ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilek ALAGÖZ

β-GALAKTOZİDAZ VE GLUKOZ İZOMERAZ'IN EUPERGİT DESTEĞE KOVALENT İMMOBİLİZASYONU VE İMMOBİLİZE ENZİMLERİN LAKTOZ HİDROLİZİ VE GLUKOZ İZOMERİZASYONUNDA KULLANILMASI

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

β-GALAKTOZİDAZ VE GLUKOZ İZOMERAZ'IN EUPERGİT DESTEĞE KOVALENT İMMOBİLİZASYONU VE İMMOBİLİZE ENZİMLERİN LAKTOZ HİDROLİZİ VE GLUKOZ İZOMERİZASYONUNDA KULLANILMASI

Dilek ALAGÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez ..../...../…... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....……	İmza.....… …..	İmza.....…….
Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL	Doç.Dr.Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ	Yrd.Doç.Dr.Ramazan BİLGİN
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler (BAP) Birimi tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF.2006.YL.55

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

β-GALAKTOZİDAZ VE GLUKOZ İZOMERAZ'IN EUPERGİT DESTEĞE KOVALENT İMMOBİLİZASYONU VE İMMOBİLİZE ENZİMLERİN LAKTOZ HİDROLİZİ VE GLUKOZ İZOMERİZASYONUNDA KULLANILMASI

Dilek ALAGÖZ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof.Dr. S. Seyhan TÜKEL

Yıl : 2007 Sayfa: 72

Jüri : Prof.Dr. S.Seyhan TÜKEL
: Doç.Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Yrd.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN

Kluyveromyces lactis'den izole edilen β-Galaktozidaz ve *Streptomyces rubiginosus*'dan izole edilen Glukoz İzomeraz (GI) Eupergit C 250 L üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda serbest ve immobilize GI için maksimum aktivite sırasıyla 5000 ve 98092 U/g proteins olarak ölçülmüş, K_M değerleri sırasıyla 423 ve 2602 mM olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar immobilize GI'ın katalitik etkinliğinin serbest GI'dan yaklaşık 3 kat daha yüksek olduğunu göstermektedir. İmmobilize GI'ın tekrar kullanılabilirliği kesikli, karıştırmalı reaktör modelinde araştırılmış ve 18 kullanımdan sonra immobilize GI'ın başlangıçtaki aktivitesinin %85'ini koruduğu belirlenmiştir. Serbest ve immobilize GI'ın farklı sıcaklıklarda belirlenen termal kararlılıkları karşılaştırılmış ve 60ºC'de 18 saat inkübe edilen immobilize GI'ın başlangıç aktivitesinin % 84'ünü, serbest GI'ın ise aynı koşullarda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 78'ini koruduğu belirlenmiştir. İmmobilize GI'ın 5°C ve 25°C'de 6 hafta depolanma süresi sonunda kalan aktivitesi sırasıyla başlangıç aktivitesinin %71 ve %43'üdür. Bununla birlikte serbest GI, 5°C ve 25°C'de 4 hafta depolanma süresi sonunda sırasıyla başlangıç aktivitesinin %88 ve %78'ini korumuştur. Belirlenen optimum koşullarda serbest β-Galaktozidaz için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla, 933 mM ve $1{,}7 \times 10^5$ µmol glukoz dk^{-1} g $protein^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada, denenen koşullarda immobilize β-Galaktozidaz'ın hidrolitik aktivitesinin düşük olduğu, ancak hidrolitik aktivitesine ek olarak beklenenin aksine daha büyük oranda transgalaktozilasyon aktivitesini gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Glukoz izomeraz, β-galaktozidaz, kovalent immobilizasyon, Eupergit

ABSTRACT

MSc THESIS

IMMOBILIZATION OF β-GALACTOSIDASE AND GLUCOSE ISOMERASE ONTO EUPERGIT SUPPORT AND USAGE OF IMMOBILIZED β-GALACTOSIDASE FOR LACTOSE HYDROLYSIS AND IMMOBILIZED GLUCOSE ISOMERASE FOR GLUCOSE ISOMERIZATION

Dilek ALAGÖZ

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof.Dr. S.Seyhan TÜKEL
Year : 2007 Pages: 72

Jury : Prof.Dr. S.Seyhan TÜKEL

: Assoc. Prof.Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

: Assist. Prof.Dr. Ramazan BİLGİN

β-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* and Glucose Isomerase (GI) from *Streptomyces rubiginosus* were immobilized covalently onto Eupergit C 250 L. Maximum activity of free GI was measured as 5000 U/g protein and maximum activity of immobilize GI was measured as 98092 U/g protein at predetermined optimum conditions. The K_M values for free and immobilized GI were determined as 423 and 2602 mM, respectively. These results showed that catalytic efficiency of immobilized GI was about 3 fold higher than that of free GI. Reusability of the immobilized GI was investigated in a batch type stirred reactor. After 18 reuses, the residual activity of immobilized GI was about 85% of its initial activity. Thermal stabilities of free and immobilized GI determined at different temperatures were compared. Thermal stability of immobilized GI was higher than that of free GI at 60ºC for 18 h preincubation time. The residual activity for immobilized GI stored at 5ºC and 25ºC for six weeks were 71% and 43% of its initial activity, respectively. However, free GI was protected 88% and %78 of its original activity at 5ºC and 25ºC respectively for four weeks. Under the optimized conditions, K_M and maximum activity of free β-Galactosidase were determined as 933 mM and $1,7x10^5$ μmol glukoz dk^{-1} g $protein^{-1}$, respectively. In this study we also determined that transgalactosylation activity of immobilized β-Galactosidase was higher than that of its hydrolytic activity.

KeyWords: Glucose isomerase, β-galactosidase, covalent immobilization, Eupergit.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tez çalışmam süresince her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen, görüş ve bilgi birikiminden yararlandığım çok değerli Danışmanım Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL'e gösterdiği sabır, anlayış ve iyi niyetinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Değerli hocalarım Doç.Dr.Güzide Yücebilgiç ve Yrd.Doç.Dr. Ramazan Bilgin'e manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her türlü yardım ve manevi desteklerini esirgemeyen, dostuklarını gördüğüm Deniz Yıldırım, Özlem Alptekin, Hasan Karadağ, Fadile Yener ve Özlem Yıldırım'a sabır ve ilgilerinden dolayı ve HPLC analizlerinde yardımlarını gördüğüm Osman Malik Atanur'a çok teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, her konuda büyük ilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen babam Ahmet Alagöz, annem Nebahat Alagöz ve kardeşlerime şükranlarımı sunmayı borç bilirim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ.....I

ABSTRACT.....II

TEŞEKKÜR.....III

İÇİNDEKİLER.....IV

SİMGELER VE KISALTMALAR.....VII

ÇİZELGELER DİZİNİ.....VIII

ŞEKİLLER DİZİNİ.....IX

1.GİRİŞ.....1

1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....2

1.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri.....3

1.1.1.1.Bağlama.....3

1.1.1.2. Tutuklama.....6

1.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon.....9

1.2. Glukoz İzomeraz (GI).....9

1.2.1. GI'ın Genel Özellikleri.....11

1.2.2. GI'ın Reaksiyon Mekanizması.....11

1.2.3. GI'ın Kullanım Alanları.....12

1.3. β-Galaktozidaz.....14

1.3.1. β-Galaktozidaz'ın Genel Özellikleri.....18

1.3.2. β-Galaktozidaz'ın Kullanım Alanları.....19

1.4. Eupergit.....20

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....23

3. MATERYAL VE METOD.....30

3.1. Materyal.....30

3.2. Metod.....30

3.2.1. Protein tayini.....30

3.2.2. β-Galaktozidaz ve GI'ın Eupergit'e Kovalent İmmobilizasyonu.....31

3.2.3. Serbest veya İmmobilize GI'ın Aktivitesinin Belirlenmesi.....32

3.2.4. Fruktoz Tayini.....33

3.2.5. Serbest veya İmmobilize β-Galaktozidaz'ın Aktivitesinin Belirlenmesi.....33

3.2.6. Laktoz Tayini.....34

3.2.7. HPLC Analizleri.....35

3.2.8. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu.....36

3.2.8.1. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum pH'larının Belirlenmesi.....36

3.2.8.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Tampon Derişimlerinin Belirlenmesi.....37

3.2.8.3. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....37

3.2.8.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi.....37

3.2.8.5. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi.....38

3.2.8.6. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi.....38

3.2.8.7. İmmobilize GI'ın Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi.....38

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....40
4.1. Bulgular.....40
4.1.1. Serbest ve İmmobilize GI'ın Karakterizasyonu.....40
4.1.2. Serbest β-Galaktozidaz'ın Karakterizasyonu…….....49
4.1.3. İmmobilize β-Galaktozidaz'ın Karakterizasyonu…….....52
4.1.3.1. HPLC Analizleri…….....52
4.1.3.2. İmmobilize β-Galaktozidaz ile Muamele Edilen Laktoz için HPLC Sonuçları……..53
4.2. Tartışma…….....56
4.2.1. GI'ın Eupergit Desteğe İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu…….....56
4.2.2. β-Galaktozidaz'ın Eupergit Desteğe İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu…….....60
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....62
5.1. Sonuçlar…….....62
5.2.Öneriler…….....63
KAYNAKLAR.....64
ÖZGEÇMİŞ…….....72

SİMGELER VE KISALTMALAR

GI : Glukoz İzomeraz

HFCS : High Fructose Corn Syrup (Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu)

DEAE : Dietilaminoetil

TEAE : Trietilaminoetil

K_M : Michaelis-Menten hız sabiti (mM)

V_{max} : Maksimum hız (μmol. dk^{-1}. g $protein^{-1}$)

Ea : Aktivasyon enerjisi (kJ mol^{-1})

K_{cat} : Geri dönüşüm sayısı (s^{-1})

K_{cat}/K_M : Katalitik etkinlik (s^{-1} M^{-1})

U : Ünite

V : Tepkime hızı (μmol. dk^{-1}. g $protein^{-1}$)

[S] : Substrat derişimi

ONPG : o-nitrofenol-β-D-galaktopiranoz

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Çeşitli mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılan β-galaktozidaz'ın aktif bölgesi ve fiziksel özellikleri…….. 18

Çizelge 1.2. Farklı kaynaklardan saflaştırılan β-Galaktozidazların özellikleri……..... 19

Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize GI'ın kinetik parametreleri…….. 45

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1.	Çapraz bağlama ile immobilizasyon……	3
Şekil 1.2.	Enzimin desteğe adsorpsiyon metoduyla bağlanması…….	4
Şekil 1.3.	Reaktif aminoasit artıkları……	5
Şekil 1.4.	Biyospesifik bağlanma ile immobilize edilen enzimin substratı ile etkileşimi daha fazladır ……	6
Şekil 1.5.	Enzimin tutuklama yöntemi ile immoblizasyonu…….	6
Şekil 1.6.	Enzimin polimerler arasında tutuklanması……...	7
Şekil 1.7.	Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu…….	8
Şekil 1.8.	Enzimlerin immobilizasyonu için lipozom kapsül……...	8
Şekil 1.9.	Çözünür formda immobilizasyon…….	9
Şekil 1.10.	Glukoz (Ksiloz) izomeraz ile şekerlerin immobilizasyonu…..	10
Şekil 1.11.	GI'ın etki mekanizması…….	12
Şekil 1.12.	Şekerlerin % tatlılık oranları……	13
Şekil 1.13.	β-Galaktozidaz ile laktoz immobilizasyonu…….	15
Şekil 1.14.	β-Galaktozidaz tarafından laktozun hidrolizi……...	16
Şekil 1.15.	β-Galaktozidaz tarafından katalizlenen galaktozil transfer reaksiyonu……	16
Şekil 1.16.	Aktif bölgesinde proton verici ve proton alıcı olarak iki tane glutamikasit artığı bulunan β-Galaktozidaz'ın katalizlediği hidroliz mekanizması……...	17
Şekil 1.17.	Eupergit desteğin yapısı ve enzimin kovalent immobilizasyonu……..	21
Şekil 2.1.	Enzimlerin eupergit desteğe kovalent immobilizasyonu……..	32
Şekil 2.2.	Sülfolanmış polistren dolgu malzemesinin Ca^{+2} formundan oluşan Bio-Rad Aminex HPX-87C şeker kolonunda glukoz ve galaktozun alıkonması……..	36
Şekil 2.3.	İmmobilize GI'ın tekrar kullanım kararlılığının belirlendiği kesikli ve karıştırmalı kolon reaktör……	38
Şekil 4.1.	Serbest ve immobilize GI aktivitesinin pH'a bağlı olarak	

	değişimi……..	40
Şekil 4.2.	Serbest ve immobilize GI aktivitesinin tampon derşimine bağlı olarak değişimi……	41
Şekil 4.3.	Serbest ve immobilize GI aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi……...	42
Şekil 4.4.	İmmobilize GI'ın Arrhenius grafiği…….	43
Şekil 4.5.	Serbest GI'ın Arrhenius grafiği……...	43
Şekil 4.6.	Serbest GI için Lineweaver-Burk grafiği……	44
Şekil 4.7.	İmmobilize GI için Lineweaver-Burk grafiği…….	45
Şekil 4.8.	İmmobilize GI'ın termal kararlılık grafiği……..	46
Şekil 4.9.	Serbest GI'ın termal kararlılık grafiği…….	47
Şekil 4.10.	İmmobilize GI'ın depolama kararlılığı……	47
Şekil 4.11.	Serbest GI'ın depolama kararlılığı……..	48
Şekil 4.12.	İmmobilize GI'ın tekrar kullanım kararlılığı……...	49
Şekil 4.13.	Serbest β-Galaktozidaz'ın aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi……..	49
Şekil 4.14.	Serbest β-Galaktozidaz aktivitesinin tampon derşimine bağlı olarak değişimi…….	50
Şekil 4.15.	Serbest β-Galaktozidaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi…….	51
Şekil 4.16.	Serbest β-Galaktozidaz için Lineweaver-Burk grafiği……..	51
Şekil 4.17.	%5'lik (w/v) Galaktoz standartı için HPLC analizi sonucu……	52
Şekil 4.18.	%5'lik (w/v) Glukoz standartı için HPLC analizi sonucu……...	53
Şekil 4.19.	%5'lik (w/v) Laktoz standartı için HPLC analizi sonucu……...	53
Şekil 4.20.	10 mg immobilize β-Galaktozidaz ile 0,5 mL %5'lik laktoz çözeltisi (w/v)… ……..	54
Şekil 4.21.	10 mg immobilize β-Galaktozidaz ile 1 mL %5'lik laktoz çözeltisi (w/v)……	54
Şekil 4.22.	10 mg immobilize β-Galaktozidaz ile 2 mL %5'lik laktoz çözeltisi (w/v)……	55
Şekil 4.23.	20 mg immobilize β-Galaktozidaz ile 2 mL %5'lik laktoz	

çözeltisi (w/v)…… 55
Şekil 4.24. Enzimin gözenek içerisindeki dağılımı……... 56

1. GİRİŞ

Enzimler biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve protein yapısında olan özel biyokatalizörlerdir. Canlı organizmalarda gerçekleşen çok sayıda reaksiyon enzimlerle katalizlenir. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar katalizlenmemiş karşıtlarına göre 10^7-10^{16} kez daha hızlı gerçekleşir.

Enzimlerin ilgili reaksiyonları ılımlı koşullarda çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanı sağlar. Bu nedenle enzimler tıp alanında, kimya endüstrisinde, gıda proseslerinde, tarım ve ziraat alanlarında oldukça önemli bir yere sahiptirler.

Enzimler canlı organizmalarda bulunurlar. Her bir hücre metabolik reaksiyonlarını devam ettirebilmek için farklı enzimlerden bol miktarda sentezler. Bir canlı hücreden enzim izolasyonu ve saflaştırılması işlemleri oldukça pahalı proseslerde yapılmaktadır. Bu nedenle enzimler genellikle pahalı materyallerdir. Bununla birlikte endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması oldukça zordur. Serbest enzimin reaksiyon ortamından istenildiği anda uzaklaştırılamaması reaksiyonun kontrolünü güçleştirir. Serbest enzimi reaksiyon ortamında etkisiz hale getirebilmek için kullanılan inhibitörler ise serbest enzim tarafından kirletilen reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru olarak eklenir. Reaksiyon ortamındaki bu kirlilik unsurlarının uzaklaştırılmaya çalışılması maliyeti artıracaktır. Bunun yanı sıra serbest enzimler sürekli üretim proseslerinde de tercih edilmezler. Enzimlerin bir çok alanda çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanmasından dolayı, enzimleri daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmaları artmıştır. Bu nedenle serbest enzimlerden daha fazla yararlanabilmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir.

Enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir ve endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilir. Bu nedenle enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda

çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler (Telefoncu, 1997).

İmmobilizasyon sonucunda enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özellikleri değişebilmektedir. Enzim molekülünün hareket yeteneği sınırlanır, konformasyonu değişir, kovalent bağlanması sonucu yükü ve kimyasal yapısı değişir. Teorik olarak aktivitesinde düşme beklenir. Bunun yanında aktivitesinin arttığı veya değişmediği durumlarda gözlenebilmektedir.

Enzim immobilizasyonunda doğal ve sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan taşıyıcıda aranan özellikler aşağıda verilmiştir (Broun, 1978).

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Mekanik kararlılık ve uygun gözenek büyüklüğü,
- Kimyasal ve termal kararlılık,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Rejenere olabilme,
- Zehirsizlik,
- Kovalent bağlamada kullanılacak olan taşıyıcılar ılımlı koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı,

1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri;

1. Çözünmez formda immobilizasyon
2. Çözünür formda immobilizasyon olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.

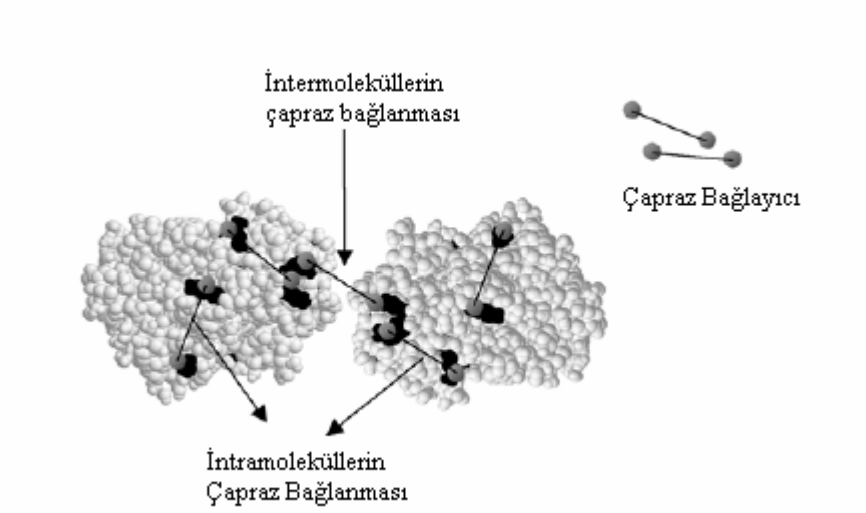
1.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri de bağlama ve tutuklama olarak ikiye ayrılmaktadır.

1.1.1.1. Bağlama

Bağlama yöntemi; çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu ve taşıyıcıya bağlama olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Çapraz bağlama; Küçük moleküllü iki veya çoklu fonksiyonel grupları olan reaktifler enzim molekülleri arasında çapraz bağlar yapmaktadırlar (Chibata, 1978).



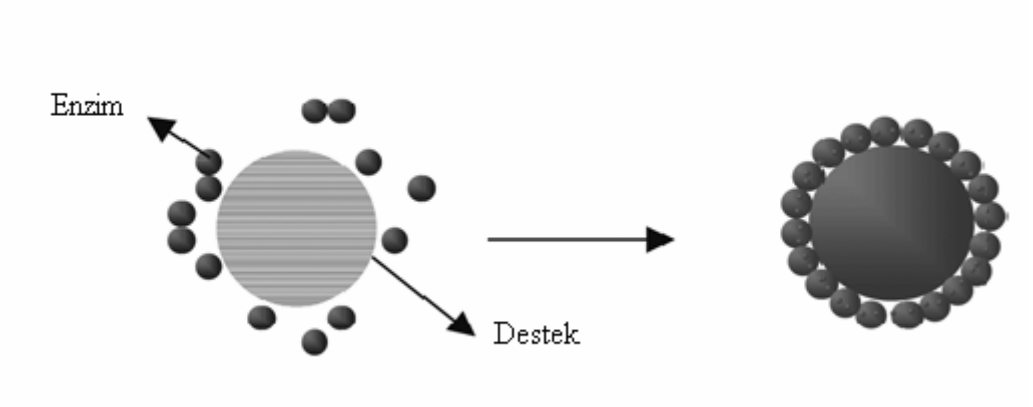
Şekil 1.1. Çapraz bağlama ile immobilizasyon

Enzim kopolimerizasyonu; Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır.

Taşıyıcıya bağlama; Adsorpsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama olarak beş gruba ayrılmaktadır.

Adsorpsiyon; yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, gözenekli cam, kül, silikajel, $CaCO_3$, nişasta, gluten gibi) enzim çözeltisi ile

karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak ortamdan uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Nelson ve Griffen, 1916).

