ilgisi…… 17
Çizelge 3.1. Kombi CLEA'da kullanılan GA ve Gİ enzimlerinin başlangıç derişimleri ve protein miktarla……..... 41
Çizelge 3.2. İyonik sıvılar ve anyonları 42
Çizelge 4.1. Kombi- CLEA kullanılan GA ve Gİ enzimlerinin başlangıç derişimleri ve gram destek başına kullanılan protein miktarları……..... …….60

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri 3
Şekil 1.2. Çözünür formda immobilizasyon 4
Şekil 1.3. Biyokatalizörlerin tutuklanması 4
Şekil 1.4. Geometrilerine göre taşıyıcıların sınıflandırması 5
Şekil 1.5. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyon 6
Şekil.1.6. İyonik bağlanma yöntemi 6
Şekil 1.7. Reaktif amino asit artıkları 7
Şekil 1.8. Genel CLEA hazırlama şeması 8
Şekil 1.9. Nilüfer (Lotus) çiçeğinin nano ve hidrofobik özelliği 10
Şekil 1.10. Kertenkelenin cam gibi kaygan yüzeyleri tutunma özelliği gösteren ayağındaki kıllar 11
Sekil l.11. İyonik sıvıların tarihi gelişimi 13
Şekil 1.12. İyonik sıvıların kullanım alanları 15
Şekil 1.13. Glukoamilaz enziminin muhtemel çalışma mekanizması 18
Şekil 1.14. Glukoamilaz enziminin bölümleri 19
Şekil 1.15. Glukoz izomerazın katalizleme reaksiyonu 20
Şekil 1.16. GI'nın endiol mekanizması 22
Şekil 3.1. Glukozun DNSA ile verdiği reaksiyonun gösterimi 34
Şekil 3.2. Kombi CLEA(GA+Gİ)'nın tekrar kullanım kararlılığının belirlendiği kesikli ve karıştırmalı kolon reaktör 39
Şekil 3.3. Manyetik nanopartiküllerin 3-APTES ile aktivite edilmesi 45
Şekil 3.4. Aktifleştirilmiş manyetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile reaksiyonu 45
Şekil 3.5. Ninhidrinin $–NH_2$ grubu ile verdiği reaksiyon 47
Şekil 3.6. Manyetik nanopartiküllerin epiklorohidrin ile reaksiyonu 48
Şekil 4.1. Serbest GA aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi 51
Şekil 4.2. Serbest GA aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi 52
Şekil 4.3. Serbest GA aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi 52
Şekil 4.4. Serbest GA aktivitesinin termal kararlılığına bağlı değişimi 53
Şekil 4.5. Serbest GA aktivitesinin depolama kararlılığına bağlı değişimi 54

Şekil 4.6. Serbest Gİ aktivitesinin pH'a bağlı değişimi 54
Şekil 4.7. Serbest Gİ aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi 55
Şekil 4.8. Serbest Gİ aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi 55
Şekil 4.9. Serbest Gİ enziminin termal kararlılığı 56
Şekil 4.10. Serbest Gİ enziminin depolama kararlılığı 56
Şekil 4.11. İmmobilizasyon ortamındaki amonyum sülfat derişimine bağlı olarak kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivitelerindeki değişim. 57
Şekil 4.12. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak kombi CLEA (GA+Gİ)'nin aktivitelerindeki değişim. 58
Şekil 4.13. İmmobilizasyon ortamındaki glutaraldehit derişimine bağlı olarak Kombi CLEA (Gİ+GA)'ın aktivitelerindeki değişim……. ……58
Şekil 4.14. Kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitesinin pH bağlı değişimi 59
Şekil 4.15. Kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi 59
Şekil 4.16. Kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişim 60
Şekil 4.17. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın termal kararlılığı 61
Şekil 4.18. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın depolama kararlılığı 62
Şekil 4.19. Kombi CLEA GA-Gİ'ın tekrar kullanılmasının zamana bağlı değişimi . 62
Şekil 4.20. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitelerinin pH bağlı değişimi 63
Şekil 4.21. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitelerinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi 63
Şekil 4.22. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi 64
Şekil 4.23. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ)'ın termal kararlılığı 64
Şekil 4.24. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) 'ın 4 C'deki depolama kararlılığı 65
şekil 4.25. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) 'ın 25 ^{O}C'deki depolama kararlılığı…….….65
Şekil 4.26. Serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ) ile fruktoz üretiminin kıyaslanması ……...66

Şekil 4.27. Farklı oranlarda [Bmim][PF_6]/tampon ortamında serbest(GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivite değişimi. ..……..67
Şekil 4.28. Farklı oranlarda [Bmim][AOc]/tampon ortamında serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivite değişimi……..67
Şekil 4.29. Farklı oranlarda [Bmim][CI]/tampon ortamında serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivite değişimi……..……68
Şekil 4.30. Farklı oranlarda [Amim][CI]/tampon ortamında serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivite değişimi……68
Şekil 4.31. Farklı oranlarda [Emim][CI]/tampon ortamında serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivite değişimi 69
Şekil 4.32. Farklı iyonik sıvılarda serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA(GA+Gİ)'nın aktivite değişim…… ……70

SİMGELER VE KISALTMALAR

GA	: Glukoamilaz
Gİ	: Glukoz izomeraz
GL	: Glutaralaldehit
PGL	: Poliglutaraldehit
K_M	: Michaelis-Menten hız sabiti (mM)
V_{max}	: Maksimum hız(µmol. dk $^{-1}$. mg protein $^{-1}$)
Kcat	: Geri dönüşüm sayısı (s^{-1})
K_{cat}/K_M	: Katalitik etkinlik (s^{-1} M^{-1})
PHEMA	: Poli (hidroksietilmetakrilat)
EGDMA	: Etilen glikol dimetakrilat
DEAE	: Dietilaminoetil
ECH	: Epiklorohidrin
DNSA	: Dinitro salisik asit
MNP	: Manyetik nano partikül
APTES	: 3- Aminopropil trietoksisilan
[Bmim][PF_6]	: 1- bütil-3-metilimidazolyum heksaflorofosfat
[Bmim][AOc]	: 1- bütil-3-metilimidazolyum asetat
[Bmim][CI]	: 1- bütil-3-metilimidazolyum klorür
[Amim][CI]	: 1-alil-3-metilimidazolyum klorür
[Dmim][CI]	: 1-desil-3-metilimidazolyum klorür
[Emim][CI]	: 1-etil-3-metilimidazolyum klor

1. GİRİŞ

Enzimler hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda sentezlenen, çoğu protein yapısında olan ve kimyasal tepkimelerde katalizör görevi yapan moleküllerdir. Enzimler, canlı hücrelerde binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü kendisi değişikliğe uğramadan düzenleyebilirler. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar katalizlenmemiş reaksiyonlara göre 10^7-10^{16} kez daha hızlı gerçekleşir

Enzimlerin yapay katalizörlere göre düşük basınçta ve sıcaklıkta çalışabilme, yüksek katalitik etkinlik, hassasiyet ve spesifik olma gibi avantajları vardır. Günümüzde enzimler tıp, eczacılık, gıda, tekstil gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bugün kullandığımız enzimlerin ilk kullanımı antik dönemlere kadar dayanmaktadır. O dönemlerde bira, peynir, keten, mayalı ekmek, deri, sirke, şarap gibi işlemlerde kullanılmaktaydı (Kirk ve ark., 2002). Enzimlerin yapısı ve tepkime mekanizması ortaya çıkarıldıktan sonra doğal ortamın dışında başka amaçlar için kullanılmaya başlanmıştır.

Enzimler çeşitli canlı kaynaklardan saflaştırılabilirler ve saflaştırma işi oldukça masraflı bir iştir. Serbest enzimler çözünür durumda olduğu için sadece bir defa kullanabilmektedir. Enzimlerin tekrar kullanabilir duruma getirilmeleri özellikle sulu ortamlarda gerçekleştirilen reaksiyonlar için yeniden saflaştırılmaları gerekir. Serbest enzimler, pH ve sıcaklık değişimlerine karşı dayanıksızdır ve aktivitesini kaybederek bozulurlar. Serbest enzimler bir reaksiyonu katalizledikten sonra ancak ortam koşulları (pH, sıcaklık, inhibitör v.b) değiştirilerek durdurulabilir. Bu nedenlerden dolayı bilim insanları enzimlerde maksimum verim elde etme, enzimleri tekrar kullanabilme, fiziksel ve kimyasal koşullara daha dayanıklı hale getirebilmek için yeni araştırmalara yönelmişlerdir.

Enzimlerin kullanıldığı endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilir. Sulu çözeltilerde gerçekleşen enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya bağlanarak veya suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ya da suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler (Telefoncu, 1997).

İmmobilize enzimin serbest enzime göre bazı üstünlükleri:

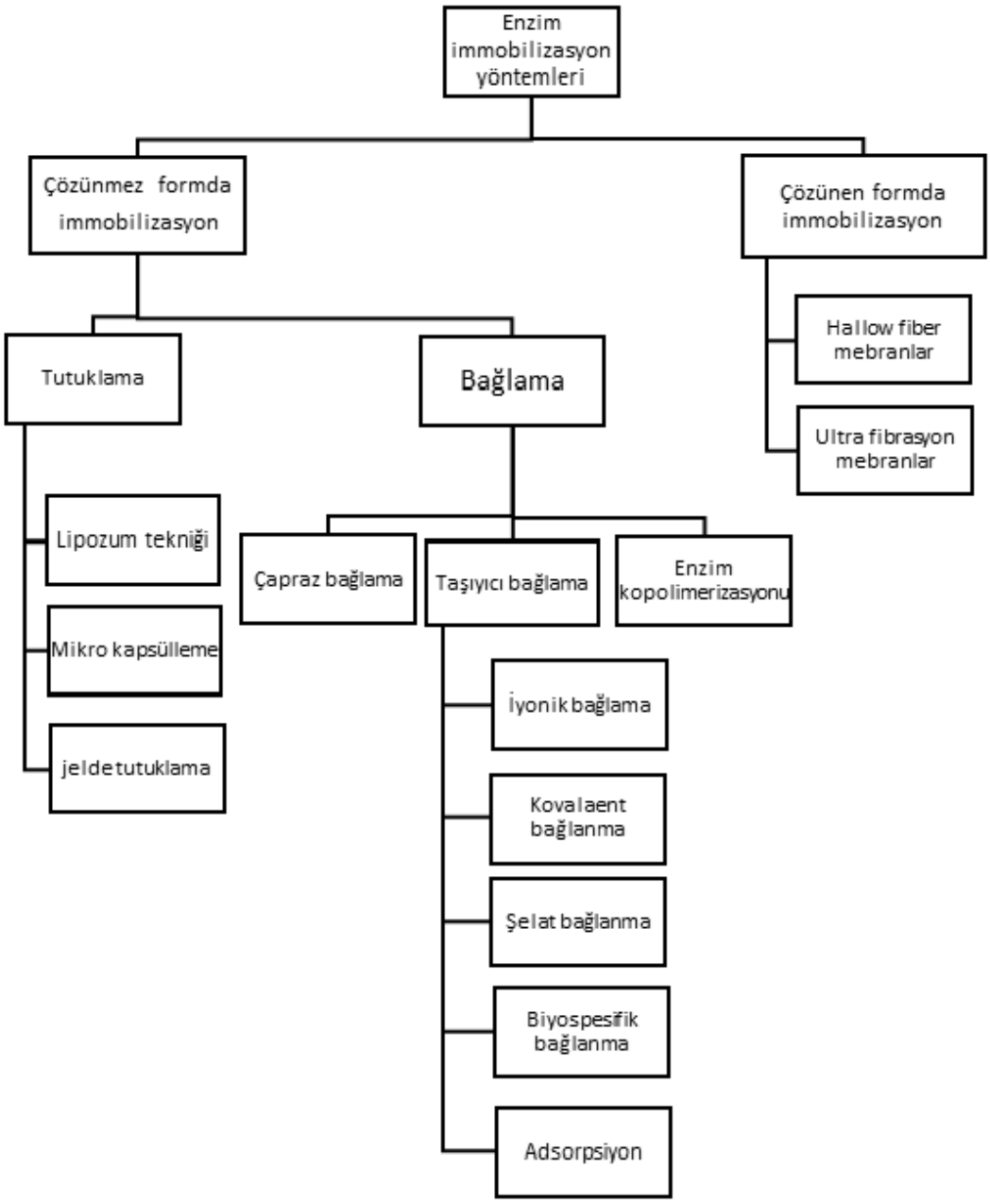
* Serbest enzimlere göre daha kararlıdırlar ve bazı durumlarda serbest enzimlerden daha yüksek aktivite gösterebilirler.
* Birbirini izleyen çok kademeli reaksiyonlar için uygundurlar.
* Çevre koşullarına (pH, sıcaklık… vb.) karşı daha dayanıklıdırlar.
* Sürekli işlemlere uygulanabilirler.
* Kirlenmeye daha az duyarlıdır.
* *Reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılabilir.
* Çok defa kullanabilir.
* Depolama kararlılığı yüksektir.

1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemi seçilirken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın enzimin aktif merkezinde gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon sırasında ve immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezine zarar vermeyecek bir yöntem olmalıdır. Uygun immobilizasyon yöntemi seçiminde 4 ana ölçüt göz önüne alınmalıdır. Bu ölçütler, kararlılık, güvenirlik, maliyet ve aktivitedir. Bu ölçütler içinde enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir (Önal, 2000).

Günümüzde enzim immobilizasyonunda, fiziksel ve kimyasal bağlanma yöntemleri kullanılır. Fiziksel yöntemlerde, enzim desteğe daha zayıf bağlanır. Kimyasal yöntemlerde ise enzim ve katı destek arasında, kovalent bağlar oluşturulur (Telefoncu, 1997; Karaca, 2006).

Enzim bağlanma yöntemleri Şekil 1.1’de sınıflandırmıştır.

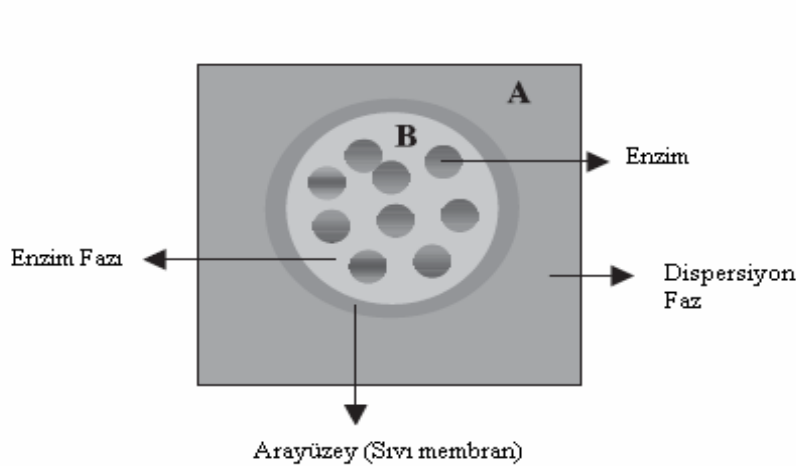


Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri

1.1.1. Çözünen Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Bu yöntemde enzimin fiziksel veya kimyasal yollarla bir taşıcıya bağlanmanın aksine etrafı yarı geçirgen bir zarla çevrelenmiş olup, enzime geniş bir hareket alanı sağlanır. Enzim taşıyıcıya herhangi bir bölgesinden bağlanmaz. Bundan dolayı enzimin moleküler geometrisi, esnekliği ve katalitik etkinliği

değişmemektedir. Bu yöntem seçilirken küçük moleküllü substrata sahip olan enzimler tercih edilmelidir. Çünkü substratın membrandan geçip enzime ulaşmasında bazı engellemelere sebep olabilir (Wichmann ve ark., 1981).



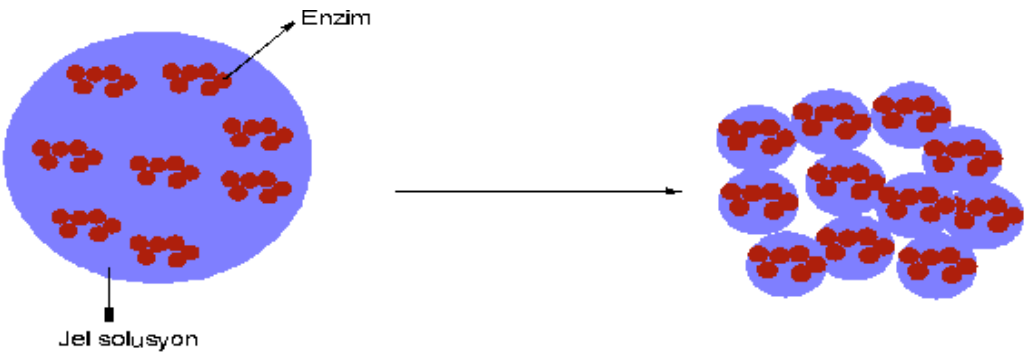
Şekil 1.2. Çözünür formda immobilizasyon.

1.1.2. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri tutuklama ve bağlanma olmak üzere ikiye ayrılır.

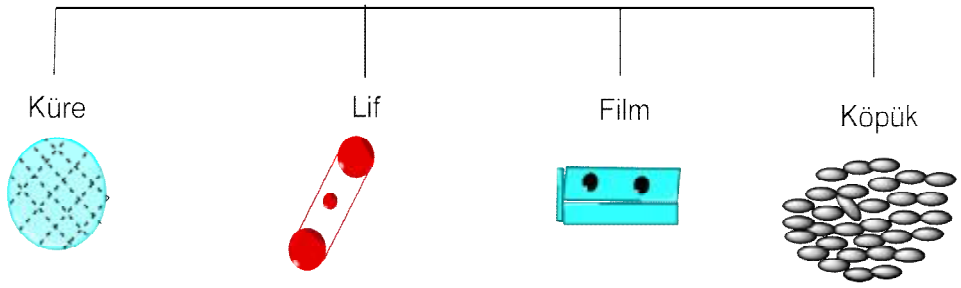
1.1.2.1. Tutuklama Yöntemleri

Bu yöntemin amacı enzimi küçük bir hacimde tutmaktır ve dolayısıyla enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem yarı geçirgen membranlarda veya polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebilir (Karaca, 2006) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Biyokatalizörlerin tutuklanması.

İmmobilize enzimin şekli ve büyüklüğünün seçimi sadece metota ve taşıyıcıya bağlı değil aynı zamanda uygulamanın özelliklerine de çok bağlıdır. Genelde tutuklanmış enzimlerin geometrisi lifli taşıyıcılar, köpük, kürecikli taşıyıcılar, film ve disk gibi sınıflandırılabilir (Cao, 2006).



Şekil 1.4. Geometrilerine göre taşıyıcıların sınıflandırması.

1.1.2.2. Bağlanma

1.1.2.2.(1). Enzim Kopolimerizasyonu

Bu yöntem polimer matrikste tutuklamaya benzer fakat enzim kaçışı önlenmiştir. Enzimler kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranır ve böylece polimer matrikse bağlanır.

1.1.2.2.(2). Taşıyıcı Bağlanma

Taşıyıcıya bağlanma en eski ve basit immobilizasyon yöntemidir. Bu bağlanmada enzimin molekül yapısından faydalanarak geliştirilen bir yöntemdir. İyonik, molekül düzeyindeki fonksiyonel gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanmada önemli rol oynar.

Adsorpsiyon: Bu yöntemde enzimler taşıyıcının yüzeyinde adsorplanır. Enzim genelde destek materyale van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimlerle fiziksel olarak bağlanır ve dolayısıyla etkileşim zayıftır. Bu da adsorpsiyon yönteminin en büyük dezavantajıdır.



Şekil 1.5. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyon (Çetin, 1983)

İyonik Bağlanma: Bu yöntem iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünemeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması temeline dayanır. Enzim immobilizasyon esnasında herhangi bir modifikasyona uğramaz (Wong, 1993, Solomon, 1974). Enzimin destek materyale bağlanması, kullanılan tampon çözeltiden, pH'dan, iyonik şiddetten ve sıcaklıktan etkilenir.

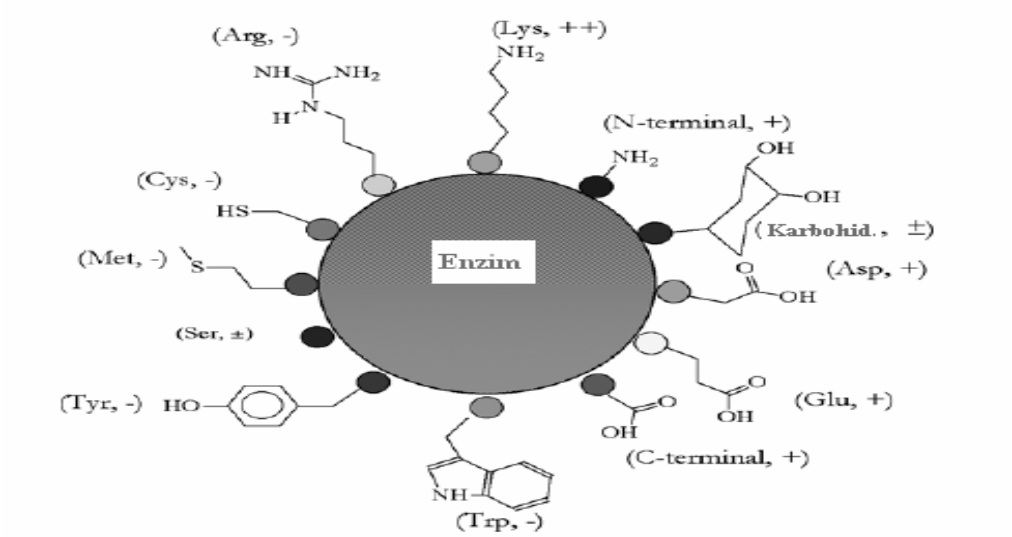


Şekil.1.6. İyonik bağlanma yöntemi (Çetin, 1983)

Şelat Bağlanma veya Metal Bağlanma: Organik taşıyıcıların yüzeyde depolanmış hidroksitler veya geçiş metal tuzları matrikste nükleofilik gruplarla koordinasyonu ile bağ yapar. Başlıca titanyum ve çinko tuzları kullanılır ve bu metot "metal bağ immobilizasyonu" olarak bilinir (Kennedy ve Cabral, 1985; Cabral ve ark., 1986; Cabral ve Kennedy, 1991).

Biyospesifik Bağlanma: Bu yöntemde enzimlerle antikorlar ve lektinler arasında biyospesifik etkileşimlerden faydalanılır. Lektinler spesifik karbohidrat artıkları içeren enzimlere kuvvetlice bağlanılır.

Kovalent Bağlanma: Bu yöntemde enzim taşıyıcıya kovalent olarak bağlanır. Enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar taşıyıcıya kimyasal olarak bağlanır. Kovalent immobilizasyonda rol oynayan aminoasit artıkları ise Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Reaktif amino asit artıkları : immobilizasyonda çok sık kullanılır (++),sıklıkla kullanılanır (+), sık kullanılmaz (±), kullanılmaz (-) (Cao, 2005).

1.1.2.2.(3). Çapraz Bağlanma

Bu yöntem küçük molekül yapılı, bir- veya multi fonksiyonel reaktifler ile enzim molekülleri arasında kovalent bağların oluşturulması ile suda çözünmeyen kompleksler oluşturma esasına dayanır (Schoevaart ve ark., 2004; Sheldon ve ark., 2005; Shah ve ark., 2006). Çapraz bağlanma derecesi ile immobilizasyon reaktif ve proteinin derişimine, pH'ya ve immobilize edilecek enzime bağlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlanma reaktifleri; glutaraldehit, geçiş metal iyonları, kloroformat ve karbonilimidazol, bioksiranlar, heterosiklik halojenürler, epiklorohidrinler, p-benzokinon ve divinilsülfonlardir. Genellikle pahalı olmadığı ve ticari olarak kolay bulunduğu için glutaraldehit çapraz bağlanma reaktifi olarak kullanılmaktadır.

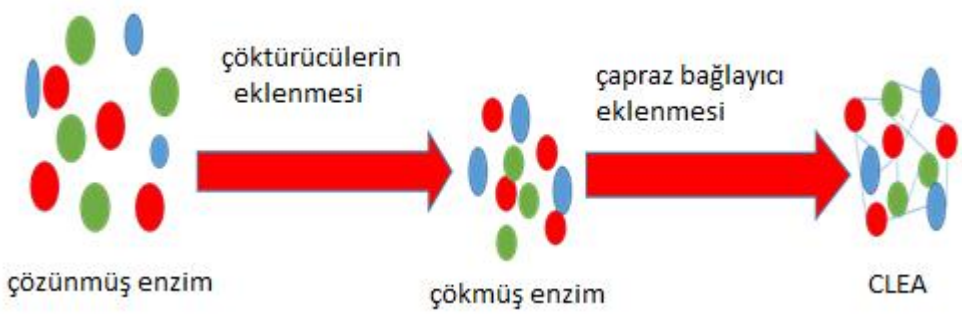
Literatürde çapraz bağlı enzimler 4 grupta incelenir.

1. **CLE:** Çapraz bağlı çözünmüş enzim (Cross-linked dissolved enzyme)
2. **CLEC:** Çapraz bağlı enzim kristali (Cross-linked enzyme crystal)
3. **CSDE**: Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim (Cross-linked spray dried enzyme)

4. **CLEA:** Çapraz bağlı enzim agregatları (Cross-linked enzyme agregate)

CLEA: Enzim moleküllerinin başka bir destek maddesi olmadan, kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlanması esasına dayanır. Bu yöntemde enzimin tamamen saf olmasına gerek yoktur. CLEA'da çapraz bağlanma için kullanılan reaktif aldehit grubu içeren, yüksek molekül ağırlıklı polifonksiyonel polimerlerin (100-200 kDa) enzimlerin veya alt ünitelerin çapraz bağlanmasında etkili olduğu bildirilmektedir (Mateo ve ark., 2004).

CLEA, çözünür enzim moleküllerinin çözünmez agregatlar oluşturması esasına dayanmaktadır. Uygun agregat oluşturucular eklenmesiyle enzim çözeltisinin elektrostatik sabitlerinin değişmesi veya enzim çözeltisinin hidrasyon durumunun değiştirilmesi söz konusudur ve dolayısıyla çözünmez enzim agregatları oluşur. Çöktürücülerinin enzim çözeltisine eklenmesiyle yüksek oranda çözünmüş olan serbest enzim moleküleri çözünmez şekilde çökelir. Bu çözünmez çökeltilere bifonksiyonel çapraz bağlayıcıların eklenmesiyle çapraz bağlanırlar. CLEA'nın kullanımı halen gelişmekte olan bir teknolojidir (Cao ve ark., 2003).



Şekil 1.8. Genel CLEA hazırlama şeması.

Bu yöntem çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için bazı sıkıntılar söz konusudur. Bu şekilde immobilize edilen enzimin aktifliği; tepkime süresi, iyonik şiddet, pH, sıcaklık, çapraz bağlayıcı madde ve enzim derişimi gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır.

CLEA'nın Avantajları:

- Herhangi bir destek kullanılmaması nedeniyle enzim aktivitesinde seyrelme olmaması,
- Tek bir işlemde enzimlerin immobilize edilebilmesi,
- Metotun hızlı immobilizasyon için basit olması,
- Yöntemin kombine CLEA'ların hazırlanması için de uygun olması,
- Metot ilk adımda saflaştırma ve immobilizasyonun bir bileşimi olduğundan enzimin yüksek saflığını gerektirmemesi,
- Enzim immobilizasyonu için yeni, çok yönlü ve etkili olması,
- Yüksek kararlılık ve düşük üretim maliyeti,
- Endüstriyel uygulamalarda zamandan ve maliyetten kazanç,

CLEA' nın Dezavantajları:

- Çöken enzimlerin partikül boyutlarının kontrolünün zorluğu
- Yüksek aktiflik gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki zorluklardır.

1.1.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Enzim immobilizasyon teknolojisinin geliştirilmesi için 1960'den günümüze kadar birçok immobilizasyon yöntemi kullanılmıştır. Enzimlerin birbirinden farklı kimyasal özeliklere sahip olması ve ayrıca kullanılan subsratların farklı kimyasal özeliklerinin olmasından dolayı bütün enzimler için aynı yöntemi kullanmak mümkün değildir. Her enzim içinde birkaç immobilizasyon yöntemi de önerilebilir. Çizelge 1.1'de immobilizasyon yöntemlerinin birbirlerine karşı kıyaslanması gösterilmiştir (Telefoncu 1997, Karaca 2006).

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

Özellik	**Fiziksel adsorpsiyon**	**İyonik bağlanma**	**Çapraz bağlanma**	**Kovalent bağlanma**	**Tutuklama**
Hazırlama	Kolay	Kolay	Zor	Zor	Zor
Bağlanma gücü	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli	Kuvvetli
Enzim Aktivitesi	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek
Tekrar kullanılabilirliği	Mümkün	Mümkün	İmkânsız	Nadiren	İmkânsız
Maliyeti	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Düşük
Kararlılık	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Uygulabilirlik	Düşük	Orta	Düşük	Orta	Yüksek

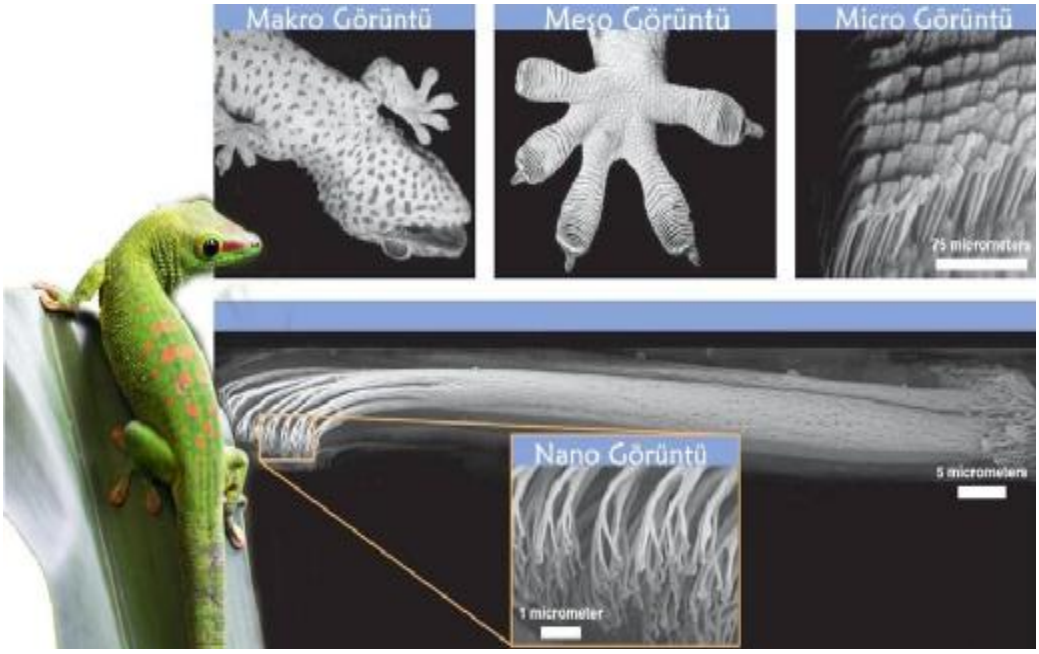
1.2. Nano Teknoloji

İnsanoğlunun doğadaki biyolojik sistemlerden esinlenerek moleküller makineler yapması mümkündür. Bilim insanları nilüfer çiçeğini çamurda yaşamasına rağmen hiç kirlenmemesinin ve böcek tutmamasının sebebini araştırmışlar. Bu araştırmanın sonucunda nilüfer çiçeğinin hidrofobik ve nano özelliği olduğundan dolayı kirleri temizleme özeliğnine sahip olduğunu bulmuşlar.