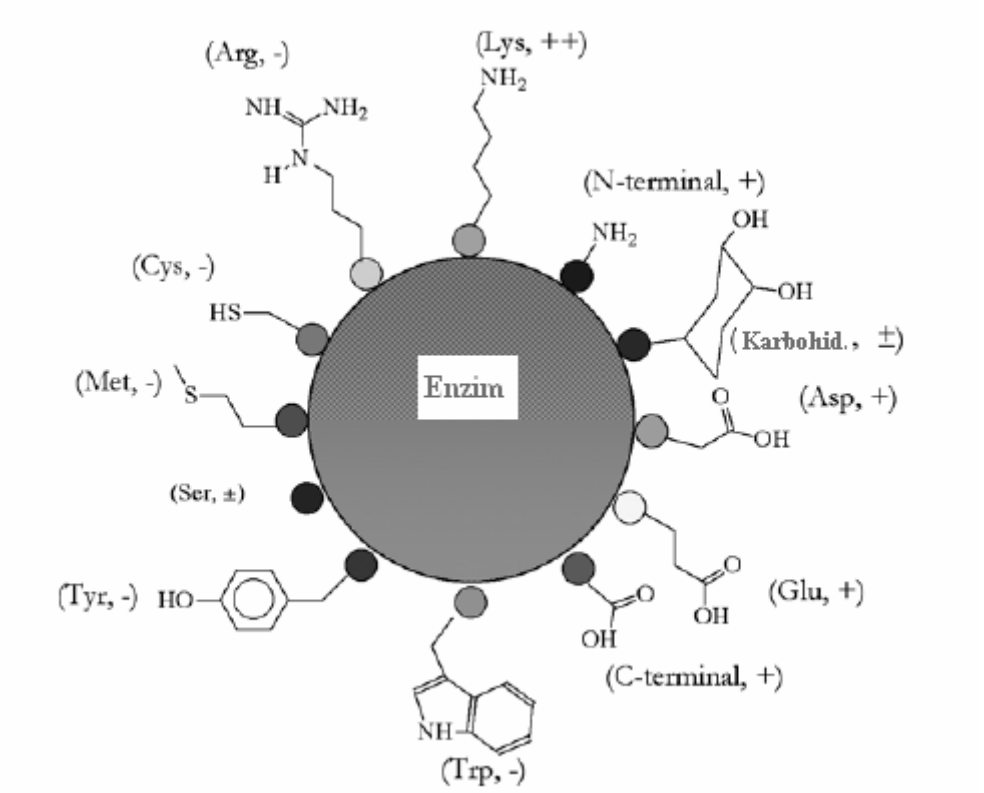


Şekil 1.2. Enzimin desteğe adsorpsiyon metoduyla bağlanması

İyonik bağlama; İyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanmaktadır (Wang, 1993).

Şelat bağlama; Bu yöntemde, bazı geçiş metallerinin (Titan(III), Titan(IV), Zirkonyum (IV)) şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması sağlanmaktadır (Kennedy ve ark., 1983).

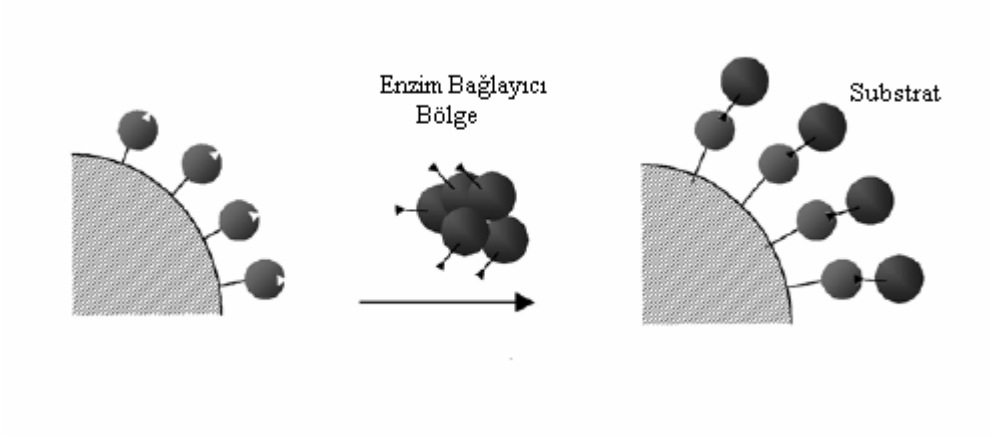
Kovalent bağlama; Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanması enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir. Şekil 1.3'de bu fonksiyonel gruplar gösterilmiştir (Zaborsky, 1973).



Şekil 1.3. Reaktif aminoasit artıkları: (+) enzim immobilizasyonunda sıkça kullanılır; (-) enzim immobilizasyonunda kullanılmaz; (±) enzim immobilizasyonunda çok sık kullanılmaz; (++) enzim immobilizasyonunda çok sık kullanılır.

.

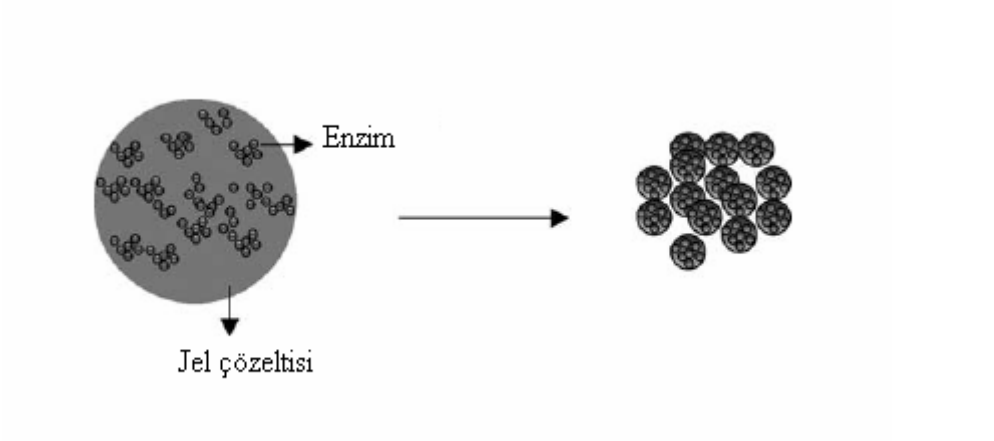
Biyospesifik bağlama; Bu yöntemde, enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimlerden yararlanarak enzimler immobilize edilmektedirler (Telefoncu, 1997).



Şekil 1.4. Biyospesifik bağlanma ile immobilize edilen enzimin substratı ile etkileşimi daha fazladır.

1.1.1.2. Tutuklama

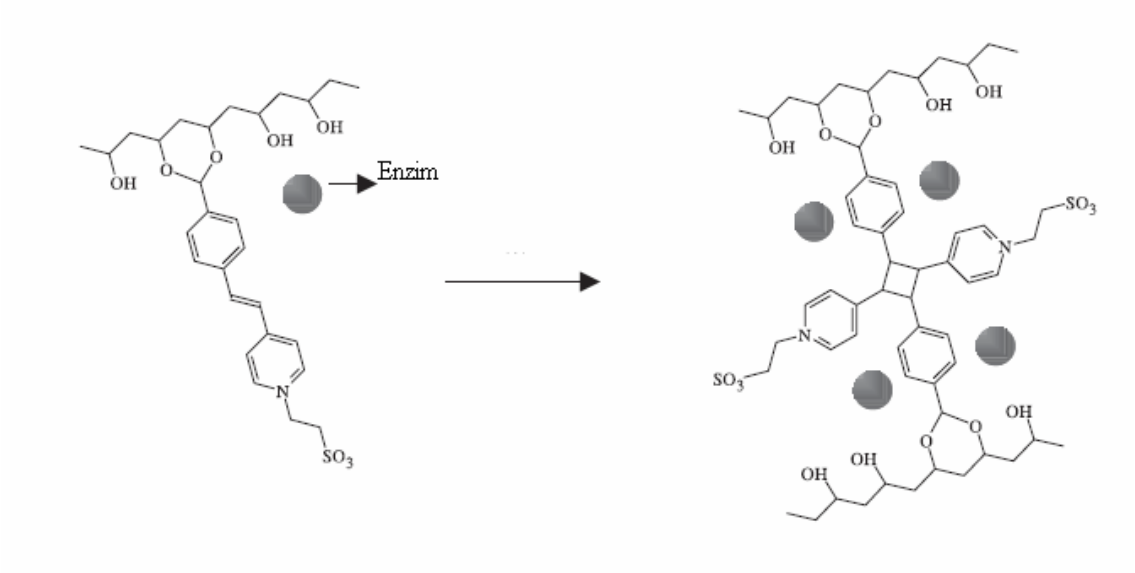
Tutklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir ortamda durmaya zorlanmaktadır. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştiği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilmektedir (Telefoncu, 1997).



Şekil 1.5. Enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu

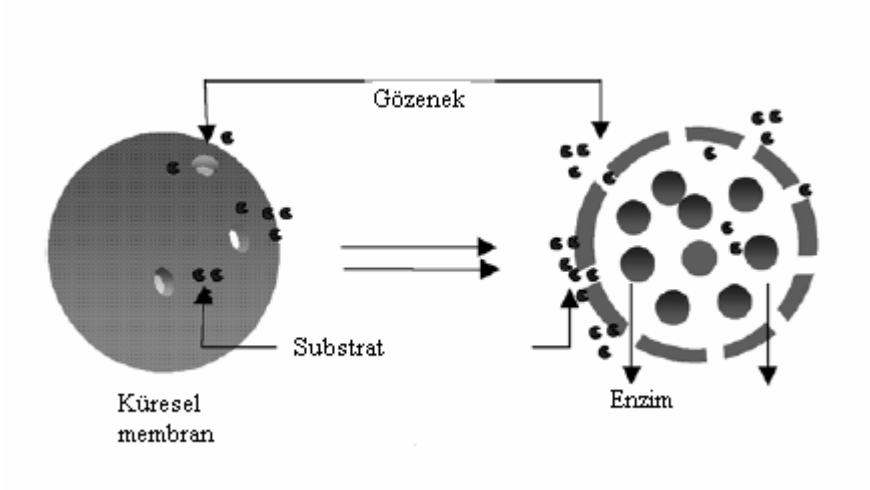
Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olarak üçe ayrılmaktadır.

Polimer matrikse tutuklama yöntemi; Bu yöntem, polimerizasyon ve çapraz bağlamanın oluştuğu ortamda enzimin de bulunması durumunda çapraz bağlama sonucu oluşan kafeslerde enzimin tutulması esasına dayanmaktadır (Cremonesi ve Angiuro 1983).



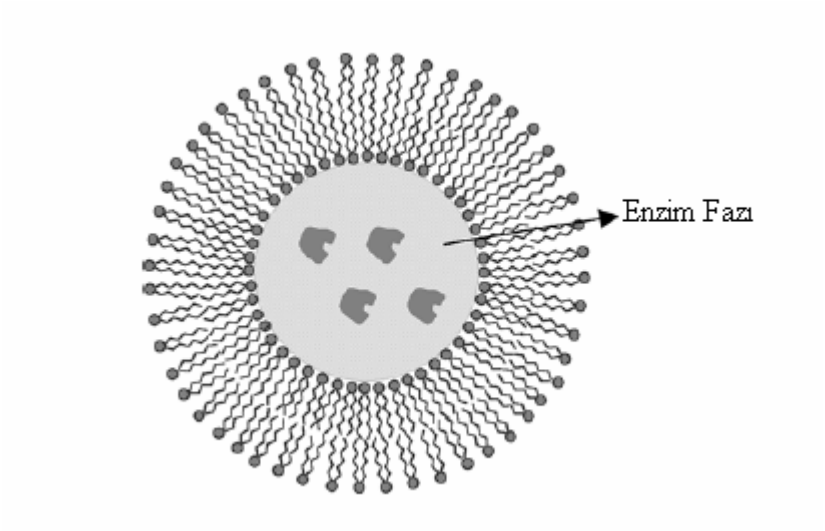
Şekil 1.6. Enzimin polimerler arasında tutuklanması

Mikrokapsülleme; Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanmaktadır. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μ arasında değişmektedir. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır (Chang, 1976).



Şekil 1.7. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu

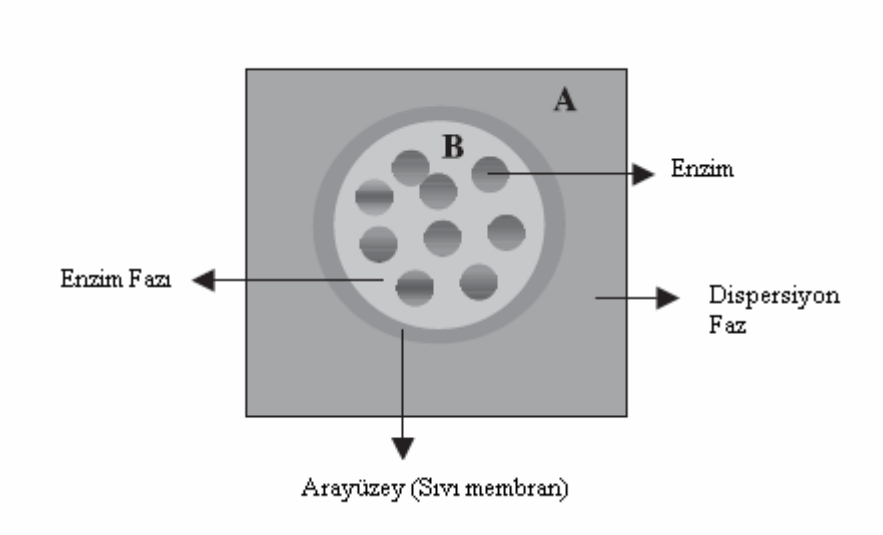
Lipozom tekniği; Bu yöntem, sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanmaktadır. Süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel bir yöntemdir. Oldukça büyük bir kontakt yüzeyine sahip olup, aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlamaktadır. Bunların yanında, substrat ve ürünün membrandan geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin aktivite kaybetmesi ve sıvı olan membrandan enzim kaçma olasılığı bulunmaktadır (Luisi ve Magid, 1986).



Şekil 1.8. Enzimlerin immobilizasyonu için lipozom kapsül

1.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon

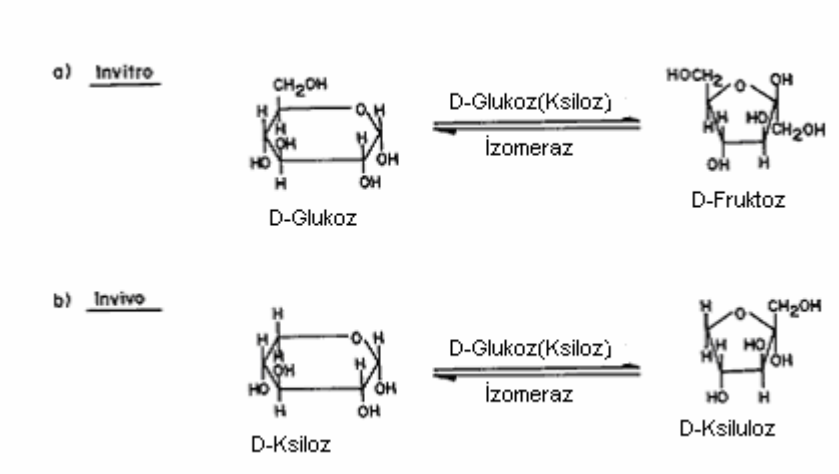
Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin herhangi bir taşıyıcıyla fiziksel veya kimyasal etkileşiminden çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir yöntemdir. Enzim taşıyıcıya herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmemektedir. Fakat substratın membrandan geçip enzime ulaşmasında kısıtlamalara rastlanmaktadır. Bu nedenle küçük moleküllü substrata sahip olan enzimlerin bu yöntemle immobilize edilmesi tercih edilebilir (Wichmann ve ark., 1981).



Şekil 1.9. Çözünür formda immobilizasyon

1.2. Glukoz İzomeraz (GI)

GI (Glukoz/Ksiloz İzomeraz; EC 5.3.1.5) enzimi, büyümeleri için ksilozu kullanan bakterilerde bulunan intrasellüler bir enzimdir (Chen, 1980). GI, *in vivo* koşullarda D-ksilozun D-ksiluloza ve *in vitro* koşullarda D-glukozun D- fruktoza dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Takasaki ve ark., 1969). Reaksiyon aşağıdaki gibidir:



Şekil 1.10. a) in vitro, b) in vivo koşullarda Glukoz (Ksiloz) İzomeraz enzimi ile şekerlerin izomerizasyonu.

GI enzimi *Flavobacterium, Bacillus, Arthrobacter* ve bazı *Streptomyces* türleri gibi çeşitli mikroorganizmalardan saflaştırılmaktadır (Bhosale ve ark., 1996). Oldukça termostabil ve termofilik olan glukoz izomerazlar ise *Thermus thermophilus, Thermus aquaticus, Thermotoga maritima* ve *Thermotoga neapolitana* bakterilerinden izole edilmektedir (Vieille ve Zeikus, 2001).

1957'de Marshall ve Kooi tarafından *Pseudomonas hydrophila'*dan izole edilen enzimin glukoz izomerizasyonuna neden olduğunun keşfedilmesinden sonra HFCS üretimi için bu enzimden yararlanılmaya başlanılmıştır (Marshall ve Kooi., 1957). Bu enzim ksiloza glukozdan daha spesifiktir. Ayrıca Takasaki ve Tanabe (1966), *Paracolobacterium aerogenoides*'den izole ettikleri glukoz izomerazın hem glukozu hem de mannozu fruktoza çevirdiğini rapor etmişlerdir.

Glukozun fruktoza enzimatik izomerizasyonunun endüstriyel alanda ilk uygulaması ABD'de Clinton Corn Processing Co. tarafından 1967 yılında yapılmıştır. İmmobilize GI ise 1974 yılında kullanılmaya başlanmıştır. GI, bugün meşrubat, fırıncılık, konserve yapımı ve şekerleme endüstrisinde en büyük pazar payına sahip olan bir enzimdir (Bhosale ve ark., 1996).

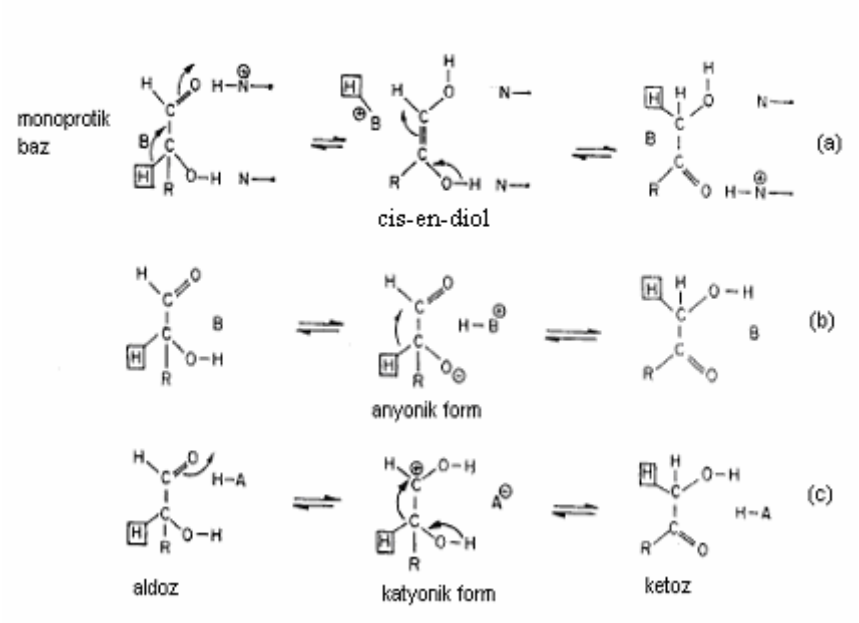
1.2.1. GI'ın Genel Özellikleri

GI, yüksek sıcaklıklarda kararlı ve aktivitesi için NAD^{+} ve ATP gibi pahalı kofaktörler gerektirmeyen bir enzimdir. GI özellikle Mg^{+2}, Co^{+2} ve Mn^{+2} katyonlarının varlığında kararlı ve aktiftir. D-ksilozun izomerizasyonunda Mn^{+2} daha etkili iken, D-glukozun izomerizasyonunda Co^{+2}'nin daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Mg^{+2}'nin ise her iki izomerizasyonda da etkin olduğu, GI'ın Cu^{+2} tarafından güçlü; Ni^{+2}, Fe^{+2} ve Ca^{+2} tarafından ise zayıf olarak inhibe edildiği bildirilmektedir (Sriprapundh ve ark., 2000).

GI'ın molekül kütlesi saflaştırıldığı mikroorganizmaya göre 52 kDa ile 191 kDa arasında değişmektedir. Sedimantasyon sabiti ise 7,55 ile 11,45 arasında değişmektedir (Chen, 1980). GI'ın alt ünitelerinin yapısı ve aminoasit dizilimi bu enzimin bir tetramer veya birbirinin aynısı veya eşdeğer alt üniteleri olan dimerlerin kovalent olmayan bağlarla bir arada tutulup tutulmadığını ve zincir içerisinde disülfit bağlarının olup olmadığını göstermektedir. *Bacillus sp*.'den izole edilen GI bir trimerdir (Chauthaiwale, 1994). Basuki ve arkadaşları *Streptomyces phaechromogenes*'den izole edilen GI'ın izoenzimlerinin olduğunu rapor etmişlerdir. Bu izoenzimlerin N-terminal ucundaki aminoasit dizilimi farklıdır ve peptit dizilimi, *Achromobacter* proteaz I ve siyanojen bromürün peptit dizilimine benzemektedir. İzoenzimlerden herbiri birbirinin aynısı olmayan altünitelerden oluşan bir tetramerdir (Basuki ve ark., 1992).

1.2.2. GI'ın Reaksiyon Mekanizması

Glukozun fruktoza izomerizasyonunun reaksiyon mekanizması Rose ve ark. (1969), tarafından aşağıdaki gibi önerilmiştir (Şekil 1.10).



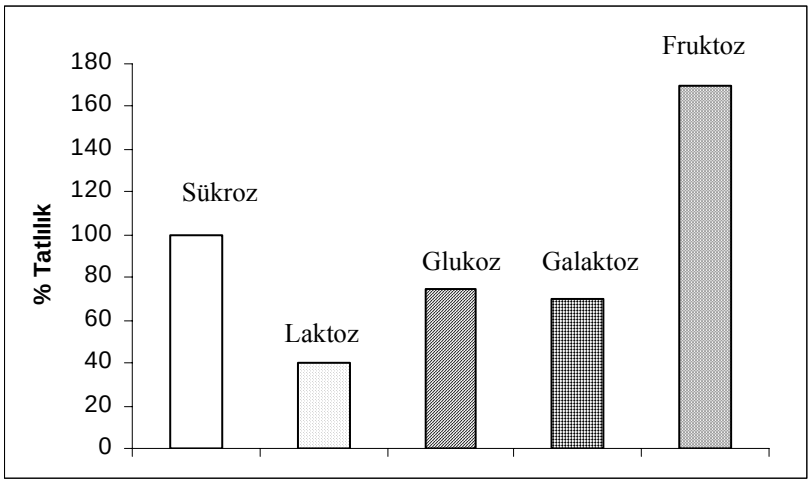
Şekil 1.11. GI'ın etki mekanizması. (a) *cis*-En-diol (b) proton transferi (c) Hidrojen kayması. Kutuların içerisindeki hidrojen atomları steriospesifik olarak transfer edilir (Rose ve ark, 1969).

GI, oldukça yaygın bir enzim olmasına rağmen yapısı ve etki mekanizması ile ilgili çok az bilgi vardır. Önceleri şeker fosfat izomeraza benzer bir fonksiyonu olduğu kabul edilir ve en-diol mekanizması izlenirdi (Şekil 1.10.a). Son yıllarda yapılan çalışmalarda GI'ın etki mekanizmasının hidrojen kayma mekanizmasına dayandığı (Şekil 1.10.c), etki mekanizmasının temelini substratdaki halkanın açılması, C-2'den C-1'e hidrojen kayması ve halkanın tekrar kapanarak ürünü oluşturması oluşturmaktadır.

1.2.3. GI'ın Kullanım Alanları

GI, ileri biyokimyasal ve genetik mühendisliği tarafından yapı-fonksiyon ilişkileri için ilginç bir model olarak kullanılır. Ayrıca akademik çalışmalarda, HFCS üretiminde ve hemiselülozlardan etanol üretiminde yararlanılması gibi farklı amaçlar için kullanılabilir.

HFCS üretiminde kullanılması: Rafine şekere talebin artması, üretim maliyetinin yüksek olması ve insan sağlığına sükrozun ve şekerin fazla tüketiminin olumsuz etkisinin farkına varılmasıyla birlikte sükrozun yerine kullanılabilecek başka kaynaklar araştırılmıştır. Kalorisiz ve karbohidrat içermeyen sakkarin, siklamat, asesülfam-K, aspartam ve taumatin gibi yapay tatlandırıcılar bulunmaktadır. Fakat bunlar sağlıkla ilgili temel problemlerin yaşanmasına neden olmaktadırlar. Alkolsüz içeceklerin depolanma süresini arttırmak için kullanılan aspartam, düşük pH'da yavaş hidroliz olduğundan dolayı içeceklerin tatlılık oranını düşürmektedir. Taumatin protein yapısında bir tatlandırıcıdır ve sükrozdan 2000 kez daha tatlıdır. Fakat hoş olmayan bir tat verir. HFCS ise glukoz ve fruktozun dengede olduğu ve nişastadan elde edilen bir tatlandırıcıdır. Sükrozdan 1,3 kez ve glukozdan da 1,7 kez daha tatlıdır. Şekil 1.11'de bazı şekerlerin tat verme oranları gösterilmiştir.



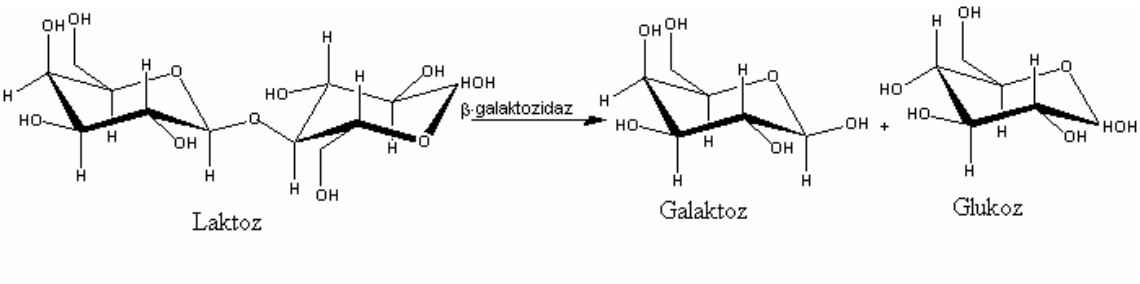
Şekil 1.12. Şekerlerin % tatlılık oranları

HFCS, sükrozdan %10-20 daha ucuzdur ve sukroz gibi kristallenmeye neden olmadığından dolayı yiyecek endüstrisinde tercih edilmektedir. Ayrıca fruktoz diyabetik tatlandırıcılarda önemli bir rol oynar. Çünkü fruktoz midede yavaş bir şekilde absorbe edilir ve kan şekeri seviyesini etkilemez. HFCS, başlıca meşrubat ve şekerleme endüstrisinde, fırıncılıkta ve konserve yapımında kullanılmaktadır.

Etanol Üretiminde Kullanılması: Yenilenen biyokütlelerin fermente olabilen şekerlere ve sonrasında etanole biyolojik çevrimi hızla tükenen fosil yakıtlar bakımından önemlidir. Biyokütleler, %40 selüloz, %30 hemiselüloz ve %30 lignin içermektedir. Lignin karbohidrat olmayan polifenolik bir bileşiktir. Biyokütlelerden ekonomik olarak yararlanılabilmesi selüloz ve hemiselülozun glukoz ve ksiloza hidroliz olmasına ve daha sonra mayalar tarafından etanole fermentasyonuna bağlıdır. Araştırmacılar selülozun biyolojik çevrimi ile ilgili birçok çalışma yapmışlardır ve lignoselülozun biyolojik çevriminin hızlı ve verimli olduğunun farkına varmışlardır. Zirai artıkların değerlendirilmesi ve hemiselüloz içeren biyokütlelerden en etkili şekilde yararlanabilmek için tüm dünyanın ilgisi hemiselülozun fermentasyonuna kaymaktadır. Ksilan hemiselülozun ana birleşenidir ve ksiloz ünitelerinin β (1,4) bağlanmasıyla oluşmaktadır. Ksilanın enzimatik veya asidik yöntemlerle kolayca hidroliz edilmesiyle ksiloz üniteleri açığa çıkmaktadır. Bazı *saccharomyces cerevisiae* türünden mayalar kullanılarak heksozların etanole fermentasyonu sağlanır. *Candida utilis, Candida shetatae, Pachysolen tannophilus* ve *Pichia stipitis* gibi bazı mayalar ise pentozlardan etanol üretiminde kullanılmaktadır. Fakat ksilozun bu şekilde etanole fermentasyonu sağlanamamaktadır. Bunun yanı sıra oksijenli ortamda etanolün katabolizması ve düşük etanol toleransı pentozların ticari kullanımını sınırlamaktadır. *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe* ve *Candida tropicalis* gibi mayalar tarafından ksilozun etanole fermantasyon prosesinde ksiloz metabolik engel olarak görülmektedir. Bu nedenle GI'ın kullanılmasıyla ksilozun ksiluloza izomerizasyonu sağlanmakta ve daha sonra ksiluloz etanole fermente edilmektedir (Chaing ve ark., 1981).

1.3. β-Galaktozidaz

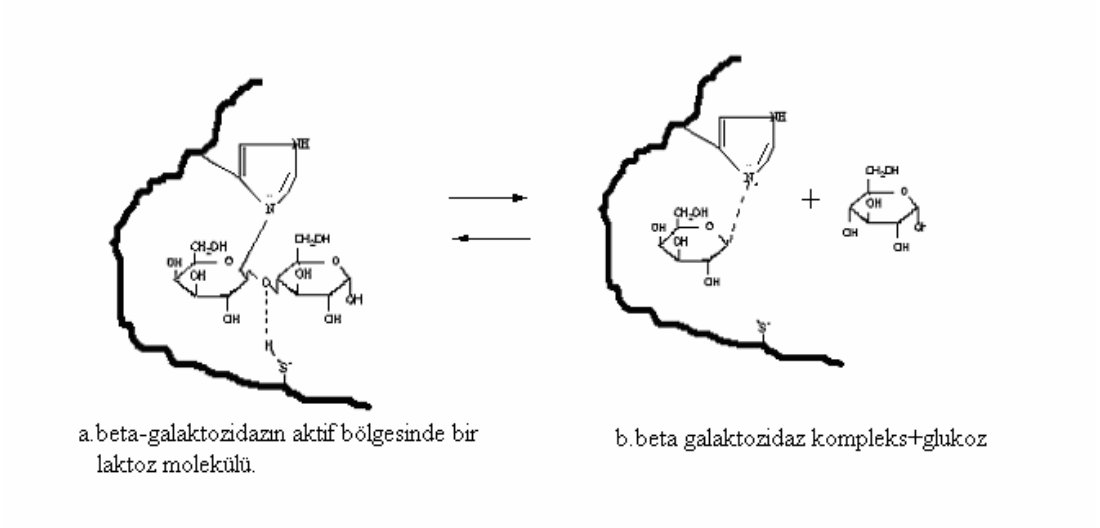
β-galaktozidaz (Laktaz, E.C. 3.2.1.23), laktozdaki β-glikozidik bağının enzimatik hidrolizini katalizleyerek, laktozdan daha tatlı ve çözünürlüğü laktoza göre daha fazla olan glukoz ve galaktozun oluşmasını sağlamaktadır. Katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir:



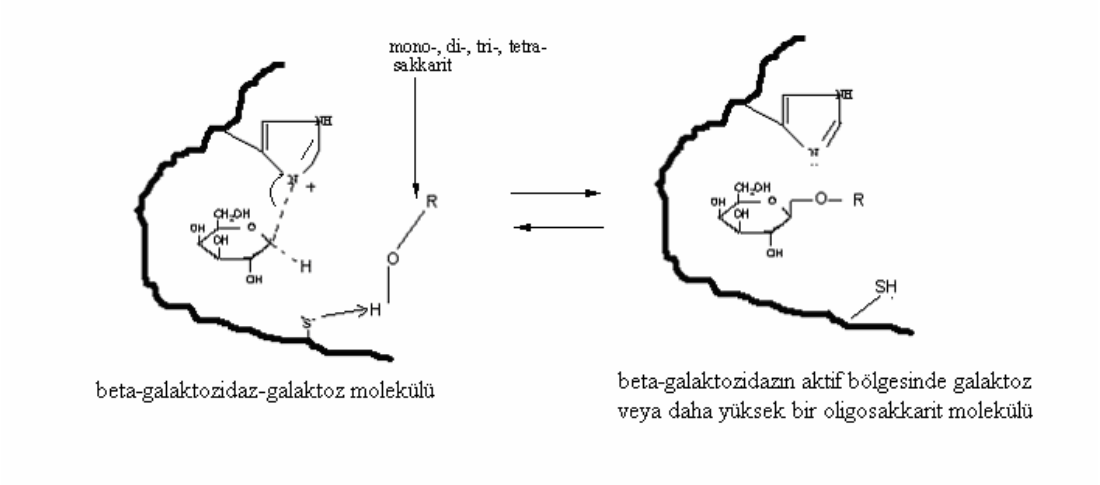
Şekil 1.13. β-Galaktozidaz ile laktozun hidrolizi

Laktoz sütün başlıca karbohidratı olup yaklaşık %3-8 (w/v)'ini oluşturmaktadır. Laktoz konsantrasyonu sütün kaynağına göre 50-100 g/L arasında değişmektedir. Laktozun hidrolizi asitlerle veya enzimatik olarak sağlanabilmektedir. Asit kullanılan proseslerde sütteki laktoz hidroliz edildiğinde süt ve sütün türevlerinin tadında, kokusunda ve renginde bozulma görülmektedir. Laktoz hidrolizi enzimatik olarak gerçekleştiğinde ise sütün sadece tatlılığında bir değişiklik oluşmakta, sütün tatlılık oranı 4 kat artmaktadır (Pivarnik ve ark., 1995). β-Galaktozidaz laktozun enzimatik hidrolizini katalizlemenin yanı sıra oligosakkaritlerin oluşum reaksiyonunu da katalizlemektedir.

Wallenfels ve Malhotra (1961), *E-coli*'den izole ettikleri laktazı kullanarak laktozun hidroliz mekanizmasını tanımlamışlardır. Bunun dışında çeşitli yayınlarda laktozun hidroliz mekanizması ve galaktozil transfer reaksiyonunun mekanizması tanımlanmaktadır (Richmond, 1981; Rouwenhorst ve ark., 1989; Mahoney, 1998; Zhou ve Chen, 2001). Bu çalışmalarda önerilen reaksiyon mekanizmasında β-Galaktozidaz'ın aktif bölgesinde proton verici olarak sistein ve proton alıcı olarak ise histidin aminoasiti bulunmaktadır. Laktozun enzimatik hidrolizinin ve galaktozil transfer reaksiyonunun mekanizması sırasıyla şekil 1.14 ve şekil 1.15'de gösterilmiştir.

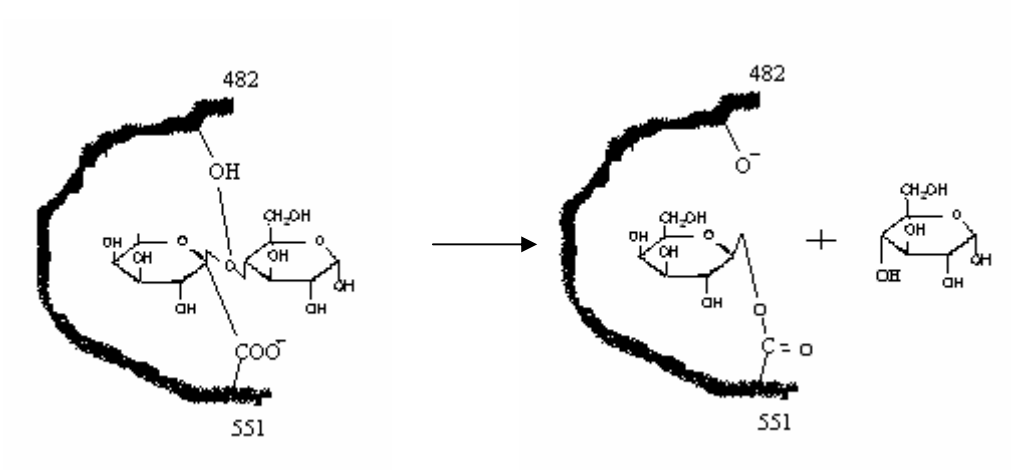


Şekil 1.14. β-Galaktozidaz tarafından laktozun hidrolizi (Richmond, 1981)

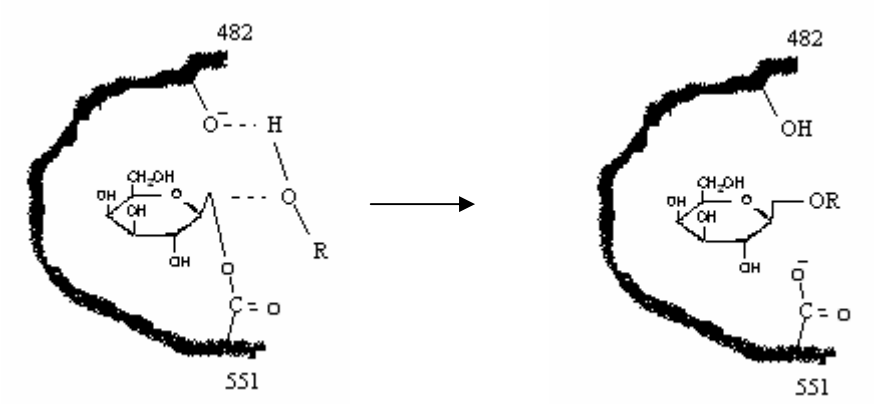


Şekil 1.15. β-Galaktozidaz tarafından katalizlenen galaktozil transfer reaksiyonu (Richmond, 1981)

Son zamanlarda β-Galaktozidaz için yeni bir aktif bölgenin olduğu ileri sürülmüştür (Zhou ve Chen, 2001). Bu aktif bölgede glutamik asit artığı bulunmaktadır. Mikrobiyal kökenli bazı β-Galaktozidazlarda iki tane glutamikasit artığı bulunmaktadır (Glu^{482} ve Glu^{551} gibi). Bunlardan birisi proton alıcı ve diğeri ise proton verici olarak görev yapmaktadır. Reaksiyonun mekanizması şekil 1.16'da gösterilmektedir:



a) Enzim-galaktozil kompleks oluşumu ve aynı zamanda glukozun serbest bırakılması



b) Enzim-galaktozil kompleksinin hidroksil grubu içeren bir akseptöre transfer edilmesi

Şekil 1.16. Aktif bölgesinde proton verici ve proton alıcı olarak iki tane glutamikasit artığı bulunan β-Galaktozidazın katalizlediği hidroliz mekanizması (Zhou ve Chen, 2001).

Bununla birlikte farklı mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılan β-Galaktozidaz'ın aktif bölgesinde bulunan glutamikasitlerin pozisyonları, protein zincirinin uzunluğu ve molekül kütlesi farklıdır. Çizelge 1.1'de bazı örnekler verilmektedir.

Çizelge 1.1. Çeşitli mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılan β-Galaktozidazın aktif bölgesi ve fiziksel özellikleri (Zhou ve Chen, 2001).

Enzim Kaynağı	*K.Lactis*	*E.Coli*	*E.Coli*	*A.Niger*
Molekül Kütlesi (Da)	117618	116351	118016	119160
Uzunluk (AA)	1025	1023	1031	1006
Proton verici	Glu^{482}	Glu^{461}	Glu^{449}	Glu^{200}
Nükleofil/Baz	Glu^{551}	Glu^{537}	Glu^{512}	Glu^{298}

1.3.1. β-Galaktozidaz'ın Genel Özellikleri

β-Galaktozidazlar, mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvan dokularında yaygın olarak bulunmaktadırlar. Bununla birlikte bakteriyal kaynaklı β-Galaktozidazlar daha çok tercih edilmektedirler. Çünkü yüksek enzim aktivitesi gösterirler ve kararlıdırlar (Godfrey ve West, 1996). Mikrobiyal kaynaklar olarak maya ve küfler gösterilebilir. Farklı kaynaklardan saflaştırılan β-Galaktozidazlar farklı özellikler göstermektedirler. Çizelge 1.2'de farklı kaynaklardan saflaştırılan β-Galaktozidazların çeşitli özellikleri verilmektedir.

Çizelge 1.2. Farklı kaynaklardan saflaştırılan β-Galaktozidazların özellikleri (Gikas ve Lopez-Levia, 1985)

Kaynak	Optimum pH	Optimum sıcaklık	Molekül kütlesi (kDa)	Aktivatörler ve diğer durumlar
A.niger	3,0-4,0	55-60	124	
A.oryzae	5, 0	50-55	90	Mn^{+2}, K^{+2}
K.fragilis	6,9-7,3	37	201	Mn^{+2}, Na^{+2}
K.lactis	7,2	35	135	K^{+2}, Na^{+2}
E.Coli	6,2-7,1	40	540	
L.thermophilus	3,4-4,3	55-57	530	
C.inaegualis	6,0	30-55		Yağsız süt için
B.Circulans	6,8	60-65		yüksek aktivite
Bacillus sp.	6,5-7,5	65		
L.bulgaricus		42-45		
S.thermophilus		55	500-600	

Ca^{+2} β-Galaktozidazların inhibitörü olarak bilinmektedir. Fakat sütte bulunan Ca^{+2} iyonlarının tamamı kazeine bağlıdır ve çözelti içerisinde serbest halde bulunmamaktadır. Bu nedenle β-Galaktozidazın aktivitesini inhibe etmemektedir (Garman ve ark., 1996).