Şekil 1.9. Nilüfer (Lotus) çiçeğinin nano ve hidrofobik özelliği.

Benzer özellik gecko kertenkeleleri türünde de görülmektedir. Gecko kertenkelesinin düz bir duvara tırmanması, tavanda hareket edebilmesini nano düzeyde araştıran bilim insanları ayak yapısında bulunan iğne ucu kadar bir alanda 5000 mikro tüye sahip olduğunu görmüşlerdir. Bu da her ayakta ortalama yarım milyon tüy anlamına gelmektedir. Daha da ilginci bu tüylerinde sayıları 400 ile 1000 arasında değişen tüycüklere ayrılmasıdır. Bu tüycükler Gecko her hareket ettiğinde yüzeyle zayıf bir çekim kuvveti oluşturur. Van der Walls kuvveti oluşturan Gecko bu kuvvet sayesinde rahatlıkla istenilen her düzeyde yer çekimine meydan okuyarak hareket edebilmektedir. Doğada gözlenen bu durumlar nanoteknoloji biliminin ortaya çıkmasına sebep olmuştur.



Şekil 1.10. Kertenkelenin cam gibi kaygan yüzeylere tutunma özelliği gösteren ayağındaki kıllar (Autumn 2009).

Nano sözcükteki anlamı herhangi bir birimin milyarda birini ifade etmektedir. Nanoteknoloji, nanometre boyutlarına inerek maddeyi kontrol etme olarak ortaya çıkmıştır. Genel olarak 0,1 nm – 100 nm aralığındaki yapılarda; işleme, ölçüm, modelleme, üretim gibi faaliyetlerde nanoteknolojiden söz edilebilir

1.2.1. Nanopartikül

Nano partiküllerin atomik dizilimleri, yüzey Şekilleri ve boyutları farklı olduğu için diğer maddelere göre farklı kimyasal ve fiziksel özelik göstermektedirler. Yüksek hacim/yüzey alanına sahiptirler ve bu özeliğinden dolayı onlara üstün manyetik, mekanik, optik, elektriksel ve termal özellik kazandırılır. Nano malzemeler bu özeliğinden dolayı elektronik, tekstil, savunma sanayisi boya endüstrüsü, tıp, biyoteknoloji, tarım ve ilaç yapımında kullanılmaktadır.

1.2.1.1. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller, nano boyuttan mikron boyutuna kadar sentezlenebilirler ve kullanım alanları çok yaygındır. Manyetik nanopartiküllerin uygulanan manyetik alana cevap vererek istenilen şekilde hareket ettirilebilmeleri birçok uygulamada avantaj sağlamaktadır.

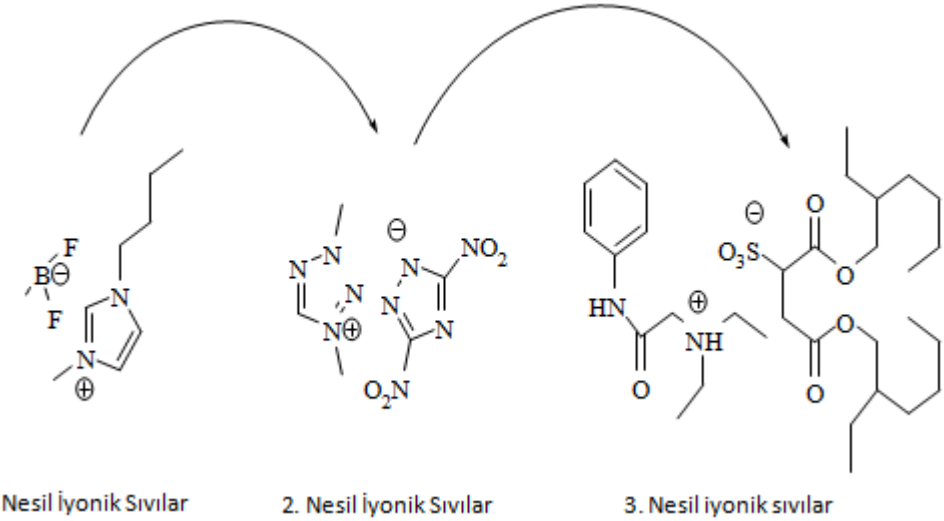
Manyetik nanopartiküller farklı maddelerle oluşturulabilir. Bunlar, metaller (Fe ve Co), demir oksitler (Fe_3O_4 , γ-Fe_2O_3), Spinel yapıda ferrimagnetler ($MgFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$ ve $CoFe_2O_4$) ve alaşımlardır ($CoPt_3$, ve FePt).

1.3. İyonik Sıvılar

Düşük erime noktasına sahip ve %99,99 oranında iyon içeren tuzlar iyonik sıvı olarak adlandırılır. İyonik sıvı terimi günümüzde daha çok erime sıcaklığı 100 ^oC'nin altındaki tuzlar için bu terim kullanılmaktadır. İyonik sıvıların en önemli özeliği, hemen hemen hiç buhar basıncının olmaması, termal karalılığı, yanmazlığı, tekrar kullanabilirliği ve farklı maddeleri çözebilmeleridir (Wilkes, 2002).
İyonik sıvıların gelişimi 3 aşamada gruplandırılabilir;

1. İyonik sıvılar keşfedildiği ilk yıllarda fiziksel özelliklerinden yararlanılarak çözgen olarak kullanılmışlardır (1. Nesil iyonik sıvılar).

1. Nesil iyonik sıvılar geliştirilerek ileri materyaller olarak kullanılan seçimli fiziksel özelliklerinin yanında kimyasal özellikleri de bulunan iyonik sıvılar sentezlenmiştir (2. Nesil iyonik sıvılar).
2. Seçimli fiziksel ve kimyasal özellikleri ile birlikte biyolojik özellikleri bulunan iyonik sıvılar sentezlenmiştir (3. Nesil iyonik sıvılar)[Hough ve ark.2007].



Sekil l.11. İyonik sıvıların tarihi gelişimi.

1.3.1. İyonik Sıvıların Özelikleri

İyonik sıvıların çok belirgin olan özelikleri aşağıda sıralanmıştır.

1.3.1.1. Erime Noktası

İyonik sıvıların erime noktası diğer tuzlara göre daha düşüktür. Bunların anyon ve katyonlara bağlı alkil grupları da erime noktasını etkilemektedir ve bunun temel nedeni ise iyon çaplarının büyüdükçe erime noktalarının azalmasıdır.

1.3.1.2. Buhar Basıncı

İyonik sıvılar ihmal edilebilir buhar basıncına sahip olduğundan dolayı kaynama noktaları çok yüksektir. Ancak 200 °C sıcaklıkta ve çok düşük basınç altında, çok yavaş bir destilasyon hızıyla destillenebilir.

1.3.1.3. Termal Kararlılık

İyonik sıvılar 450 °C'ye kadar termal kararlılık gösterir. İyonik sıvıların bu kararlılıkları sahip oldukları heteroatom-karbon ve heteroatom H-bağlarının gücünden kaynaklanmaktadır. İyonik sıvıların çoğu yüksek sıcaklıkları kısa bir süre dayanabilmektedir fakat yüksek sıcaklıklara uzun süre maruz kaldıklarında bozunmaları kaçınılmazdır (Wasserscheid, 2002: Endros ve ark., 2006).

1.3.1.4. Çözünürlük

İyonik sıvılar hem hidrojen bağı alıcısı (anyon) hem de vericisi (katyon) olarak davranabildiklerinden dolayı hem elektron alıcı hem de elektron verici bölgeleri bulunan substratlarla etkileşime girebilirler (Dupont ve Suarez, 2006). İyonik svıların sudaki çözünürlüğü iyonik sıvının anyonuna, sıcaklığa, imidazolyum katyon üzerindeki alkil zincirin uzunluğuna bağlıdır (Liu ve ark.,2004).

1.3.1.5. Yoğunluk

İyonik sıvılar genellikle sudan daha yoğundurlar. Daha kısa alkil zincirli iyonik sıvılar daha uzun zincirlilerden yüksek yoğunluğa sahiptir.

1.3.1.6. Viskozite

İyonik sıvılar yüksek viskoziteye sahiptirler. İyonik sıvıların viskozitesi sudan daha büyük, yağlarınkine benzerdir. İyonik sıvıların viskozitesi H-bağı ve Van

der Waals kuvvetleri tarafından belirlenir. Katyonun alkil zinciri uzadıkça iyonik sıvıların viskoziteleri artar. Genellikle iyonik sıvılarda sıcaklık artıkça viskozite azalır.

1.3.2. İyonik Sıvıların Kullanıldığı Alanlar

Günümüzde iyonik sıvılar sensörlerde, yakıt hücrelerinde, pillerde, kapasitörlerde, termal sıvılarda, plastikleştiricilerde, yağlayıcılarda, kaplamalarda fonksiyonel katkı maddelerinde, iyonik jellerde, çözgen ve ekstrakte edici olarak analizlerde (Lee ve ark., 2004), kataliz işlemlerinde, sabit faz olarak gaz kromotografisinde, kütle spektroskopisinde (Armstrong ve ark., 2001), tıp alanında çeşitli çalışmalarda ve daha birçok uygulamada kullanılmaktadır (Plechkova ve ark., 2009, Kokorin 2011). Şekil 1.12'de iyonik sıvıların kullanım alanları şematize edilmiştir (Gençer, 2014).



Şekil 1.12. İyonik sıvıların kullanım alanları

İyonik sıvılar biyopolimerlerin(nişasta, selüloz, lignin) çözülmesinde son zamanlarda çok kullanılmaktadır. Biyopolimerleri çözmek için kullanılacak olan iyonik sıvıların aşağıdaki özeliklerini dikkate almak gerekir:

- Katyon çekirdeğin türü (imidazolyum, pirrolidinyum, alifatik, aromatik,)
- Alkil zincirin uzunluğu
- Alkil zincirin üzerindeki fonksiyonel gruplar
- Anyon çeşidi(asetat, bromid, klorid, dimetilfosfat, disiyaninid, formate, metilsülfat, tetraflorobromat, triflat)(Wilpiszewska ve Spychaj, 2011)

1.4. Glukoamilaz

Glukoamilaz (EC 3.2.1.3), amiloz, amilopektin ve glikojenin redükte olmayan zincir sonlarından ardışık bağ hidroliziyle β- D-glukoz salınmasını sağlayan bir ekzo enzimdir. Enzim α-1,4- bağları için çok yüksek katalizleme gücüne sahip olmasının yanı sıra aynı zamanda çok yavaş da olsa α-1,6- ve α-1,3- bağlarını da hidrolizleyecek afiniteye sahiptir. Amiloglukozidaz, 1,4-α-D-glukan glukohidrolaz, glukojenik enzim, nişasta glukojenaz, γ-amilaz, maltaz gibi isimlerle de adlandırılır. Glukoamilazlar mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkiler gibi kaynaklardan elde edilebilirler (Shenoy ve ark., 1985; Coutinho ve Reilly, 1997; Crabb ve Shetty, 1999; Reilly , 1999; Maheshwari ve ark., 2000; Pandey ve ark., 2000; Sauer ve ark., 2000; Norouzian ve ark., 2006).

1.4.1. Glukoamilazın Genel Özelikleri

Glukoamilazın katalitik merkezinde hidrolitik aktivitede etkin olan amino asitler olarak histidin, triptofan, tirozin ve glutamik asit bulunur. (Shenoy ve ark., 1985; Williamson ve ark., 1997; Reilly, 1999; Sauer ve ark., 2000; Juge ve ark., 2002; Sutthirak ve ark., 2005; Ševcík ve ark., 2006).

Yapılan kimyasal modifikasyon çalışmaları ile glukoamilaz enziminin katalitik aktivitesini göstermesindeki en önemli amino asitin Triptofan olduğu

belirlenmiştir (Rao ve ark. 1981). Trp120 substratın bağlanması ve katalitik aktivite için uygun geometrinin sağlanmasındaki en önemli kalıntı olduğu bilinmektedir (Clarke ve Svenson, 1984).

Glukoamilazlar çok çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilebilir olmasına rağmen çoğu glukoamilazlar mantarlarda görülmektedir. Özellikle ticari olarak *Aspergillus niger* veya *Rhizopus* türlerinden elde edilen enzimler kullanılmaktadır (Fogarty ve ark., 1983; Pandey, 1995).

Glukoamilazın optimum pH ve sıcaklık aralığı sırasıyla 4.5-5 ve 46-60 ^{o}C olarak bildirilmiştir. (Fogarty ve ark., 1983)

Sanayide kullanılan *Aspergillus Niger* Glukoamilaz altı formu izole edilmiştir (A-II~IV ve B-I~III)(Reischwitz ve ark,1995).

Çizelge 1.2. *A. Niger* tarafından üretilen GA enzimlerinin değişik substratlara ilgisi (Anonymous,1988).

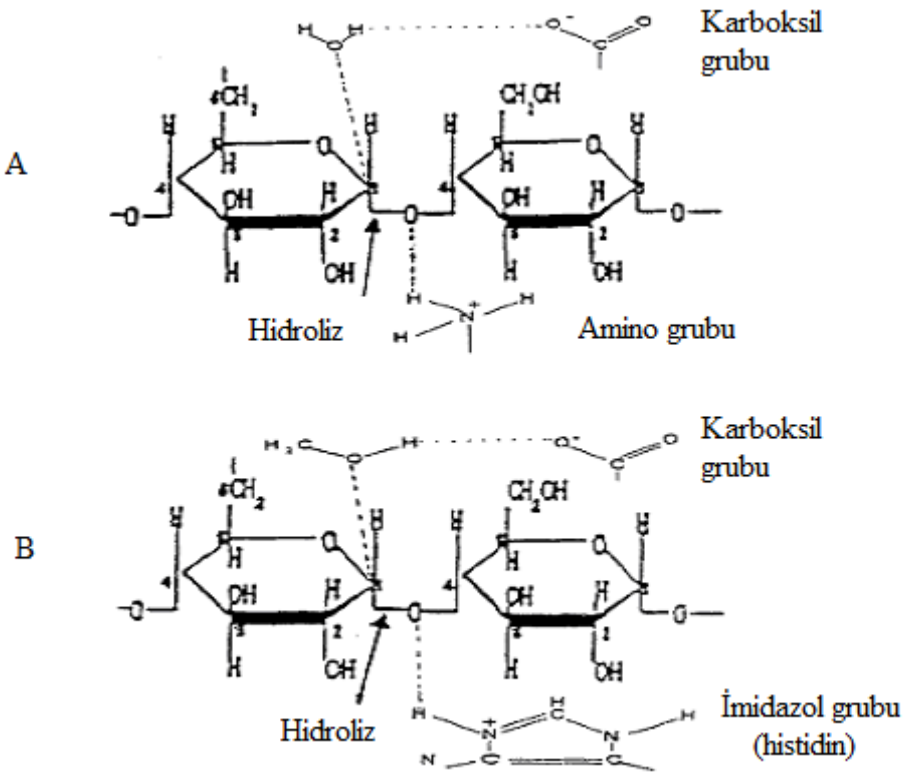
Substrat	**son kons. (%)**	**bağıl Aktivite (%)**				
		A-II	**A-III**	**B-I**	**B-II**	**B-III**
Çözünür Nişasta	0.5	100	100	100	100	100
K.Amylose	0.25	108	87	143	99	88
Glikojen	0.5	108	96	20	99	99
Pullulan	0.5	< 4	< 5	0	< 7	<6
Dextran 80	0.05	20	18	0	26	25
RCS*	0.5	9	16	< 3	16	48

*RCS, raw corn starch (işlenmemiş mısır nişastası)

1.4.2. Glukoamilazın Reaksiyon Mekanizması

D-glikozik bağ oksijeni, amino grubundaki bir hidrojen iyonu ile veya enzimin aktif bölgesinde yer alan imidazol grubu ile protonlanır. Bağın elektronca yoksun merkezi C-1, elektronları hidroksil grupları, su ve aktif bölgedeki serin

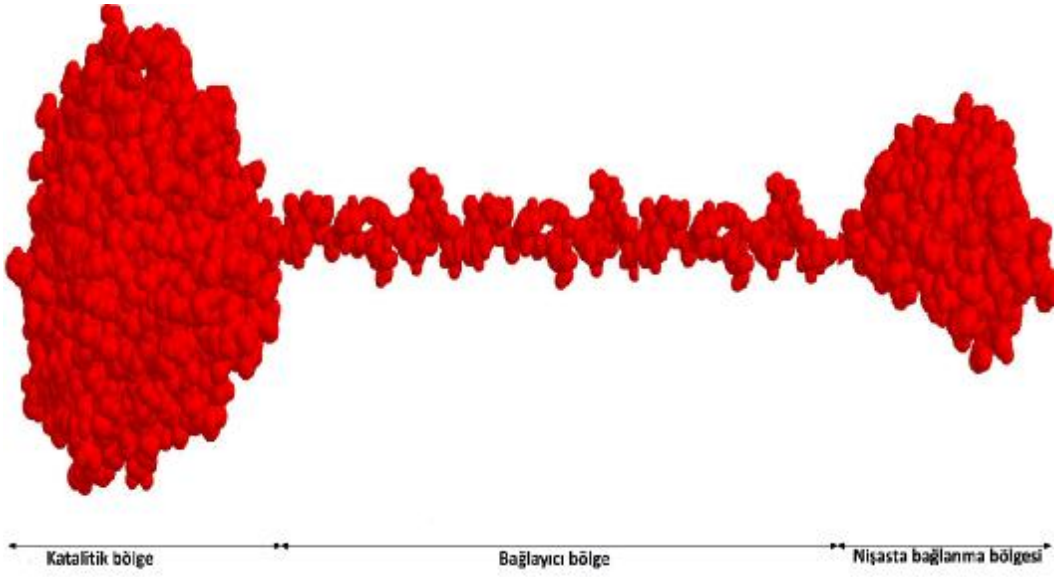
grupları gibi elektron verici gruplardan alır. Ortaya çıkan yapı bağın C-1 karbon kısmından ayrılır, karbonyum iyonu ara ürünü ve nötral D-glikozil fragmenti oluşturur. Son basamak karbonyum iyonu ara ürününe hidroksil iyonu (veya bir su molekülü) katılmasını içerir. OH grubu β-konfigürasyonunda yapıya katılır bu yüzden hidroliz ürününün adı β-D-glukozdur (Solomon ve Levin, 1974). Glikozik bağ kırılmasını gösteren reaksiyon mekanizma Şekil 1.13'te gösterilmektedir.



Şekil 1.13. Glukoamilaz enziminin muhtemel çalışma mekanizması

Glukoamilazlar katalitik bölgeye ek olarak nişasta bağlama bölgesi de içerir. Katalitik bölge ile nişasta bağlama bölgesi arasında yaklaşık 100 Å'luk bir bağlayıcı kısım vardır (şekil 1.14). Bu iki bölümü birbirine O-glikozit bağlarıyla çubuk şeklinde amino asitlerden oluşan bir bağlayıcıyla bağlanır. Nişasta bağlanma bölgesi çözünmez nişasta üzerine aktiviteden sorumludur. Proteazlar enzimin bu bölgesi üzerine etki ederek, çözünmez nişasta üzerine olan aktivitesinde azalmaya sebep olabilirler.

Glukoamilaz enzimleri değişik miktarlarda mannoz ve az miktarlarda da glikozamin içeren glikoproteinlerdir. Fungal glukoamilazların çoğu molekül ağılıklarının % 10-20'si oranında karbohidrat içermektedir ve bu karbohidrat içeriği enzimin üç boyutlu yapısını etkilememektedir. Karbohidrat içeriğinin uzaklaştırılması ile termal stabilizasyon ve enzim salınımının azaldığı bildirilmiştir (Coutinho ve Reilly, 1997; Jafari-Aghdam ve ark., 2005; Norouzian ve ark., 2006).



Şekil 1.14. Glukoamilaz enziminin bölümleri (Coutinho and Reilly, 1994).

1.4.3. Glukoamilazın Kullanım Alanları

Glukoamilazın en önemli kullanım alanı fruktoz surubu (HFCS-High Fructose Corn Syrup) ve glukoz surubu (HGS-High Glucose Syrup) üretimidir. Nişastanın fruktoza enzimatik dönüşümü, üç aşamalı bir işlemdir. İlk işlem olan sıvılaştırma basamağını, sakkarofikasyon basamağı(glukoza dönüştürme) ve en son olarak izomerizasyon basamağı izler (Van Der Maarel ve ark., 2002).

Glukoamilazlar proteazlardan sonra dünya çapında en çok satılan ikinci enzimdir. Glukoamilaz sanayide düşük kalorili bira, alkol, dekstroz üretimi, fırınlanmış ürünlerin eldesi, tahıl hidrolizi gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

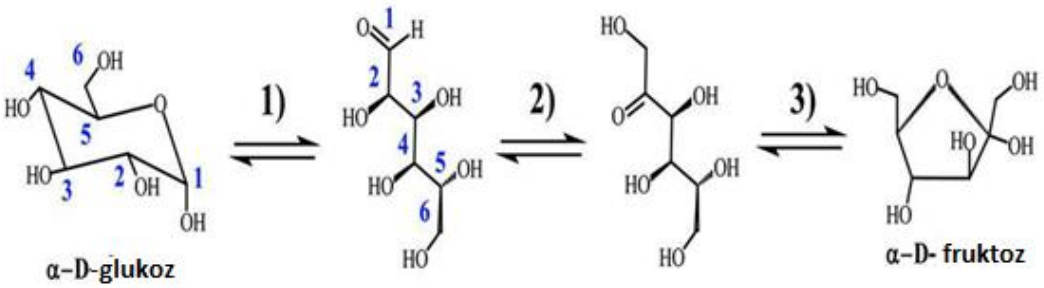
Glukoamilaz enzimi ekmeğin kabuk rengini arttırmak, hamurun bayatlamasını geciktirmek, fırınlanmış ürünlerin eldesinde unun kalitesini arttırmak,

ekmeğin işlene bilirliğini kolaylaştırmak gibi amaçlarla sıklıkla kullanılmaktadır (James ve Simpson, 1996).

Üretim fazlası nişasta içerikli ürünler ve düşük kaliteli tahıllar yakıt etanol, metan ve laktik asit gibi değerli kimyasalların üretiminde kullanılabilmektedir.(Lee, 1991; Linko ve Wu ,1993)

1.5. Glukoz İzomeraz

D-glukoz / ksiloz izomeraz (D-ksiloz ketol izomeraz; EC 5.3.1.5) birçok mikro organizma tarafından sentezlenen, izomeraz sınıfı, hücre içi bir (intraselülar) enzimdir ve hem D-ksilozun D-ksiluloza hem de D-glukozun D-fruktoza dönüşümlü izomerizasyonunu katalizler (Bhosale ve ark., 1996; Chen, 1980). Glukoz izomeraz, D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz ve D-allozun düşük izomerizasyon oranına sahip birer substratı oldukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Moses ve Cape, 1994; Pastinen ve ark., 1999; Sanchez ve Smiley, 1975; Yamanaka, 1968). Glukoz izomeraz reaksiyonu Şekilde gösterilmiştir (Kovalevsky ve ark., 2010).



Şekil 1.15. Glukoz izomerazın katalizleme reaksiyonu.

Glukoz izomeraz 1957 yılında Marshall ve Kooi tarafından *Pseudomonas hydrophila'dan* izole edildi ve glukozun izomerizasyonuna neden olduğunun keşfedildi. Bu keşiften sonra şeker kamışından tatlandırıcı üretimi yerine, HFCS üretimi için bu enzimden yararlanılmaya başlanılmıştır (Marshall ve Kooi, 1957). Enzimin ilgisinin ksiloza, glukozdan 160 kat daha fazla olmasına rağmen, sahip olduğu kapasite enzimin ticari olarak önemli olmasına yetmiştir. Enzim üretimi için

mikrobiyal büyüme ortamında ksiloza ihtiyaç duyulmuş ve arsenatın varlığı ise enzim üretimini arttırmıştır (Chaing ve ark., 1981).

1.5.1. Glukoz İzomerazın Genel Özelikleri

Glukoz izomerazın farklı mikroorganizmalardan elde edilmesine göre substrat spesifikliği değişiklik gösterir, ancak en yaygın substratları D-glukoz ve D-ksilozdur (Karaoğlu, 2010). Glukoz izomerazın maksimum izomerizasyon gerçekleştirdiği substratlar glukoz ve ksiloz gibi ekvatoral düzlemindeki 3. ve 4. karbonlarında hidroksil grubu taşıyan substratlardır (Karaoğlu, 2010). Glukoz izomerazların farklı mikroorganizmalardan çözünmüş veya immobilize formda bulunan D-glukozu D-fruktoza dönüştürme oranı %26-59 arasındadır. Enzimin K_m değeri D-glukoz için 0,086 ile 0,920 M arasında, D-ksiloz için 0,005 ile 0,093 M arasında dağılım gösterir (Chen, 1980).

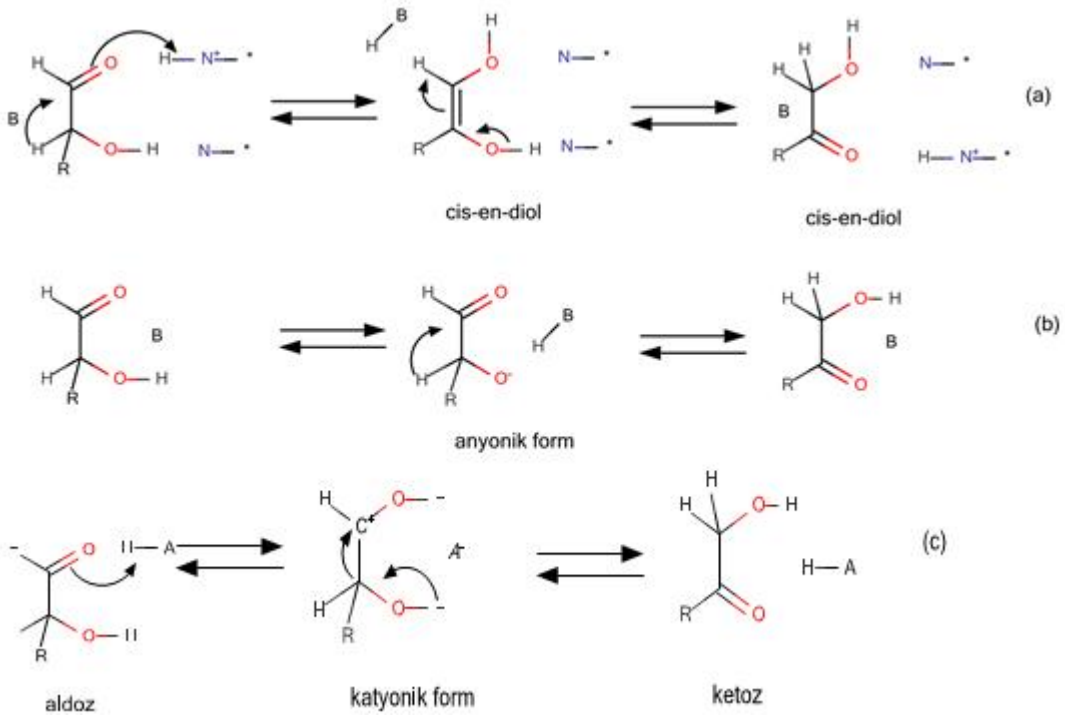
Glukoz izomerazın optimum pH değerleri genel olarak 7,0 ile 9,0 arasında değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte endüstriyel olarak arzu edilen düşük pH değerlerinde çalışabilen enzimler de bulunmaktadır. Örneğin *Lactobacillus brevis*'den elde edilen GI, pH 6 ile 7 arasında optimum aktivite göstermektedir. Optimum sıcaklıklar ise farklı organizmalarda 60 ˚C ile 80 ˚C arasındadır ve bu değerler Co^{+2} varlığı ile artış göstermektedir. Glukoz izomerazlar *Streptomyces spp. Bacillus spp., Actinoplanes missouriensis* ve *Thermus thermosulfurogenes'e* yüksek sıcaklıklarda kararlı enzimler oldukları halde *Lactobacillus* ve *Escherichia spp''*de yüksek sıcaklıklara az kararlıdırlar (Bhosale ve ark., 1996).

Glukoz izomeraz maksimum aktivite için Co^{+2}, Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi katyonlara ihtiyaç duymaktadır. Co^{+2} ve Mg^{+2} aktivite için gerekli olmasına rağmen, her ikisi de farklı bir görevde rol oynarlar. Mg^{+2}, $Co+^{2}$ ye nazaran daha etkin bir aktivatör iken, Co^{+2} istenilen konformasyonu sağlayarak enzimin kararlı hale gelmesinden sorumludur (Callens ve ark., 1986; Callens ve ark., 1988; Gaikwad ve ark., 1992; Karaoğlu, 2010). Glukoz izomerazlar katalitik aktivitesi; Ag^{+}, Hg^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Ni^{+2} ve belli bir oranda da Ca^{+2} ile inhibe olmaktadır ve diğer bazı inhibitörleri; sorbitol,

ksilitol, liksoz, arabitol, mannitol ve TRİS'tir (Bucke, 1983; Smith ve ark., 1991; Karaoğlu, 2010).

1.5.2. Glukoz İzomerazın Reaksiyon Mekanizması

Glukoz izomerazların reaksiyon mekanizmaları hakkında ilk bilgiler bu enzimin şeker fosfat izomerazlara benzer bir Şekilde endiol mekanizması ile işlev gördükleri ileri sürülmektedir (Rose ve ark., 1969). Bu iki enzimin de aynı tersiyer yapı motifine sahip olduğu ve aktif bölgede aynı reaksiyonları katalizlediği bilinmektedir (Sinnot, 1998: Karaoğlu, 2010).



Şekil 1.16. Gİ'nın endiol mekanizması. (a) cis-En-diol (b) proton transferi (c) Hidrojen kayması. Kutuların içerisindeki hidrojen atomları steriospesifik olarak transfer edilir (Rose ve ark, 1969).

Daha sonradan iki enziminde çok farklı olduğu belirlendi. Glukoz izomerazlar aktivitesi için iki metal kofaktör gereksinim duyarken fosfat izomerazları ise herhangi bir kofaktöre ihtiyaç olmadığını bulunmuştur ve katalitik bölgede endiol mekanizması için gerekli olan uygun bir baz içermemektedir (Collyer ve ark.,

1990). Sonradan yapılan çalışmalar, enzimin hidrür kayması mekanizması ile çalıştığını göstermektedir. Şekil 1.16'da glukoz izomerazın katalitik mekanizması gösterilmiştir (Karaoğlu, 2010).

1.5.3. Glukoz İzomerazın Kullanım Alanları

1958 yılındaki Küba devrimi sonrası meydana gelen sukroz yokluğu sebebiyle Glukoz izomerazın fruktoz şuruplarda kullanımı hız kazanmıştır (Bhosale ark., 1996). Fruktoz şurupları ozmotik basınçlarının yüksek olması (Hobbs, 1986.), nemi tutarak kurumayı önlemeleri (Pomeranz, 1985), gıdaların lezzetinin artırması (CRA., 1994) ve fermente edilebilir şekerler açısından zengin olması (Henry, 1976) gibi sebeplerden dolayı sıklıkla gazlı ve gazsız içecekler, fırın ürünleri, çeşitli hububat ürünleri, süt mamulleri ve işlenmiş gıdalarda kullanılabilmektedir (Wulff ve Helgeson, 1987). Fruktoz şurupları tatlı (Pomeranz, 1985), düşük viskozite ve daha az kristalleşme gibi özelliklerinden dolayı sanayiciye depolama ve taşıma işlemleri sırasında avantaj sağlar (Inglett, 1974.). Fruktoz şurubu mayonez ve salata sosları gibi ürünlerde emülsiyon stabilitesini artırmakta (Inglett, 1974) ve enerji değerini de düşürülebilmektedir (Reeder,1978). Fruktoz şurupları; ekmek, bisküvi, kek, kurabiye, tart dolguları ve jölelerde kullanılabilir (Pomeranz, 1985). Ekmekte kabuk rengine, lezzete katkıda bulunmakta ve raf ömrünü uzatmaktadır (Kulp ve ark., 1991). İndirgen şekerler içerisinde en iyi bisküvi rengi fruktoz şurupları ile elde edilmiştir (Manohar ve Rao, 1997). Keklerde sakkaroz yerine fruktoz şurupları kullanımı içerdiği yüksek indirgen şekerler sebebiyle tazelik süresini uzatmakta ve esmerleşmeyi arttırmaktadır (Johnson ve ark., 1989). Dondurma viskozitesini arttığını dondurmaya eriyebilirlik, dokuda pürüzsüzlük ve hacim kazandırmaktadır (Anon, 1979). Fruktoz şuruplarının su aktivitesini azaltıcı özelliğinden yararlanılmakta ve salamura ürünlerde kullanılabilmektedir (Hobbs,1986). Fruktoz şuruplarının domates sosları, çorba, sebze ve meyve gibi konserve ürünlerde de kullanımı alanı genişlemiştir (Nabors ve Gelardi, 1991; Hebeda, 1987; Anon, 1993). Fruktozun şurubunun dil üzerinde algılanma yoğunluğu sakkaroza göre çok daha yüksektir ve hissedilmesi kısa sürelidir. Bu sebepten dolayı fruktoz şurupları

gıdalarda karakteristik lezzet özelliklerinin algılanmasını zenginleştirmede etkilidir (Howling, 1992).

Bu tezin amacı;

Yapılan literatür taramalarında GA ve Gİ ile ilgili immobilizasyon çalışmalarına rastlanmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan destekler immobilize enzim preparatlarının maliyetini artıran önemli faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca bu çalışmalardaki immobilizasyon yöntemleri bazı özel ekipman ve/veya pahalı kimyasalların kullanımını zorunlu kılmaktadır. Bu nedenlerden dolayı bu çalışmada GA ve Gİ enzimlerinin kombi CLEA prepatlarının hazırlanması hedeflenmiştir. Bu iki enzimin birlikte kullanılmasıyla GA'nın nişastayı glukoza hidroliz etmesi Gİ'ın ise oluşan glukozu fruktoza dünüştürmesi amaçlanmakmıştır. Üç aşamada yapılan bu dönüşümün tek aşamada yapılmasını hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Roushdi ve ark. (1979), Yaptıkları çalışmada, fruktoz şurubu elde etmek için serbest glukoamilaz ve glukoz izomeraz enzimlerini kullanmışlardır. Fruktoz şurubunu üç aşamada elde etmişlerdir. Birinci aşamada asit kullanarak nişastayı çözünür hale getirmişlerdir. İkinci basamakta ise glukoamilaz kulanarak glukoz şurubu elde etmişlerdir ve son basamakta ise glukoz izomeraz kullanarak % 50 konsantrasyonlu glukozu maksimum düzeyde fruktoza dönüştürmüşlerdir. Glukoz – fruktoz tatlılık oranlarını hesaplamışlar ve %26'lık fruktoz şurubunun tatlılık oranının sükroz ile aynı olduğunu rapor etmişlerdir.

Margel ve Rembaum (1980), Glutaraldehitin pH 7-13.5 aralığında aldol kondenzasyonu ile molekül ağırlığı 12 den 20000 kadar olan suda çözünebilen ve çözünemeyen poliglutaraldehit (PGL) üretmişlerdir. Poliglutaraldehitin yapısını UV, IR spektrofotometre ve elektrokimyasal çalışmaları ile aydınlatmışlardır. Geniş pH aralığında hazırlanan PGL'in polimer yapısını benzer olduğunu ve temel farkın fonksiyonel grupların konsantrasyonundaki değişikliklerden kaynaklandığını rapor etmişlerdir. PGL içindeki primer hidroksil ve karboksil gruplarını cannizzaro reaksiyonu ile kanıtlamışlardır. Elektrokimyasal çalışmalarla konjuge aldehit gruplarının varlığını spektrofotometrik olarak doğrulamışlardır.

Katwa ve Rao (1983), Glukoamilaz, *α*-amilaz ve glukoz izomeraz enzimleri ayrı ayrı ve birlikte CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose- 6MB'ı kullanarak kovalent olarak immobilize etmişlerdir. *α*- amilaz, GA, Gİ, (GA+Gİ) ve (*α*-amilaz+GA+Gİ) için optimum pH'ları sırasıyla 6.4, 4.8, 8, 6.4 ve 6.0 olarak rapor etmişlerdir. *α*-amilaz, GA, Gİ, (GA+Gİ) ve (*α*-amilaz+GA+Gİ)'nin optimum sıcaklıkları ise sırasıyla 60, 50, 60, 70 ve 60 ˚C olarak bildirmişlerdir. İmmobilize enzimleri aynı reaktörde % 5 nişasta subsratı ile 6 saat inkübe etmişler ve reaktördeki fruktoz konsatrasyonunu %40 olarak belirlemişlerdir.

Schafhauser ve Storey (1992), Glukoamilaz, pullulunaz ve glukoz izomeraz enzimlerini tavuk kemikleri küreciklerine (BIOBONETM) ko-immobilizasyon etmişlerdir. İmmobilize enzimin aktivitesinin serbest enzime göre 4.6 kat azaldığın rapor etmişlerdir. Reaksiyon pH'sının fruktoz üretimi üzerinde çok etkili olduğunu

bildirmişlerdir. İmmobilize enzimin optimum koşullarında (pH 6.5 ve sıcaklık 55 ˚C) % 20 fruktoz elde edildiğini rapor edilmiştir.

Converti ve Del Borghi (1997), Ticari glukoz izomeraz kullanarak glukozun fruktoza izomerizasyonunu termodinamik niceliklerinin etkisini bach yöntemi ile test etmişlerdir. Gİ'ın kinetik parametrelerini heasaplamak için Briggs-Haldene mekanizmasından yararlanmışlardır. İmmobilize enzim için hesaplanan değerleri daha önce kaydedilmiş serbest enzim değerleriyle karşılaştırmışlar. 70 ^{o}C'nin üstünde daha yüksek denge sabiti ve hem standart entalpide hem de reaksiyonun entropisinde artış olduğunu rapor etmişlerdir. Briggs-Haldane modeli ile farklı sıcaklıklarda entalpi ve entropi değişimleri hesaplanmışlar. İmmobilize enzimin aktivasyon entalpisinin serbest enziminkinden %24 daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Arıca ve ark. (1998), Glukoamilaz enzimini 50-100 µm ve 100-200 µm çapındaki iki farklı pHEMA/EGDMA mikro küreciklere kovalent olarak immobile etmişlerdir. Küçük küreciklerle yapılan immobilizasyonun aktivitesini büyük küreciklere göre yaklaşık olarak 2 katı daha fazla bulmuşlardır. Küçük küreciklere tutunan enzim miktarı 0.64 mg/g destek ve büyük küreciklere ise tutunan enzim 0.40 mg/ g destek olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize enzimin K_m değeri yaklaşık beş kat artığını rapor etmişlerdir. İmmobilize enzimin aktivitesi oldukça kararlı olduğunu ve 120 saat sonra aktivitesinin sadece % 9 kaybetmiş olduğunu bildirmişlerdir.

Ge ve ark. (1999), Glukoz izomerazı yalnız başına immobilize ettikten sonra glukoamilaz ve glukoz izomerazı trimetilamin polisitren boncukları kullanarak adsorplama yöntemi ile beraber immobilize etmişlerdir. İmmobilize glukoz izomerazın pH eğri aralığı genişlemiş ve pH 6,2'de maksimum aktivitesinin %75'ni koruduğunu gözlemlemişlerdir. İki enzim beraber immobilize edildiği zaman, nişastadan ve deksrinden fruktoz elde etme yeteneğinin pH 6'da olduğunu rapor etmişlerdir. Bu pH'daki ko-immobilizasyon sistemindeki toplam fruktoz miktarının, serbest enzime göre yaklaşık iki kat olduğunu bulmuşlardır.

Uludağ (2000), *Aspergillus niger'*den izole ettiği glukoamilaz enzimini adsorplama yöntemi ile immobilize etmiştir. Glukoamilaz önce jelatinleştirilmiş mısır nişastası üzerine adsorplanmıştır. Daha sonra gliserol içerisinde çözülmüş

sodyum alginat ilave edip karıştırmıştır. Bir enjektör yardımı ile %1 glutaraldehit içeren %1'lik $CaCl_2$ çözeltisine ilave edilerek fiberler elde etmiştir. İmmobilizasyon verimini %22 olduğunu bildirmişlerdir. 20 defa kullanımda sonra ve 21 gün boyunca immobilize glukoamilaz'ın aktivitesinde azalma olmadığını rapor etmişlerdir.

Tanrıseven ve ark. (2002), *Aspergillus niger*'den izole edilen glukoamilaz enzimini alginat lifleri kullanarak tutuklama yöntemi ile immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin 22 gün kullanımdan sonra herhangi bir aktivite kaybı olmadığını rapor etmişlerdir. İmmobilizasyon işleminde optimum şartlarda herhangi bir değişim olmadığını bildirmişlerdir.

Bryjak (2003), α-amilaz, β-amilaz ve glukoamilaz enzimlerinin bütil akrilatın kopolimerleri, pentaeritrit triakrilat ve etilen glikol dimetakrilat üzerine immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. Özellikle –OH, -COOH ve $–NH_2$ fonksiyonel gruplarını içeren kopolimerler üzerinde odaklanmıştır. Fonksiyonel grupları etilendiaminle aminoliz polimer matrisler üzerinde oluşturulmuştur. Aynı yapıya sahip destekler, glutaraldehit, divinil sülfon ve karbodiimit ile aktive etmiştir. Bu materyallerin içinde bütil akrilat ve etilen glikol dimetakrilatın kopolimerinin üç amilolitik enzimin immobilizasyonu için en uygun olduğu bulunmuştur. Seçilen immobilize enzim uygulamalarının aktiviteleri ile pH ve termal kararlılıkları belirlenmiştir. Bu çalışmalar çift enzim sisteminin (*a*-amilaz+*b*-amilaz ve *a*-amilaz+glukoamilaz) polimer matriks ile immobilize olabileceğini göstermiştir.

Abraham ve ark. (2004), Glukoamilaz enzimini çapraz bağlı enzim kristali (CLEC) yöntemi ile immobilize etmişlerdir. CLEC glukoamilazın spesifik aktivitesi 0.0687 IU/mg ve optimum şartlarda, nişasta subsratı ile muamele edildiğinde aktivesinin % 57 koruduğunu belirlemişlerdir. Paralelkenar şeklinde 10-100 µm boyutunda yoğunluğu 1.8926 g/cm^3 ve yüzey alanı 0.7867m^2/g olan bir kristal elde etmişlerdir. Kristalizasyon ve çapraz bağlanma sonucunda K_m ve V_{mak} sabitlerinin 10 kat artığını rapor etmişlerdir. Glukoz üretimi, 60 ˚C de paket yatak reaktöründe %10 nişastada 7, 6 dakikada 110.58 g/L/h ve %10 maltodekstrin (12.5 DE) 3.4 dakikada 714.1 g/L/h üretildiğini hesaplamışlardir. CLEC glukoamilazın yarılama ömrü 10 saat olduğunu bildirmişlerdir.

Park ve ark. (2005), Yüzeyi modifiye edilmiş taşıyıcılar kullanarak nişasta dönüştürücü enzimler (*a*-amilaz ve glukoamilaz) ile ko-immobilizasyon gerçekleştirmişlerdir. Ko-immobilizasyon için alginat buncukları içinde tutturulmuş olan hidrofil silika jel ile DEAE-selülozın en etkili taşıyıcılar olarak seçmişlerdir. Hidrofilik taşıyıcı olarak polyethylimine-kaplama, hidrofobik taşıyıcı ise silanizasyon yapılarak immobilizasyon işlemini yapmışlardır. Hidrofolik taşıyıcı ile yapılan tüm ko-immobilizasyonlarda maksimum aktivite sergilendiğini gözlemlenmişlerdir. İmmobilizasyondan sonra optimum sıcaklık 50 ˚C den 60 ˚C ye optimum pH ise 5 ten 5,5'e değiştiğini rapor etmişlerdir. Alginat boncukları içinde tutturulmuş olan Hidrofil silika jel ve DEAE-selüloz ile yapılan ko-mmobilzasyonda, 10 defa kullanımda sonra hidrofil silika jel ile yapılan aktivitenin %92,3 ve DEAE-selüloz yapılan immobilizasyonda ise aktivitenin % 88,9 korunduğunu rapor etmişlerdir.

Bai ve ark. (2006), Epoksi grup içeren makro gözenekli, hidrofilik ve reaktif taşıyıcılar, çapraz bağlayıcı olarak divinil benzen (DVB) kullanarak glisidil metakrilat (GMA) ve metakrilik asit (MAA) polimerizasyonu ile elde etmişler ve gözenek oluşturucu olarak lineer poli (vinil asetat) (PVAc) ve toluen karışımı kullanarak glukoamilazı immobilize etmişlerdir. Taşıyıcılar içindeki epoksi grup mükemmel reaktif olduğu için glukoamilazı kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Glukoamilaz enziminin immobilizasyon işleminden sonra başlangıç aktivitesinin %78'ini koruduğunu rapor edilmiştir. İmmobilize glukoamilazın K_m değeri yaklaşık olarak serbest enzime göre üç kat daha fazla olduğu ve V_{mak} değerinin serbest enzime göre biraz daha büyük olduğunu bildirmişlerdır. İmmobilize glukoamilazın optimum pH ve sıcaklıkları sırasıyla 5.0 ve 55 ˚C olduğunu bildirmişlerdir.

Şahin (2007), Glukoz izomeraz(Gİ) ,siyanürik klorür (CC) ve epiklorhidrin (ECH) ile aktifleştirilmiş poli(metil metakrilat-2-hidroksietil metakrilat), P(MMA-HEMA), mikroboncuklarına kovalent olarak immobilize edilmiştir. Serbest Gİ, CC-İGİ ve ECH-İGİ için K_m değerleri sırasıyla $6{,}50x10^{-5}$ mol/L, $1{,}26x10^{-4}$ mol/L, $2{,}55x10^{-4}$ mol/L, V_{mak} değerleri ise sırasıyla $2{,}42x10^{-5}$ mol/L.dak., $4{,}18x10^{-5}$ mol/L.dak., $3{,}46x10^{-5}$ mol/L.dak., olarak rapor etmiştir. Kolonda 110 dak sürekli kullanımda, CC-İGİ ve ECH-İGİ başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %73,6 sını ve

%78,8 ini korunduğunu gözlemlenmiştir. 4 ^{o}C de 56 gün sonunda, serbest Gİ, CC-İGİ ve ECH-İGİ başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %48,3 ünü, %57,1 ini ve %59,4 ünü koruduğu bildirmiştir.

Tanrıseven ve Ölçer (2008), *Aspergillus niger*'den izole edilen glukoamilaz, poligluteraldehit ile aktive edilmiş jelatine immobilize etmişler ve %85 tutunma olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize enzim 30 gün boyunca aktivitesinin hiç kaybetmemiş ve 60 ve 90 gün sonra ise sirasıyle aktivitelerinin % 90 ve %75'ini korunduğunu bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin değişmediğini ve sırasıyla 4 ve 65 ˚C olduğu bildirmişlerdir. Maltodeksrin için serbest ve immobilize enzim K_m değerleri sırasıyla 7,5 ve 10,1g maltodektrin/L, V_{mak} değerlerinin ise sırasıyla 20 ve 16 µmol glucose/(dak µl enzyme) olarak bildirmişlerdir.

Kök (2009), Glukoamilaz enzimini metal-şelat yöntemini kullanarak immobilize etmiştir. İmmobilize glukoamilazın maksimum adsorbsiyon kapasitesi pH 6,5'te 104 mg/g olarak belirlenmiştir. Serbest glukoamilaz 20 gün içerisinde aktivitesinin tamamını kaybederken immobilize glukoamilaz aynı süre içerisinde aktivitesinin sadece % 5'ini kaybettiğini rapor etmişlerdir. Glukoamilaz enziminin Michaelis sabiti, K_m adsorbsiyona bağlı olarak artarken V_{mak} değeri azaldığını bunun sebebi enzimin substratına karşı olan afinitesinin azaldığının bir göstergesi olduğunu bildirmiştir. İmmobilize glukoamilaz 10 kez tekrar kullanım sonucunda enziminin aktivitesinin %76 'sını koruduğunu belirlemiştir ki, bu da biyokatalitik uygulamalarda enzim bağlanmış mikrokürelerin ne kadar kullanışlı olduğunu rapor etmişler.

Ning ve ark.(2009), Nişastayı çözmek için 1-alil-3-metilimidazolyum klorür kullanmışlardır. Farklı oranlarda [amim][CI]/gliserol kullanarak mısır nişastasını akışkan hale getirilmişlerdir. Atomik güç mikroskobu(AFM) kullanarak [amim][CI]/gliserol içindeki nişasta granüllerinin çapını 10 nm olarak bulmuşlardır. Bununla birlikte gliserolun nişasta ile oluşan hidrojen bağları [amim][CI]'a göre daha yoğun formda oluştuğunu FT-IR ile belirlenmişlerdir. Bundan dolayı nişastayı akışkan hale getirmek için bazı iyonik sıvılar ile beraber yüksek konsantrasyon ve hidrojen bağ alıcılarının da gerekliliğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda yüksek

içerikli [amim][CI] çözeltisinin eş zamanlı olarak nişastanın suyu adsorplamasını ve iletkenliğini artırabileceğini bildirmişlerdir. %30 amim][CI] ile termosplastik nişasta fılmin iletkenliği %14,5 suda ise $10^{-1,6}$ S cm^{-1} olarak bulmuşlardır.

Ashly ve Mohanan (2010), ***Rhizopus'***tan saflaştırılan glukoamilaz, protonlanmış tuz (TS) ile kimyasal olarak sentezlenen poli(o-toludin) (POT) kullanarak hem adsorpsiyon hemde kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Polimerleri glutaraldehit ile aktive edilmiştir. İmmobilize verimi ortamın pH'sı, inkübasyon süresi ve enzim miktarından etkilendiğini rapor edilmişlerdir. İmmobilize edilen enzimin pH ve sıcaklığının serbest enzime göre artığını bildirmişlerdir. İmmobilize glukoamilazın 8 defa kullanımdan sonra aktivitesinin %85'ini koruduğunu ve 90 gün depolamadan sonra ise aktivitesinin %52'sini koruduğunu rapor edilmiştir.

Tardioli ve ark. (2011), Glukoamilazı yüksek aktiviteli glioksil- agaroz desteklerle immobilize etmişlerdir. Enzim üzerindeki lizin sayısının az olmasından dolayı, enzim desteğe yüksek verimde immobilize edilmemiştir. Bu yüzden etilendiamin ile karboksil grupları (karbodiimid ile aktive edilmiş) kullanarak enzimin yüzeyini kimyasal modifikasyonla zenginleştirilmişlerdir. Aminolanmış enzim aktivitesinin %80'ni korumuş ve çok hızlı bir Şekilde immobilize edilmiştir. Yapılan bu araştırmada immobilize edilen enzimin, ısı ile aktivite kaybının serbest enzime göre 500 kat daha kararlı olduğunu rapor edilmiştir.

Zhao ve ark. (2012), İşlevleştirilmiş metal –ligand Manyetik FeSBA-15 kullanarak glukoamilazı geridönüşümlü olarak immobilize etmişlerdir. Yenilenmiş destek üzerindeki glukoamilazın aktivitesi, tekrar kullanımı ve termal kararlılığı belirlenmişledir. Sonuç olarak metal-iyon afinite etkileşimi enzim immobilizasyonunda etkili bir yöntem olduğu bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki rejenere edilmiş desteğin yeniden kullanabilirliği glukoamilaz dışındaki enzimler için de uygun olduğunu rapor etmişlerdir.

Güleşci (2013), Üreaz enzimini glutaraldehit (GLU) ve epiklorohidrin (ECH) ara kolları üzerinde manyetik nanopartiküller immobilize etmiştir. Glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize edilen üreazın kcat/Km (2,746 $dk^{-1}M^{-1}$) ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden immobilize üreazın kcat/Km (2,761 $dk^{-1}M^{-1}$) oranları serbest

üreazın kcat/Km (4,139 $dk^{-1}M^{-1}$) oranına göre yaklaşık 1,5 kat azaldığını gözlemlenmiştir. Farklı sıcaklıklardaki immobilize enzim termal kararlılığı serbest enzime göre aktivitesinin daha fazla koruduğunu rapor etmiştir. İmmobilize enzimin 20 kullanım sonrasındaki kalan aktivitesi sırasıyla %57 (GLU) ve %61 (ECH)'ini koruduğu belirlenmiştir. Serbest üreazın 5 ˚C'de ve 25 ˚C'de 1 ay depolanma süresi sonunda kalan aktivitesi sırasıyla başlangıç aktivitesinin %30 ve %23'ü koruduğunu ve immobilize enzimler için ise sırasıyla başlangıç aktivitesini %72, %71'ini (GLU) ve %60, %57'sini (ECH) koruduğu tespit etmiştir.

Talekar ve ark. (2013), Alfa amilaz, glukoamilaz ve pullulunazı çapraz bağlı enzim agregatları yöntemi ile immobilize etmişler ve bu immobilize enzimlerle tek basamakta glukoz şurubu elde etmişlerdir. SEM cihazıyla immobilize enzimlerinin küresel yapılarını göstermişlerdir. Nişastanın hidrolitik aktivitesi ko-immobilizasyondan sonra optimum pH 6 dan 7 'ye ve sıcaklık ise 65 ˚C den 75 ˚C'ye değiştiğini gözlemlenmişlerdir. Tek adımlık nişasta hidrolitik reaksiyonu kombi CLEA, ayrı kombi-CLEA ve serbest enzim karışımı sırasıyla %100, %60 ve % 40'lik dönüşüm elde etmişlerdir. Böylelikle ko-immobilizasyonla enzimlerin termal kararlılığı artırılmıştır. Çalışmalarının sonunda kombi CLEA'daki katalitik enzim aktivitesi beş kullanımdan sonra performans değişiminin olmadığını gözlemlenmişlerdir

Kodou ve ark. (2014), ***Thermotoga maritima*** üretilmiş *β*-glukosidazın farklı iyonik sıvılardaki aktivite geliştirmesi üzerine araştırma yapmışlardır. Bu çalışma için [Emim][Cl], [Emim][OAc], [Bmim][Cl] ve [Bmim][OAc] iyonik sıvıları kullanmışlar ve maksimum aktivite [Bmim][OAc] iyonik sıvısı içinde olduğunu bulmuşlardır. 0, 200 ve 500 mM [Bmim][OAc] içindeki β-glukosidazın Km değerleri sırasıyla 59.6, 22.0 , 24.4 mM, k_{kat} değerleri 1.88×105, 2.90×105, 3.02 ×105 s^{-1}, k_{cat}/k_m değerleri ise 3.15 ×103, 1.32×104 ve 1.24×104 s^{-1} mM^{-1}olduğunu hesaplamışlardır. [Bmim][OAc] içindeki β-glukosidazın maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 80 ˚C olduğunu bulmuşlardır.

Lang ve ark. (2014), Glukoamilaz(GA) ve glukoz oksidazı(GOD) multi duvarlı nanotup(MWNTs) ve modifiye cam carbon elekrotu (GCE) kullanılarak kimyasal çapraz bağlı yöntem ile yeni bir sıralı elekrokimyasal biosensör

geliştirmişlerdir. Bu yöntemde gluteraldehit çapraz bağlıyıcı, serum albümin ise bloke edici madde olarak kullanılmışlardır. Önerilen biyosensör (GA / GOD / MWNTs / GCE) Clark-tipi oksijen sensörü veya H_2O_2 sensörü gibi ekstra algılayıcı kullanmadan nişasta belirleme yeteneğine sahiptir. Nişastanın algılama sınırı %0,003 ve doğrusal artma ile azalması % 0,005 ten % 0,7 aralığı arasında olduğunu bulmuşlardır. Bu biyosensör geleneksel fehling titrasyonu ile örneklerdeki nişasta tespit için uygun olduğunu bildirmişler. Bu biyosensörde zayıf tampon içinde ve geniş liner aralıklarda istikrarlı çalıştığını bildirmişlerdir.

Bilgin ve ark. (2015) *Trichoderma reesei* sellülozu modifiye ReliZyme HA403 ve sepabeads EC-EP üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Selülozun hidrolizini iyonik sıvı içerisinde serbest ve immobilize selülaz kullanarak araştırmışlardır. İyonik sıvı olarak - bütil-3-metilimidazolyum heksaflorofosfat ([Bmim][PF_6]), 1- bütil-3-metilimidazolyum asetat ([Bmim][AOc]), 1- bütil-3-metilimidazolyum triflorumetanosülfonat(([Bmim][TfO]), 1-bütil-3-metilimidazolyum tetrafloroborat ([Bmim][BF_4]) kullanmışlardır. %25(v/v) iyonik sıvı içindeki selüloz hidrolizinde maksimum aktivite ([Bmim][PF_6])'de oluştuğunu gözlemlemişler. İyonik sıvı içerisindeki ölçülen aktivite tampona göre yaklaşık olarak 5,5 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu tez için kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma, Fluka ve Merck firmalarından sağlanmıştır.

Kimyasallar: *Aspergillüs niger* kaynaklı glukoamilaz (300 U/ml), glukoz İzomeraz, sodyum hidroksit, bakır (II) sülfat, folin-ciocalteu çözeltisi, sodyum klorür, sodyum sitrat, sitrik asit, potasyum hidroksit, magnezyum klorür, etanol, fosforik asit, magnezyum sülfat, kobalt klorür, rezorsinol, hidroklorik asit, sodyumkarbonat,1-bütil-3metilimidazolyum heksafluorofosfat (Bmim] [PF_6]), 1- bütil-3-metilimidazolyum asetat ([Bmim] [AOc]), 1- bütil-3-metilimidazolyum klorür ([Bmim] [CI]), 1-alil-3-etilimidazolyum klorür ([Amim] [CI]), 1-desil-3-metilimidazolyum klorür ([Dmim] [CI]) ve 1-etil-3-metilimidazolyum klorür ([Emim] [CI]).

Araç ve Gereçler: UV-Vis spektrofotometre (ATI UNICAM), manyetik karıştırıcı, inkübatör (ES 500), santrifüj, analitik terazi, otomatik pipet, termostatlı çalkalayıcılı su banyosu

3.2. Metot

3.2.1. Protein Tayini

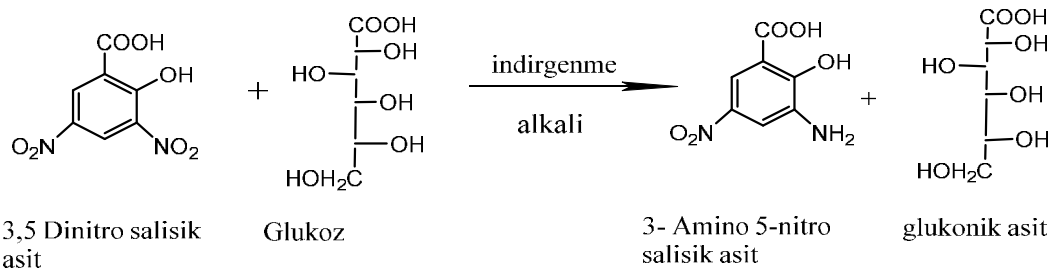
Protein tayini için Lowry ve ark. (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılacaktır. Bunun için A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1. Çözelti A: Bu çözelti 20 g Na_2CO_3, 4 g NaOH saf suda birlikte çözülerek son hacim1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
2. Çözelti B: 0,5 g $CuSO_4.5H_2O$, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözeltiyle 100 mL'ye tamalanarak hazırlanmıştır.

3. Çözelti C: 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.
4. Folin-Ciocalteau çözeltisi saf su ile 1/2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
5. Standart protein çözeltisi:100 mL'de 3,95 mg sığır albümini olacak şekilde % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile hazırlanmıştır
6. Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0, 50, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 µL olacak Şekilde standart protein çözeltisinden ilave edilmiştir. Her tüp içeriğinin hacmi serum fizyolojik ile 1 mL'yetamamlanmış sonrasında her tüpe 5 mL C çözeltisinden ilave edilmiştir. Örnekler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1/2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuştur, bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standartprotein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. Serbest Glukoamilazın Aktivitesinin Belirlenmesi

Glukoamilazın aktivitesi dinitrosalisilik asit (DNSA) metotu (Miller, 1959) kullanarak tayin edilmiştir. Bu yöntemin esası indirgen şekerlerdeki serbest karbonil gruplarının (C=O) varlığını tespit etmektir. Bununla birlikte glukozdaki fonksiyonel aldehit gruplarının oksidasyonunu ve ayni anda alkali koşullar altında 3,5-dinitrosalisilik asitin, 3-amino, 5-nitrosalisilik asite indirgenmesini içermektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Glukozun DNSA ile verdiği reaksiyonun gösterimi.

DNSA reaktifinin bileşeni (w/v) : %1 DNSA, %0,2 fenol, %0,05 sodyum sülfit, %1 sodyum hidroksit, %30 sodyum potasyum tartarat

Serbest glukoamilaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi, 0,5 mL seyreltilmiş serbest enzim içeren 0,5 mL sitrat tamponu (0.05 M, pH 4,5) kullanılarak belirlenmiştir. 15% (w/v) çözünebilir nişasta suda jelatinize edilerek (20 dk, 100 ^{o}C, sürekli karıştırma) hazırlandı ve bu çözeltiden 0,5 mL alınarak başlangıçta hazırlanmış olan enzim çözeltisi üzerine ilave edilmiştir. Reaksiyon 60 ^{o}C'de 15 dakikalık inkübe edilmiştir. Bu yöntemde glukoz tayini yapmak için 0,5 ml glukoz çözeltisi ile 0,5 ml DNSA reaktifi bir tüpte karıştırıp kaynar su banyusunda 10 dakika bekletilmiş ve daha sonra buz banyosunda soğutumuştur. Çözelti 1:1 oranında seyreltildikten sonra spektrofotometrede 575 nm absorbansı ölçülmüştür.