1.3.2. β-Galaktozidaz'ın Kullanım Alanları

Sütteki laktozun uzaklaştırılması için kullanımı: Laktoz hidrolizi, bileşiminde laktoz bulunmayan yeni ürünlerin oluşturulması için yiyecek ve içecek endüstrisinde tercih edilen bir prosestir. Dünya nüfusunun büyük bir çoğunluğunda rastlanmakta olan laktoz intoleransı probleminin çözümlenebilmesi için sütteki laktozun uzaklaştırılması gerekmektedir. Laktoz intoleransı olan kişilerde süt ve süt ürünlerinin tüketimi sonrasında gaz sancısı, karın ağrısı ve ishal şikayetleri görülmektedir. β-galaktozidaz'ın insan bağırsağında bulunmasına rağmen bazı kişilerde yaşam boyunca hiç aktivite göstermediği veya aktivitesinin zamanla kaybedebildiği rapor edilmektedir (Pivarnik ve ark., 1995). Laktoz intoleransı

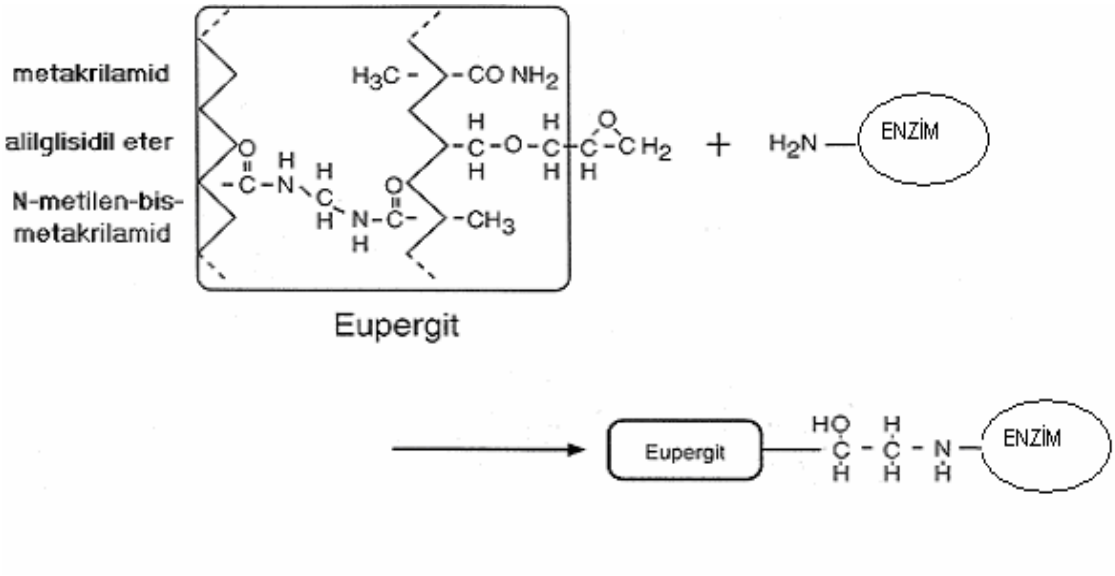
rastlanan kişilerin tüketimine sunulacak olan sütteki laktozun hidrolizi, laktozun kolay kristalize olabilmesi nedeniyle dondurma gibi donmuş yiyeceklerin kristallenmesini önlemek ve şekerleme üretiminde tatlılık oranını arttırmak için β-galaktozidaz kullanılmaktadır. Ayrıca fermente ve alkolsüz içkilerin üretiminde (Pivarnik ve ark., 1995) ve fırıncılıkta mayanın gelişmesi için (Pomeranz, 1964) β-galaktozidaz enziminden faydalanılmaktadır.

Peyniraltı suyundaki laktozun uzaklaştırılması için kullanımı: Peynir altı suyunda yüksek oranda bulunan laktozun geri kazanılmasıyla bisküvi, çikolata, dondurma, hazır çorba ve şarküteri ürünlerinin imalatında belirli oranlarda kullanıldığında süt tozunun yerine kullanılabilen bir ürün elde edilmekte ve aynı zamanda ekonomiye katkı sağlanmaktadır (Uhlig, 1998).

***Oligosakkaritlerin sentezlenmesinde kullanımı*:** β-galaktozidaz transgalaktozilasyon veya geri dönüşüm reaksiyonu ile bağırsakta yararlı bakterilerin gelişmesini sağlayan galaktooligosakkaritlerin oluşumunu katalizlemektedir. Yüksek laktoz konsantrasyonu, yüksek sıcaklık ve düşük su miktarının sağlandığı reaksiyon koşullarında (Brena ve ark., 2002) β-galaktozidaz, bütanol ve antibiotik (chlorphenisin ve chloroomphenical) içeren akseptör bileşiklerin üzerine laktozun galaktoz ünitelerini transfer ederek galaktooligosakkaritlerin oluşmasını sağlamaktadır (Iwasaki ve ark., 1996; İsmail ve ark., 1999).

1.4. Eupergit

Eupergit, N,N' –metilen-bis-(metakrilamid), glisidil metakrilat, allil glisidil eter ve metakrilamidin kopolimerasyonuyla yapılmış olan, çapı 100–200 μm olan makro gözenekli boncuklar içermektedir. Eupergit desteğin yapısı aşağıda gösterilmektedir:



Şekil 1.17. Eupergit desteğin yapısı ve enzimin kovalent immobilizasyonu

Enzimlerin Eupergite immobilizasyonu hem laboratuar koşullarında hem de endüstriyel uygulamalarda kolay ve hızlıdır. Özel ekipman ve kimyasal madde gerektirmemektedir. Standart yönteme göre tampon veya suda çözülmüş enzim ile Eupergit boncuklar etkileştirilir ve oda sıcaklığında veya +4°C'de 12-72 saat bekletilir (Boller ve ark., 2002).

Pessela ve ark. (2007), enzimin Eupergit desteğe immobilizasyonunun iki basamakta gerçekleştiğini önermektedirler. İlk basamakta enzim desteğe fiziksel adsorpsiyonla bağlanmaktadır. İkinci basamakta ise enzim oksiran gruplarıyla kovalent olarak bağlanmaktadır. Böylece oldukça kararlı olan C-N ve C-S bağları oluşmaktadır (Mateo ve ark., 2000).

Eupergit, nötral ve alkali pH değerlerinde protein moleküllerinin amino grupları ile oksiran gruplarını kovalent bağlamaktadır. Ayrıca asidik, nötral ve alkali pH değerlerinde enzimin karboksil ve sülfidril gruplarıyla da bağlanabilmektedir. Bu nedenle Eupergite bağlı enzim molekülleri pH 1-12 değerleri arasında uzun süre kararlılığını koruyabilmektedir (Katchalski ve Kraemer, 2000).

Eupergit, ucuz ve toksik etkisi görülmediğinden dolayı yiyecek ve ilaç sanayisinde kullanılan enzimlerin kovalent immobilizasyonunu sağlayan ve büyük ilgi gören bir destek materyalidir (Martin ve ark., 2003). 1000 L'den daha geniş

substrat ve reaktör tanklarında 650 kullanımdan sonra dahi Eupergit taneciklerinde önemli bir aşınma gözlenmemektedir (Katchalski ve Kraemer, 2000).

β-Galaktozidaz ve Glukoz İzomeraz enzimlerinin Eupergit C 250 L üzerine kovalent immobilizasyonu, immobilize enzimlerin karakterizasyonu (optimum pH, optimum sıcaklık, termal kararlılık, depolama kararlılığı, tekrar kullanılabilirliği); immobilize enzimlerin kinetik parametrelerinin (aktivasyon enerjisi, K_m, V_{max}, katalitik etkinliği) belirlenmesi ve bu parametrelerin serbest β-Galaktozidaz ve Glukoz İzomeraz ile kıyaslanması bu çalışmanın temelini oluşturmaktadır. Ayrıca immobilize β-Galaktozidaz'ın hidrolitik aktivitesinin yanı sıra transgalaktozilasyon aktivitesi de araştırılacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Chen ve ark., 1979 Glukoz İzomerazı *Streptomyces flavogrises'*den $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi ve DEAE-selüloz ile DEAE-sefadeks A-50 kolonlarını kullanarak iyon değiştirici kromatoğrafi ile saflaştırmışlardır. Saf enzimin ultrasantrifüj ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi yardımıyla homojen olmasını sağlamışlardır. Saflaştırdıkları Glukoz İzomeraz'ı benzil DEAE-selüloz, TEAE-selüloz ve DEAE-selüloza immobilize etmişler ve serbest enzim, immobilize enzim ve ısı ile muamele edilmiş tam hücre arasında çeşitli farklar olduğunu rapor etmişlerdir. Substrat olarak ise glukoz ve ksiloz kullanmışlardır. Tam hücrenin hem ksiloz hem de glukoz için en yüksek K_M değerine; serbest ve immobilize enzimlerin ise en düşük K_M değerine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimler için optimum sıcaklık 70^oC, tam hücre için 75^oC ve her üç enzim formu için optimum pH' nın 7,5 olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin aktivitesi için Mg^{+2} ve Co^{+2} gerekirken, Hg^{+2}, Ag^{+2} veya Cu^{+2}'nin enzimin inhibitörü olduğunu bildirmişlerdir. Serbest enzimin pH 5.0-9.0 aralığında , immobilize enzimin ve tam hücrenin ise pH 5,5-9.0 aralığında daha kararlı olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize enzimin ve tam hücrenin Mg^{+2} ve Co^{+2} varlığında 70^oC'de 5 gün reaksiyonundan sonra, sürekli izomerizasyonundan sonra kalan aktiviteyi %50-75 olarak belirlemişlerdir.

Converti ve Del Borghi, 1997 Glukozun fruktoza izomerizasyonuna termodinamik niceliklerin etkisini ticari immobilize glukoz izomeraz kullanarak test etmişlerdir. Hesaplanan değerleri serbest enzimle karşılaştırmışlar ve 70^oC'nin üstünde daha yüksek denge sabiti ve hem standart entalpide hem de reaksiyonun entropisinde artış olduğunu bildirmişlerdir. İleri reaksiyonun aktivasyon entalpisinin serbest enziminkinden %24 daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir. GI'ın kinetik parametrelerini heasaplamak için Briggs-Haldene mekanizmasından yararlanmışlardır.

Giacomini ve ark. 1998 *Kluyveromyces Lactis* β-galaktozidazını silanladıkları ve glutaraldehit ile aktifleştirdikleri CPC-silika ve 1-siyano-4-(dimetilamino)-piridinyum tetrafloroborat (CDAP) ile aktifleştirdikleri agaroza kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Enzimin aktif CPC-silikaya aktif CDAP-agarozdan daha az tutulduğunu rapor etmişlerdir. Desteğe yüklenen enzim miktarı daha düşük olduğunda (12,6 mg/ml) enzim immobilizasyonunun % 100 olduğunu ancak immobilize GI aktivitesinin serbest GI aktivitesinin %34'ü kadar olduğunu rapor etmişlerdir. ONGP substratı kullanılarak ölçülen K_M değeri CDAP-agaroza bağlı enzim için 3,4 mM, serbest β-galaktozidaz için 2 mM olarak belirlenmiştir. Desteğe yüklenen enzim miktarı 5 kat arttırıldığı zaman CDAP-agaroza tutturulmuş enzim için K_M değerinin 4 kat artarak 13 mM olduğunu ve CPC-silikaya tutturulmuş enzimin V_{max} değerinin serbest enzimin V_{max} değerine göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. CDAP-agaroza bağlanmış enzimin, CPC-silikaya bağlanmış enzime göre daha yüksek termal kararlılık gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Palazzi ve Converti, 1999 Hem glukozun fruktoza izomerizasyonunu hem de immobilize glukoz izomerazın farklı koşullardaki kinetik parametrelerini karşılaştırmışlar ve tartışmışlardır. İzomerizasyon kinetiğini tanımlamak için Briggs-Halden mekanizmasından yararlanmışlardır.

Manjon ve ark., 1999 *Kluyveromyces Lactis* β-galaktozidazını Amberlite IRC–50 üzerine tutuklamışlardır. Sıkıştırılmış yataklı reaktör kullanarak sütteki laktozun sürekli hidrolizini incelemişlerdir. Bu sonuçları serbest enzim ile kesikli reaktörden aldıkları sonuçlar ile karşılaştırmışlardır. Serbest enzimin çözelti içerisindeki derişiminin artması ile birlikte laktozun hidroliz hızında da doğru orantılı olarak bir artış görülmediğini rapor etmişlerdir. Bu durumda reaksiyon zamanı ve substratın ürüne dönüşüm miktarı için en iyi oranı elde etmek için enzim miktarının en iyi şekilde kullanılması gerektiğini rapor etmişlerdir.

Boon ve ark., 2000 *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae,Kluyveromyces lctis* ve *Kluyveromyces fragilis'*den izole edilen β-galaktozidaz'ı kullanarak 20, 30, 40 ve 50°C'deki oligosakkaritlerin enzimatik sentezini araştırmışlardır. Sıcaklık arttıkça oligosakkarit sentezinin de arttığını bildirmişlerdir.

Hernaiz ve Crout, 2000 *Bacillus circulans* β-galaktozidazını ve A*spergillus oryzae* α-galaktozidazını Eupergit C üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimlerin katalitik etkinliğinin ve termal kararlılığının serbest enzime göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Szczodrak, 2000 *Kluveramyces fragilis* nötral β-galaktozidazını glutaraldehit ara kolu üzerinden silanlanmış gözenekli cama immobilize etmişler ve immobilize enzimin serbest enzimin aktivitesinin %90'ından daha fazlasını koruduğunu bildirmişlerdir. İmmobilizasyon sonucunda optimum pH 7.0'den 6.0'ya düşmüş, optimum sıcaklık ise 35^{o}C'den 50^{o} C'ye çıkmıştır. Serbest enzime göre immobilize enzimin geniş pH ve sıcaklık aralığında daha yüksek katalitik aktivite ve daha yüksek kararlılık gösterdiğini rapor etmişlerdir. Enzimin aktivitesini GOD-peroksidaz kullanarak açığa çıkan glukoz miktarını ölçerek hesaplamışlardır.

Lee ve Hong, 2000 İmmobilize D-glukoz izomerazın substratına ilgisini immobilize enzim-paket reaktörünü kullanarak araştırmışlardır. İzomerizasyon deneylerini α-, β-, ve dengedeki D-glukoz çözeltilerini kullanarak yapmışlardır. pH 7,5 ve 60^{o}C'deki reaksiyon koşullarında glukozun β-anomerinin α-anomeri kadar iyi bir substrat olduğunu gözlemlemişlerdir. Substrat konsantrasyonu için 0,028 mol L^{-1} (%1 w/v) α-D-glukoz kullanıldığında glukozun fruktoza dönüşüm oranının aynı konsantrasyondaki D-glukoz çözeltisinden (0,028 mol L^{-1}) %43, β-D-glukoz çözeltisinden %113 daha yüksek olduğunu bildirmektedirler. Glukoz izomerazın bu anomerik aktivitesi Briggs-Haldene mekanizmasına uyan reaksiyon basamaklarına göre hesaplanarak kinetik dengenin matematiksel olarak tanımlanması sağlanmış ve kinetik sabitler deneysel olarak belirlenmiştir.

Chen ve Zhou, 2001 *Kluveromyces Lactis* β-galaktozidaz enziminin glutaraldehit ile grafit yüzeye çapraz bağlanarak tutturulmasını sağlamışlardır. Grafit yüzeyi 200^{o} C'de, 18 saat oksidatif olarak aktifleştirmişlerdir. İmmobilize enzimin aktivitesini tayin etmek için laktoz ve enzimin suni substratı olan ONPG kullanılmıştır. Sırasıyla glukozun ve o-nitrofenolün renk şiddetinden yararlanarak spektrometrik olarak enzimin aktivitesi hesaplanmıştır. Bu çalışmaya göre yüklenen enzim miktarı attıkça, ürün miktarının da azaldığı gözlenmiştir. Serbest enzim için K_M değeri 1,74 mM , V_{max} 77,34 μmol o-nitrofenol min^{-1} mg^{-1} enzim olarak

belirlenirken, immobilize enzimin K_M değeri ise serbest enzimin 5 katı olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada immobilize enzimin reaksiyon karalılığının ve depolama kararlılığının serbest enzime göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Tanrıseven ve Doğan, 2002 *Aspergillus oryzae* β-galaktozidazını glutaraldehit ile sıkılaştırılmış jelatin ve alginat karışımı fiberler içerisinde tutuklamışlardır. İmmobilizasyon sonucunda bağıl aktivitenin 35 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %56'sının kaldığını hesaplamışlardır. İmmobilizasyon sonucunda optimum koşulların değişmediği ve hem serbest hem de immobilize enzim için optimum reaksiyon pH'sının 4,5 ve optimum reaksiyon sıcaklığının ise 50^oC olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize β-galaktozidazın yüksek pH ve sıcaklık değerlerinde serbest enzime göre daha kararlı olduğunu rapor etmişlerdir. Serbest enzim için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 42 mM , 1,30 mg glukoz min^{-1} mg^{-1} enzim iken immobilize enzim için 51 mM, 0,73 mg glukoz min^{-1} mg^{-1} enzim olarak bildirilmiştir.

Bandlish ve ark. 2002 *Thermotoga maritima* (TMGI), *Thermotoga neapolitana 5068* (TNGI) *ve Streptomyces murinus* (SMGI) glukoz izomerazlarının immobilize ve serbest formlarını kullanarak yüksek sıcaklıklarda glukozun fruktoza izomerizasyonunu araştırmışlardır. pH 7'de Mg^{+2}'nin varlığında serbest enzimler için optimum reaksiyon sıcaklığını SMGI için 85^oC, TNGI için 95-100 ^oC, TMGI için 100^oC ve üzeri olarak rapor etmişlerdir. Cam boncuklara kovalent olarak immobilize edilen her üç enzim için Mg^{+2} varlığındaki verimlilik 1 kg SMGI için 60-70^oC de 750-760 kg fruktoz, en yüksek verimlilik ise hem TMGI hem de TNGI için Mg^{+2} varlığında 70^oC'de yaklaşık 200-230 kg fruktoz olarak bildirilmiştir. 80^oC'de her üç enzim için verimliliğin 30 kg'dan 273 kg'a kadar değiştiğini rapor etmişlerdir.

Numanoğlu ve Sungur, 2003 β-galaktozidaz enzimi salgılayan *Kluveromyces Lactis* hücreleri glutaraldehit kullanılarak jelatine çapraz bağlama yöntemiyle tutturulmuştur. 2 tane kimyasal (toluen, etanol-kloroform çözeltisi kullanarak) ve 1 tane de fiziksel(cam boncuk ile öğüterek) hücre parçalama yöntemi uygulanmış olup, fiziksel metodun kullanımıyla daha iyi sonuç alındığı bildirilmektedir. Kimyasal metodun kullanılmasıyla toksik etkinin görüldüğünü rapor etmişlerdir. Serbest ve immobilize *Kluveromyces Lactis* β-galaktozidaz hücreleri

için en yüksek aktivitenin 37 ^{o}C'de, pH 6.5 fosfat tamponunda görüldüğü ve 34 gün içinde 17 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %80'ini koruduğunu bildirmişlerdir.

Pessela ve ark, 2003 *Thermus sp.*T_2 (Htag-BgaA) β-galaktozidazının galaktoz (K_i:3,1mM) tarafından yarışmalı, glukoz (K_i:49,9 mM) tarafından ise yarışmasız olarak inhibe edildiğini rapor etmişlerdir. Bu inhibisyonlar enzimin heterofonksiyonel epoksi Sefadeks boncuklara (boronat-epoksi –sefadeks ve şelat-epoksi-sefadeks) immobilizasyonu ile azaltılmıştır. Enzimin immobilizasyonuyla galaktozun yarışmalı inhibisyon sabiti boronat-epoksi-sepadeks için 12,5 mM ve şelat-epoksi-sefadeks için 11,7 mM olarak değişirken enzimin K_M değerinin sadece 2 kat arttığını bildirmektedirler. Yarışmasız inhibisyon sabitinin ise önemli bir artış göstermediği, sadece 2 katı kadar arttığını rapor etmişlerdir.

Ovseveji ve ark., 2004 agaroz**,** Toyopearl ve Eupergit üzerinde tiyopropil yardımıyla merkaptohidroksipropil-eter gruplarını oluşturarak, bu desteklerle etkileştirdikleri *Kluyveromyces lactis* β-galaktozidaz'ındaki disülfit bağlarının indirgenmesini ve enzimin –SH gruplarının içeriğinin 3 kat arttırılmasını sağlamışlardır. Disülfit bağlarının indirgenmesi için β-galaktozidaz içeren çözeltiye DTT eklediklerinde de aynı sonuçları elde etmişlerdir. İndirgenme yönteminden sonra desteklerde kalan –SH gruplarının miktarı tiyopropil-agaroz ve tiyopropil-Toyopearl için % 60 ve tiyopropil-Eupergit için %40 olarak hesaplanmıştır. İndirgenen enzimi tiyosülfinat (TSI) artıkları ile aktifleştirilen agaroza immobilize etmişlerdir. DTT veya tiyopropil-agaroz ile indirgenen enzim için immobilizasyon sonucu bağlanma %60'dan fazla iken tiyopropil-Toyopearl veya tiyopropil-Eupergit ile indirgenen enzim için immobilizasyon sonucu bağlanma %40'dan fazladır. 45° C'de hesaplanan yarı ömürleri DTT ile indirgenen enzim için 90 dakika ve tiyopropil-Toyopearl ve tiyopropil-agaroz ile indirgenen enzim için 30 dakikadır. Bu enzimlerin kullanılmasıyla 25°C'de 2 saat sonunda laktozun %90'ının hidroliz olduğunu rapor etmişlerdir.