3.2.3. Serbest Glukoz İzomerazının Aktivitesinin Belirlenmesi

Glukoz izomerazın aktivite tayini Tolsma (2002) tarafından kullanılan rezorsinol-HCI metotuna göre belirlenmiştir. Yöntemde uygun pH ve derişimdeki tampon içinde 2,6 M glukoz olacak şekilde substrat çözeltisi hazırlanmıştır ve enzimin aktivatörü olarak kullanılan $MgSO_4.7H_2O$ ve $CoCl_2.6H_2O$'nun çözelti içerisindeki son derişimleri sırasıyla 20 mM ve 1 mM'dır. 1 mL substrat çözeltisi üzerine 250 μL enzim çözeltisi eklenmiş ve 60 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için ortama 250 μL % 20'lik HCI (v/v) çözeltisi eklenmiştir. Fruktoz miktarını belirlemek için fruktoz içeren örnekler 500 kat seyreltildikten sonra gerekli reaktifler eklenmiş ve absorbansları 540 nm'de okunmuştur. Standart fruktoz grafiğinden yararlanılarak enzim aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.4. Kombi CLEA (GA+Gİ) Hazırlanması

16 mg/mL GA ve 64 mg/ml Gİ enzimleri 4 ml (100 mM, pH 7,0) fosfat tamponunda çözüldükten sonra derişimi % 60 (w/v) olacak Şekilde amonyum sülfat eklenerek çöktürülmüştür. Daha sonra enzimlerin tamamının çökmesi için 4 ˚C'de 45 dakika bekletilmiş ve çöktürme sağlandıktan sonra üzerine %25'lik 1,5 ml

glutaraldehit eklenerek sürekli karıştırılmıştır. Karışım, 5 ˚C'de çalkalayıcılı su banyosunda 5 saat bekletildikten sonra saf su ile süzüntüde glutaraldehit kalmayıncaya kadar yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra çökeltinin kurumasını hızlandırmak amacıyla, 2 ml aseton eklenmiştir. Süzüntüde glutaraldehit ve protein olup olmadığını kontrol etmek için 280 nm'de süzüntüde absorbans görülmeyinceye kadar yıkama işlemi yapılmıştır. Oluşan kombi CLEA (GA+Gİ) çökeltisi soğutmalı inkübatörde kurutulduktan sonra 4 ˚C'de kullanılıncaya kadar bekletilmiştir.

3.2.5. Kombi CLEA(GA+Gİ)'nın Aktivite Tayini

Kombi CLEA(GA+Gİ)'nın aktivitesi Tolsma (2002) tarafından kullanılan Rezorsinol-HCI metoduna göre reaksiyonda oluşan fruktoz miktarlarının ölçülerek tayin edilmiştir.

Bir unite, 1 dakikada 1mikromol glukozu fruktoza dönüştüren enzim miktarı olarak hesaplanmıştır.

10 mg kombi CLEA alınarak üzerine uygun derişim ve pH'daki tampon içerisinde hazırlanmış %1,5 nişasta (20 dakika,100˚C), 1 mM $CoCI_2.6H_2O$ ve 20 mM $MgSO_4.7H_2O$ içeren substrat çözeltisinden 1 mL eklenmiş ve 1 saat sonunda kombi CLEA (GA+Gİ) reaksiyon ortamından uzaklaştırılıp Tolsma (2002)'ya göre gerekli reaktifler eklenerek absorbanslar 540 nm okunmuştur. Standart fruktoz grafiğinden yararlanılarak kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.6. Fruktoz Tayini

Standart fruktoz eğrisinin çizimi: 6 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 ve 0,1 mg/mL olacak Şekilde 1 mL fruktoz çözeltisi ve kör için ise 1 mL saf su konulmuştur. Her bir tüpe 1000 mL %95'lik (v/v) etanol içerisinde 1 g rezorsinol olacak şekilde hazırlanmış alkolik rezorsinol çözeltisinden 1'er mL ve %32'lik (w/v) HCI çözeltisinden 3'er mL eklendikten sonra 80 ˚C'de 40 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 5 dakika buz içerisinde bekletilen tüplerin absorbansları köre karşı 540 nm'de okunmuş ve bu değerler derişime karşı grafiğe

geçirilmiştir. Örneklerin fruktoz içerikleri aynı yöntemle standart fruktoz grafiği kullanılarak değerlendirilmiştir (Tolsma 2002).

3.2.7. Kombi CLEA (GA+Gİ) Örneklerinin Hazırlanmasında İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Optimum amonyum sülfat derişiminin belirlenmesi amacıyla çöktürücü olarak kullanılan amonyum sülfatın son derişimi % 20, 30, 40, 50, 60, 70 (w/v) olacak şekilde immobilizasyon yapılmıştır. En yüksek kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitesinin elde edildiği amonyum sülfat derişimi belirlenmiştir.

Optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi amacıyla immobilizasyon ortamında glutaraldehitin son derişimi 35, 70, 140 ve 210 mM olacak şekilde kombi CLEA(GA+Gİ) örnekleri hazırlanmıştır. Kombi CLEA (GA+Gİ)'ın en yüksek aktivitesinin görüldüğü glutaraldehit derişimi belirlenmiştir.

Optimum immobilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla 1, 3, 5, 6, 9, 12, 15, 18 ve 24 saatlik kombi CLEA(GA+Gİ) örnekleri hazırlanmıştır. En yüksek kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitesinin elde edildiği immobilizasyon süresi belirlenmiştir.

Optimum immobilizasyon pH'ının belirlenmesi amacıyla kombi CLEA (GA+Gİ) örnekleri pH 4,0-9,0 aralığında hazırlanmıştır. En yüksek kombi CLEA (GA +Gİ) aktivitesinin elde edildiği immobilizasyon pH değeri belirlenmiştir.

3.2.8. Serbest Glukoamilaz, Glukoz İzomeraz ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'ın Karekterizasyonu

3.2.8.1. Serbest GA, Gİ ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Optimum pH'larının Belirlenmesi

Serbest glukoamilazın aktivitesi farklı pH'larda (3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0 7,0, 8,0 ve 9,0) 50 mM tampon içinde hazırlanmış % 1.5 nişasta çözeltisi kullanılarak

belirlenmiştir.15 dakika sonunda oluşan glukoz miktarı ölçülerek aktiviteler hesaplanmış ve maksimum aktivite gösterdiği pH değeri belirlenmiştir.

Serbest Gİ'nın aktivitesi farklı pH'larda (4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ve 10) 400 mM tampon içinde hazırlanmış 2,6 M glukoz çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 30 dakika sonunda oluşan fruktoz miktarı ölçülerek aktiviteler hesaplanmış ve maksimum aktivite gösterdiği pH değeri belirlenmiştir.

Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivitesi farklı pH'larda (4,0, 5,0, 6,0 7,0, 8,0 ve 9,0) 100 mM tampon içinde hazırlanmış % 1.5 nişasta çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 60 dakika sonunda oluşan glukoz miktarı ölçülerek aktiviteler hesaplanmış ve maksimum aktivite gösterdiği pH değeri belirlenmiştir.

3.2.8.2. Serbest GA, Gİ ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Optimum Tampon Derişimlerinin Belirlenmesi

Serbest glukoamilazın aktivitesi farklı tampon derişimlerinde (25, 50, 100 ve 200 mM) ölçülmüş ve maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimi belirlenmiştir.

Serbest glukoz izomerazın aktivitesi farklı tampon derişimlerinde (100, 200, 300, 400 ve 500 mM) ölçülmüştür ve maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimi belirlenmiştir.

Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivitesi farklı tampon derişimlerinde (50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mM) ölçülmüş ve maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimi belirlenmiştir.

3.2.8.3. Serbest GA, Gİ ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest glukoamilaz, glukoz izomeraz ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktiviteleri farklı sıcaklıklarda (40, 50, 60, 70 ve 80 °C) hazırlanarak ölçülmüş ve maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık belirlenmiştir.

3.2.9. Serbest GA, Gİ ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Termal Kararlılığın Belirlenmesi

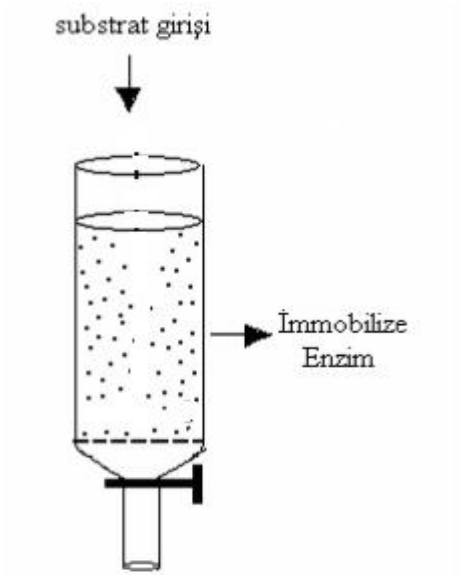
Serbest glukoamilaz, glukoz izomeraz ve kombi CLEA(GA+Gİ)'nın 60 ve 80 ˚C sıcaklıklarda 24 saat farklı aralıklarla (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 ve 24) inkübe edilmiş ve kalan aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.10. Serbest GA, Gİ ve Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Depolama Kararlılığın Belirlenmesi

Serbest glukoamilaz, glukoz izomeraz ve kombi CLEA (GA+Gİ) örneklerini başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 1 ay boyunca 5 ve 25 ˚C sıcaklıklarda bekletilerek kalan aktiviteleri belirli aralıklarla ölçülmüştür.

3.2.11. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Tekrar Kullanım Kararlılığın Belirlenmesi

Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın tekrar kullanım kararlılığı belirlenirken kesikli kolon reaktör kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın tekrar kullanım kararlılığının belirlendiği kesikli kolon reaktör

100 mg kombi CLEA (GA+Gİ) bulunan kolona 2 mL %1,5 nişasta çözeltisi eklenmiş ve 30 dakika sonunda alttaki musluğun açılması ile kolon boşaltılmıştır. Enzim aktivitesi oluşan fruktoz miktarı ölçülerek hesaplanmıştır. Kolon boşaltıldıktan 20 sn sonra aynı kolona tekrar 2 mL substrat çözeltisi eklenerek aynı şekilde aktivite belirlenmiş ve bu işlem 20 kez tekrarlanmıştır. Kalan aktivite ilk kullanımdaki aktivitenin %'si olarak hesaplanmıştır.

3.2.12. GA ve Gİ Enzimlerinin Ko-immobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Glukoamilaz ve glukoz izomerazlardan farklı oranlarda içeren enzim çözeltisi kullanarak kombi CLEA hazırlanmıştır. 3 farklı GA başlangıç enzim miktarı (4, 8, 12 mg protein) ve 4 farklı Gİ başlangıç enzim miktarı (8, 16, 32, 64 mg protein) seçilerek 12 kombi CLEA çalışması yapılmıştır. Kombi CLEA çalışmaları bulgular ve tartışmalar kısmında kolaylıkla takip edebilmesi için örnekler iki rakamda oluşan sayılarla sembolize edilmiştir. Bu sayılarda birincisi kombi CLEA'da kullanılan GA'ın başlangıç miktarı, ikincisi ise Gİ'ın başlangıç enzim miktarına karşılık gelmektedir. Kombi CLEA'da kullanılan GA'ın başlangıç enzim miktarı 4, 8, 12 mg sırasıyla 1, 2, 3 rakamı ile gösterilmiştir ve aynı şekilde Gİ başlangıç 16, 32, 64 mg enzim miktarı da 1, 2, 3 şeklinde rakamla gösterilmiştir. Örneğin **13** sayısı başlangıç miktarı 4 mg GA ve 64 mg Gİ kullanılarak yapılan kombi CLEA çalışması göstermektedir aynı şekilde **32** sayısı ise başlangıç 12 mg GA ve 32 mg Gİ kullanılarak yapılan immobilizasyon çalışmasını sembolize etmektedir ve diğer çalışmalardan benzer şekilde simgelenmiştir. Çizelge 3.1'de GA ve Gİ enzimlerinin kombi CLEA'da kullanılan başlangıç derişimleri ve kullanılan protein başlangıç miktarları verilmiştir.

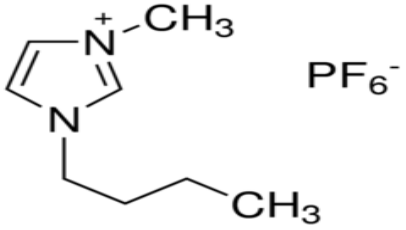
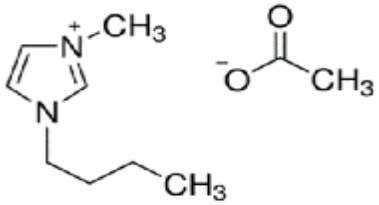
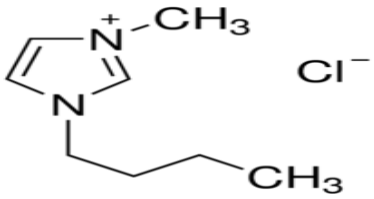
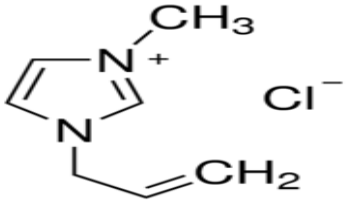
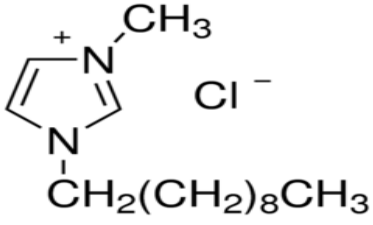
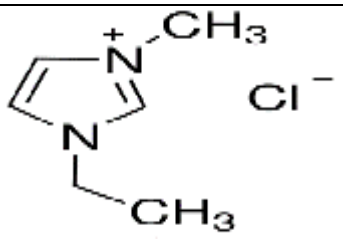
Çizelge 3.1. Kombi CLEA'da kullanılan GA ve Gİ enzimlerinin başlangıç derişimleri ve protein miktarları.

	Başlangıç enzim miktarı (mg protein)		m_{toplam}(mg protein)
	m_{GA}	$m_{Gİ}$	
11	4	8	12
12	4	16	20
13	4	32	36
14	4	64	68
21	8	8	16
22	8	16	24
23	8	32	40
24	8	64	72
31	12	8	20
32	12	16	28
33	12	32	44
34	12	64	76

3.2.13. İyonik Sıvılar İçinde Kombi CLEA (GA+Gİ) ile Fruktoz Üretimi

Kombi CLEA (GA+Gİ) ile elde edilen fruktoz verimini artırmak için nişastayı daha iyi çözen yardımcı çözücü olarak 1- bütil-3-metilimidazolyum heksafluorofosfat ([Bmim] [PF_6]), 1-bütil-3-metilimidazolyumasetat ([Bmim] [AOc]), 1-bütil-3-metilimidazolyumklorür ([Bmim] [CI], 1-alil-3-metilimidazolyum klorür ([Amim] [CI],1-desil-3-metilimidazolyum klorür ([Dmim] [CI] ve 1-etil-3-metilimidazolyum klorür ([Emim] [CI] iyonik sıvılar kullanılmıştır. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivitesi hacimce % 2,5, 5, 10 ve 25 olan iyonik sıvılar içeren ortamlarda ölçülmüştür. Çizelge 3,2'de enzim aktivitesi için kullandığımız iyonik sıvılar ve onların anyonların listesi verilmiştir.

Çizelge 3.2. İyonik sıvılar ve anyonları

İsim	**Kısaltma**	**Yapı**	**Anyon**
1- bütil-3-metilimidazolyum heksafluorofosfat	[Bmim][PF6]		PF_6^-
1- bütil-3-metilimidazolyum asetat	[Bmim][AOc]		$CH_3CO_2^-$
1- bütil-3-metilimidazolyum klorür	[Bmim][CI]		CI^-
1-alil-3-metilimidazolyum klorür	[Amim][CI]		CI^-
1-desil-3-metilimidazolyum klorür	[Dmim][CI]		CI^-
1-etil-3-metilimidazolyum klorür	[Emim][CI]		CI^-

3.2.14. Poliglutaradehitin Sentezi

Poliglutaraldehit (PGL) sentezi ve karakterizasyonu Fırat Üniversitesinde araştırma görevlisi Fatih BİRYAN tarafından Margel ve Rembaum (1980) önerdiği yöntem modifiye edilerek yapılmıştır. Yöntemde glutaraldehiten 2 gram alınıp pH 9' da (pH ayarı 0,1M NaOH ile yapıldı) 96 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırarak reaksiyona tabi tutulmuş daha sonra ortama saf su ilave edilerek polimerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Reaksiyona girmeyen glutaraldehit ve NaOH fazlası yıkanarak uzaklaştırılmış, sentezlenen polimerler FT-IR, NMR analiz edilmiştir. Polimerlerin molekül ağırlıklarını belirlemek için ise GPC analizi yapılmıştır. 24 saat oda sıcaklığında kurutulduktan sonra vakum altında 40 ˚C'de 3 saat bekletilmiştir**.**

3.2.15. Poliglutaraldehit Kullanarak GA ve Gİ Enzimlerinin Kombi CLEA Olarak İmmobilizasyonu

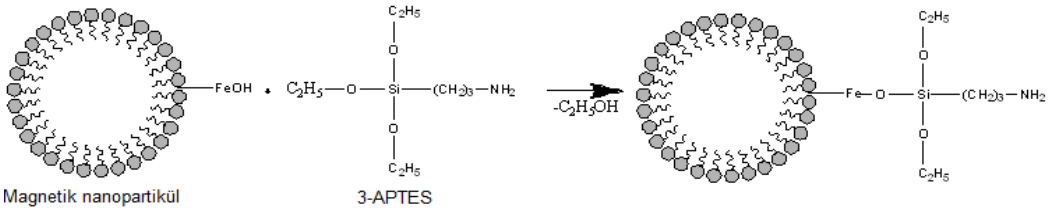
Farklı pH'larda elde edilen PGL kullanarak GA ve Gİ enzimleri ile kombi CLEA çalışmaları yapılmıştır. Optimum amonyum sülfat derişimini belirlemek amacıyla çöktürücü olarak kullanılan amonyum sülfatın son derişimi % 20, 30, 40, 50, 60, 70 (w/v) olacak şekilde immobilizasyon ortamı hazırlanmış ve immobilizasyon yapılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak PGL optimum immobilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla 1, 3, 5, 6, 9, 12, 15, 18, 21 ve 24 saatlik süre ile immobilizasyon örnekleri hazırlanmıştır. Daha sonra saf su ile süzüntüde poliglutaraldehit kalmayıncaya kadar yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra çökeltinin kurumasını hızlandırmak amacıyla, 2 ml aseton eklenmiştir. Süzüntüde protein olup olmadığını kontrol etmek için 280 nm' de süzüntüde absorbans görülmeyinceye kadar yıkama işlemi yapılmıştır. Oluşan kombi CLEA (GA+Gİ) çökeltisi soğutmalı inkübatörde kurutulduktan sonra 4ºC'de kullanılıncaya kadar bekletilmiştir.

3.2.16. Manyetik Nanopartikül Sentezi

Manyetik nanopartiküller birlikte çökeltme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Manyetik nanopartiküller Valenzuela ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntemi modifiye edilerek sentezlenmiştir. 300 mL 0,1 M $FeCl_3.6H_2O$ çözeltisiyle, 300 mL 0,05 M $FeSO_4.7H_2O$ çözeltisi hazırlanıp bir beherde 25 °C'de 250 devir/dak hızla karıştırarak ısıtılmıştır. Daha sonra bu çözeltinin sıcaklığı 36 °C'ye ulaştığında üzerine damla damla 1 N NaOH siyah bir çökelti oluşturuncaya kadar eklemeye devam etmiştir. Çözeltinin sıcaklığı 52 ºC'ye ulaştığında ısıtıcı kapatılmıştır. Daha sonra çözeltinin üzerine damla damla 3 N NaOH eklenerek siyah çökeltinin yoğunluğu arttırılmıştır. Elde ettiğimiz çökelekler etanol ile yıkanarak süzülmüş ve 12 saat 74 ºC'de etüvde kurutulmuştur.

3.2.17. Manyetik Nanopartiküllerin Kombi CLEA (GA+Gİ) İmmobilizasyonu İçin Hazırlanması

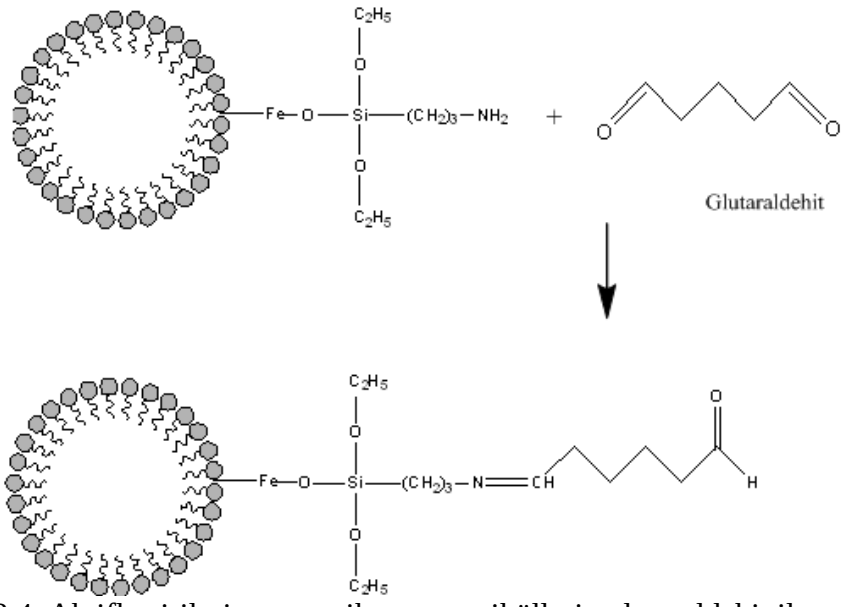
GA ve Gİ enzimlerinin kombi CLEA immobilizasyonunda kullanılacak olan manyetik nanopartiküllerin immobilizasyonundan önce yüzeylerinin aktifleştirilmesi ve daha sonra glutaraldehit ile muamele edilmesi gerekmektedir. Manyetik nanopartiküllerin aktifleştirilmesinde Weethall (1976) tarafından önerilen yöntemi kullanılmış ve 3-APTES ile desteğin alkilamin türevi (silanlama) oluşturulmuştur. Manyetik nanopartikülün 2,0 gramı %4'lük (v/v) 3-APTES'in aseton içerisinde hazırlanmış çözeltisine eklenerek 45 ºC'de 24 saat bekletilerek aktifleştirilmiştir (Şekil 3.3). Daha sonra aktifleştirilen destek saf su ile yıkanarak etüvde 115 ºC'de 12 saat kurutulmuştur. 3-APTES ile aktifleştirilen manyetik nanopartikül desteğindeki serbest amino gruplarının miktarının belirlenmesinde Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Manyetik nanopartiküllerin 3-APTES ile aktivite edilmesi

3.2.18. Manyetik Nanopartiküllerdeki Alkilamin Türevinin Glutaraldehit ile Aktifleştirilmesi

Alkilamin türevine glutaraldehitin bağlanmasında Cho ve Rhee (1993) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 2,0 g aktifleştirilmiş destek üzerine 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda %2,5 (w/v) olacak şekilde hazırlanmış glutaraldehit çözeltisinin 25 mL'si eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır (Şekil 3.4). Manyetik nanopartiküller saf su ile süzüntüde glutaraldehit gözlenmeyinceye kadar iyice yıkanmış ve 50 ºC'de 24 saat süresince kurutulmuştur. Süzüntüde glutaraldehit olup olmadığını kontrol etmek için literatürde Boratynski ve Zal'ın (1990) önerdiği yöntem kullanılmıştır. Alkilamin türevine glutaraldehitin bağlanması sonrasında arta kalan serbest amino grubu miktarının tayini Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır.

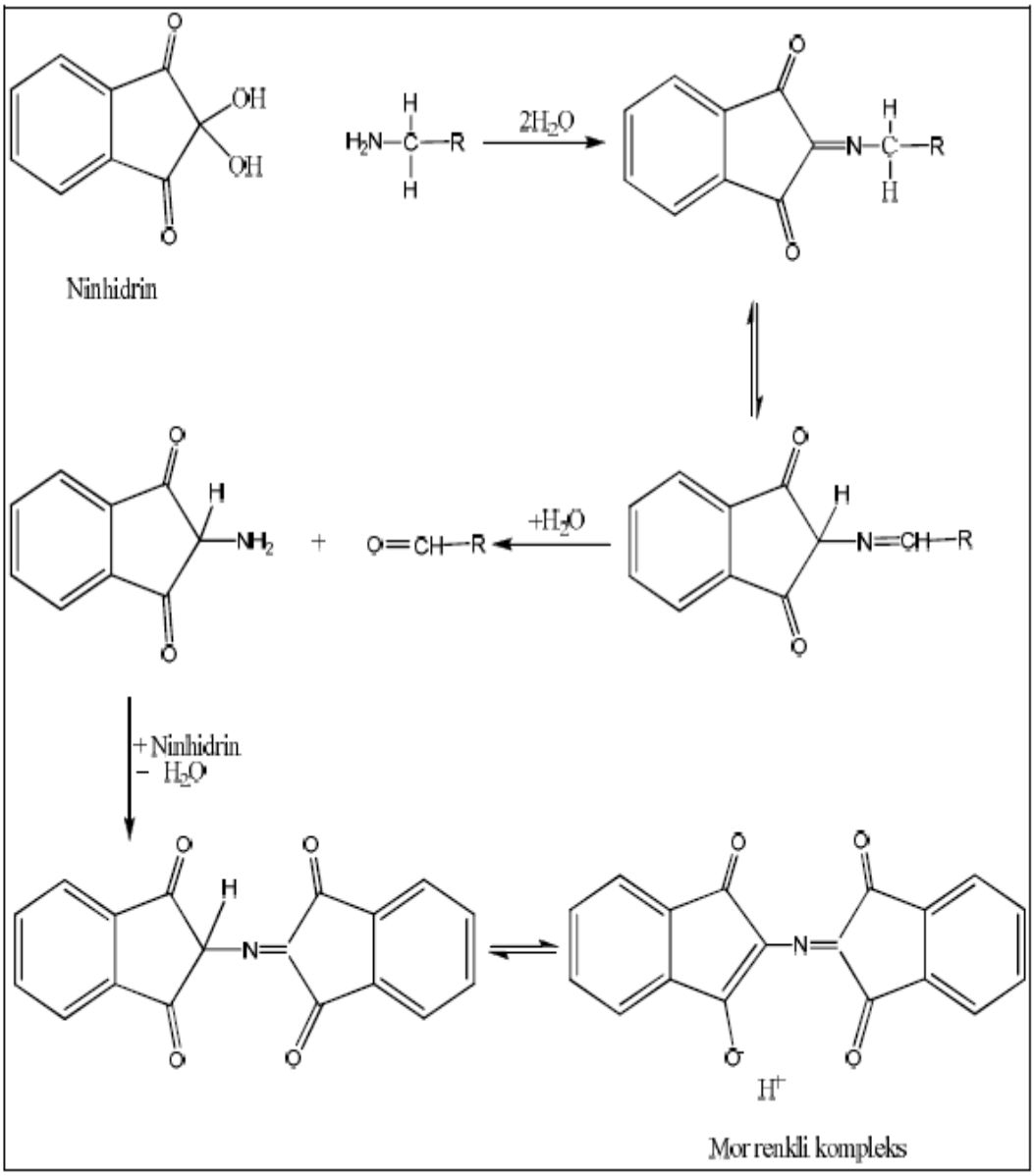


Şekil 3.4. Aktifleştirilmiş manyetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile reaksiyonu.

3.2.19. Manyetik Nanopartiküllerin Silanlama Sonrası ve Glutaraldehit ile Aktifleştirilmesi Sonrası Kalan Serbest Amino Gruplarının Tayini

Manyetik nanopartiküller silanlandıktan sonra destek yüzeyinde bulunan amino ($–NH_2$) grubunun miktarı Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Aynı yöntem silanlanan desteklerin glutaraldehit ile etkileştirilmesinden sonra glutaraldehit bağlanmadan kalan serbest $–NH_2$ grubu tayini içinde kullanılmıştır. Yöntemin esası, $–NH_2$ grubunun ninhidrinle verdiği reaksiyon sonucunda oluşan kompleksin (Şekil 3.5) etanol fazına alınarak spektrofotometrik olarak 570 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. Amino gruplarının tayini için,

1. Derişimi $6x10^{-4}$, 9x10-4, $12x10^{-4}$, $15x10^{-4}$, $18x10^{-4}$, $21x10^{-4}$ M olan 3-APTES çözeltileri hazırlanmıştır .
2. Hazırlanan çözeltilerden 100 μL tüplere alınarak üzerine 200 μL ninhidrin (%2 (w/v)) çözeltisi eklenmiştir. Kör tüpü için 100 μL su alınarak üzerine 200 μL ninhidrin çözeltisi eklenmiştir.
3. Tüpler 15 dakika kaynayan su banyosunda bekletildikten sonra buz banyosunda soğuması için bekletilmiştir.
4. Her bir tüpe 50:50 etanol:su karışımından 5 mL eklenerek girdap karıştırıcıda karıştırılmıştır.
5. Çözeltilerin absorbansı köre karşı 570 nm'de okunmuştur. Amino grubu belirlenecek destek materyalinden 10 mg tartılarak üzerine 100 μL su eklendikten sonra standart çalışmasındaki basamaklar aynen uygulanmıştır. Örnekler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan kompleks etanol-su fazına alınarak absorbansı 570 nm'de okunmuştur.



Şekil 3.5. Ninhidrinin $–NH_2$ grubu ile verdiği reaksiyon.

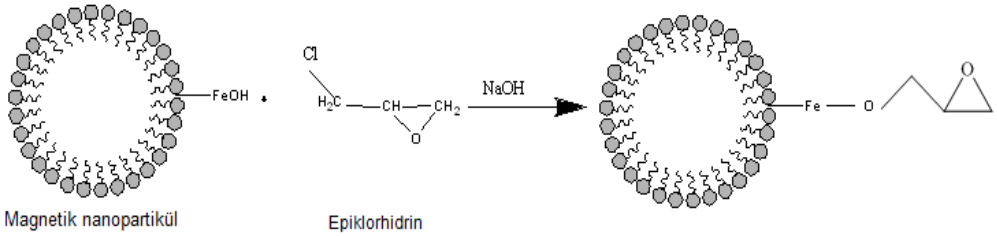
3.2.20. GA ve Gİ Enzimlerinin Glutaraldehit Üzerinden Manyetik Nanopartiküllere Kovalent Olarak Ko-immobilizasyonu

GA ve Gİ enzimlerinin manyetik nanopartiküllere glutaraldehit üzerinden kovalent olarak ko-immobilizasyonu Sahoo ve ark., (2011) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Farklı miktarlarda GA ve Gİ enzimleri kullanılarak immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. İmmobilizasyon süresi sonunda immobilize preparatlarda protein kalmayıncaya kadar yıkanmıştır. Süzüntüde desteğe

bağlanmayan serbest GA ve Gİ enzimlerinin ortamdan tamamen uzaklaştığını anlamak için süzüntünün 280 nm'deki absorbansları ölçülmüştür. Süzüntülerdeki protein miktarı tayini (Lowry ve ark.,1951ve Bredford, 1976) önerdiği yöntemlere göre yapılmıştır.

3.2.21. Manyetik Nanopartiküllerin Epiklorohidrin ile Aktifleştirilmesi

Manyetik nanopartiküllere 1-kloro-2,3-epoksipropan'ın (epiklorohidrin) bağlanmasında Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 2,0 g destek üzerine 50 mL 2 M'lık NaOH olacak şekilde hazırlanmış çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra NaOH ile muamele edilen manyetik nanopartiküllerin üzerine 3,9 mL 0,05 mol epiklorohidrin eklenerek oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. Epiklorohidrin ile aktifleştirilen manyetik nanopartiküller süzülerek yıkanmış ve 24 saat süresince kurutulmuştur. Epoksi gruplarının olup olmadığını kontrol etmek için literatürde Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 0,5 g destek alınarak üzerine 2,6 mL 1,3 M'lık sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3$) ve bir damla fenolftalein eklenmiştir ve 0,1 M'lık HCl ile titrasyon yapılmıştır.



Şekil 3.6. Manyetik nanopartiküllerin epiklorohidrin ile reaksiyonu.

3.2.22. GA ve Gİ Enzimlerinin Epiklorohidrin Üzerinden Manyetik Nanopartiküllere Ko-immobilizasyonu

GA ve Gİ enzimlerinin manyetik nanopartiküllere epiklorohidrin üzerinden ko-immobilizasyonu Sahoo ve ark., (2011) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Farklı miktarlarda GA ve Gİ enzimleri kullanarak immobilizasyon

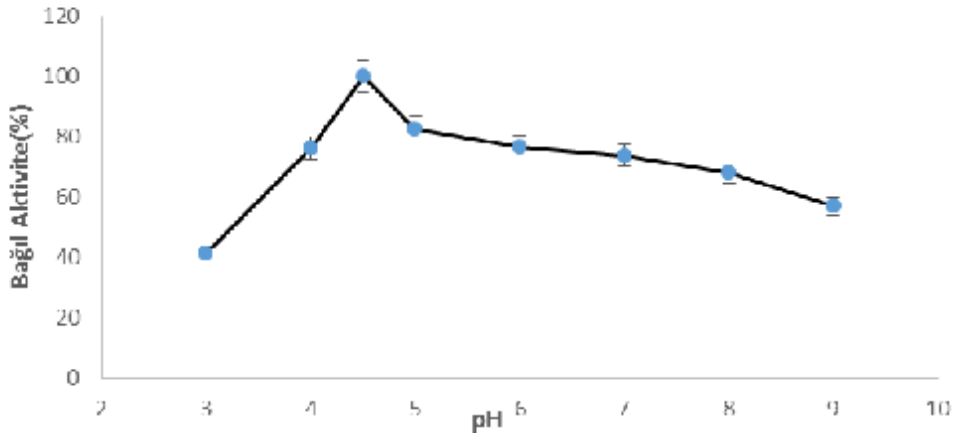
çalışmaları yapılmıştır. İmmobilizasyon süresi sonunda immobilize preparatlarda protein kalmayıncaya kadar saf su ile yıkanmıştır. Süzüntüde desteğe bağlanmayan serbest GA ve Gİ enzimlerinin ortamdan tamamen uzaklaştığını anlamak için süzüntünün 280 nm'deki absorbansları ölçülmüştür. Süzüntülerdeki protein miktarı tayini (Lowry ve ark.,1951ve Bradford, 1976) önerdiği yönteme göre yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

4.1. Bulgular

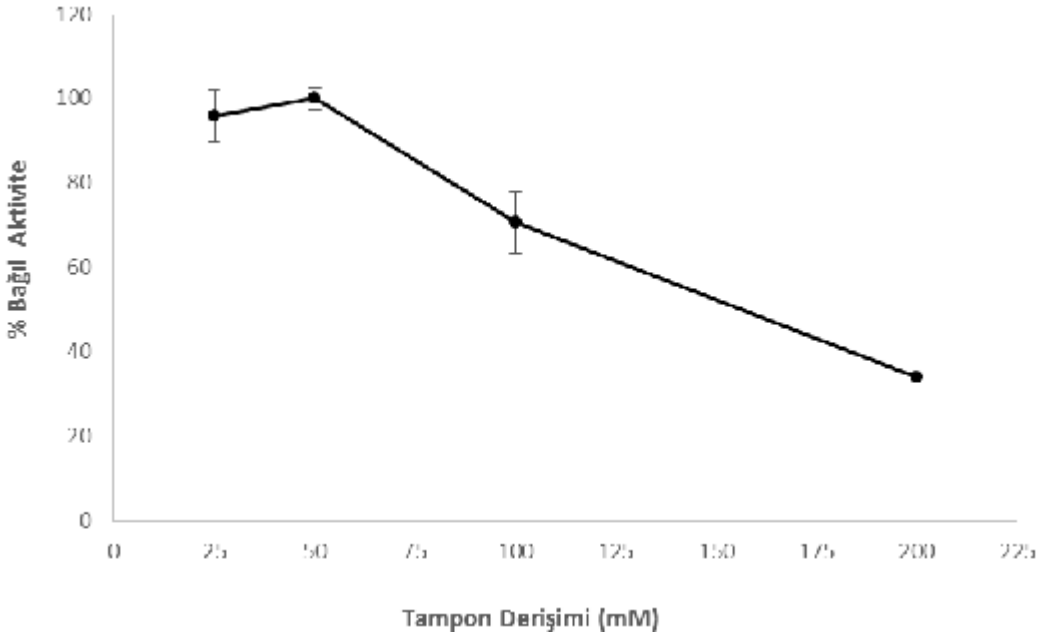
4.1.1. Serbest GA'nın Karakterizasyonu

Serbest GA aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi 60 ^{o}C'de ve 50 mM derişiminde farklı pH'daki tamponlar kullanarak (3-9) ölçülmüştür. GA enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH 4,5 olarak belirlenmiştir ve sonuçlar % bağıl aktivite olarak şekil 4.1 'de gösterilmektedir.



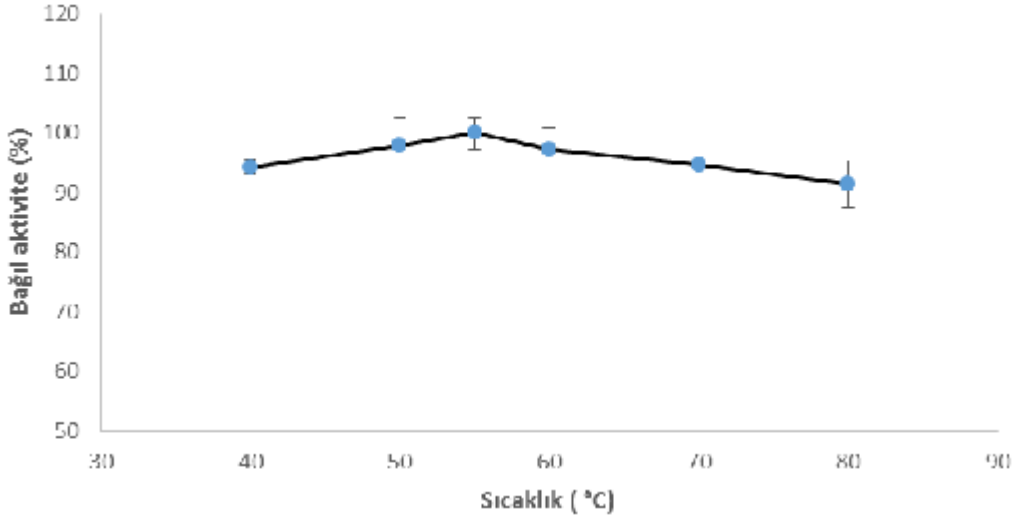
Şekil 4.1. Serbest GA aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi

Serbest GA'nın pH 4,5'te hazırlanmış olan farklı derişimlerdeki sitrat tampon çözeltileri kullanılarak aktiviteleri belirlenmiştir. GA enzimin maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimi 50 mM olarak bulunmuştur (şekil 4.2).



Şekil 4.2**.** Serbest GA aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi

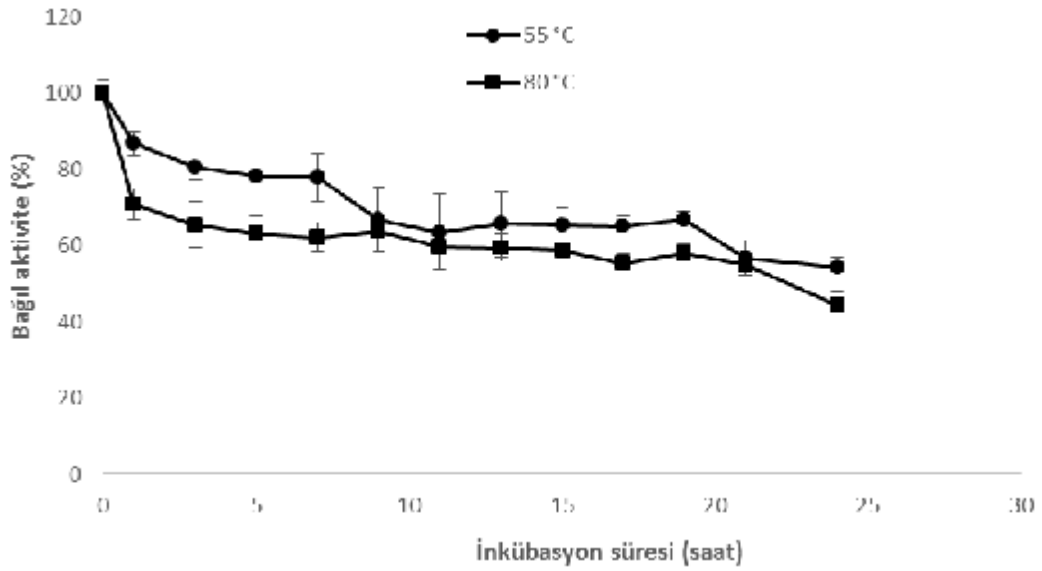
Serbest GA aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi pH 4,5 ve 50 mM sitrat tamponu kullanılarak farklı sıcaklıklarda (40-80 ^{o}C) ölçülmüş ve enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 55 $^{\circ}$C olarak belirlenmiştir (şekil 4.3).



Şekil 4.3. Serbest GA aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

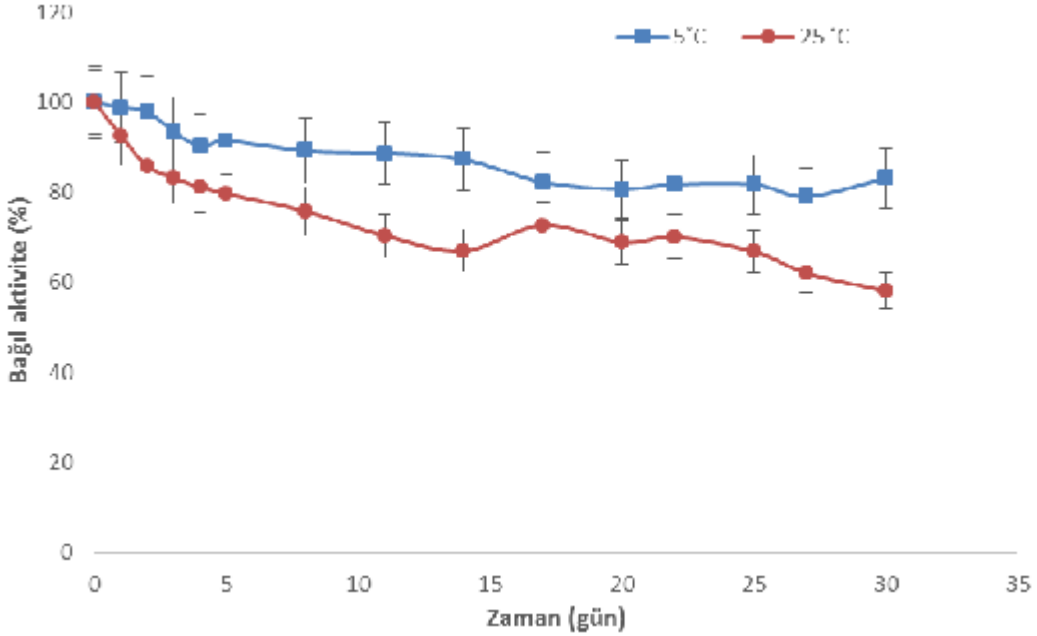
Serbest GA enziminin termal kararlılığını belirlemek için sitrat tamponu (50 m M, pH 4,5) kullanılarak iki farklı sıcaklıkta (55 ve 80 $^{\circ}$C) enzimin kalan

aktivitesi ölçülerek belirlenmiştir. Serbest GA'nın sıcaklık arttıkça termal kararlılığının azaldığı görülmektedir. Serbest GA'nın 55 ºC'de 24 saat inkübasyonu sonunda kalan aktivitesi başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 54'ü iken, 80 ˚C'de 24 saat inkübasyonu sonunda kalan aktivitesi başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 44'ü dür (şekil 4.4).



Şekil 4.4. Serbest GA aktivitesinin termal kararlılığına bağlı değişimi

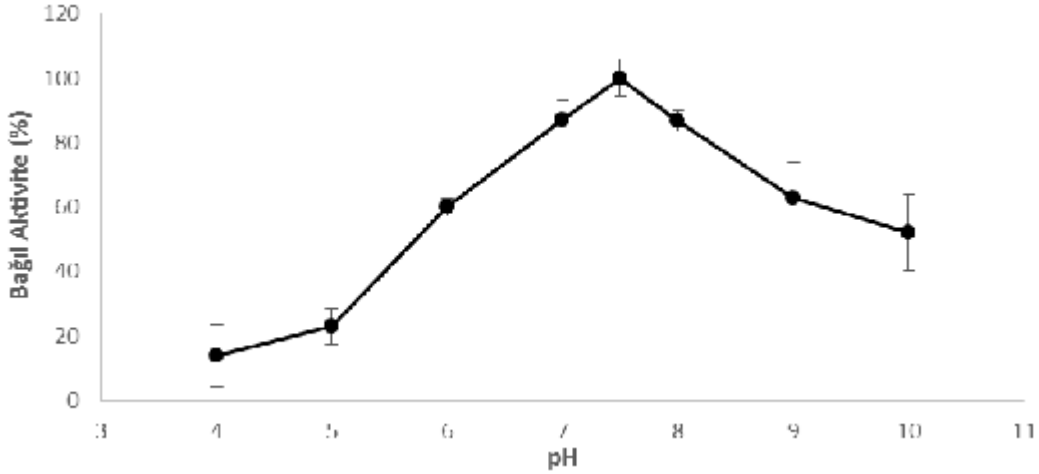
Serbest GA'nın depolama kararlılığını belirlemek için 4 ˚C ve 25 ˚C'de örnekler bekletilerek belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.5'te gösterilmiştir. 1 ay boyunca 4 ˚C ve 25 ˚C 'de serbest glukoamilazın kalan aktivesi sırasıyla %83 ve %58 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. Serbest GA aktivitesinin depolama kararlılığına bağlı değişimi

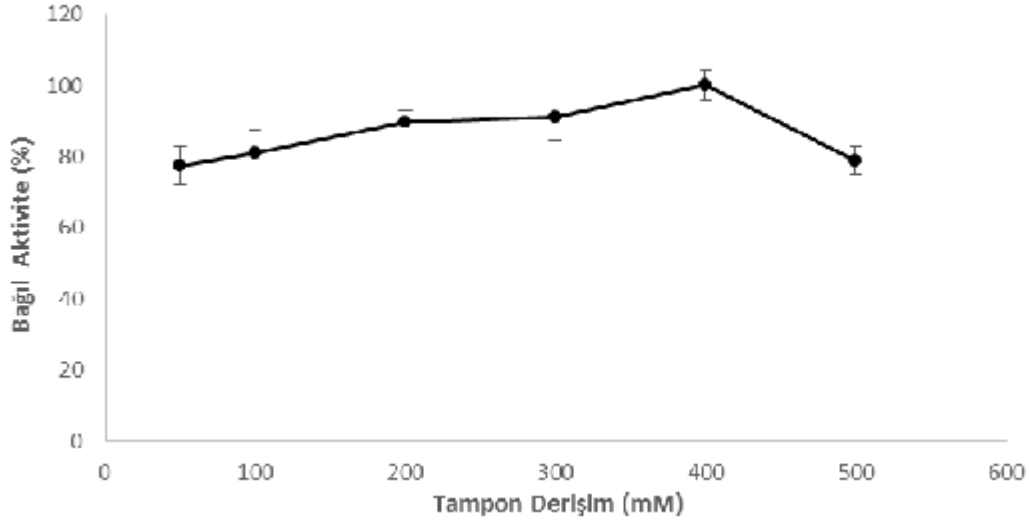
4.1.2. Serbest Gİ'nin Karakterizasyonu

Serbest Gİ'nın farklı pH 'daki aktiviteleri % bağıl aktivite olarak şekil 4.6'da verilmektedir. Serbest Gİ'nın maksimum aktivite gösterdiği pH 7,5 olarak bulunmuştur.



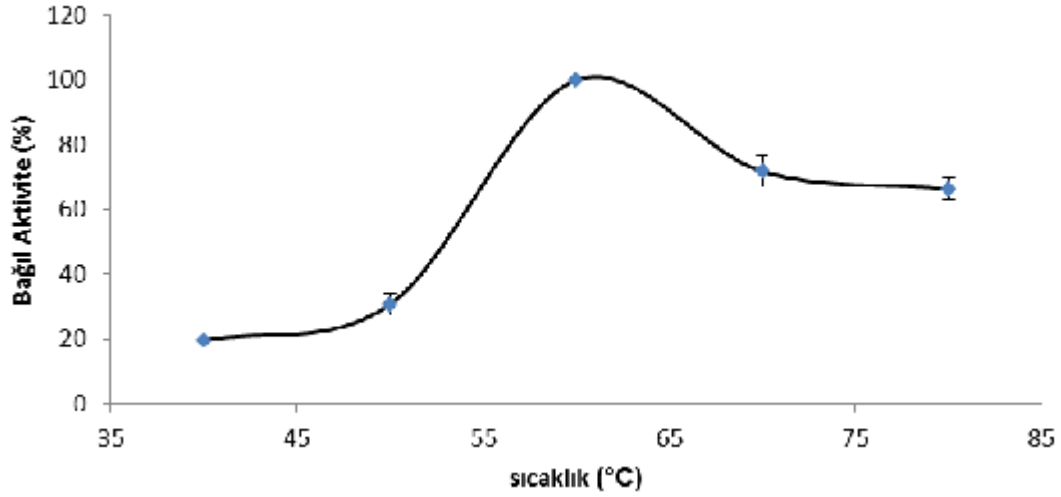
Şekil 4.6. Serbest Gİ aktivitesinin pH'a bağlı değişimi

Serbest Gİ'nın pH 7,5'te hazırlanmış olan farklı derişimlerdeki tampon çözeltileri kullanılarak aktiviteleri belirlenmiş ve enzimin maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimi 400 m M olarak belirlenmiştir (şekil 4.7).



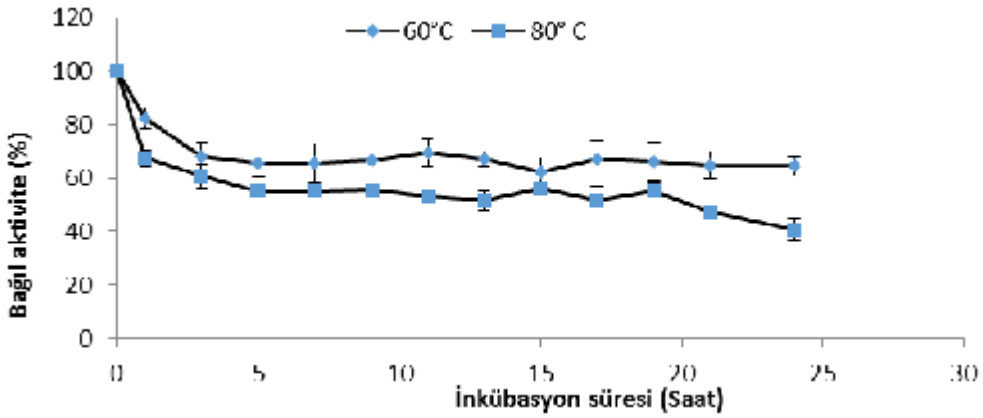
Şekil 4.7. Serbest Gİ aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi

Serbest Gİ aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi 400 mM pH 7,5 fosfat tamponu kullanılarak farklı sıcaklıklarda (40-80 ˚C) ölçülmüş ve enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60 ˚C olarak belirlenmiştir (şekil 4.8).



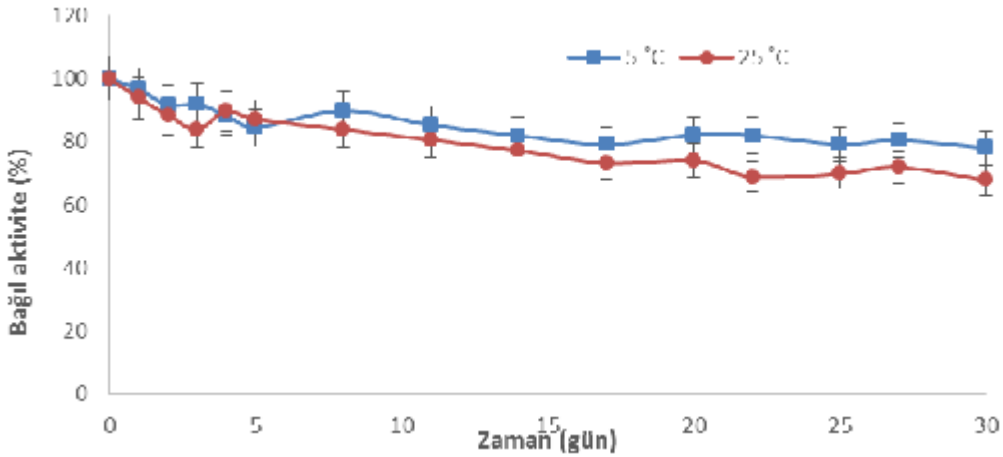
Şekil 4.8. Serbest Gİ aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

Serbest Gİ'nın termal kararlılığı fosfat tamponunda (400 mM, pH 7,5) iki farklı sıcaklıkta (60 ve 80 ^{o}C) enzimin kalan aktivitesi inkübasyon süresine bağlı olarak ölçülerek belirlenmiştir. Serbest Gİ'nın sıcaklık arttıkça termal kararlılığının azaldığı görülmektedir. Serbest Gİ'nın 60 ºC'de 24 saat inkübasyonu sonunda kalan aktivitesi yaklaşık %64 iken, 80 ºC'de 24 saat inkübasyonu sonunda kalan aktivitesi başlangıç aktivitesinin yaklaşık %41'idir (şekil 4.9).



Şekil 4.9. Serbest Gİ enziminin termal kararlılığı

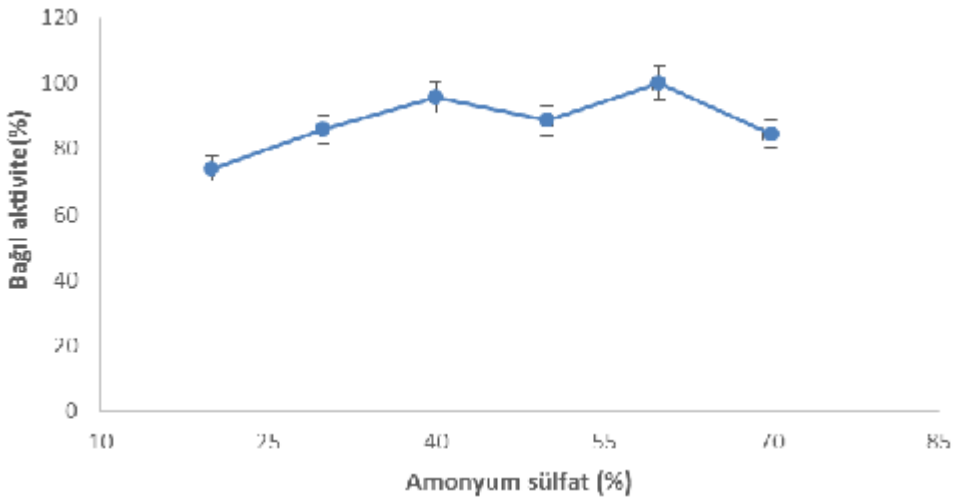
Serbest Gİ'nın depolama kararlılığını belirlemek için örnekler 4 ve 25 °C'de bekletilerek belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Serbest Gİ enziminin depolama kararlılığı

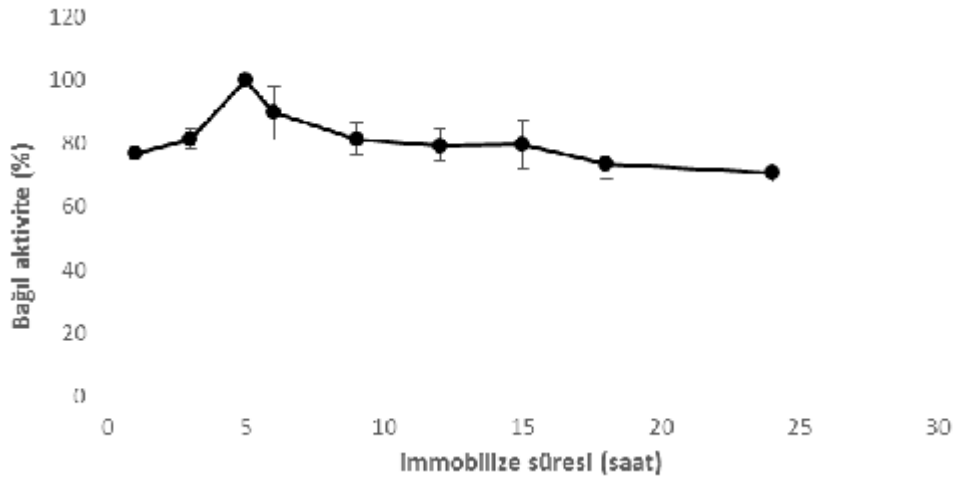
4.1.3. Kombi CLEA (Gİ+GA)'nın İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Kombi CLEA(GA+Gİ) maksimum aktivite göstermesi için immobilizasyon koşullarının optimizasyonu yapıldı. Optimum amonyum sülfat derişimini belirlemek için çöktürücü olarak kullanılan amonyum sülfatın son derişimi % 20, 30, 40, 50, 60, 70 (w/v) olacak şekilde immobilizasyon ortamı hazırlandı. En yüksek aktivitenin elde edildiği amonyum sülfat derişimi % 60 (w/v) olarak belirlenmiştir (şekil 4.11)



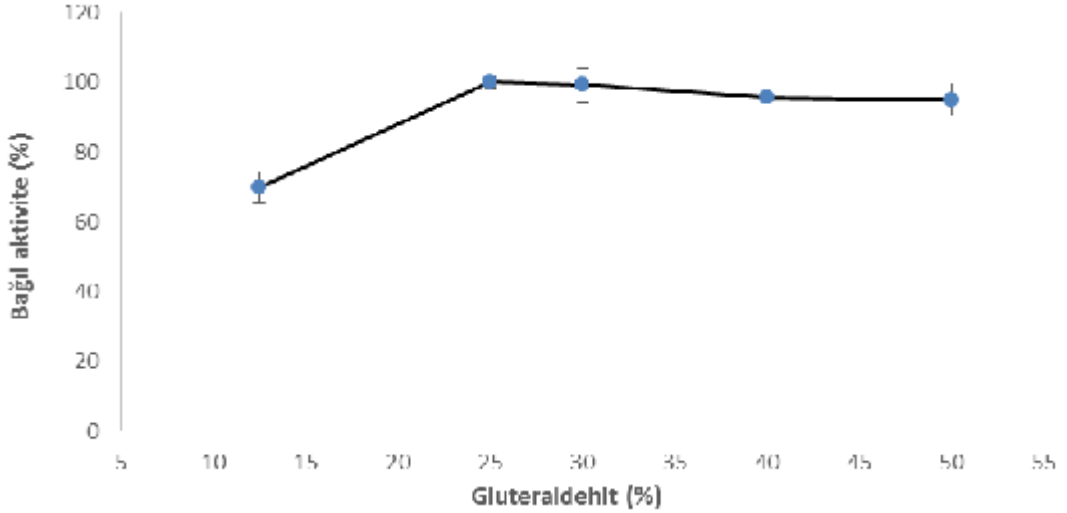
Şekil 4.11. İmmobilizasyon ortamındaki amonyum sülfat derişimine bağlı olarak kombi CLEA (Gİ+GA)'nın aktivitelerindeki değişim

Kombi CLEA'nın Optimum immobilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla, 1-24 saatlik immobilizasyon süresi sonunda kombi CLEA'lar hazırlanmıştır. En yüksek kombi CLEA (Gİ+GA) aktivitesinin elde edildiği immobilizasyon süresi 5 saat olarak belirlenmiştir (şekil 4. 12)



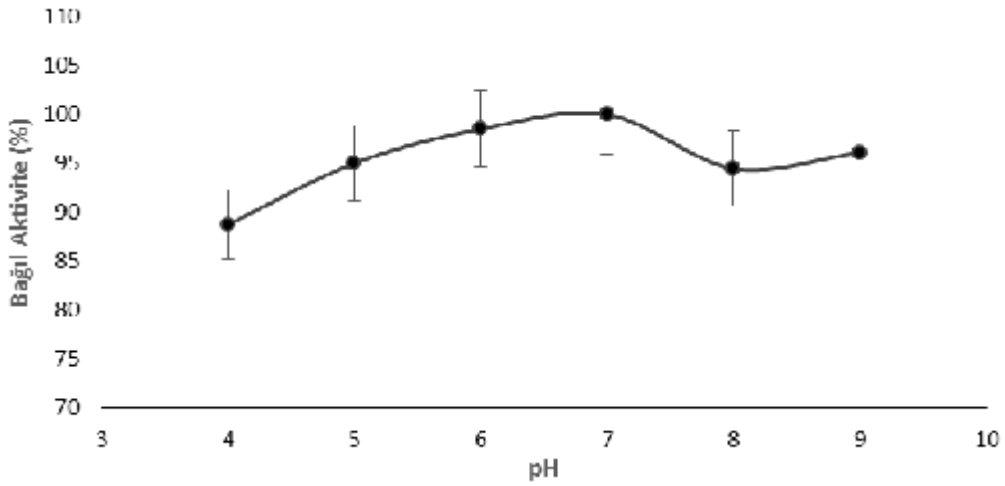
Şekil 4.12. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak kombi CLEA (Gİ+GA)'nin aktivitelerindeki değişim

Optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi amacıyla %12,5, 25, 30, 40, 50'lik glutaraldehit kullanılarak kombi CLEA (GA+Gİ) örnekleri hazırlanmıştır. En yüksek CLEA (Gİ+GA) aktivitesinin elde edildiği glutaraldehit derişimi %25 olarak belirlenmiştir (şekil 4.13).