Gaur ve ark., 2006 *Aspergillus oryzae* β-galaktozidaz'ını selit üzerine adsorpsiyon, çitosana kovalent bağlama ve glutaraldehit ile çapraz bağlama yöntemlerini kullanarak immobilize etmişler ve immobilize enzimlerin K_M

değerlerinin arttığını hesaplamışlardır. Çitosana immobilize edilen β-galaktozidaz'ın bu çalışmadaki diğer immobilize enzim preparatları ile kıyaslandığında daha fazla oligosakkarit sentezi aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çitosana immobilize edilen β-galaktozidaz'ın serbest enzime göre 60°C'de 1,6 kat daha kararlı olduğunu ve çapraz bağlı β-galaktozidaz ile serbest β-galaktozidaz'ın 65°C'deki yarı ömürlerinin sırasıyla 1.07 saat ve 0.79 saat olduğunu bildirmişlerdir. Hem çitosana immobilize edilen β-galaktozidaz'ı hem de çapraz bağlamayla immobilize edilen β-galaktozidaz'ı oligosakkarit sentezinde kullanmışlardır. %20 laktoz çözeltisi kullanıldığında çitosana immobilize edilen β-galaktozidaz'ın 40°C'deki 2 saat reaksiyon sonunda serbest enzime göre daha fazla oligosakkarit aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Demirel ve ark., 2006 glukoz izomeraz enzimini poliakrilamid, poliakrilamid/κ-karrojen ve poliakrilamid/alginat gibi üç farklı hidrojele tutuklamışlardır. Serbest ve immobilize GI enzimi için optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7,5 ve 60^{o} C olarak belirlemişlerdir. Serbest enzim, poliakrilamid, poliakrilamid/κ-karrojen ve poliakrilamid/alginata immobilize edilmiş enzimin K_M değerleri sırasıyla 18,87, 1,22, 2,78 ve 4,54 mg/ml ; V_{max} değerleri ise yine aynı sıraya göre 2,51, 0,63, 0,72 ve 0,82 mg/ml dk ; immobilize enzimin depolama kararlılığını ise 42 gün sonrasında %81, %33, %32 olarak bildirmektedirler. 5 gün içerisindeki 25. kullanımdan sonra kalan aktiviteyi %98, %71 ve %72 olarak rapor etmişlerdir. Optimum pH için 5.0-9.0 aralığında; optimum sıcaklık için ise 40-80^{o}C aralığında çalışmışlardır. 70^{o}C veya 40^{o}C'de yapılan çalışmalarda serbest enzim için aktivite kaybınının %40 immobilize enzim için ise %78'den daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Ladero ve ark., 2006 *Thermus sp. strain T2'den* saflaştırılan β-Galaktozidaz'ın serbest ve immobilize formunun termal ve pH inaktivasyonunun kinetik modeli üzerinde çalışmışlardır. Sıcaklık olarak 60-90^{o}C ve pH aralığı olarak ise 3.0-5.0 asidik ile 10.0-13.0 bazik aralığını kullanmışlardır. 50 g/L laktoz içeren, 50 mM ve pH 7,2 fosfat tamponunda inaktivasyon sıcaklığının serbest enzim için 60-90^{o}C, immobilize için ise 80-90^{o}C olduğunu rapor etmişlerdir. Kinetik parametre değerleri asidik şartlarda immobilize formun daha kararlı olduğunu göstermiştir.

Böylece peynir altı suyunun endüstriyel olarak işlenmesinde kazanç sağlanabileceğini rapor etmişlerdir. pH inaktivasyonunun kinetik parametrelerinin eğiliminde protonik ve hidroksit türlerinin konsantrasyonuna bağlı olarak hiperbolik veya sigmoid bir eğilim gözlemlenmiştir.

Borges da Silva ve ark., 2006 taşınabilir yataklı reaktör (SMBR-simulated moving bed reactor) teknolojisini kullanarak glukozun fruktoza izomerizasyonuyla HFCS üretimi üzerinde çalışmışlardır. Bunun için immobilize GI kullanmışlardır. İzomerizasyon kinetiği Lineweaver-Burk grafiği ile 328 K'de tanımlanmıştır. Taşınabilir yataklı reaktör benzeri bir sistemde reaksiyon ve ayırma prosesinin birleştirilebileceğini rapor etmişlerdir. Glukoz izomerizasyonu için yeni bir SMBR sistemi önermişlerdir. Ayrıca proses parametrelerinin enzimin aktivitesine etkisini araştırmışlardır.

Deveci, 2006 immobilize GI'ın sıkıştırılmış yatak ve akışkan yatak reaktörlerindeki çalışma kinetiklerini, yarı ömürlerini ve prodüktivitelerini incelemiş ve karşılaştırmıştır. Yükseklik (H)/ Çap (D) oranı 3,75 olan sıkıştırılmış yatak reaktördeki GI'ın yarı ömrünü 122 gün ve prodüktivitesini 5528 kg fruktoza dönüşen katı madde/kg enzim olarak bulmuştur. H/D oranları 2,67;1,71;1,25 olan akışkan yatak reaktörlerinin üçünde de enzimin yarı ömrünü 143 gün ancak prodüktivitelerini sırasıyla 6360, 5995 ve 5643 kg fruktoza dönüşen katı madde /kg enzim olarak bulmuştur. Yarı ömürler sonunda sıkıştırılmış yatak reaktörün ortalama fruktoza dönüştürme yüzdesi %42,13 iken akışkan yatak reaktörler için bu değer sırasıyla %39,24; %38,05; %37,90 olarak bulunmuştur.

Panesar ve ark., 2007 laktozun hücre zarından geçirgenliğinin zayıf olması nedeniyle açığa çıkan sindirim problemlerinin üstesinden gelmek için sütteki laktozun hidrolizi için *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3465 hücrelerini kullanmışlardır.Bu hücrelerin kullanılması ile yağı alınmış sütteki laktozun maksimum hidrolizi için çeşitli proses parametrelerinin (sıcaklık, reaksiyon süresi, çalkalama gibi) optimizasyonunu araştırmışlardır. Etanol ile muamele edilmiş maya hücrelerinin belirlenen optimum koşullar altında sütteki laktozun %89'unu hidroliz ettiğini rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck veya Sigma, St. Louis, MO. firmasından sağlanmıştır. Araştırmada kullanılan kimyasallar, araç ve gereçler şunlardır:

Kimyasallar: *Kluyveromyces Lactis* β-Galaktozidazı (Sigma G-3664, 3000 U. mL^{-1}), *Streptomyces Rubiginuous* Glukoz İzomerazı (3000 U/g (minimum), spesifik yoğunluğu 1.11-1.30 g/mL), Eupergit C 250 L (gözenek çapı:100 nm ve oksiran grupları: 300 μmol g^{-1} kuru boncuk), glukoz, galaktoz, laktoz, fruktoz, 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, sodyum karbonat, sığır serum albumin (BSA)

Araç ve gereçler: UV-Vis spektrofotometre (ATI UNICAM), HPLC (Shimadzu, Classs Vp serisi), pH metre (HANNA 8417), magnetik karıştırıcı, inkübatör (ES 500), santrifüj, analitik terazi, otomatik pipet, girdap karıştırıcı, termostatlı çalkalayıcılı su banyosu, kriyostat, magnetik karıştırıcı, otomatik pipet.

3.2. Metod

3.2.1. Protein Tayini

Protein tayini Lowry (1951) yöntemiyle yapılmıştır. Bunun için içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1) Çözelti A: 20 g Na_2CO_3 ve 4 g NaOH saf suda birlikte çözülüp son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

2) Çözelti B: 0,5 g $CuSO_4.5H_2O$, % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülüp son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3) Çözelti C: 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. (Kullanılacağı zaman hazırlanmasına dikkat edilmiştir).

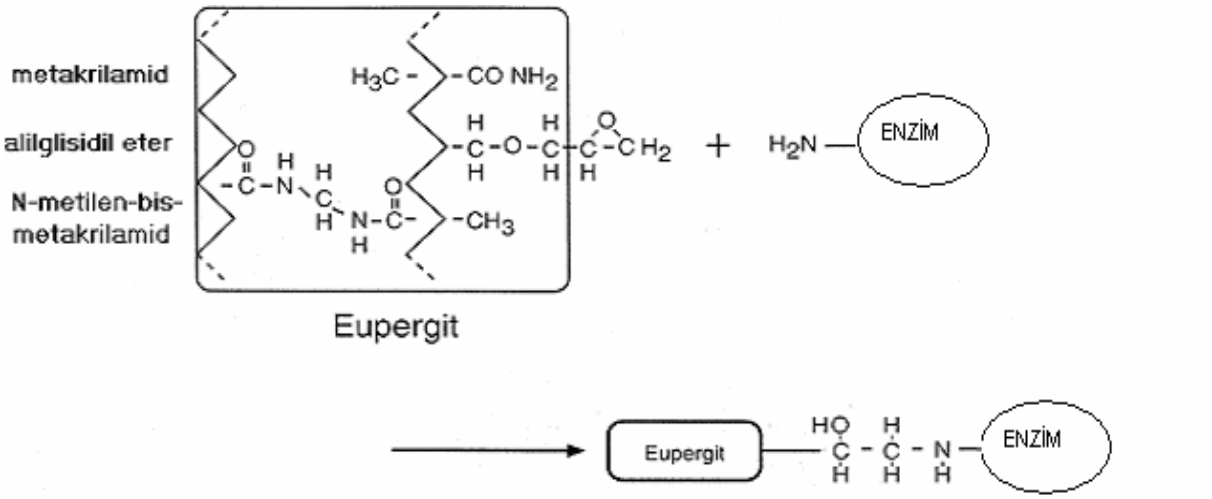
4) Folin-Ciocalteu çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

5) Standart protein çözeltisi:100 mL'de 14 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 ve 1000 µL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi su ile 1 mL'ye tamamlanmış, her tüpe 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 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 standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. β-Galaktozidaz ve GI'ın Eupergit'e Kovalent İmmobilizasyonu

Enzimlerin Eupergit'e immobilizasyonunda Pessela ve ark.(2007), tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 5 gr desteğe 10 mL enzim çözeltisi (1 mg/mL) içeren 1 M pH 7,0 fosfat tamponu eklenmiş ve 25^{o}C'de 24 saat çalkalayıcılı su banyosunda bekletilmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra immobilize enzim saf su ile süzüntüde protein kalmayıncaya kadar yıkanmıştır. Toplam süzüntüde protein tayini yapılarak g destek başına tutuklanan mg enzim miktarı hesaplanmıştır. Protein tayini Lowry metoduna göre yapılmıştır.



Şekil 2.1. Enzimlerin Eupergit desteğe kovalent immobilizasyonu

3.2.3. Serbest veya İmmobilize GI'ın Aktivitesinin Belirlenmesi

GI'ın aktivite tayini için ise Chen ve ark. (1979) 'un önerdiği yöntem kullanılmıştır. 60^{o}C'de 30 dakika bekletilen reaksiyon karışımında glukozun fruktoza izomerizasyonu sonucu oluşan fruktoz miktarı ilk defa McRary ve Slattery (1945) tarafından önerilen ve Tolsma, A.D., (2002) tarafından kullanılan Rezorsinol-HCI metoduna 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 $CoCI_2.6H_2O$'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 eklenir. Fruktoz içeren örnekler 500 kat seyreltildikten sonra gerekli reaktifler eklenmiş ve absorbansları 540 nm'de okunmuştur. Oluşan fruktoz miktarı belirli fruktoz derişimlerine karşı 540 nm'de absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen standart fruktoz eğrisinin eğiminden yararlanılarak bulunmuştur. Enzimin aktivitesi µmol fruktoz dk^{-1} g^{-1} protein olarak hesaplanmıştır.

İmmobilize GI aktivitesinin ölçümünde, immobilize GI içeren 5 mg destek alınarak üzerine uygun derişim ve pH'daki tampon içerisinde hazırlanmış olan 2,6 M

glukoz, 1 mM $CoCI_2.6H_2O$ ve 20 mM $MgSO_4.7H_2O$ içeren substrat çözeltisinden 1 mL eklenmiş ve 30 dakika sonunda reaksiyon 250 µL %20'lik HCI (v/v) çözeltisinden eklenerek durdurulmuştur 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz alınmıştır. Fruktoz içeren örnekler 170 kat seyreltildikten sonra gerekli reaktifler eklenmiş ve absorbansları 540 nm'de okunmuştur. İmmobilize GI aktivitesi µmol fruktoz dk^{-1} g^{-1} destek olarak hesaplanmıştır.

3.2.4. 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, A.D., 2002).

3.2.5. Serbest veya İmmobilize β-Galaktozidaz'ın Aktivitesinin Belirlenmesi

β-Galaktozidaz'ın aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan yöntemde 37°C'de 30 dakika bekletilen reaksiyon karışımında azalan laktoz veya laktozun hidrolizi sonucu oluşan glukoz veya galaktozun miktarı belirlenmiştir. Uygun pH ve derişimdeki tampon içerisinde %5 laktoz (w/v) içerecek şekilde substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Enzimin aktivatörü olarak kullanılan $MgCI_2$'ün substrat çözeltisi içerisindeki derişimi 1,5 mM'dır. 2 mL substrat çözeltisi üzerine 50 µL 0,5 mg/mL derişimindeki enzim çözeltisinden eklenir ve 37°C'de 30 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için reaksiyon tüpleri kaynar su banyosunda 10 dakika bekletilir. 150 kat seyreltilen laktoz örneklerinin absorbansları gerekli reaktifler eklendikten sonra 540 nm'de okunmuştur. Reaksiyon sonucu kalan laktoz miktarı,

belirli laktoz derişimlerine karşı 540 nm'de okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen standart laktoz grafiğinin eğiminden yararlanılarak hesaplanmıştır (Nickerson ve ark., 1976). Bu değer başlangıçta ortamda bulunan laktoz miktarından çıkarılarak oluşan glukoz veya galaktoz miktarından aktivite hesaplanmış ve enzimin aktivitesi μmol glukoz dk^{-1} mL^{-1} protein olarak verilmiştir.

İmmobilize β-Galaktozidaz'ın aktivitesinin ölçümünde immobilize β-Galaktozidaz içeren 10 mg destek alınarak üzerine uygun derişim ve pH'daki tampon içinde hazırlanmış olan %5 laktoz ve 1,5 mM $MgCI_2$ içeren substrat çözeltisinden 2 mL eklenmiş ve 30 dakika sonra tüpler kaynar su banyosunda 10 dakika bekletilerek reaksiyon durdurulmuştur. Tüpler 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra alınan üst faz alınarak HPLC cihazında ölçüm alınmıştır.

3.2.6. Laktoz Tayini

Bu yöntemin temeli laktoz ile metilaminin sıcak alkali ortamda verdiği kırmızı renkli kompleksin 540 nm'de verdiği absorbansına dayanmaktadır.

Çözeltilerin hazırlanması:

***Glisin-NaOH Tamponu*:** 2,4768 g glisin içeren 150 mL glisin çözeltisi ile 0,385 N NaOH (pH 12,8) içerisinde 1,9359 g NaCI bulunan çözeltinin 850 mL'si karıştırılır.

***Metilamin Çözeltisi*:** 5 g metilamin-HCI saf su ile çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlanır ve buzdolabında saklanır.

%1'lik (w/v) Sodyum Sülfit Çözeltisi: 1 g sodyum sülfit saf su ile çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

Standart Laktoz Çözeltisi: 2,5315 g laktoz monohidrat saf su ile çözülerek hacmi 200 ml'ye tamamlanır.

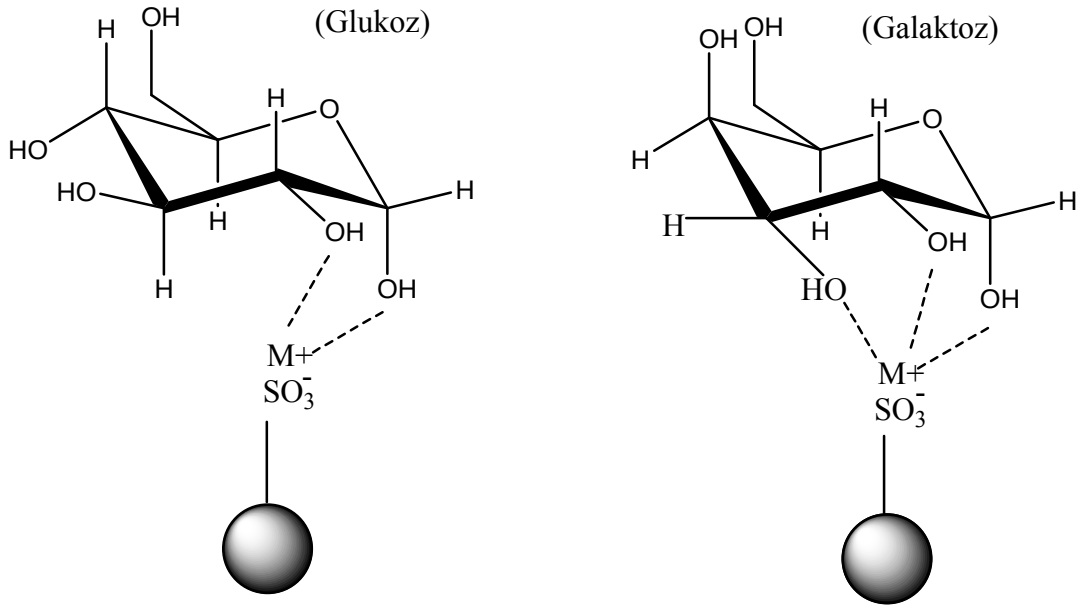
Standart laktoz eğrisinin çizimi: 7 adet deney tüpü alınır ve tüplerin laktoz derişimleri 0.5, 1, 1.5, 2, 3.5, 4 ve 5 mg/mL olacak şekilde 2,5 mL laktoz çözeltisi ve kör için ise 2,5 mL saf su konulmuştur. Her bir tüpe 2,5 mL glisin-NaOH tamponu, 0,250 mL sodyum sülfit ve 0,250 ml metilamin çözeltisi ilave edildikten sonra 65°C'de 25 dakika bekletilmiş ve tüpler iki dakika buz banyosunda bekletilerek reaksiyon durdurulmuştur. Tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 540 nm'de

okunmuştur. Bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiş ve bu grafiğin eğiminden yararlanılarak aynı yöntemle örneklerin laktoz içerikleri tayin edilmiştir (Nickerson ve ark., 1976).

3.2.7. HPLC Analizleri

HPLC analizleri Shimadzu (Classs Vp serisi) marka cihaz ile yapılmıştır. Sistem LC-6AD dual pompa, CTO-10AS Vp kolon fırını, SL-10AF oto örnekleyici ve RID-10A refraktif indeks dedektör ile konfigüre edilmiştir. Analizler Bio-Rad Aminex HPX-87C şeker kolonunda (300mm x 7.8mm), 0.5 mL/dakika akış hızında, 70ºC sıcaklıkta yapılmıştır. Mobil faz olarak deiyonize su kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar LC solution yazılımı ile değerlendirilmiştir. Kalitatif tayinlerde glukoz, galaktoz, laktoz standartları kullanılmıştır.

Glukoz, galaktoz ve laktoz'un saf su içerisinde hazırlanan %5'lik (w/v) standart çözeltileri ve immobilize β-Galaktozidaz ile etkileştirilen laktoz örnekleri Aminex HPX-87C kolonu kullanılarak HPLC ile ölçülmüştür. Bu kolonun ayırma prensibi; moleküler eleme, ligand değişim ve iyonik etkileşim olmak üzere üç temele dayanmaktadır. Kolon dolgu malzemesi karbohidrat ve organik madde analizlerinde çok etkin olan sülfolanmış polistiren dolgu malzemesinin Ca^{+2} formundan oluşmaktadır. Bu yapı sayesinde Ca^{+2} iyonları şekerlerdeki -OH grupları ile ne kadar fazla etkileşirlerse alıkonma da o kadar fazla olacaktır (Şekil 2.2). Moleküler elemeyle ayırım sayesinde ise büyük olan moleküllerin kolonda alıkonma süresi küçük olanlardan daha kısadır. Buradan çıkartılacak sonuca göre oligosakkaritler, disakkaritlerden önce dedektörde görülürken en son monosakkaritler görüleceklerdir. Bir başka ifade ile bir disakkarit olan laktozun alıkonma süresi, moleküler eleme prensibi gereği kendisini oluşturan glukoz ve galaktoz monosakkaritlerinden daha kısadır. Bu iki monosakkaritten kolon ile konformasyonu gereği daha fazla etkileşen galaktozun kolonda alıkonma süresi glukoza göre daha uzundur.