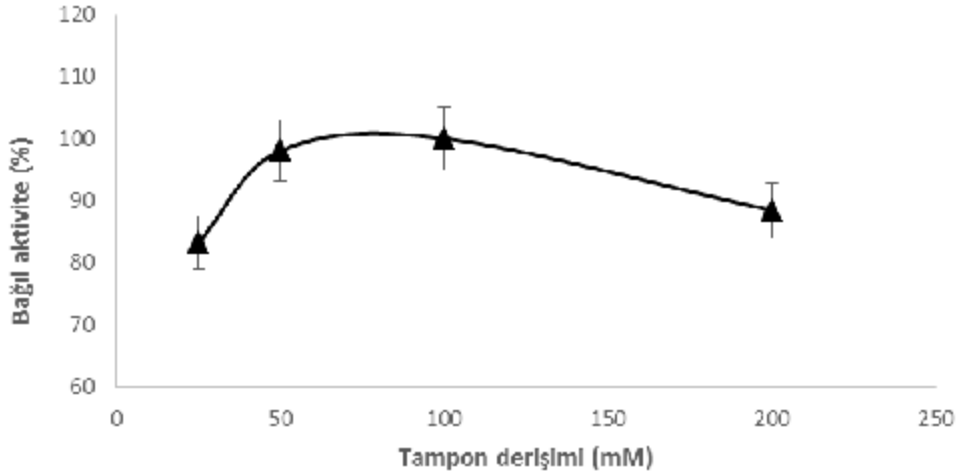
Şekil 4.13. İmmobilizasyon ortamındaki glutaraldehit derişimine bağlı olarak kombi CLEA (Gİ+GA)'nın aktivitelerindeki değişim

Kombi CLEA (GA+Gİ)'ın farklı pH 'daki aktivitesi % bağıl aktivite olarak şekil 4.14'te verilmektedir. Kombi (GA+Gİ)'ın maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7 olarak belirlenmiştir.



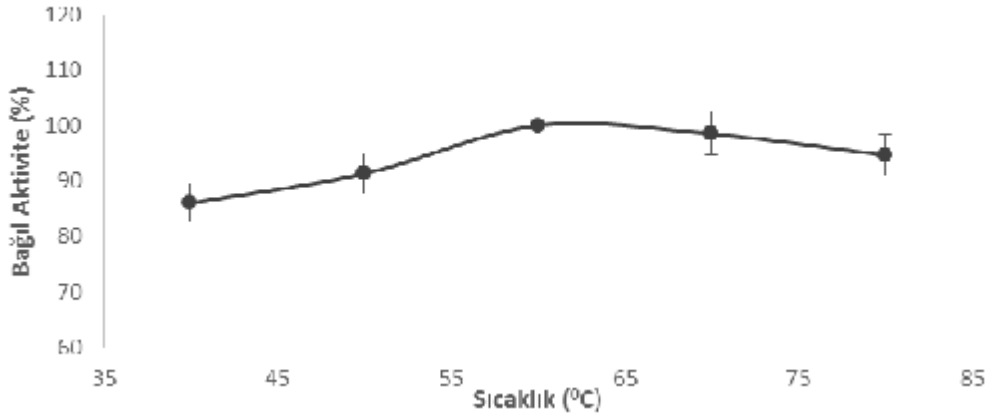
Şekil 4.14. Kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitesinin pH'a bağlı değişimi

Kombi CLEA (GA+Gİ)'ın pH 7'de hazırlanmış olan farklı derişimlerdeki tampon çözeltileri kullanılarak aktiviteleri belirlenmiş, elde edilen sonuçlar şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi

Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın farklı sıcaklıklardaki aktivitesi % bağıl aktivite olarak şekil 4.16'da verilmektedir. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60 ˚C olarak bulunmuştur.



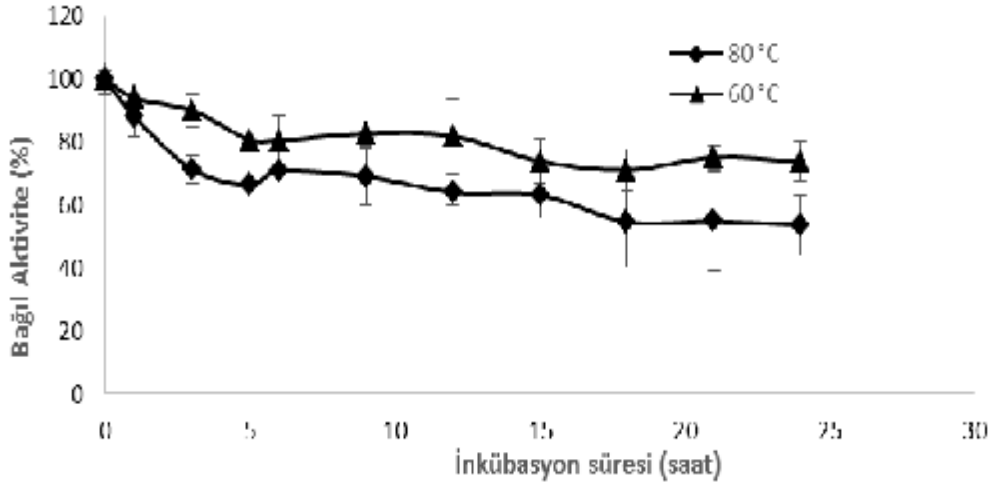
Şekil 4.16. Kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişim

Kombi CLEA'nın maksimum aktivite gösterdiği başlangıç GA ve Gİ enzim derişimlerini belirlemek için üç farklı GA başlangıç miktarı (4, 8, 12 mg) ve dört farklı Gİ başlangıç miktarı (8, 16, 32, 64 mg) seçilerek 12 kombi CLEA çalışması yapılmıştır. Çalışmalarda farklı başlangıç miktarlarında kombi CLEA örneklerinin daha iyi takip etmek için örnekler 2 rakamda oluşan sayılarla sembolize edilmiştir. Bu sayılardan birincisi kombi CLEA'da kullanılan GA başlangıç miktarı, ikincisi ise Gİ başlangıç miktarına karşılık gelmektedir. En yüksek aktivite 24 numaralı çalışmada 10,15 U/g CLEA olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Kombi CLEA kullanılan GA ve Gİ enzimlerinin başlangıç derişimleri ve gram destek başına kullanılan protein miktarları

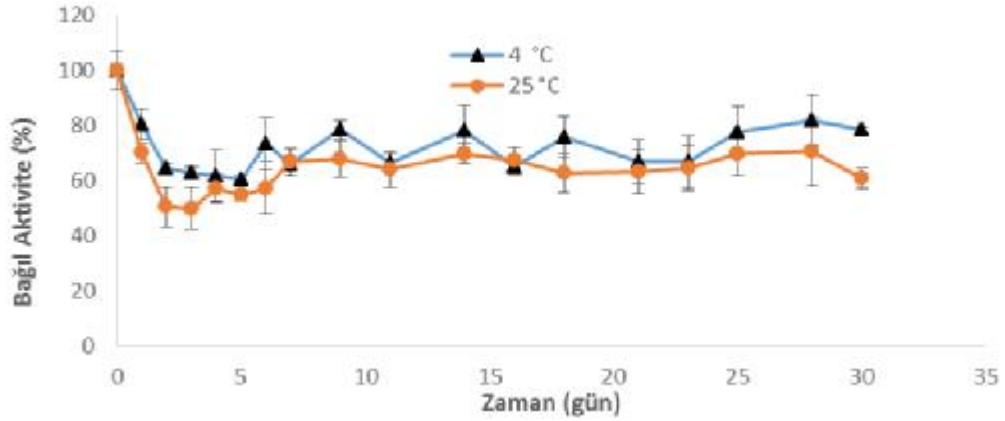
Sayı	Baş.ezm miktarı (mg protein)		$M_{toplam.}$(mg protein gr destrek^{-1})	Oluşan CLEA (mg)	Aktivite (U/g CLEA)
	M_{GA}	$M_{Gİ}$	M_{toplam}		n=4
11	4	8	12	oluşmadı	
12	4	16	20	0,0067	2,95 ± 0,03
13	4	32	36	0,032	7,44 ± 0,02
14	4	64	68	0,0879	9,75 ± 0,036
21	8	8	16	oluşmadı	
22	8	16	24	0,0071	2,37 ± 0,021
23	8	32	40	0,0339	7,04 ± 0,024
24	8	64	72	0,1025	10,15± 0,029
31	12	8	20	oluşmadı	
32	12	16	28	0,0119	2,66 ± 0,005
33	12	32	44	0,0446	6,61 ± 0,033
34	12	64	76	0,0976	8,26 ± 0,010

Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın termal kararlılığını belirlemek amacıyla fosfat tamponu (100 mM, pH 7) kullanılarak iki farklı sıcaklıkta (60 ve 80 ˚C) enzimin kalan aktivitesi ölçülmüştür. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın sıcaklığı artırdıkça termal kararlılığının azaldığı görülmektedir. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın 60 ˚C'de 24 saat inkübasyonu sonunda kalan aktivitesi başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 74'ü iken, 80 ˚C'de 24 saat inkübasyonu sonunda kalan aktivitesi başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 54 tür (şekil 4.17).



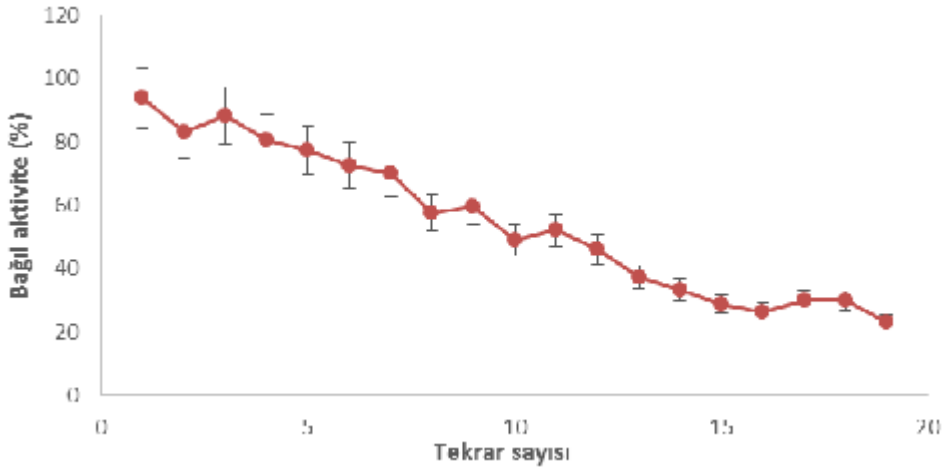
Şekil 4.17. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın termal kararlılığı

Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın depolama kararlılığını belirlemek için örnekler 4 ve 25 ˚C'de bekletilerek belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. 4 ˚C'de depolanan Kombi CLEA (GA+Gİ) 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 78'ini, 25 ˚C'de depolanan örnekler ise başlangıç aktivitesinin % 61'ini koruyabilmiştir (şekil 4.18).



Şekil 4.18. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın depolama kararlılığı

Kombi CLEA (GA+Gİ) tekrar kullanım sayısı belirlemek için 60 ˚C, 100 mM ve pH 7 fosfat tamponu kullanılarak ölçülmüştür. 20 kullanımdan sonra kombi CLEA (GA+Gİ) başlangıç aktivitesinin %23'ünü koruyabilmektedir. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın kullanım sayısına bağlı olarak aktivitesindeki değişimi şekil 4.19'da görülmektedir.

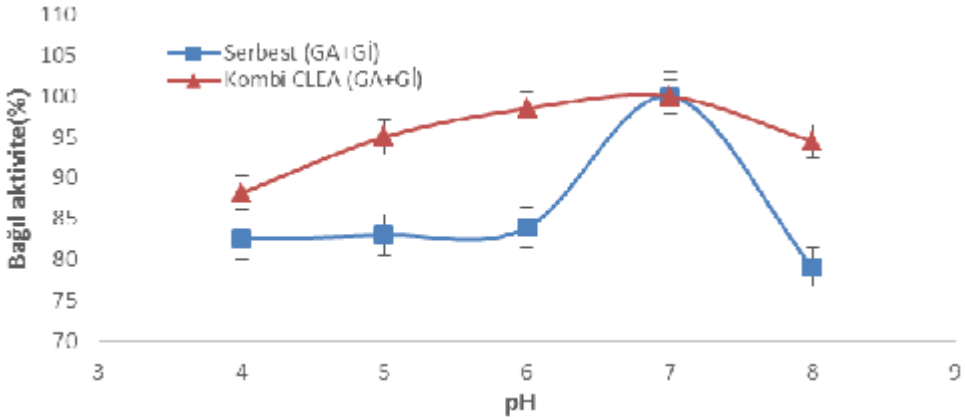


Şekil 4.19. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivitesinin tekrar kullanılmasına bağlı değişimi

4.1.4. Serbest (GA+Gİ) ile Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın Karşılaştırılması

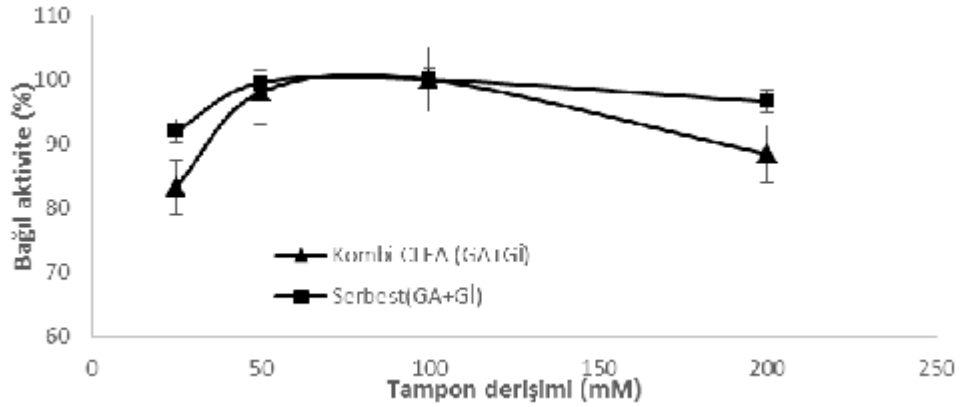
Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitelerinin gösterdiği optimum pH şekil 4.20'de gösterilmektedir. Serbest (GA+Gİ) ve CLEA

(GA+Gİ)'nın maksimum aktivite gösterdiği her ikisi için de pH 7 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitelerinin pH bağlı değişimi

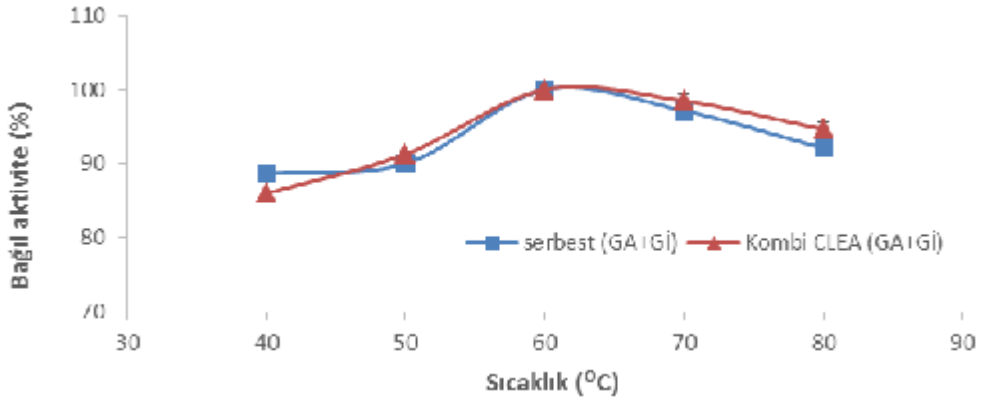
Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ)'nın pH 7,0'da hazırlanmış olan farklı derişimlerdeki tampon çözeltileri kullanılarak aktiviteleri belirlenmiş ve sonuçlar şekil 4.21'de verilmiştir. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ)'nın maksimum aktivite gösterdiği maksimum tampon derişimi 50 Mm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.21. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitelerinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi

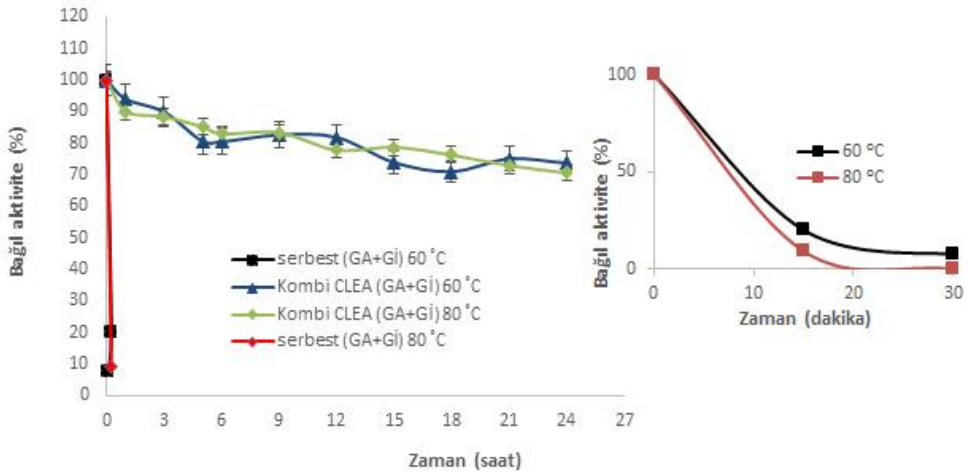
Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ)'nin farklı sıcaklıklardaki aktiviteleri % bağıl aktivite olarak şekil 4.22'de verilmektedir. Serbest (GA+Gİ) ile

kombi CLEA (GA+Gİ)'ın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60 ˚C olarak bulunmuştur.



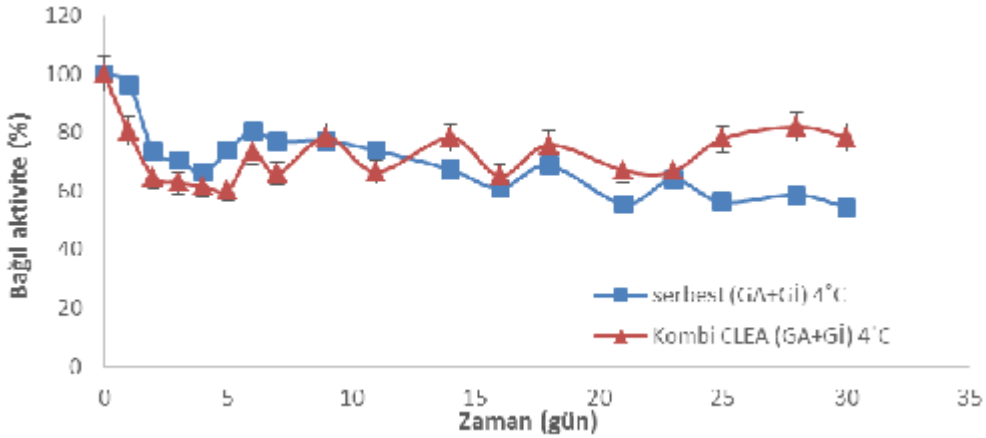
Şekil 4.22. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi

Serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'ın termal kararlılığı iki farklı sıcaklıkta (60 ve 80 ˚C) enzimin kalan aktivitesi zamana bağlı ölçülerek belirlenmiştir. Serbest (GA+Gİ) örneğinin 30 dakikada aktivitesinin tamamını kaybettiği görülmektedir. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın 60 ve 80 ˚C'de 24 saat inkübasyonu sonunda kalan aktiviteleri sırasıyla yaklaşık % 74 ve % 54'tür (şekil 4.23). Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın 60 ve 80 ˚C'lerdeki yarınlanma ömürleri sırasıyla 33,3 ve 21,5 saat iken serbest (GA+Gİ) 60 °C 7,6 dakika ve 80 °C ise 15 dakika sonra aktivite tamamen kayboldu.



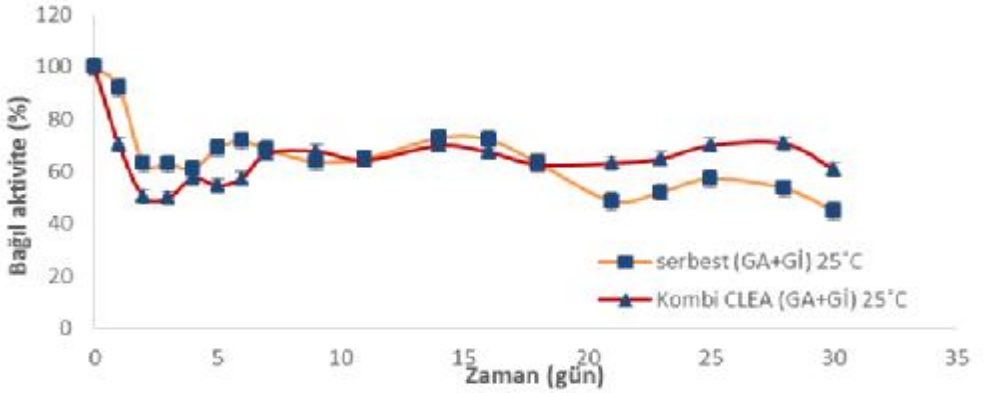
Şekil 4.23. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ)'nın termal kararlılığı

Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) ‘nın 4 ˚C’deki depolama kararlılığını belirlemek için örnekler 30 gün boyunca belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. 4 ˚C’de Serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ) başlangıç aktivitelerini sırasıyla %54 ve %78’ini koruyabilmiştir (şekil 4.24).



Şekil 4.24. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) ‘ın 4 ˚C’deki depolama kararlılığı

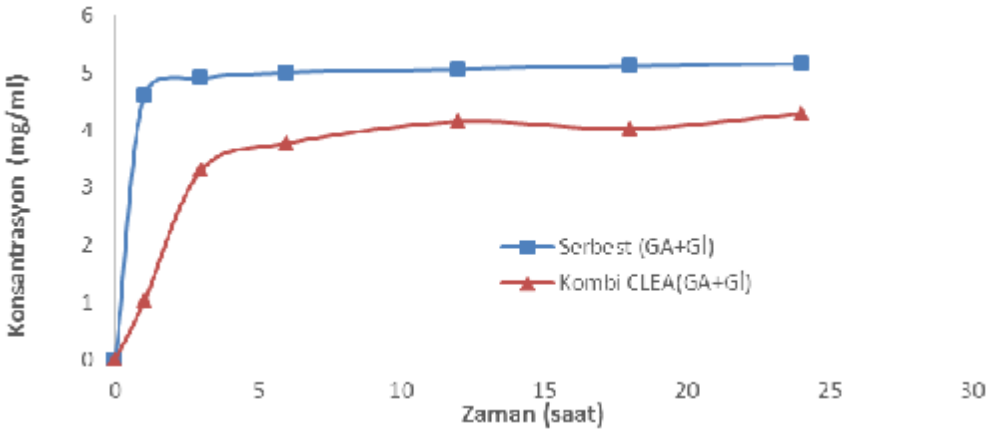
Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) ‘nın 25 ˚C’deki depolama kararlılığını belirlemek için örnekler 30 gün boyunca belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. 25 ˚C’de Serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ) başlangıç aktivitelerini sırasıyla %45 ve %60’ini koruyabilmiştir (şekil 4.25).



Şekil 4.25. Serbest (GA+Gİ) ile kombi CLEA (GA+Gİ) ‘ın 25 ^{O}C’deki depolama kararlılığı

4.1.5. Serbest (GA+Gİ) ve Kombi CLEA (GA+Gİ) ile Fruktoz Üretimi

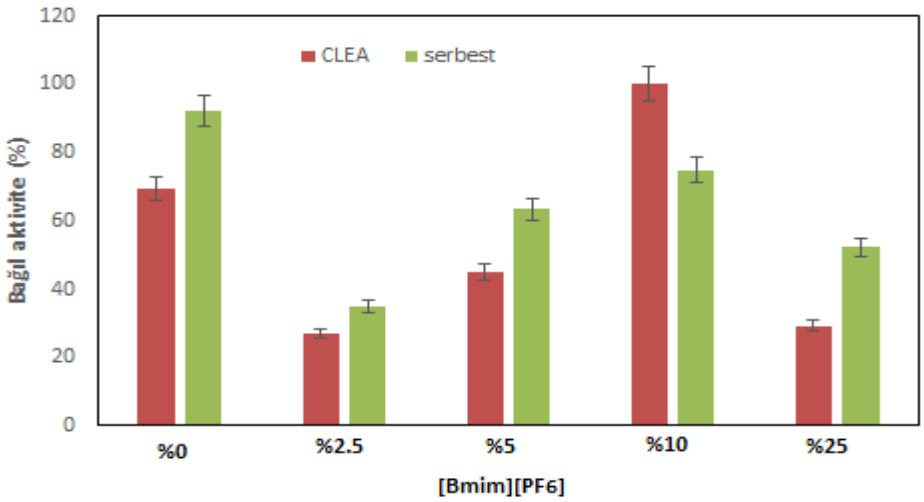
Serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın zamana bağlı fruktoz üretimi Şekil 4.26'da gösterilmiştir. 24 saat sonunda aynı miktarlarda hazırlanan Serbest (GA+Gİ), kombi CLEA (GA+Gİ)'a göre %20 daha fazla fruktoz ürettiği hesaplanmıştır.



Şekil 4.26. Serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ) ile fruktoz üretimini kıyaslanması

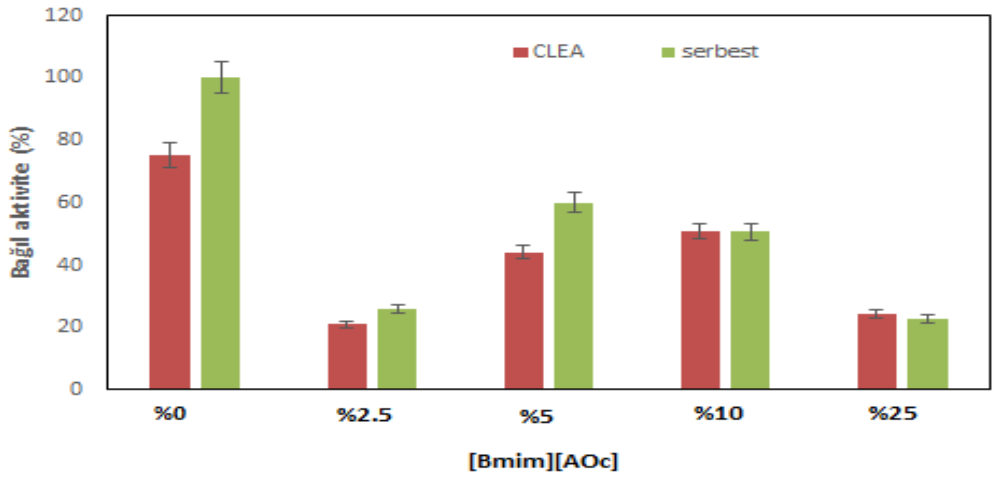
4.1.6. Kombi CLEA (GA+Gİ) ve Serbest (GA+Gİ)'ın Aktivite Değerlerinin İyonik Sıvı Ortamına Bağlı Olarak Değişimi

Hacimce % 0, 25, 5, 10 ve 25 [Bmim][PF_6] içeren tampon (100 mM, pH 7) kullanarak serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.27'de gösterilmiştir. Serbest ve kombi CLEA'nın maksimum aktivitesi hacimce %10 [Bmim][PF6] içeren tampon çözeltide bulunmuştur.



Şekil 4.27. Farklı oranlarda [Bmim][PF_6]/tampon ortamında serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivite değişimi

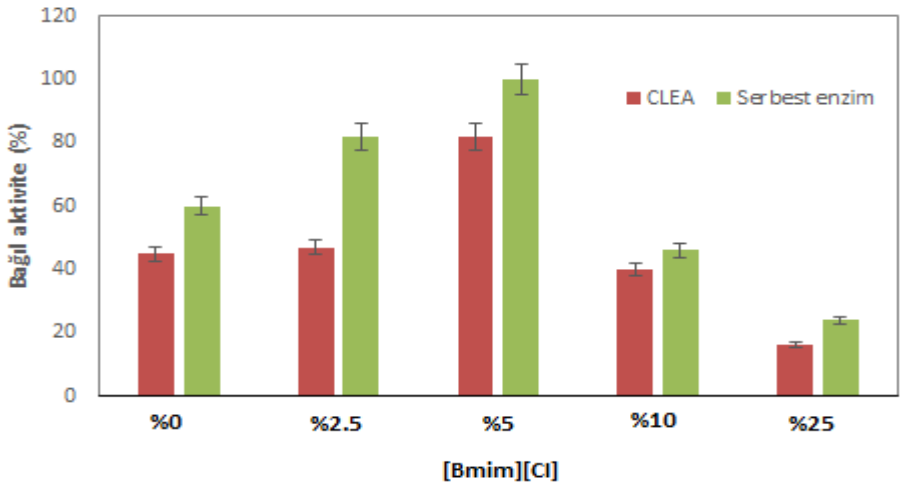
Hacimce % 0, 25, 5, 10 ve 25 [Bmim][OAc] içeren tampon (100 mM , pH 7) kullanarak serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nin bağıl aktivitesi belirlenmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.28'de gösterilmiştir. Serbest ve kombi CLEA'nın maksimum aktivitesi hacimce % 5 [Bmim][OAc] içeren tampon çözeltide bulunmuştur.



Şekil 4.28. Farklı oranlarda [Bmim][AOc]/tampon ortamında serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivite değişimi

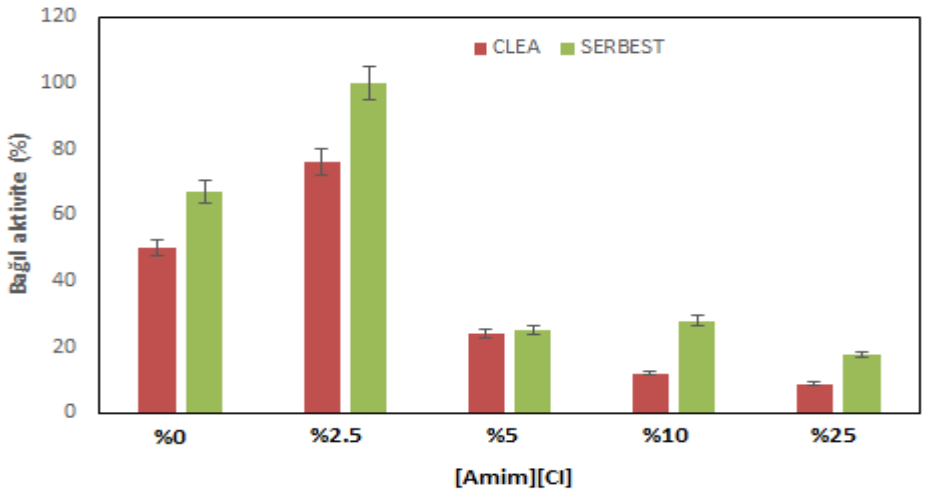
Hacimce % 0, 2,5, 5, 10 ve 25 [Bmim][CI] içeren tampon (100 mM , pH 7) kullanarak serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nin bağıl aktivitesi

hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.29'da gösterilmiştir. Serbest ve kombi CLEA'nın maksimum aktivitesi hacimce % 5 [Bmim][CI] içeren tampon çözeltide bulunmuştur.



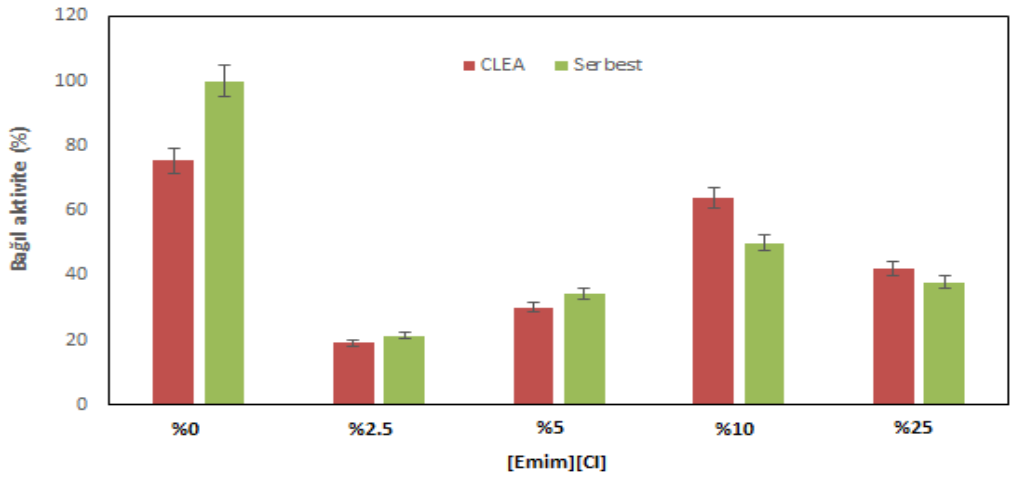
Şekil 4.29. Farklı oranlarda [Bmim][CI]/tampon ortamında serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivite değişimi

Hacimce % 0, 2,5, 5, 10 ve 25 [Amim][CI] içeren tampon (100 mM , pH 7) kullanarak serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.30'da gösterilmiştir. Serbest ve kombi CLEA'nın maksimum aktivitesi hacimce % 2,5 [Amim][CI] içeren tampon çözeltide bulunmuştur.



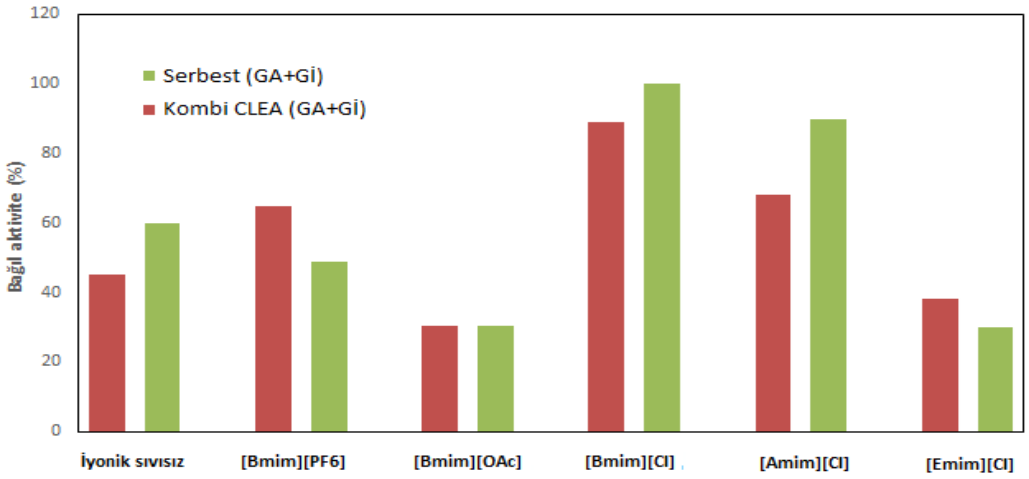
Şekil 4.30. Farklı oranlarda [Amim][CI]/tampon ortamında serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'ın aktivite değişimi

Hacimce % 0, 2,5, 5, 10 ve 25 [Emim][CI] içeren tampon (100 mM , pH 7) kullanarak serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.31'de gösterilmiştir. Serbest ve kombi CLEA'nın maksimum aktivitesi hacimce % 10 [Emim][CI] içeren tampon çözeltide bulunmuştur.



Şekil 4.31. Farklı oranlarda [Emim][CI]/tampon ortamında serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'ın aktivite değişimi

Serbest (GA+Gİ) ve kombi (GA+Gİ)'nin çeşitli iyonik sıvılarda aktivite çalışmaları yapılmıştır. [Bmim] [PF_6], [Bmim] [OAc], [Bmim] [CI], [Amim] [CI], ([Emim] [CI] ve [Dmim] [CI] iyonık sıvılar kullanarak kullanarak serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.32'de gösterilmiştir. Serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nin maksimum aktivitesi gösterdiği iyonik sıvı [Bmim][CI] bulunmuş fakat [Dmim][CI] iyonik sıvıda ise hiç aktivite göstermediği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.32. Farklı iyonik sıvılarda serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivite değişimi

4.1.7. Poliglutaraldehit Kullanarak GA ve Gİ'nin Kombi CLEA ile İmmobilizasyonu

Farklı pH'larda (8 ve 9) elde edilen Poliglutaraldehit kullanarak GA ve Gİ'ı kombi CLEA immobilizasyon denemeleri yapılmıştır. İmmobilize enzim aktiviteleri çok düşük olması ve tekrarlılığın olmamasından dolayı ileriki deneysel aşamaları yapılmasını uygun bulunmadı.

4.1.8. MNP Kullanarak GA ve Gİ' Ko-immobilizasyonu

Epiklorohidrin ve glutaraldehit ile aktifleştirilmiş MNP kullanarak GA ve Gİ enzimlerinin ko-immobilizasyon denemeleri yapılmıştır. İmmobilize enzim aktiviteleri çok düşük olması ve tekrarlılığın olmamasından dolayı ileriki deneysel aşamaları yapılmasını uygun bulunmamıştır.

4.2. Tartışma

GA nişastayı hidroliz edilerek glukoz açığa çıkarırken, Gİ glukozu fruktoza dönüştürür. Yüksek fruktoz şurubu (HFS) için bu iki enzim gereklidir. Sanayide HFS

üretimi farklı reaksiyon koşullarında ve üç ayrı aşamada elde edilir. Bu çalışmada GA ve GI enzimleri ko- immobilize edilerek 3 aşamada olan HFS üretimi tek basamağa indirilmiştir.

GA ve Gİ ile beraber immobilizasyonu ile ilgili literatürde iki çalışma mevcuttur (Schafhauser ve Storey, 1992; Ge ve ark., 1999). Bu iki literatür çalışmasında koşulların nasıl belirlendiği konusunda tam bir bilgi verilmemiştir. Bu çalışmada, GA ve Gİ enzimleri çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) ile beraber immobilize edilmiştir. Bu iki enzimin kombi CLEA olarak immobilize edilmesi daha önce kullanılan yöntemlere göre birçok avantajı sağlar. Kombi CLEA'nın hazırlanmasının kolay olması, tek bir işlemde yapılabilmesi ve endüstriyel uygulamalarda zamandan ve maliyetten kazanç sağlaması gibi birkaç önemli avantaja sahiptir.

Ko-immobilizasyon çalışmalarında en büyük engel immobilizasyon koşullarının kullanılan enzimler için farklı olmasıdır. Bu çalışmada karşılaşılan en büyük problem GA ve GI'ın farklı pH'larda aktivite göstermesi ve GI için kofaktör olan maddenin GA için inhibisyon etkisi yapması olmuştur. Glukoz izomeraz için kofaktör olarak kullanılan magnezyumun, glukoamilaz aktivitesine inhibisyon etki yaptığı bildirilmiştir (Schafhauser ve Storey,1992). GA ve Gİ'ın optimum pH'ları fruktoz üretimine güçlü bir şekilde etki etmektedir. Kombi CLEA ile yapılan çalışmada düşük pH'larda glukoz üretimi artarken glukozun fruktoza dönüşümü azalmaktadır. Bunun nedeni ise düşük pH'larda Gİ'ın aktivitesinin azalmasıdır. Serbest GA, Gİ ve kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi sırasıyla şekil 4.1, 4.6 ve 4.14 gösterilmiştir. Serbest GA, Gİ ve kombi CLEA (GA+Gİ) için optimum pH sırasıyla 4,5, 7,5 ve 7,0 olarak bulunmuştur. Ge ve ark., (1999), büyük gözenekli trimetilamin polistiren boncukları destek materyali kullanarak yaptığı immobilizasyon çalışmada serbest GA, Gİ ve ko-immobilize GA ve Gİ için optimum pH'yı sırasıyla 4,5, 7,5 ve 6,0 olarak bildirmişlerdir. Katwa ve Rao (1983), alfa amilaz, GA ve Gİ enzimlerini ayrı ayrı ve birlikte CNBr ile aktileştirilişmiş sefaroz 6MB üzerine kovalent olarak immobilize etmişler ve alfa amilaz, GA, Gİ ve ko-immoblize (alfa amilaz+GA+Gİ) optimum pH sırasıyla 6,4, 6,4, 7,2 ve 6,0 olduğunu bildirmişler.

Farklı tampon derişimlerinin (25-500 mM) serbest Gİ, serbest GA, kombi (GA+Gİ) ve serbest (GA+Gİ)'nin aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiştir. Serbest Gİ'nin maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimi 400 mM (Şekil 4.7), serbest (GA+Gİ), GA ve kombi (GA+Gİ)'nin maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimi ise 50 mM (şekil 4.2 ve 4.21) olarak hesaplanmıştır. Literatürde tampon derişiminin kombi CLEA (GA+Gİ)'nın aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım potansiyellerinin yüksek olması ekonomik açıdan sanayide en büyük avantajlardan birisidir. Optimum koşullarda kombi CLEA (GA+Gİ)'ın 20 kullanımdan sonra kalan aktivitesi başlangıç aktivitesinin % 23'dür (Şekil 4.19). Daha önceki çalışmalarda kombi CLEA (GA+Gİ)'nin tekrar kullanılması ile ilgili verilere rastlanmamıştır.

Ko-immobilzasyon çalışmlarında birden fazla enzim kullanıldığı için kullanılan enzimlerin başlangıç miktarları büyük önem taşımaktadır. Bunun için farklı miktarlarda GA ve Gİ enzimleri kullanılarak immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. En uygun enzim başlangıç miktarı GA ve Gİ için sırasıyla 8 ve 64 mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Serbest GA, Gİ ve kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri sırasıyla şekil 4.3, 4.8 ve 4.16'da gösterilmiştir. Şekillerde görüldüğü gibi optimum sıcaklıklar sırasıyla 55, 60 ve 60˚C olarak belirlenmiştir. Ge ve ark., (1999), büyük gözenekli trimetilamin polistiren boncuklara beraber immobilize ettikleri GA ve Gİ için optimum sıcaklığı 65˚C olarak bildirmişlerdir. Katwa ve Rao (1983), CNBr ile aktive edilen sefaroz 6MB ile beraber immobilize ettikleri alfa amilaz, GA ve Gİ için optimum sıcaklıkları 60˚C olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada serbest (GA+Gİ) kullanarak elde edilen fruktoz miktarının, kombi CLEA (GA+Gİ)'ya göre %20 daha fazla olduğu hesaplanmıştır (şekil 4.26). Ge ve arkdaşları (1999) GA ve Gİ enzimlerini trimetilamin polisitren boncukları kullanarak adsorplama yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Bu çalışmada immobilize enzim kullanarak elde edilen fruktoz miktarının serbest enzimlere göre yaklaşık iki kat fazla olduğunu bildirmişlerdir. Kombi CLEA (GA+Gİ) yöntemi ile yapılan immobilizasyon çalışmasında elde edilen fruktoz miktarının adsorpsiyon yöntemine

göre daha düşük çıkmasının nedeni kombi CLEA çalışmalarında sıralı immobilizasyon işlemler için uygun olmamasıdır. Eğer önce GA'yı pH 4,5'da immobilize edip daha sonra pH 7,5'da Gİ immobilize edilirse bu sorunun giderilmesi mümkün olabilecektir.

Enzimlerin kararlı olması biyokatalitik işlemlerde çok istenilen özeliklerden biridir. Serbest GA, Gİ ve kombi CLEA(GA+Gİ)'nın 1 ay boyunca 4 ve 25 ˚C'deki depolama kararlılıkları sırasıyla şekil 4.5, 4.10 ve 4.18'de gösterilmiştir.

Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın depolama kararlılığı serbest enzim karışımına (GA+Gİ) göre daha yüksek çıkmıştır (şekil 4.24 ve 4.25). Daha önceki çalışmalarda kombi (GA+Gİ) immobilizasyon çalışmalarında depolama kararlılığı ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Şekil 4.23'te serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nin farklı sıcaklıklarda (60 ve 80 ˚C) inkübasyon süresi ile kalan aktiviteleri gösterilmektedir. 60 ˚C'de serbest (GA+Gİ) 30 dakikada aktivitesinin tamamını kaybederken kombi CLEA (GA+Gİ) ise 24 dakika sonunda aktivitesinin %74'nü korumuştur. 80˚C'de serbest (GA+Gİ) 20 dakikada aktivitesinin tamamını kaybederken kombi CLEA (GA+Gİ) ise 24 dakika sonunda aktivitesinin %54'ünü korumuştur. Daha önceki GA ve Gİ ile beraber yapılan immobilizasyon çalışmalarında termal kararlılıkla ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

İmmobilizasyon çalışmalarında immobilize edilen enzimin serbest enzime göre sıcaklıkla yarılanma ömrünün uzaması en istendik özeliklerinden biridir. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın 60 ve 80 ^{O}C'deki yarılanma ömürleri sırasıyla 33.3 ve 21.5 saatir. Serbest (GA+Gİ) sıcaklık yarılanma ömürleri 60 ^{O}C'de 7.6 dakika ve 80 ^{O}C'de ise 15 dakika sonra enzim aktivitenin tamamını kaybetmiştir. Yaptığımız bu çalışmada GA ve Gİ, kombi CLEA (GA+Gİ) olarak immobilize edilerek enzimlerin sıcaklıkla yarılanma ömürleri uzatılmıştır.

Nişasta ucuz ve yenilebilir bir hammadde olduğu için sanayide kimyasal, ilaç ve gıda gibi birçok kullanım alanı vardır. Ancak zor çözünen bir madde olduğundan kullanımında bazı problemlere neden olmaktadır. Bu problemlerin üstesinde gelmek için son zamanlarda iyonik sıvılar kullanılmaktadır (Biswas ve ark. 2006; Xu ve ark., 2006; Lehmann, ve Volkert, 2009; Xie, ve ark..2010; Wang ve Xie, 2010). İyonik

sıvılar nişastanın yarı kristal yapısını yıktığı ((Xie ve ark., 2010) ve karbonhidratın hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağları bozduğu (Stevenson ve ark., 2007) için nişastanın çözünürlüğünü artırmaktadır. Bu sayede çözünmüş nişasta ile GA enziminin etkilişimi artmaktadır. Bu çalışmada da iyonik sıvıların tampon çözletiye göre nişastayı daha iyi çözmüş olduğu gözlemlenmiştir. (şekil 4.27, 4.29, ve 4.30).

Daha önceki çalışmalarda iyonik sıvı ile nişastayı çözme, yumuşatma ve modifiye etme çalışmaları mevcuttur (Bismas ve ark. 2006; Xu ve ark., 2006; Lehmann, ve Volkert, 2009; Xie, ve ark..2010; Wang ve Xie 2010; Shogren ve Biswas 2010.) Bu çalışmalarda nişastayı çözmek için iyonik sıvının yanında asetik anhidrit, pridin gibi kimyasallar kullanıp nişastanın kimyasal yapısını değiştirmişlerdir. Bu çalışmada ise nişastanın kimyasal yapısını değiştirmeden sadece iyonik sıvı kullanarak nişastanın çözünürlüğü artırılmıştır (şekil 4.32).

Nişastanın molekül yapısından dolayı çözünürleştirilmesinde bazı güçlüklerle karşılaşılmaktadır. Bu yüzden çözününürlüğü artırmak için bazı yöntemlere başvurulmaktadır. Bu yöntemlerden bir tanesi de nişasta çözeltisi hazırlanırken iyonik sıvıların kullanılmasıdır. Bu amaçla deneysel aşamada farklı iyonik sıvılar kullanarak nişasta çözeltileri hazırlanmıştır. İyonik sıvılar kullanarak hazırlana nişasta çözeltileri kullanarak aktivite tayini yapılmıştır. Nişastanın çözünürlüğünü artırmak için kullandığımız iyonik sıvılar içersinde serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın göreceli aktivitesi sırasıyla [Bmim][CI], [Amim][CI], [Bmim][PF6], [Emim][CI], [Bmim][OAC] ve [Dmim][CI]'dır. [Dmim][CI]'de aktivite gözlenememiştir ve bunun sebebi olarak anyonlar ve alkil zincirinin uzunluğundan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Swatloski ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada imidazolyum içindeki alkil zincirinin uzunluğu selülozun çözünürlüğünü azalttığını rapor etmişlerdir.

GA ve Gİ MNP'e glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimlerinin aktiviteleri çok düşük olmasından dolayı ileriki deneysel aşamalar için uygun olmadığını belirlenmiştir

Çapraz bağlayıcı PGL kullanarak kombi CLEA (GA+Gİ) elde edilmiştir. PGL kullanarak elde edilen kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitesinin glutaraldehit ile elde edilenlere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. PGL çapraz bağlanmaya

katılan fonksiyonel grup sayısının glutaralaldehite göre az ve molekül büyüklüğü glutaralaldehite göre daha büyüktür. Bundan dolayı enzimlerin immobilizasyon işleminden sonra aktivite kaybettiği düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. İmmobilizasyon koşulları optimize edilerek kombi CLEA (GA+Gİ) örnekleri hazırlanmıştır. Optimum amonyum sülfat derişimi ve glutaraldehit derişimi sırasıyla % 60 ve %25 olarak belirlenmiştir. En yüksek kombi CLEA (GA+Gİ) aktivitesinin elde edildiği immobilizasyon süresi 5 saat olarak belirlenmiştir.
2. Serbest GA, Gİ ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın immobilizasyon koşulları arasında en uygun sıcaklık sırasıyla 55, 60 ve 60 ˚C olarak belirlenmiştir.
3. Serbest GA, Gİ ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nın immobilizasyon koşulları arasında en uygun pH değerleri sırasıyla 4,5, 7.5, 7.0 olarak belirlenmiştir.
4. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nin hem 5 ˚C 'de hemde 25 ˚C'de serbest (GA+Gİ)'a göre depolama kararlılığı daha yüksek olduğu belirlenmiştir.
5. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nin optimum koşullarda 20 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %23'ünü koruduğu belirlenmiştir.
6. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nin farklı sıcaklıklarda (60 ve 80 ˚C) termal kararlılığı serbest (GA+Gİ) göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Serbest (GA+Gİ) 30 dakikada 60 ve 80 ˚C aktivitesin tamamını kaybettiğini görülmektedir. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nın 60 ve 80 ˚C'lerdeki 24 saat inkübasyon sonunda kalan aktivitesi sırasıyla yaklaşık % 74 ve % 54'tür.
7. Serbest (GA+Gİ) ve kombi CLEA (GA+Gİ)'nin maksimum aktivite gösterdiği iyonik sıvı [Bmim][CI] olarak belirlenmiştir, [Dmim][CI] ise enzimlerin hiç aktivite göstermediği gözlemlenmiştir.
8. Kombi CLEA (GA+Gİ)'nin 60 ve 80 ˚C yarılanma ömürleri sırasıyla 33,3 ve 21,5 saat olarak belirlenmiştir. Serbest (GA+Gİ)'nın 60 ˚C'de yarılanma ömrü 7,6 dakika, 80 ˚C'de ise 15 dakika sonra aktivitenin tamamını kaybettiğini belirlenmiştir.
9. Poli glutaraldehitin kombi CLEA (GA+Gİ) immobilizasyonu için uygun olmadığını belirlenmiştir.

10. GA ve Gİ'nın MNP'e glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonun gerçekleşmediği belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

1. GA ve Gİ ko-immobilizasyon için farklı immobilizasyon teknikleri denenebilir.
2. Bu araştırmaya paralel olarak manyetik kombi CLEA (GA+Gİ) denenmesi önerilmektedir.
3. Bir enzimin ürünü başka bir enzim için substrat ise, bu enzimlerin immobilizasyon için kombi CLEA önerilmektedir.
4. Aseton, izo-propanol, metanol, etanol, t-bütanol, 1,2- dimetoksietan, PEG, asetonitril vb. çöktürücüler kullanılarak, çöktürücülerin CLEA aktivitesi üzerindeki etkisi incelenebilir.
5. Farklı çapraz bağlayıcılar (paraformaldehit, dekstran, polialdehit, polimerik dialdehitler gibi) kullanarak CLEA aktivitesi üzerinde çapraz bağlayıcıların etkisi incelenebilir.

KAYNAKLAR

ABRAHAM, T. E., JOSEPH, E. R., BİNDHU L. B.V., JAYAKUMAR, K. K., 2004. Crosslinked Enzyme Crystals of Glucoamylase as a Potent Catalyst for Biotransformations. Carbohydrate Research, 339, 1099–1104

ALAGÖZ, D., 2007. B- galaktosidaz ve Glukoz İzomeraz'ın Eupergit Desteğe Kovalent İmmobilizasyonu ve İmmobilize Enzimlerin Laktoz Hidrolizi ve Glukoz izomerazisyonda Kullanılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Ünv., Fen Bilimler Enstitüsü.

ALPTEKIN, Ö., TÜKEL, S. S., YILDIRIM, D., ALAGÖZ, D., 2009. Characterization and Properties of Catalase Immobilized onto Controlled Pore Glass and Its Application in Batch and Plug-Flow Type Reactors. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58, 124-131.

ANON, 1979. New Applications Expand HFCS Markets Increase Demand and Tighten Supplies, Food Product Development, 13, 12, 38.

ANON, 1993. Multifunctional Sweeteners, Baking and Snack., 15, 4, 31-34.

ANONYMOUS, 1988. "Handbook of Amylases and Related Enzymes", Edited by the Amylase Research Society of Japan, Permagan Press Oxford,. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 157-162.

ARİCA,Y. M., GÜRDAL, N., ALAEDDINOĞLU, T., HASIRCI, V., 1998. Immobilization of Glucoamylase onto Activated pHEMA/EGDMA Microspheres: Properties and Application to a Packed-Bed Reactor. Enzyme and Microbial Technology 22, 152-157

ARMSTRONG, D. W., ZHANG, L., HE, L., GROSS, M. L. 2001. Anal. Chem., 73, 3679-3686.

ASHLY, P. C., MOHANAN, P. V., 2010. Preparation and Characterization of Rhizopus Amyloglucosidase Immobilized on Poly(o-toluidine). Process Biochemistry, Process Biochemistry 45, 1422–1426

AUTUMN, K., 2009. How gecko toes stick, American Scientist, 94, 124-132.

AXEN, R., DREVIN, H., CARLSSON, J., 1975. Preparation of Modified Agarose Gels Containing Thiol Groups. Acta Chemica Scandinavica B., 29, 471-474.

BAI, Y. X., LI, Y. F., WANG, M. T., 2006. Study on Synthesis of a Hydrophilic Bead Carrier Containing Epoxy Groups and Its Properties for Glucoamylase Immobilization. Enzyme and Microbial Technology 39, 540–547.

BHOSALE, S. H., RAO, M. B., DESHPANDE, V. V., 1996. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase, Microbiol. Rev., 60, 280-300.

BILGIN, R.,YALÇIN, M.S.,YILDIRIM, D., 2015. Optimization of Covalent Immobilization of Trichoderma Reesei Cellulase onto Modified ReliZyme HA403 and Sepabeads EC-EP Supports for Cellulose Hydrolysis in Buffer and Ionic Liquids/Buffer Media. Artificial cells, Nanomedicine and biotechnology, DOI:10.3109/21691401.2015.1024842

BISWAS, A., SHOGREN, R. L., STEVENSON, D. G., WILLETT, J. L., BHOWMIK, P. K., 2006. Carbohydr. Polym., 66, 546–550.

BORATYNSKI, J., ZAL, T., 1990. Colorimetric Micro Methods for Glutaraldehyde Determination by Means Phenol and Sulfuric Acid or Perchloric Acid. Analytic Biochemistry, 184, 259-262.

BRADFORD,M. M.,1976. Anal biochem., 72, 248.

BRYJAK, J. 2003. Glucoamylase, α-amylase and β-amylase İmmobilisation on Acrylic Carriers. Biochemical Engineering Journal., 16, 347-355.

BUCKE, C., 1983. Glucose Transfoming Enzymes, Applied Science Publishers, London, 93-127.

CABRAL, J. M. S., NOVAIS, J. M., KENNEDY J. F. 1986. Immobilization Studies of Whole Microbial Cells on Transition Metal Activated Inorganic Supports.

CABRAL, J.M.S., KENNEDY, J. F., 1991. Covalent and Coordination Immobilization of Proteins. In: Protein immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, 73–138.

CALLENS, M., KERSTERS-HILDERSON H., VANGRYSPERRE, W., DE BRUYNE, C. K., 1988. D-Xylose İsomerase from *Streptomyces Violaceoruber*: Structural and Catalytic Roles of Bivalent Metal Ġons, Enzyme Microb. Technol, 10, 695-700.

CALLENS, M., KERSTERS-HILDERSON, H., VAN OPSTAL, O., DE BRUYNE, C. K., 1986. Catalytic Properties of D-Xylose Isomerase from *Streptomyces Violaceoruber*. Enzyme Microb. Technol, 8:696-700.

CAO, L., 2005. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kgaa, Weinheim.

CAO, L., 2006, Carrier-bound Immobilized Enzymes Principles, Applications, andDesign, Wiley-VCH, The Netherlands

CAO, L., LANGEN, L. V., SHELDON, R. A., 2003. Immobilised Enzyme: Carrier-bound or Carrier-free?. Current Opinion in Biotech., 14, 387- 394

ÇETİN, E. T., 1983. Endüstriyel Mikrobiyoloji, .Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı,

CHAING, L. C., HSIAO, H. Y., UENG, P. P., CHEN, L. F., TSAO, G. T., 1981.Ethanol Production from Xylose by Enzymic Isomerisation and Yeast Fermentation, Biotechnol. Bioeng. Symp., 11, 263–274.

CHEN, W. P., 1980. Glucose Isomerase Process Biochemistry, Chen, W.P., Proc. Biochem., 30-35.

CHO, S.W., RHEE, J.S., 1993. Immobilization of Lipase for Effective Interestification of Fats and Oils in Organic Solvents. Biotechnology and Bioengineering, 41,204-210.

CLARKE, A. J., SVENSSON, B., 1984. Identification of an Essential Tryptophanyl Residue in the Primary Structure of Glucoamylase G2 from Aspergillus Niger. Carlsberg Research Communications.,. 49, 559-566

COLLYER, C. A., BLOW, D. M., 1990. Observations of Reaction Intermediates and The Mechanism of Aldose-Ketose Ġnterconversion by D-Xylose Ġsomerase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87,1362-1366.

CONVERTI, A., DEL BORGHI M., 1997. Simultaneous Effects of Immobilization and Substrate Protection on the Thermodynamics of Glucose Isomerase Activity and Inactivation. Enzyme and Microbial Technology, 21, 511–517

COUTINHO, P. M., REILLY, P. J., 1997. Glucoamylase Structural, Functional, and Evolutionary Relationships. Proteins; Structure, Function, and Genetics 29: 334-347.CRA, 1994. Corn Refining, the Process, the Products, Corn Refiners Association Inc.

COUTINHO, P.,M., REILLY, P. J., 1994. Glucoamylase Structure: Insight for Protein Engineering. http://nte-serveur.univ.

CRABB, W. D., SHETTY, J. K., 1999. Commodity Scale Production of Sugars from Starches. Design, Wiley-VCH, The Netherlands Ecology and Industrial Microbiology, 2, 252-256.

DUPONT, J., SUAREZB, P. A. Z., 2006. Physico-Chemical Processes in Imidazolium İonic liquids. Phys. Chem. Chem. Phys., 21 (8): 2441-2452.477.

ENDROS, F., S. Z. E. ABEDIN,S., Z., E., 2006. Air and Water Stable ionic Liquids in Physical Chemistry, Phys. Chem. Chem. Phys., 8, 2101-2116.

FOGARTY, W. M., BENSON, C. P., 1983. Purification and Properties of a Thermophilic Amyloglucosidase from *Aspergillus Niger*. Applied Microbiology and Biotechnology, 18(5), 271-278.

GAIKWAD, S. M., RAO, M., DESHPANDE V. V., 1992. Structure-Function Relationship of Glucose/Xylose Isomerase from *Streptomyces*: Evidence for The Occurence of Ġnactive Dimer, Enzyme Microb. TECHNOL., 15,155-157.

GE, T., WANG, Y., ZHOU, H., WANG, S., TONG, Y., LI, W., 1999. Coimmobilization of Glucoamylase and Glucose Isomerase by Molecular Deposition Technique for One-step Conversion of Dextrin to Fructose. Journal of Biotech nology 67, 33–40

GENÇER, G. M., 2014. Antibakteriyel Özelik Taşıyan Pirolidin Bazlı İyonik Sıvıların Sentezi. Yüksek lisans tezi. Akdeniz Üniversitesi,

GÜLEŞCI, N., 2013. Üreaz Enziminin Manyetik Nanopartiküllere Farklı Ara Kollar Üzerine İmmobilizasyonu ve Karekterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, doktora tezi.

HEBEDA, R. E., 1987. Corn Sweeteners. In: Watson, S.A. and Ramstad, P.E. (eds) "Corn Chemistry and Technology", AACC, Inc. St. Paul, MN., 501-534.

HENRY, E. R., 1976. High Fructose Corn Syrup: New Sweetener for the Baker., Baker's Digest., 50, 2, 25.

HOBBS, L.,1986. Corn Syrups, Cereal Foods World., 31, 12, 852, 854, 856, 858.

HOUGH, W. L., SMIGLAK, M., RODRİGUEZ, H., SWATLOSKİ, P. R., SPEAR, S. K.,DALY, D. T., PERNAK, J., GRISEL, J. E., CALISS, R. D., SOUTULLO,

HOWLING, D., 1992. Glucose Syrup:Production, Properties and Applications. In: Schenck, F.W. and R.E. Hebeda (Eds), "Starch Hydrolysis Products", VCH Publ. Inc. New York, 277-316.

INGLETT, G. E., 1974. Sweeteners., Westport, Connecticut, The AVI Publ. Co., 240.