Şekil 2.2. Sülfolanmış polistiren dolgu malzemesinin Ca^{+2} formundan oluşan Bio-Rad Aminex HPX-87C şeker kolonunda glukoz ve galaktozun iyonik etkileşim ile alıkonması (M^{+}: Ca^{+2}).

3.2.8. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

3.2.8.1. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum pH'larının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize GI'ın aktivitesi farklı pH'larda (5.0 asetat, 6.0 sitrat, 7.0, 8.0 fosfat ve 9.0 borat) 200 mM tampon içinde hazırlanmış 2,6 M glukoz çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 30 dakika sonunda oluşan fruktoz miktarı ölçülerek aktiviteler hesaplanmış ve sonuçlar % maksimum aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir.

Serbest β-Galaktozidaz'ın aktivitesi farklı pH'larda (5.0 asetat, 6.0 sitrat, 7.0 ve 8.0 fosfat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 2 mL %5'lik (w/v) laktoz çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 30 dakika sonunda oluşan glukoz miktarı ölçülerek sonuçlar % maksimum aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.2.8.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Tampon Derişimlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize GI'ın aktiviteleri daha önce belirlenmiş olan optimum pH'larda ve farklı tampon derişimlerinde (100, 200, 300, 400 ve 500 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüştür.

Serbest β-Galaktozidaz'ın aktivitesi daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da ve farklı tampon derişimlerinde (50, 75, 100, 125 ve 150 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.8.3. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize GI'ın aktiviteleri daha önce belirlenmiş olan optimum pH ve tampon derişimi için farklı sıcaklıklarda (40, 50, 60, 70 ve 80°C) belirlenmiştir.

Serbest β-Galaktozidaz'ın aktivitesi daha önce belirlenmiş olan optimum pH ve tampon derişimi için (20, 30, 37, 40 ve 50°C) belirlenmiştir. Her enzim örneği için aktivitenin sıcaklıkla arttığı ve azaldığı bölgeler için Arrhenius grafiği çizilmiş ve elde edilen iki doğrunun ortak çözümü ile enzimin denatüre olmaya başladığı sıcaklık belirlenmiştir. Aktivitenin sıcaklıkla arttığı bölge için elde edilen grafiğin eğimi yardımıyla enzimin aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır.

3.2.8.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize GI ve serbest β-Galaktozidaz'ın aktiviteleri optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Ayrıca serbest ve immobilize GI için geri dönüşüm sayısı ve katalitik etkinlik paramatreleri hesaplanmıştır.

3.2.8.5. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

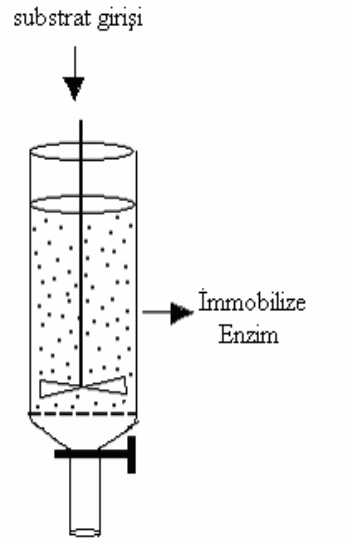
Serbest ve immobilize GI 4 farklı sıcaklıkta (5, 25, 40 ve 60°C) 18 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 3, 7 ve 18 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.8.6. Serbest ve İmmobilize GI'ın Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize GI'ın başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 1 ay boyunca belirli aralıklarla ölçülmüştür.

3.2.8.7. İmmobilize GI'ın Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

İmmobilize GI'ın tekrar kullanım kararlılığı belirlenirken kesikli ve karıştırmalı kolon reaktör kullanılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. İmmobilize GI'ın tekrar kullanım kararlılığının belirlendiği kesikli ve karıştırmalı kolon reaktör

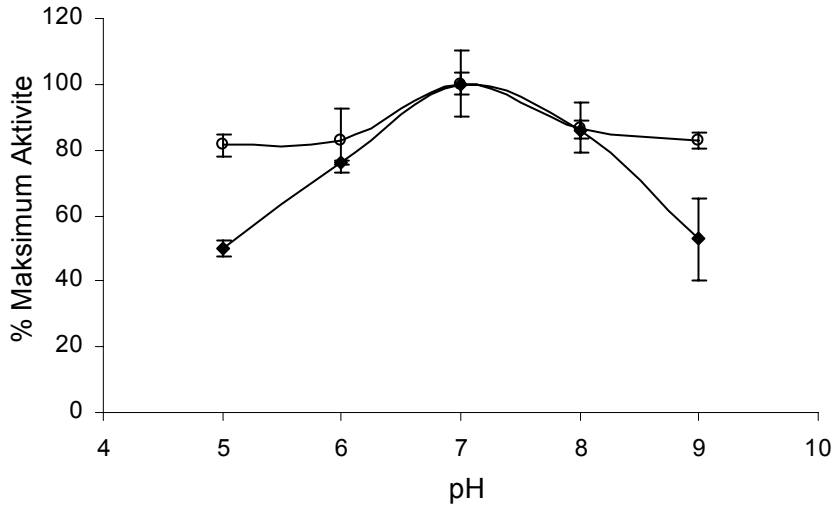
10 mg immobilize GI bulunan kolona 1 mL 2.6 M glukoz çözeltisi eklenmiş ve 30 dakika sonunda alttaki musluğun açılması ile kolon boşaltılmıştır. Enzim aktivitesi oluşan fruktoz miktarı ölçülerek hesaplanmıştır. Kolon boşaltıldıktan 30 sn sonra aynı kolona tekrar 1 mL substrat çözeltisi eklenerek aynı şekilde aktivite belirlenmiş ve bu işlem 18 kez tekrarlanmıştır. Kalan aktivite ilk kullanımdaki aktivitenin %'si olarak hesaplanmıştır.

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1.Bulgular

4.1.1. Serbest ve İmmobilize GI'ın Karakterizasyonu

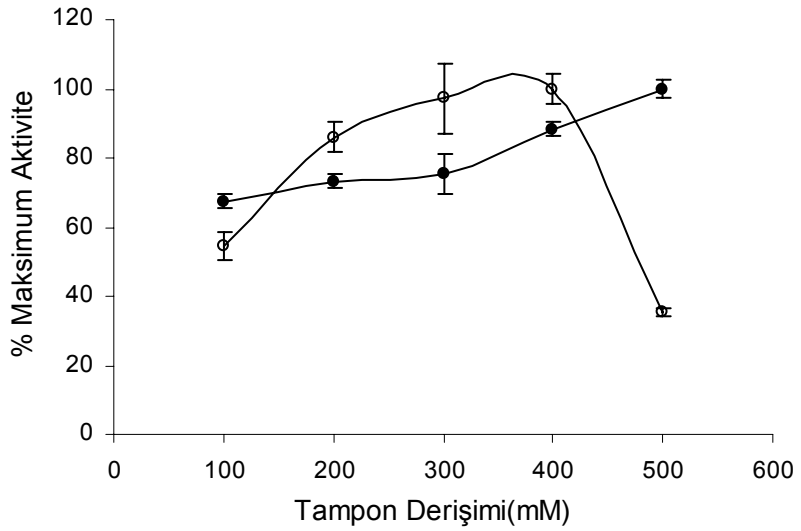
Serbest ve immobilize GI'ın farklı pH 'daki aktiviteleri % maksimum aktivite olarak şekil 4.1'de verilmektedir.



Şekil 4.1. Serbest ve immobilize GI aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi (◦): İmmobilize GI, (●): Serbest GI

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi serbest ve immobilize GI'ın her ikisi de en yüksek aktiviteyi pH 7.0'de göstermektedir.

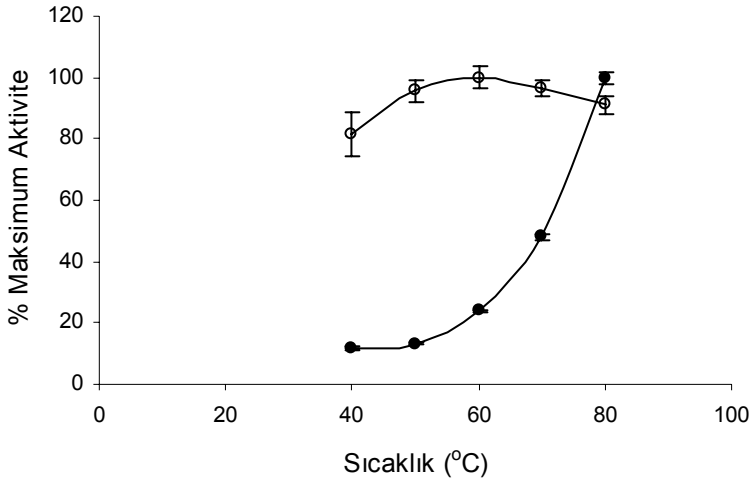
Serbest ve immobilize GI'ın pH 7.0'de hazırlanmış olan farklı derişimlerdeki tampon çözeltileri kullanılarak aktiviteleri belirlenmiş ve sonuçlar % maksimum aktivite olarak şekil 4.2'de gösterilmektedir



Şekil 4.2. Serbest ve immobilize GI aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi (◦):İmmobilize GI, (●): Serbest GI

Şekil 4.2'de görüldüğü gibi immobilize GI için uygun tampon derişimi 400 mM olarak belirlenmiştir. Serbest GI'ın aktivitesinin denenen tampon derişimi aralığında (100-500 mM) tampon derişimi ile orantılı olarak arttığı görülmektedir.

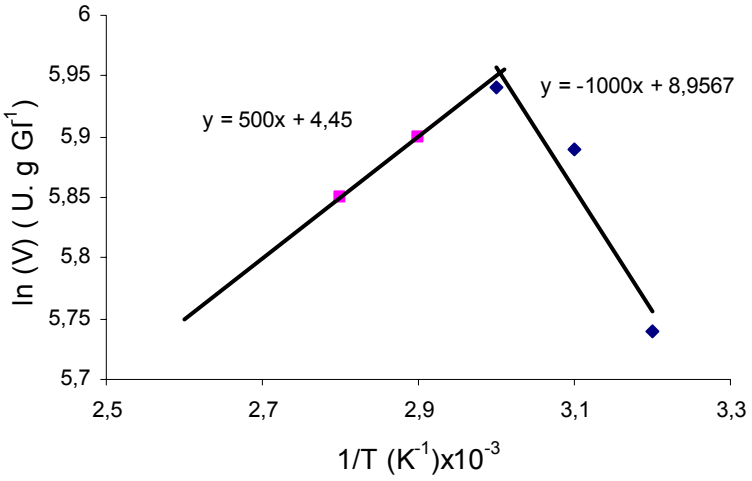
Serbest ve immobilize GI'ın aktivitesi farklı sıcaklıklarda ölçülmüş, aktivitenin sıcaklığa bağlı olarak değişimi % maksimum aktivite olarak şekil 4.3'de gösterilmiştir. İmmobilize GI'ın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C olarak belirlenmiştir. Serbest GI'ın aktivitesinin denenen sıcaklıklarda sıcaklık artışı ile parelel olarak ölçülen fruktoz miktarının da arttığı görülmektedir.



Şekil 4.3. Serbest ve immobilize GI aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi (∘): İmmobilize GI, (●): Serbest GI

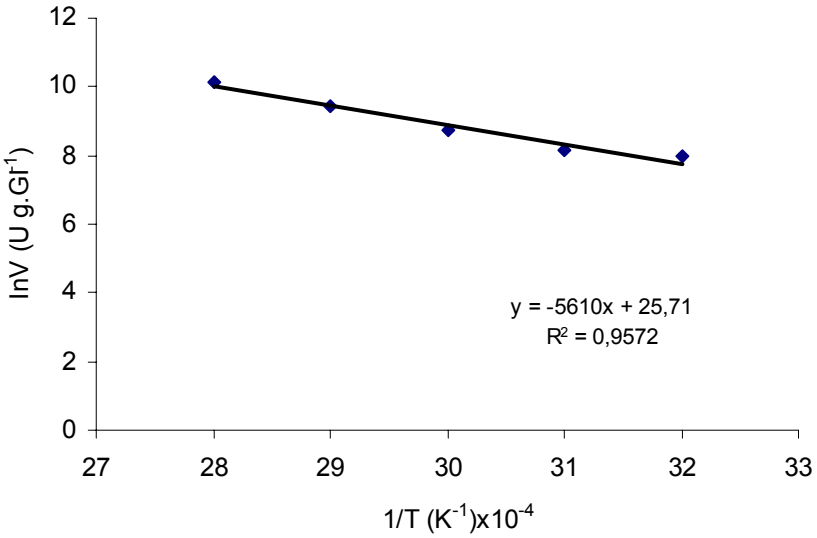
İmmobilize GI'ın sıcaklığa bağlı olarak değişen aktivite değerleri Arrhenius bağıntısına göre grafiğe geçirildiğinde şekil 4.4 elde edilmiştir.Grafikte aktivitenin arttığı ve azaldığı bölgeler ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Aktivitenin sıcaklıkla arttığı doğrunun eğimini kullanarak (eğim: -1000) immobilize GI'ın aktivasyon enerjisi 4,57 kJ mol^{-1} olarak hesaplanmıştır. Her iki doğrunun eğiminin ortak çözümü ile enzimin denaturasyona başladığı sıcaklık 63,3 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. İmmobilize GI'ın Arrhenius grafiği

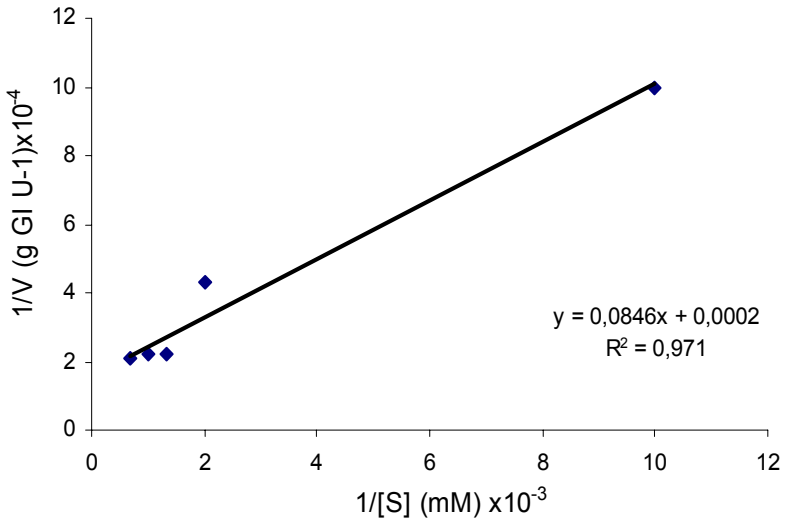
Aynı şekilde serbest GI için çizilen 1/T (K^{-1}) değerlerinin In V (U.g GI^{-1}) değerlerine karşı çizilen Arrhenius grafiği şekil 4.5'de gösterilmektedir.



Şekil 4.5. Serbest GI'ın Arrhenius grafiği

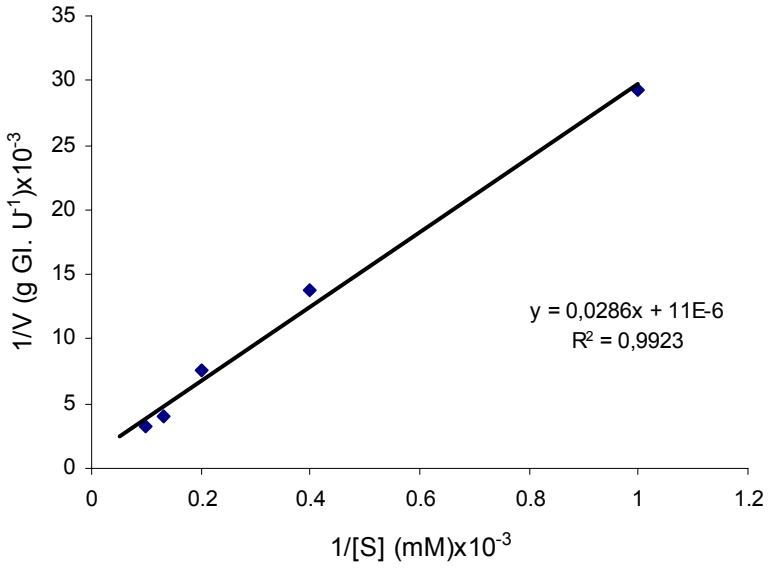
Serbest GI için çizilen Arrhenius grafiğinin eğiminden yararlanarak (eğim: -5610) serbest GI'ın aktivasyon enerjisi 25,6 kJ mol^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Serbest GI için 200 mM, pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan farklı substrat derişimleri kullanılarak 60°C'de belirlenen aktivite değerleri ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği şekil 4.6'da gösterilmektedir.



Şekil 4.6. Serbest GI için Lineweaver-Burk grafiği

İmmobilize GI için önceden belirlenmiş optimum koşullarda hazırlanan farklı substrat derişimlerinde, belirlenen aktivite değerleri kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği şekil 4.7'de gösterilmektedir.



Şekil.4.7. İmmobilize GI için Lineweaver-Burk grafiği

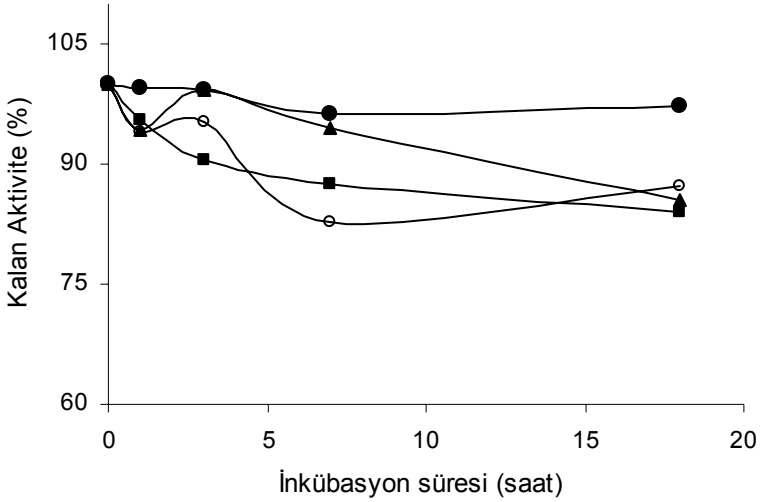
Serbest ve immobilize GI için K_M, V_{max}, K_{cat}/K_M değerleri her bir enzim için çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanarak bulunmuştur. Bu sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize GI'ın kinetik parametreleri

GI Örnekleri	K_M (mM)	V_{max} (µmol fruktoz/g protein. dk)	K_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
Serbest GI	423	5000	34
İmmobilize GI	2602	98092	108

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi immobilize GI'ın K_M'si serbest GI'ın K_M'sine göre 6 kat artmıştır. İmmobilize GI'ın V_{max} değeri de (98092 µmol fruktoz/g protein. dk) serbest GI'ın V_{max} değerine (5000 µmol fruktoz/g protein. dk) göre 20 kez artmıştır. Bunun sonucunda serbest GI'ın K_{cat}/K_M değeri 34 iken immobilize GI'ın K_{cat}/K_M değeri 108 olarak hesaplanmıştır.

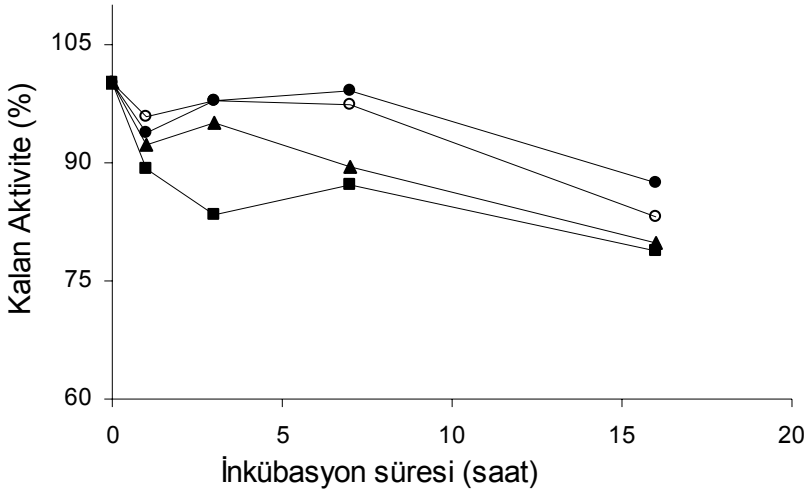
Şekil 4.8 ve 4.9'da sırasıyla immobilize ve serbest GI için termal kararlılık grafikleri verilmektedir.



Şekil 4.8. İmmobilize GI enziminin termal kararlılık grafiği. (●): 5ºC, (○): 25ºC, (▲): 40ºC, (■): 60ºC.

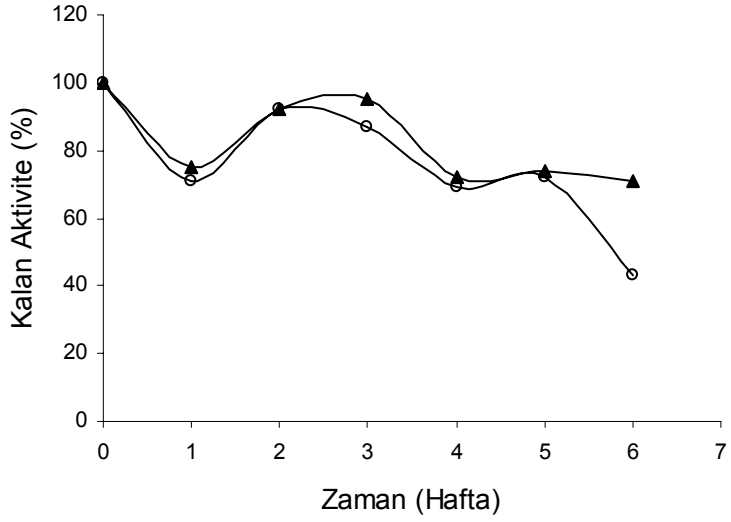
İmmobilize GI'ın farklı inkübasyon süreleri sonunda kalan aktivitelerini gösteren Şekil 4.8 incelendiğinde 5ºC'de 18 saat inkübe edilen enzimin aktivitesinin yaklaşık % 97'sini koruduğu belirlenirken, 60ºC'de 18 saat inkübe edilen immobilize GI'ın başlangıç aktivitesinin % 84'ünü koruduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi serbest GI'ın sıcaklık arttıkça termal kararlılığının azaldığı görülmektedir. Serbest GI'ın 5ºC'de 18 saat inkübasyonu sonunda kalan aktivitesi yaklaşık % 90 iken, 60ºC'de 18 saat inkübasyonu sonunda kalan aktivitesi başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 78'idir. 25°C ve 40ºC sıcaklıklarda immobilize enzimin termal kararlılığının serbest enzime göre daha yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 4.9. Serbest GI enziminin termal kararlılık grafiği. (●): 5ºC, (○): 25ºC, (▲): 40ºC, (■): 60ºC.

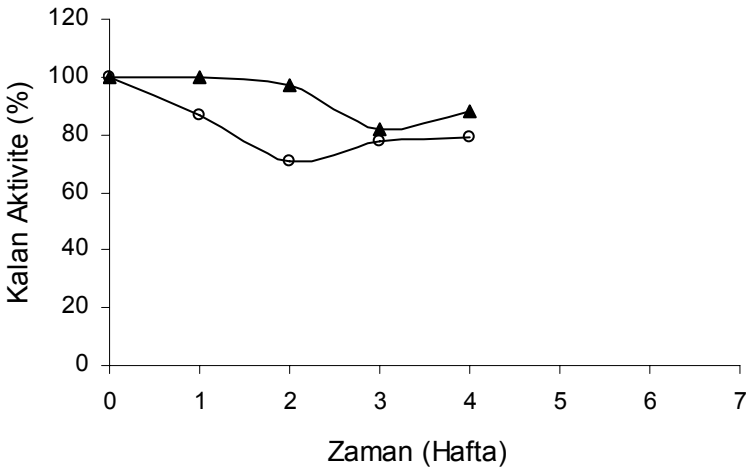
İmmobilize GI'ın 5ºC ve oda sıcaklığındaki (25ºC) depolama kararlılığı şekil 4.10'da gösterilmektedir.



Şekil 4.10. İmmobilize GI'ın depolama kararlılığı. (○): 25ºC, (▲): 5ºC.

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi immobilize GI enzimi 5ºC ve 25ºC sıcaklıklarında 6 hafta depolanmıştır. Depolanan immobilize GI'ın 5 hafta boyunca her iki sıcaklıkta başlangıç aktivitesindeki değişim benzer iken altıncı haftada 5ºC'de depolanan immobilize GI başlangıç aktivitesinin % 71'ini, 25°C'de depolanan immobilize GI ise sadece % 43'ünü koruyabilmiştir.

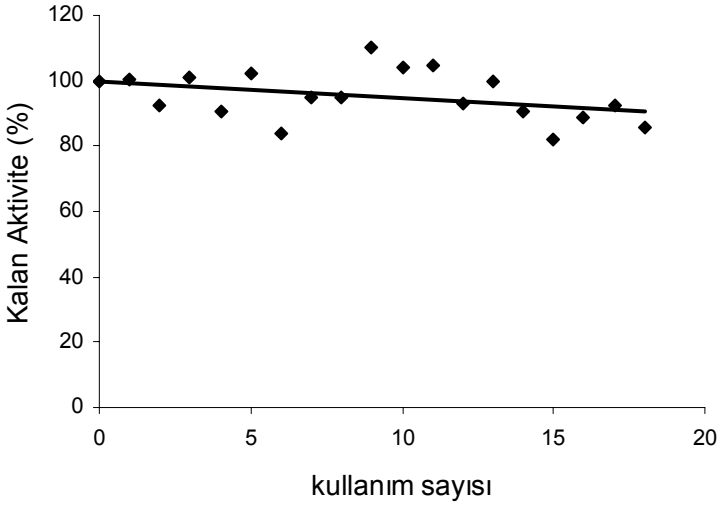
Şekil 4.11'de serbest GI'ın 5ºC ve 25ºC depolama kararlılıkları gösterilmektedir.



Şekil 4.11. Serbest GI'ın depolama kararlılığı. (○): 25ºC, (▲): 5ºC.

Şekil 4.11'de görüldüğü gibi serbest GI 5ºC ve 25ºC sıcaklıklarında 4 hafta süresince depolanmıştır. 5ºC'de depolanan serbest GI ikinci haftanın sonunda başlangıç aktivitesinin %97'sini korurken, 25ºC'de depolanan serbest GI başlangıç aktivitesinin %71'ini koruyabilmiştir. Dördüncü haftanın sonunda ise 5ºC depolanan GI için kalan aktivite %88 iken, 25ºC'de depolanan GI için %78'dir.

İmmobilize GI'ın kullanım sayısına bağlı olarak aktivitesindeki değişimi Şekil 4.12'de görülmektedir.

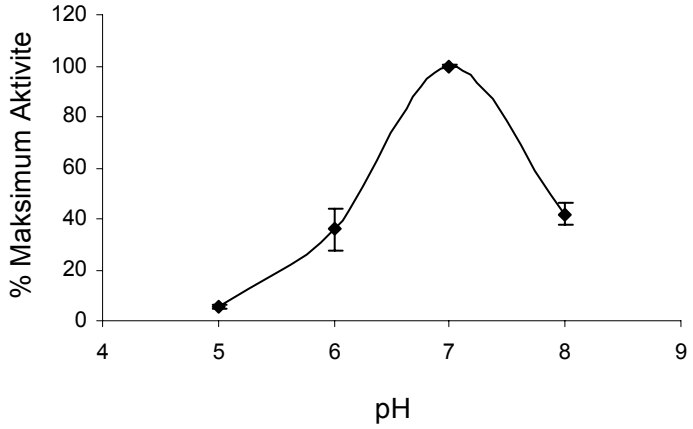


Şekil 4.12. İmmobilize GI'ın tekrar kullanım kararlılığı

İmmobilize GI, 18 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %85'ini koruyabilmektedir.

4.1.2. Serbest β-Galaktozidaz'ın Karakterizasyonu

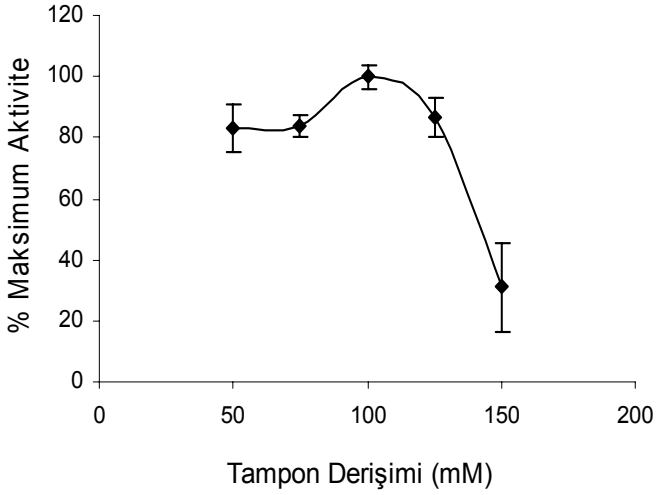
Serbest β-Galaktozidaz'ın farklı pH 'daki aktiviteleri % maksimum aktivite olarak şekil 4.13 'de verilmektedir.



Şekil 4.13. Serbest β-Galaktozidaz'ın aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi.

Serbest β-Galaktozidaz maksimum aktivitesini pH 7.0'de göstermektedir.

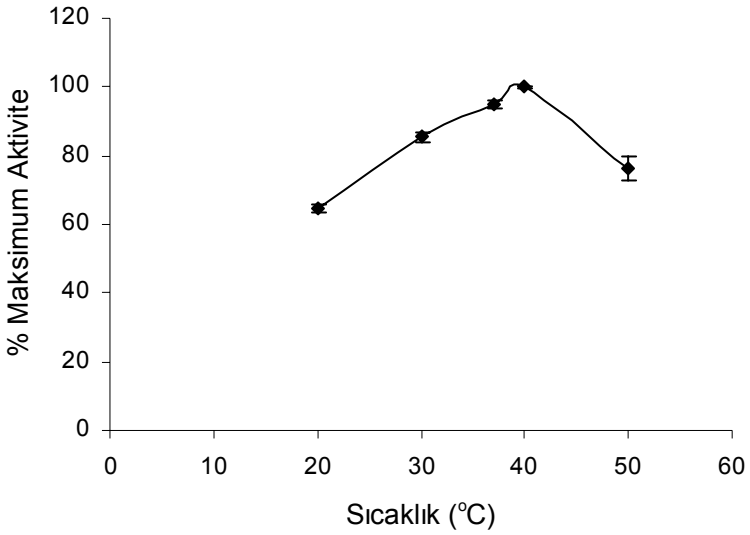
Serbest β-Galaktozidaz'ın optimum pH'sında farklı derişimlerdeki tampon çözeltileri kullanılarak belirlenen aktivite değerleri şekil 4.14'de % maksimum aktivite olarak gösterilmektedir.



Şekil 4.14. Serbest β-Galaktozidaz aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi.

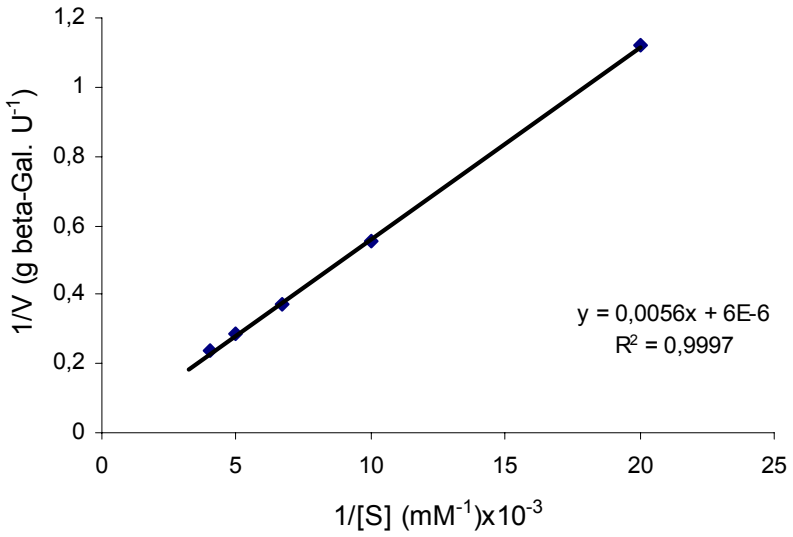
Serbest β-Galaktozidaz'ın farklı tampon derişimlerindeki aktiviteleri incelendiğinde enzimin yüksek tuz derişiminden daha çok ekilendiği görülmektedir. Maksimum aktivitesini gösterdiği tampon derişimi 100 mM (pH 7.0) olarak belirlenmiştir.

Serbest β-Galaktozidaz için çizilen sıcaklık ile aktivitenin değişimini gösteren grafik şekil 4.15'de gösterilmektedir. Serbest β-Galaktozidaz'ın maksimum aktivitesini gösterdiği sıcaklık 40ºC olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Serbest β-Galaktozidaz'ın aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

Serbest β-Galaktozidaz için farklı substrat derişimlerinde belirlenen aktivite değerleri kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği şekil 4.16'da verilmiştir. Serbest β-Galaktozidaz için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla, 933 mM ve $1{,}7x10^5$ µmol glukoz dk^{-1} g $protein^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



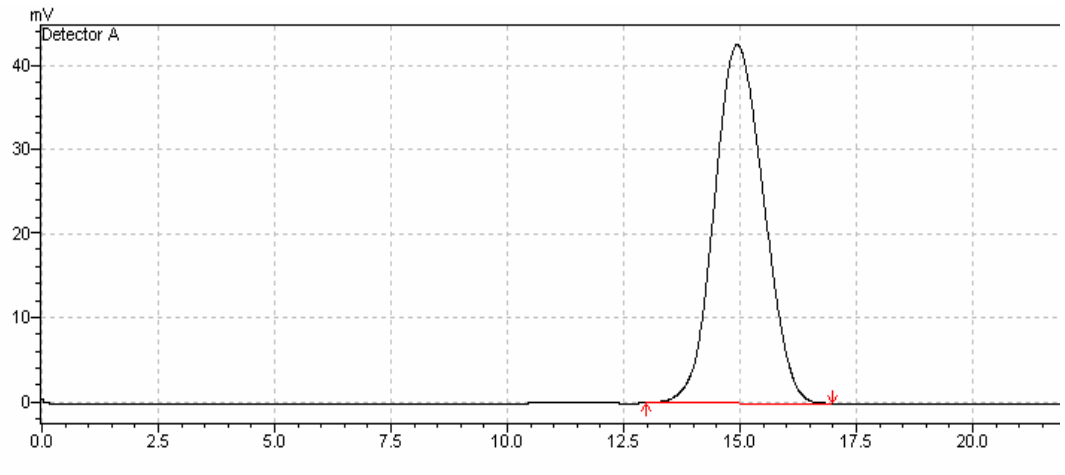
Şekil 4.16. Serbest β-Galaktozidaz için Lineweaver-Burk grafiği.

4.1.3. İmmobilize β-Galaktozidaz'ın Karakterizasyonu

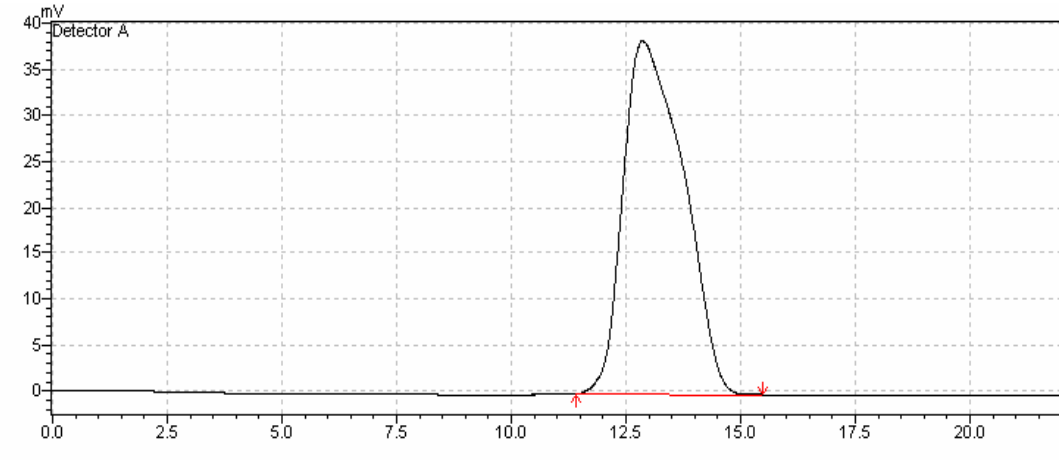
1 mg/mL derişimindeki β-Galaktozidaz 1 M, pH 7,0 fosfat tamponu kullanılarak 25ºC'de 24 saat Eupergit C 250 L ile muamele edilmiştir. β-Galaktozidaz'ın immobilizasyon ortamındaki başlangıç miktarı 0,9 mg'dır ve immobilizasyon süresi sonunda 0,675 mg β-Galaktozidaz Eupergit C 250 L üzerine bağlanmıştır. İmmobilizasyon sonucu ortamda bulunan proteinin desteğe bağlanan miktarının başlangıçtaki miktarının %75'i olduğu hesaplanmıştır.

4.1.3.1. HPLC Analizleri

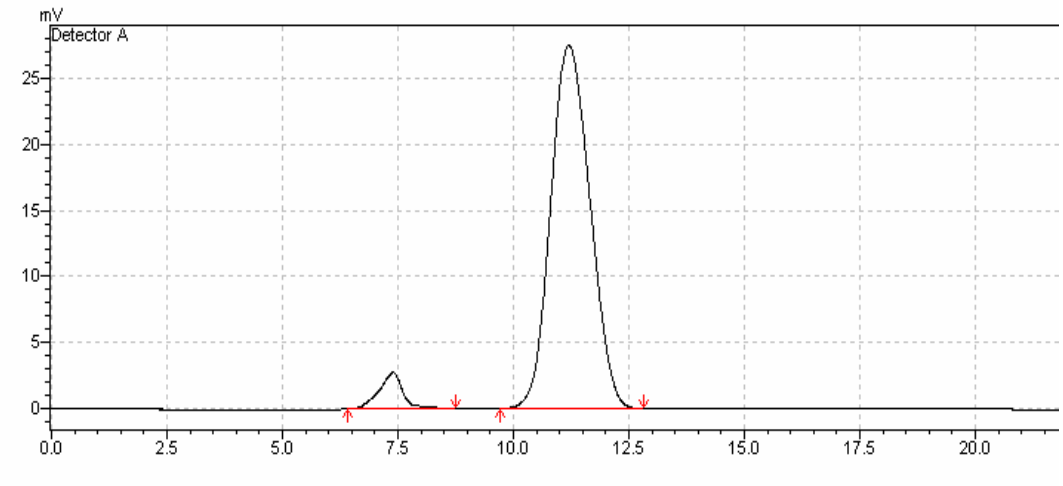
Şekil 4.17'de %5'lik standart galaktoz, şekil 4.18'de %5'lik standart glukoz ve şekil 4.19'da %5'lik standart laktoz çözeltilerinin HPLC analiz sonuçları verilmektedir. Galaktoz ve glukoz standartları için tek pik görülürken laktoz standardı için farklı alıkonma sürelerinde, birisi diğerine göre oldukça küçük (alıkonma süresi 7,5 dk.) iki pik görülmüştür ve küçük pikin alanının büyük pikin alanına oranı 0,056'dır.



Şekil 4.17. %5'lik (w/v) Galaktoz standartı için HPLC analiz sonucu.



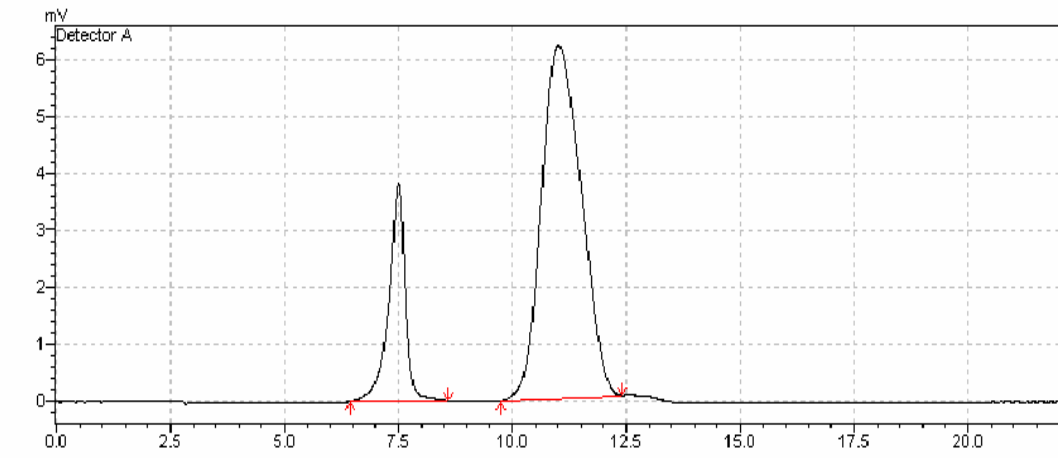
Şekil 4.18. %5'lik (w/v) Glukoz standartı için HPLC analiz sonucu.



Şekil 4.19. %5'lik (w/v) Laktoz standartı için HPLC analiz sonucu.