JAFARI-AGHDAM, J., KHAJEH, K., RANJBAR, B., NEMAT-GORGAN, M., 2005. Deglycosylation of Glucoamylase from *Aspergillus Niger*: Effects on Structure, Activity and stability. Biochimica et Biophysica Acta 1750: 61-68.

JAMES, J.A., SIMPSON, B. K., 1996. Application of Enzymes in Food Processing. Critical Review in Food Science and Nutrition.,36(5), 437-463.

JOHNSON, J. M., HARRIS, C. H., BARBEAU, W. E., 1989. Effects of HFCS Replacement for Sucrose on Browning, Starch Gelatinization and Sensory Characteristics of Cakes., Cereal Chem., 66(3) 155 - 157.

JUGE, N., LEGAL-COËFFET, M. F., FURNISS, C. S. M., GUNNING, A. P., KRAMHOFT, B., MORRIS, V. J., WILLIAMSON, G., SVENSSON, B. 2002. The Starch Binding Domain of Glucoamylase from *Aspergillus Niger*: Overview of İts Structure, Function, and Role in Raw-Starch Hydrolysis. Biologia, Bratislava, 57/Suppl. 11, 239-245.

KARACA, N., 2006. Poli (N,N-Dimetilakrilamit-Ko-Akrilamit) ve Poli (N-İzopropilakrilam_T-Ko-Akrilamit) / Karragenan Polimerler Kullanılarak Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,

KARAOĞLU, H., 2010. Anoxybacillus Gonensis Glukoz Ġzomerazının Genetik Manipulasyonlarla Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Geliştirilmesi. Doktora Tezi, K. T. Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

KATWA, L. C.,. RAGHAVENDRA RAO, M. R., 1983. İmmobilization of Alfa Amylase Glucoamylase and Glucose İsomerase on CNBR Activated Sepharose-6 MB. Technology Letters, 5 (3) 191-196

KENNEDY, J. F., CABRAL, J. M. S., 1985. Immobilization of Biocatalysts by Metallink/ Chelation Processes. In: Immobilized Cells and Enzymes, (Woodward, J., ed.), IRL, pp 19–37, Oxford, UK.

KIRK, O., BORCHERT, T. V., FUGLSANG, C. C., 2002. Industrial Enzyme Applications, Curr. Opin. Biotechnol., 13, 345-351.

KODOU, M., KUBOTA, Y., NAKASHIMA, N., OKAZAKI, F., NAKASHIMA K., OGINA, C., KONDO, A., 2014. Improvement of Enzymatic Activity of β-glucosidase from *Thermotogamaritima* by 1-Butyl-3-methylimidazolium Acetate. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 104, 17–22

KÖK, S., 2009. Glukoamilaz Enziminin Metal-Şelat Afinite Yöntemi ile Poli (etilen Glikol Dimetakrilat 1-vinil-1,2,4-triazol) MikrokürelerÜzerine İmmobilizas-yonu. Uludağ Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.

KOKORIN, A., 2011. Ionic Liquids: Applications and Perspectives. In: A. Kokorin (Editor) N.Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow. , 3-734,

KOVALEVSKY, A. Y., HANSON, L., FISHER, S. Z., MUSTYAKIMOV, M., MASON, S. A., FORSYTH, V. T., BLAKELEY, M. P., KEEN, D. A., WAGNER, T., CARRELL, H. L., KATZ, A. K., GLUSKER, J. P., LANGAN, P., 2010. Metal Ion Roles and the Movement of Hydrogen During Reaction Catalyzed by D-xylose Isomerase: A Joint X-ray and Neutron Diffraction Study. Structure, 18, 688-699.

KRAJEWSKA, B., 2004. Enzyme Microb. Technol., 35, 126.

KULP, K., LORENZ, J. K., STONE, M., 1991. Functionality of Carbohydrate Ingredients in Bakery Products. Food Technology, 45, 3, 136, 138-140, 142.

LANG, Q., YİN, L., SHİ, J., LI, L., XİA, L., LIU, A., 2014. Co-immobilization of Glucoamylase and Glucoseoxidase for Electrochemical sequential Enzyme Electrode for Starch Biosensor and Biofuelcell. Biosensors and Bioelectronics 51:158–163.

LEE, B. H., 1991. Bioconversion of Starch Wastes. In Bioconversion of Waste Materials to Industrial products. (A.M. Martin, ed.) p., Elsevier Science Pub-lishing Company., sayfa 265-291

LEE, B. S., CHI, Y. S., LEE, J. K., CHOI, I. S., SONG, C. E., NAMGOONG, S. K., LEE, S., 2004. Imidazolium Ion-Terminated Self-Assembled Monolayers on Au: Effects of Counteranions on Surface Wettability. Journal Of American Chemical Society, 126 (2): 480-481.

LEHMANN, A., VOLKERT, B., 2009. Investigations on Esterification Reactions of Starches in 1-n-Buthyl-3-Methylimidazolium Chloride and Resulting Substituent Distribution. Journal of Applied Polymer Science, 114, 369–376

LI, S., HU, J., LIU, B., 2004. BioSystems, 77, 25

LINKO, Y.Y., WU, X.Y., 1993. Improvement and Estimation of Enzymic Starch Saccharification Process. Biotechnology Techniques., vol. 7, p. 551-556.Liu,

LIU, X.M., FU, S.Y., HUANG, C.J., J. 2004. Magn. Magn. Mater., 281, 234.

LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J., 1951.Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193:265–275.

M. D., DAVIS, J. J., ROGERS, R. D., 2007. The Third Evolution of İonic Liquids: Active Pharmaceutical Ingredients, New J. Chem., 31,1429-1436.

MAHESHWARI, R., BHARADWAJ, G., BHAT, M. K., 2000. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64, (3) 461-488.

MANOHAR, R. S., RAO, P. H., 1997. Effects of Sugars on the Rheological Characteristics of Biscuit Dough and Quality of Biscuits, Journal of the Science of Food and Agriculture, 75, 383-390.

MARGEL , S., REMBAUM, A., 1980. Synthesis and Characterization of Poly(glutaraldehyde). A Potential Reagent for Protein Immobilization and Cell Separation. Macromolecules, 13, 19-24

MARSHALL, R. O., KOOI, E. R., 1957. Enzymatic Conversion of D-glucose to D-fructose, Science, 125, 648–649.

MATEO, C., PALOMO, J. M., LANGEN, L. M., RANTWIJK, F., SHELDON, R. A., 2004. A New, Mild Cross-linking Methodology to Prepare Cross-linked Enzyme Aggregates. Biotechnology and Bioengineering, 86:273-276.

MILLER, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem., 31 (3), 426-428.

MOSES, V., CAPE, R. E., 1994. Biotechnology, Harwood Academic Publishers, USA, 100,113.

NABORS, L. O., GELARDI, C. R., 1991. Alternative Sweeteners, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., 110, 36.

NING, W., XINGXIANG, Z., HAIHUI, L., BENQIAO, H., 2009. 1-Allyl-3-Methylimidazolium Chloride Plasticized-Corn Starch as Solid Biopolymer Electrolytes. Carbohydrate Polymers 76,482–484

NOROUZIAN, D., AKBARZADEH, A., SCHARER, J. M., YOUNG, M. M., 2006. Fungal glucoamylases. Biotechnology Advances 24: 80-85.

ÖNAL, T. S., 2000. Karpoz (*sitrullus vulgaris*) *a*-Galaktozidazının Doğal ve Sentetik Polimerlerde İmmobilizasyonu. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü. İzmir

PANDEY, A., NGMAN, P., SOCCOL, C. R., SOCCOL, V. T., SINGH, D., MOHAN, R., 2000. Advances in Microbial Amylases. Biotechnol. Appl. Biochem. 31:135-152.

PARK, D., HAAM, S., JANG, K, AHN, I., KIM,W., 2005. Immobilization of Starch-Converting Enzymes on Surface Modified Carriers Using Single and Co Immobilized Systems: Properties and Application to Starch Hydrolysis. Process Biochemistry 40, 53–61

PASTINEN, O., VISURI, K., SCHOEMAKER, H. E., LEISOLA, M., 1999. Novel Reactions of Xylose Isomerase from *Streptomyces rubigious*, Enzyme Microb Technol., 25, 675-700.

PLECHKOVA, N. V., ROGERS R.D., SEDDON, K. R., 2009. Ionic Liquids: From Knowledge to Application. American Chemical Society, Washington, DC 1030 (8): 119-134.

POMERANZ, Y., 1985. Functional Properties of Foods, Academic Press Inc.,Orlando, Florida, 536.

RAO, V. B., SASTRI, N. V. S., RAO, P. V. S., 1981. Purification and Characterization of a Thermostable Glucoamylase from the Thermophilic *Fungus henomyces Lanuginosa*. Biochemical Journal., vol. 193, p. 379-385.

REEDER, C. F., 1978. Light Foods Appease Weight Conscious Americans, Food Product Development, 12,3, 35-36, 40.

REILLY, P. J., 1999. Protein Engineering of Glucoamylase to Improve Industrial Performance – A Review. Starch/Stärke 51 Nr. 8-9, 269-274.

REISCHWITZ, A., REH, K, D., BUCHOLZ, K., 1995. Unconventional Immobilization of Dextransucrase with Alginate", Enzyme and Microb. Technol., 17, 457-461.

ROSE I. A., O'CONELL L., MORTLOCK R. P.,1969. Stereochemical Evidence for a Cis-Enediol intermediate in Mn- Dependent Aldose Isomerases, Biochim. Biophys. Acta., 178:376.

ROUSHDI, M., GHALI, Y., ATTIA, R. M., ALAA EL-DIN, M., 1979. Studies on the Combined Action of Amylases and Glucose lsomerase on Starch and its Hydrolysates. Part 3. Starch/Starke 31Nr. 12, S. 414-417

ŞAHİN, E., 2007. Poli (Metil Metakrilat-2-Hidoksietil Metakrilat) Mikroboncuklarına Kovalent Bağlanma ile Glukoz İzomerazın İmmobilizasyonu. Yüksek lisans Tezi, Gazi Ünv. Fen Bilimler Enst.

SAHOO, B., KUMAR, S., PRAMANIK, P., 2011. A Novel Method for The Immobilization of Urease on Phosphonate Grafted Iron Oxide Nanoparticle. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 69:95–102.

SANCHEZ, S., SMILEY, K. L., 1975. Properties of D- xylose Isomerase from Streptomyces albus, Appl Microbiol., 29,745-50.

SAUER, J., SIGURSKJOLD, B. W., CHRISTENSEN, U., FRANDSEN, T. P.,MIRGORODSKAYA, E., HARRISON, M., ROEPSTORFF, P., SVENSSON, B., 2000. Glucoamylase: Structure/Function Relationships, and Protein Engineering. Biochimica et Biophysica Acta 1543: 275-293.

SCHAFHAUSER D. Y., STOREY, K. B., 1992. Fructose Production Coimmobilized Amyloglucosidase, Pullulanase, and Glucose Isomerase on BIOBONE^{TM} .Applied Biochemistry and Biotechnology 36, 1992

SCHOEVAART, R., WOLBERS, M. W., GOLUBOVIC, M., OTTENS, M., KIEBOOM, A. P. G., RANTWICK, F., WIELEN, L. A. M., SHELDON, R. A., 2004. Preparation, Optimization, and Structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates. Biotechnol Bioeng. 20;87(6):754- 62.

ŠEVCIK, J., HOSTINOVÁ, E., SOLOVICOVÁ, A., GAŠPERIK, J., DAUTER, Z., WILSON, K. S., 2006. Structure of the Complex of a Yeast Glucoamylase with Acarbose Reveals the Presence of a Raw Starch Binding Site on the Catalytic Domain. FEBS Journal 273: 2161-2171.

SHAH, S., SHARMA, A., GUPTA, M. N., 2006. Preparation of Cross-linked Enzyme Aggregates by Using Bovine Serum Albumin as a Proteic Feeder. Analytical Biochemistry, 351:207–213.

SHELDON, R. A., 2007. Review, Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. Adv. Synth. Catal., 349:1289-1307.

SHELDON, R. A., SCHOEVAART, R., VAN LANGEN, L. M., 2005. Crosslinked Enzyme Aggregates (CLEAs): A Novel and Versatile Method for Enzyme Immobilization A Review. Biocatalysis and Biotransformation, 23(3/4):141-147.

SHENOY, B. C., KATWA, L. C., APPU RAO, A.G., RAGHAVENDRA RAO, M. R., 1985. Fungal Glucoamylases. J. Biosci., 7, (3 / 4), 399- 419.

SHLOMO, MARGEL AND ALAN REMBAUM SINNOT, M.., 1998. Comprehensive Biological Catalysis, Academic Presss, New York, 254- 271.

SMITH, C. A., RANGARAJAN, M., HARTLEY, B. S., 1991. D-Xylose (D-glucose) Isomerase from *Arthrobacter Strain NRRL B3728*, Biochem. J., 277, 255-261.

SOLOMON, B., LEVIN, Y., .1974. Biotechnol. Bioeng.16.1116.STEVENSON, D. G., BISWAS, A., JANE, J., INGLETT, G. E. 2007. Changes in Structure and Properties of Four Botanical Sources Dispersed in the Ionic Liquid, 1-Butyl-3-Methylimidazolium Chloride. Carbohydrate Polymers, 67, 21–31.

SUTTHIRAK, P., DHARMSTHITI, S., LERTSIRI, S., 2005. Effect of Glycation on Stability and Kinetic Parameters of Thermostable Glucoamylase from *Aspergillus Niger*. Process Biochemistry 40: 2821 2826.

SWATLOSKI, R. P., SPEAR, S. K., HOLBREY, J. D., ROGERS, R. D. J., 2002. Am. Chem. Soc.124, 4974–4975.

TALEKAR, S., PANDHARBALE, A., LADOLE, M., NADAR, S., MULLA, M., JAPHALEKAR, K., PATTANKUDE, K., ARAGE D., 2013. Carrier Free co-Immobilization of Alpha Amylase, Glucoamylase and Pullulanase as Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates (Combi-CLEAs): A Tri-Enzyme Biocatalyst with One Pot Starch Hydrolytic Activity. Bioresource Technology 147 , 269–275

TANRISEVEN, A. , ÖLÇER, Z., 2008. A Novel Method for the İmmobilization of Glucoamylase onto Polyglutaraldehyde-Activated Gelatin. Biochemical Engineering Journal 39, 430–434

TANRISEVEN, A., ULUDAGÜ, B. Y., DOĞAN Ş., 2002. A Novel Method for the Immobilization of Glucoamylase to Produce Glucose from Maltodextrin. Enzyme and Microbial Technology 30, 406–409

TARDIOLI, P. W., VIEIRAB, M. F., VIEIRAB, A. M. S., ZANINB, G. M., BETANCORD, L., MATEOD, C., LORENTEC, G. F., GUISÁND, J., 2011. Immobilization–Stabilization of Glucoamylase: Chemical Modification of the Enzyme Surface Followed by Covalent Attachment on Highly Activated Glyoxyl-Agarose Supports. Process Biochemistry, 46 :409–412

TELEFONCU, A., 1997. Enzimoloji. Yüksek Lisans Yaz Okulu. 21–27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye. 446 sayfa

TOLSMA, A. D., 2002. The Effects of Fire and Grazing on the Energy Reserves of Resprouting Plants in Victoria's Alpine Grasslands. sayfa. 416.

ULUDAĞ, Y., 2000. İmmobilize Glukoazmilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimler Enstitüsü, Gebze.

VALENZUELAA, R., FUENTESA, M. C., PARRAA, C., BAEZAB, J., DURANC, N., SHARMAD, S. K., KNOBELD, M., FREERB, J., 2009. Influence of Stirring Velocity on The Synthesis of Magnetite Nanoparticles (Fe3O4) by The Co-Precipitation Method. Journal of Alloys and Compounds, 488:227-231.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J. C. M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L., 2002. Properties and Applications of Starch-Converting Enzymes of the Amylase Family. Journal of Biotechnology 94: 137-155.

WANG, Y., XIE, W., 2010. Synthesis of Cationic Starch with a High Degree of Substitution in an Ionic Liquid. Carbohydrate Polymers, 80, 1172–1177.

WASSERSCHEID, T.P., 2002. Welton, Ionic Liquid in Synthesis, Wiley-VCH, WEETHALL, H. H., 1976. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. Methods of Enzymology, 44:134-148.

WİCHMANN, R., WANDREY, C., BUCHMANN, A. F. KULA, M.R., 1981. Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme Membrane Reactor with Simultaneous NADH Regeneration. Biotechnology and Bioengineering, 23, 2789–2802.

WILKES, J., 2002. A short history of Ionic Liquids-from Molten Salts to Neoteric Sol-vents..Green Chem., 4, 73-80.

WILLIAMSON, M. P., LE GAL-CO FFET, M. F., SORIMACHI, K., FURNISS, C. S. M., ARCHER, D. B., WILLIAMSON, G., 1997. Function of Conserved Tryptophans in the Aspergillus niger Glucoamylase Starch Binding Domain. Biochemistry 36: 7535-7539.

WİLPISZEWSKA, K., SPYCHAJ, T., 2011. Ionic liquids: Media For Starch Dissolution, Plasticizattion and Modification.Carbonhydrate Polymers 86, 424-428

WONG, S. S., 1993. Chmeisry of protein conjugation and cross-linking,CRC press inc.boca rote

WULFF, S. M., HELGESON, D. L., 1987. Preliminary Economic Feasibility Analysis of HFCS Processing in US with Emphasis or North Dakota, Agricultural Economics Report, No. 229. Dept. Agric. Econ. NDSU, Fargo, ND, 213.

XIE, W., SHAO, L., LIU, Y., 2010. Synthesis of Starch Esters in Ionic Liquids. Journal of Applied Polymer Science, 116, 218–224.

XU, Q., KENNEDY, J. F., LIU, L., 2008. Carbohydr. Polym., 72, 113–121.YAMANAKA, K., 1968. Purification, Crystallization and Properties of the D-xylose Isomerase from *Lactobacillus brevis*, Biochim Biophys Acta.,151-670-80.

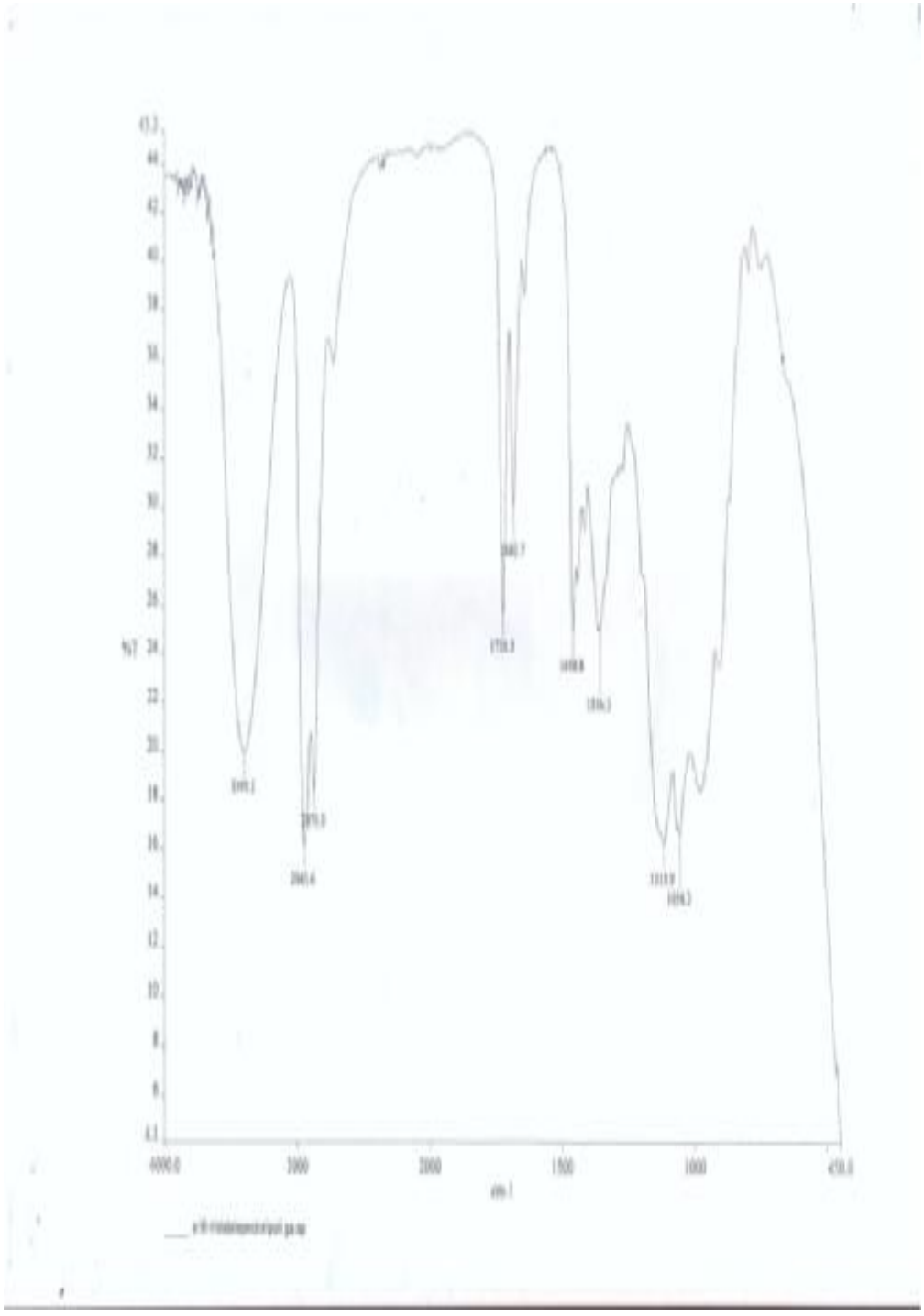
ZHAO, G., WANG, J., LI, Y., HUANG, H.,. CHEN, X., 2012. Reversible Immobilization of Glucoamylase onto Metal–Ligand Functionalized Magnetic FeSBA-15, Biochemical Engineering Journal 68, 159– 166.

ÖZGEÇMİŞ

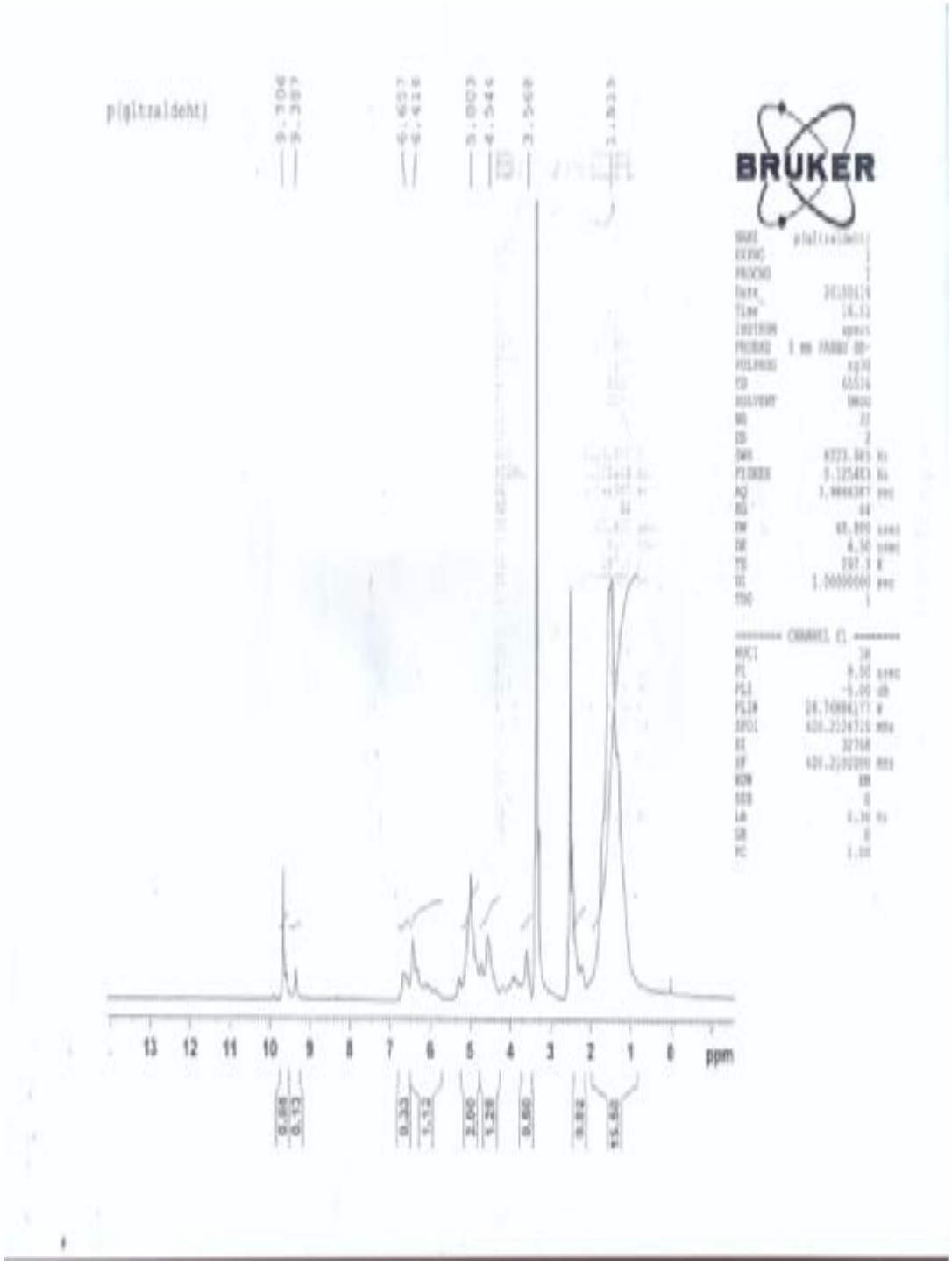
14.05.1981 yılında Adıyaman/Gerger'de doğdu. İlk ve orta eğitimini Adıyaman'da tamamladıktan sonra 2005 yılında Nahcivan Devlet Üniversitesi, Tabiat Bilimler Fakültesi, Kimya Bölümünde mezun oldu. 2011 yılında Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Kimya Bölümünde yüksek lisansı bitirdim. 2016 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalın doktorayı bitirdi.

EKLER

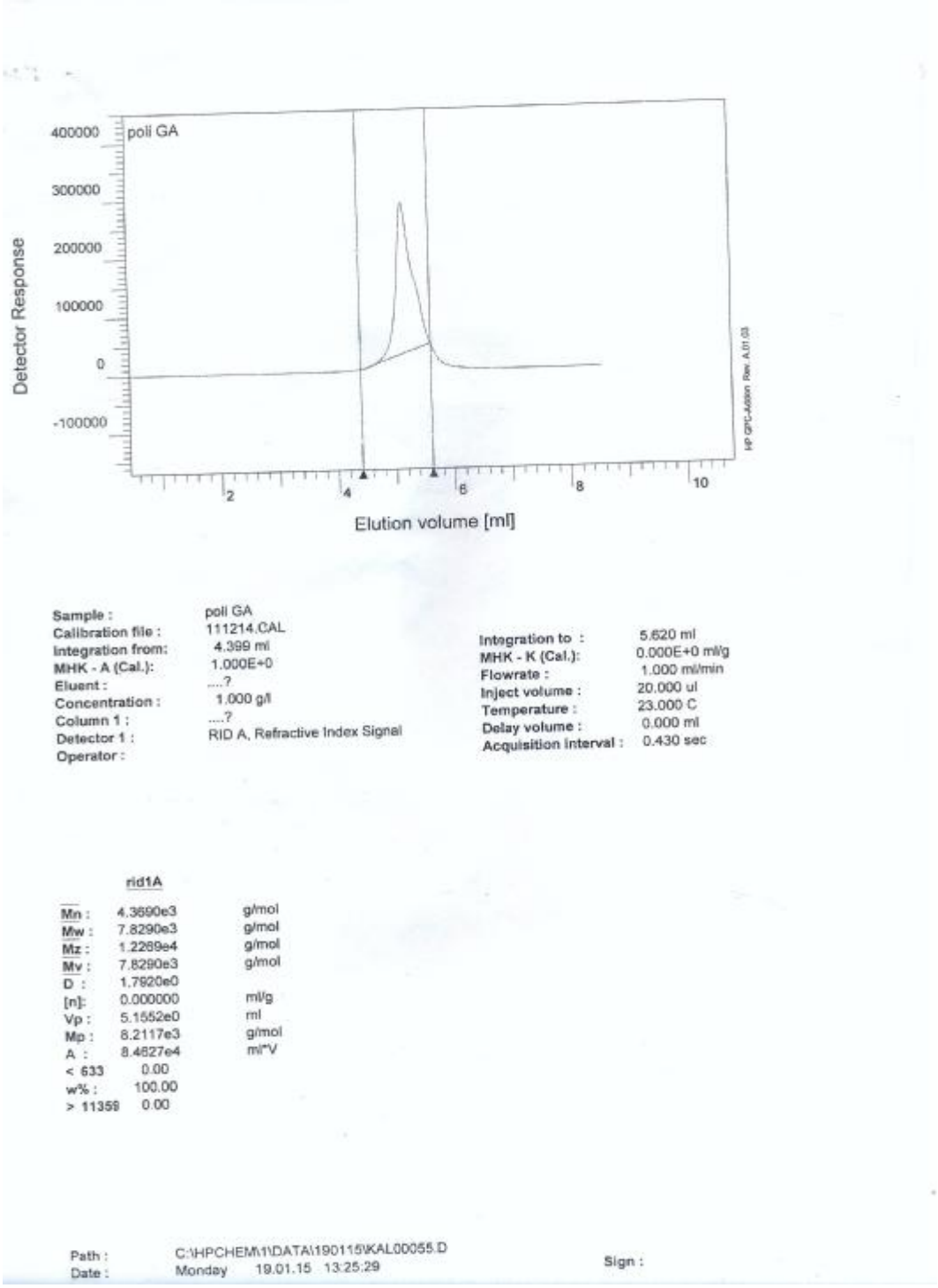
Ek.1. poliglutaraldehitin FT-IR spectrumu



Ek.2. poliglutaraldehitin NMR spectrumu



Ek.3. Poligulatarldehitin GPS spectrumu



Sample :	poli GA	Integration to :	5.620 ml
Calibration file :	111214.CAL	MHK - K (Cal.):	0.000E+0 ml/g
Integration from:	4.399 ml	Flowrate :	1.000 ml/min
MHK - A (Cal.):	1.000E+0	Inject volume :	20.000 ul
Eluent :	....?	Temperature :	23.000 C
Concentration :	1.000 g/l	Delay volume :	0.000 ml
Column 1 :	....?	Acquisition Interval :	0.430 sec
Detector 1 :	RID A, Refractive Index Signal		
Operator :			

	rid1A	
Mn :	4.3690e3	g/mol
Mw :	7.8290e3	g/mol
Mz :	1.2269e4	g/mol
Mv :	7.8290e3	g/mol
D :	1.7920e0	
[n]:	0.000000	ml/g
Vp :	5.1552e0	ml
Mp :	8.2117e3	g/mol
A :	8.4627e4	ml*V
< 633	0.00	
w% :	100.00	
> 11359	0.00	

Path : C:\HPCHEM\1\DATA\190115\KAL00055.D
Date : Monday 19.01.15 13:25:29 Sign :