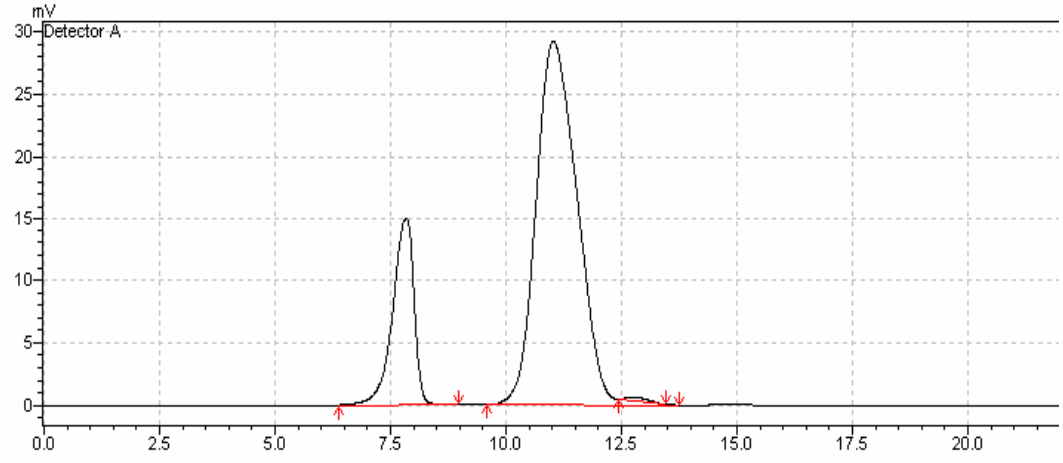
4.1.3.2. İmmobilize β-Galaktozidaz ile Muamele Edilen Laktoz İçin HPLC Sonuçları

10 mg immobilize β-Galaktozidaz ile 0,5 mL %5'lik laktoz çözeltisi karıştırılarak 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Enzimin aktivatörü olarak substrat içerisindeki son derişimi 1,5 mM olan $MgCI_2$ kullanılmıştır. 30 dakika sonra tüpler kaynar su banyosunda 10 dakika bekletilerek reaksiyon durdurulmuştur. Tüpler 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz alınarak HPLC cihazında ölçüm yapılmıştır. HPLC ile alınan ölçüm sonuçları şekil 4.20'de gösterilmektedir.

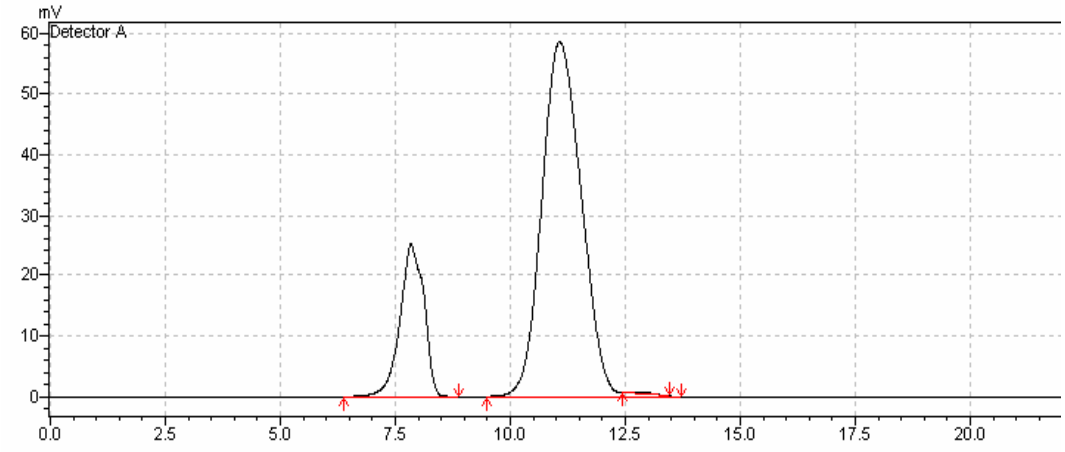


Şekil 4.20. 10 mg immobilize β-Galaktozidaz ile 0,5 mL %5'lik laktoz çözeltisi (w/v).

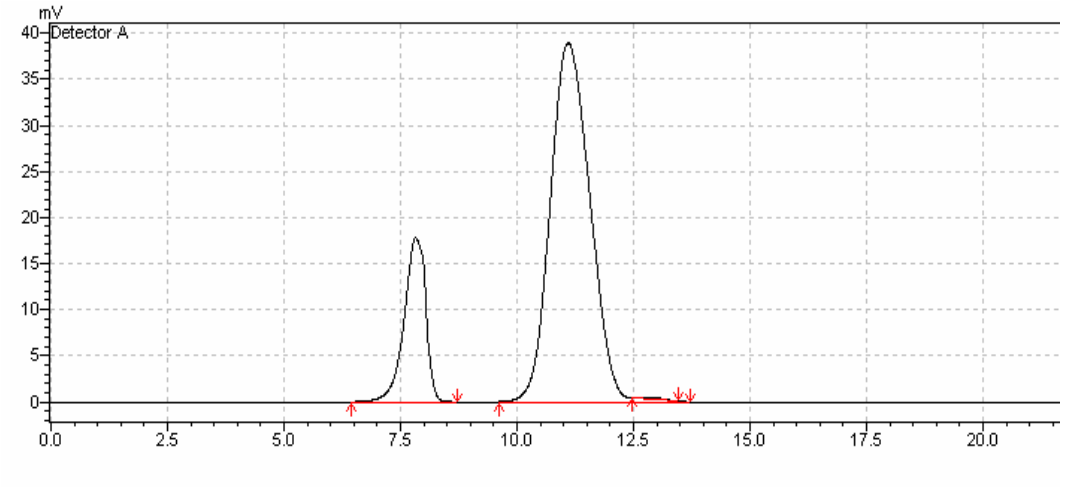
Benzer şekilde 10 mg immobilize β-Galaktozidaz ve 1 mL %5'lik laktoz çözeltisi substrat olarak kullanıldığında; 10 mg immobilize β-Galaktozidaz ile 2 mL %5 laktoz çözeltisi ve 20 mg immobilize β-Galaktozidaz ile 2 mL %5'lik laktoz çözeltisi kullanıldığında HPLC analiz sonuçları sırasıyla şekil 4.21, şekil 4.22 ve şekil 4.23'de verilmiştir.



Şekil 4.21. 10 mg immobilize β-galaktozidaz ile 1 mL %5'lik laktoz çözeltisi (w/v).



Şekil 4.22. 10 mg immobilize β-galaktozidaz ile 2 mL %5'lik laktoz çözeltisi (w/v).



Şekil 4.23. 20 mg immobilize β-galaktozidaz ile 2 mL %5'lik laktoz çözeltisi (w/v).

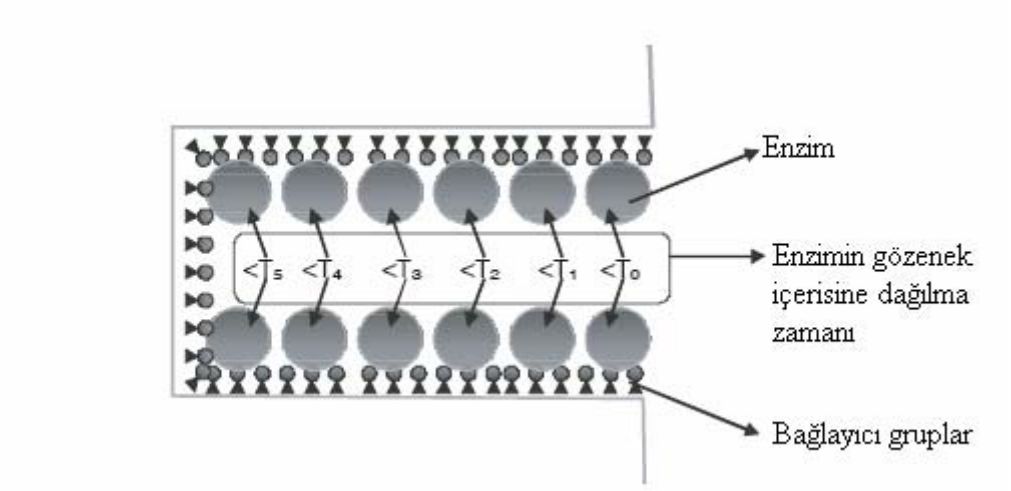
Şekil 4.19'da verilen %5'lik standart laktoz çözeltisinin HPLC analizi sonuçları ile şekil 4.20, şekil 4.21, şekil 4.22 ve şekil 4.23'de verilen immobilize β-Galaktozidaz ile reaksiyona giren %5'lik laktoz çözeltileri için elde edilen sonuçlar standart laktoz çözeltisinin analizi sonucunda görülen iki pikten alıkonma süresi kısa olanın uzun olana göre alan oranı artmıştır. β-Galaktozidaz'ın hidrolitik aktivitesi ile ilgili olarak laktozun enzimatik hidrolizi sonucu açığa çıkması beklenen glukozun alıkonma süresine denk gelen bölgede küçük bir pikin olduğu görülmektedir. Küçük

pik alanının büyük pik alanına oranı şekil 4.20, şekil 4.21, şekil 4.22 ve şekil 4.23 için sırasıyla 0.250, 0.246, 0.258 ve 0,242 olarak hesaplanmıştır.

4.2.Tartışma

4.2.1. GI'ın Eupergit Desteğe İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu

GI'ın Eupergit desteğe immobilizasyonunda Hernaiz ve Crout (2000) ile Martin ve ark. (2003) tarafından belirlenen ve birçok araştırmacı tarafından da kullanılan (Mateo ve ark., 2000; Lante ve ark., 2003; D'annibale ve ark., 2000; Tanrıseven ve ark., 2005) standart yöntem kullanılmıştır. GI'ın standart koşullar altında Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonu sonucunda başlangıçta ortamda bulunan protein miktarının %92'sinin bağlandığı hesaplanmıştır. Eupergit C 250 L gözenekli bir yapıya sahiptir. Protein bu gözeneklere önce adsorplanmakta sonra kovalent bağlanma ile immobilize olmaktadır (Şekil 4.13).



Şekil 4.24. Enzimin gözenek içerisindeki dağılımı

Chen ve Anderson (1979), *streptomyces flavogriseus*'dan saflaştırdıkları GI'ını benzil DEAE-selüloz, DEAE-selüloz ve TEAE-selüloza immobilize etmişlerdir ve immobilizasyon sonuçlarını kıyaslamışlardır. Benzil DEAE-selüloz ve

TEAE-selüloza, DEAE-selülozdan daha çok protein bağlandığını ve daha yüksek aktivite görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Eupergit destek nötral ve alkali pH değerlerinde protein moleküllerinin amino grupları ile oksiran gruplarını kovalent bağlamaktadır. Ayrıca asidik, nötral ve alkali pH değerlerinde enzimin karboksil ve sülfidril gruplarıyla da bağlanabilmektedir. Bu nedenle Eupergite bağlı enzim molekülleri pH 1–12 değerleri arasında uzun süre kararlılığını koruyabilmektedir (Katchalski-Katzir ve Kraemer, 2000). Bu çalışmada serbest ve immobilize GI'ın aktiviteleri farklı ortam pH'larında ölçülmüş olup immobilizasyon sonucunda immobilize GI'ın optimum pH değerinin serbest GI'ın optimum pH'sına göre değişmediği, 7.0 olarak kaldığı belirlenmiştir. Ancak immobilize GI pH 5.0 ve 9.0 aralığında serbest GI'a göre daha yüksek aktivite göstermektedir (Şekil 4.1).

Literatürde serbest GI'ın optimum pH değerinin 6.8 ile 7.5 arasında olduğu bildirilmektedir (Chen ve ark., 1979; Lehmacher ve Bisswanger ark., 1990; Lee ve Zeikus., 1991; Meng ve ark., 1993; Liu ve ark, 1996; Demirel ve ark, 2006). İmmobilize GI için ise pH 7.5 olarak rapor edilmektedir (Rhimi ve ark., 2007, Demirel ve ark., 2006). Enzimin saflaştırıldığı kaynak ve immobilize edildiği desteğin türüne ve kullanılan immobilizasyon metoduna göre farklılıklar görülmesi mümkündür. GI için optimum aktivitenin görüldüğü pH değerinin asidik veya nötr olması tercih edilmektedir. Aksi durumda alkali koşullarda D-mannoz ve D-psicose gibi istenmeyen bileşiklerin oluşumu sözkonusudur (Lee ve ark., 2005; Bucke, 1983).

Serbest ve immobilize GI için iyonik gücün aktiviteye etkisi araştırılmıştır ve serbest GI'ın aktivitesinin denenen tampon derişimi aralığında (100–500 mM) tampon derişimi ile orantılı olarak arttığı görülürken, immobilize GI için maksimum aktivitenin görüldüğü tampon derişimi 400 mM olarak hesaplanmıştır. Literatürde GI'a iyonik gücün etkisi araştırılmamıştır. Genel olarak enzimatik reaksiyonlarda ortamdaki iyonların miktarı enzimin aktivitesini ve kararlılığını etkilemektedir. Düşük iyon derişimi enzimin kararlılığını sağlamada yetersiz kalabileceği gibi, reaksiyon ortamında bulunan yüksek orandaki iyon miktarı enzim ile substratının etkileşiminin azalmasına neden olabilmektedir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi

immobilize GI için tampon derişiminin 400 mM'dan 500 mM'a artmasıyla birlikte aktivitede de büyük oranda bir azalma görülmektedir.

Çalışma bulgularımız serbest GI için 40-80ºC sıcaklık aralığında enzimin aktivitesinin sıcaklıkla orantılı olarak arttığını göstermektedir. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi immobilize GI aktivitesi 60ºC'ye kadar artmakta ancak 60ºC'nin üstündeki sıcaklıklarda immobilize GI'ın aktivitesinde azalma görülmektedir. Demirel ve ark. (2006), çeşitli polimer desteklere tutukladıkları GI için optimum sıcaklığı 60ºC olarak bildirmektedirler. Strandberg ve ark. (1971), *Streptomyces phaeochromogenes* NRRL B-3559'dan izole ettikleri GI için optimum sıcaklığın 80ºC olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte *Thermus thermophilus, Thermus aquaticus, Thermotoga maritima* ve *Thermotoga neapolitana* gibi termofilik bakterilerinden izole edilen GI için optimum sıcaklık 95 ve 100ºC arasında değişmektedir (Vieille ve Zeikus, 2001). Literatürde de belirtildiği gibi 80°C'nin üstündeki sıcaklıklarda psicose gibi istenmeyen bileşiklerin oluşabileceği bildirilmektedir (Bucke, 1993). Psicose indirgen bir şeker olduğundan fruktoz tayini için kullandığımız Resorsinol-HCI metodu ile fruktoza ek olarak reaksiyon vereceğinden dolayı enzim aktivitesinin yüksek sıcaklıklarda doğru olarak tayin edilmesi mümkün olmayacaktır. Deneyler sırasında yüksek sıcaklıkta (80°C) enzim çözeltisinin renginde de bozulmalar görülmektedir.

Aktivasyon enerjisi ile ilgili bulgulara göre immobilize enzimin katalizlediği reaksiyonun aktivasyon enerjisi (E_a) 4,57 kJ mol^{-1} ve serbest enzimin katalizlediği reaksiyonun aktivasyon enerjisi 25,6 kJ mol^{-1} olarak hesaplanmıştır. İmmobilize GI için denaturasyona başladığı sıcaklık ise 63,3 ºK olarak hesaplanmıştır. Converti ve Del Borghi, (1997), *Streptomyces murinus'*dan izole edilen GI için Arrhenius grafiğini çizmişler ve 70ºC'nin üstündeki sıcaklıklarda immobilize GI'ı, bu sıcaklığın altındaki sıcaklıklarda ise serbest GI'ı tercih etmenin doğru olduğunu rapor etmişlerdir.

Serbest GI'ın Eupergit desteğe immobilizasyonu sonucu hem K_M hem de V_{max} değerlerinin arttığı görülmektedir (Çizelge 4.1). İmmobilizasyon işlemi sonunda enzimin desteğe bağlanan miktarının yüksek olmasına rağmen (yaklaşık %92 bağlanma) immobilize GI'ın aktivitesinin daha düşük görülmesi desteğe kovalent

bağlanan enzim molekülünün hareketinin kısıtlanmasına bağlanabilir. Bunun dışında destek çevresinde proteinlerin üst üste birikerek difüzyon problemlerinin görülmesi söylenebilir. Bunlara rağmen immobilize GI'ın katalitik etkinliğinin bir ölçüsü olan K_{cat}/K_M (108 mM) serbest GI'ın K_{cat}/K_M (34 mM) oranına göre 3 kat artmıştır.

GI'ın diğer substratı olan ksiloza karşı ilgisi daha büyüktür. Literatürde serbest GI için 60ºC'de pH 5-7.5 arasında aktivatörleri varlığında D-ksiloz için hesaplanan K_M değerleri 22-60 mM olarak verilirken aynı koşullarda D-glukoz için hesaplanan K_M değerleri 290-1500 mM arasında değişmektedir (Hosteaux, 1992).

Enzimin kararlılığı verimliliğini etkileyen faktörlerden bir tanesidir. Şekil 4.10 ve şekil 4.11, 5ºC ve 25ºC'de bekletilen serbest ve immobilize GI'ın depolama kararlılıklarının yüksek olduğunu göstermektedir. İmmobilize GI'ın 5 hafta sonundaki kalan aktivite değerinin başlangıç aktivitesinden çok farklı olmaması enzimin endüstriyel kullanımı için bir avantajdır. Literatürde çeşitli kaynaklardan izole edilen ve farklı desteklere immobilize edilen GI'ın depolama kararlılığı araştırılmıştır. Demirel ve ark. (2006) çeşitli desteklere immobilize ettikleri GI'ın 42 gün boyunca +4ºC'deki kalan aktivitelerini izlemişlerdir. Bulgularına göre poliakrilamid jele tutuklanan enzimin başlangıç aktivitesinin %81'ini, poliakrilamid/κ-Karrajen jel ve poliakrilamid/alginat jele tutukladıkları GI'ın sırasıyla %33 ve %32'sini koruduğu, aktivitedeki azalmanın nedeninin, kullanılan jel matriksteki $-COO^-$ ve $-OSO_3^-$ grupları ile enzimin aktif bölgesindeki fonksiyonel gruplar arasında zamanla meydana gelen etkileşimler olabileceğini bildirmişlerdir.

Şekil 4.8 ve şekil 4.9 immobilize ve serbest GI'ın farklı sıcaklıklardaki inkübasyon süresi ile kalan aktivite miktarları arasındaki ilişkiyi göstermektedir. İmmobilize GI için 5ºC'de inkübe edilen enzim preparatlarının 18 saat sonundaki başlangıç aktivitelerini korudukları ama serbest GI'ın başlangıç aktivitesinin %88'ini gösterdiği görülmektedir. İmmobilize GI'ın 40ºC ve 60ºC'deki 18 saat inkübasyonu sonucu kalan aktiviteleri yaklaşık %85 olarak belirlenirken serbest GI için ise %79 olarak belirlenmiştir. Chen ve ark. (1979), çeşitli desteklere immobilize ettikleri GI'ın serbest GI'a göre termal kararlılığında önemli bir değişme olmadığını rapor etmişlerdir. Strandberg ve Smiley (1971), *Streptomyces phaeochromogenes* NRRL

B-3559'dan izole ettikleri GI'ın 70ºC'de (0.05 M pH 8.0 Tris tamponunda) 24 saat inkübasyonu sonucu başlangıç aktivitesinin %40'ını koruduğunu rapor etmişlerdir.

İmmobilize enzimlerin tekrar tekrar kullanılması maliyet açısından endüstriyel alanda en önemli faktördür. İmmobilize GI'ın tekrar kullanım kararlılığınını gösteren grafik şekil 4.12'de verilmektedir. Önceden belirlenmiş optimum koşullarda kesikli reaktörde 18 kullanımdan sonra kalan aktivite başlangıç aktivitesinin %85'idir. GI'ın tekrar kullanım kararlılığının daha yüksek olduğu verilere de rastlanmaktadır Literatürde poliakrilamid jele tutuklanmış *Streptomyces rubiginosus* GI için 5 gün içerisindeki 25. kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %98'ini koruduğu bildirilmektedir (Demirel ve ark., 2006). Lee ve Hong (2000), ticari olarak kullanılan immobilize GI'ın pH 7.5 ve 60ºC'deki yarı ömrünün 200-360 gün olduğunu rapor etmişlerdir.

4.2.2.β-Galaktozidaz'ın Eupergit Desteğe İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu

β-Galaktozidaz standart immobilizasyon yöntemi uygulanarak Eupergit desteğe immobilize edilmiştir. 5 gr desteğe 10 mL enzim çözeltisi (1 mg/mL) içeren 1 M pH 7,0 fosfat tamponu eklenmiş ve 25^{o}C'de 24 saat çalkalayıcılı su banyosunda bekletilmiştir. İmmobilizasyon süresi sonunda süzüntüde protein kalmayıncaya kadar saf su ile yıkanmış, süzüntüde Lowry metoduyla protein tayini yapılarak desteğe bağlanan proteinin başlangıçtakinin %75'i olduğu hesaplanmıştır.

Serbest β-Galaktozidaz'ın karakterizasyonu için laktoz ile metilaminin sıcak alkali ortamda verdiği kırmızı renkli kompleksin 540 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesine dayanan spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Başlangıçtaki laktoz miktarından kalan laktoz miktarı çıkarılarak oluşan glukoz miktarının belirlenmesiyle enzimin aktivitesi hesaplanmıştır. Başlangıçta immobilize β-Galaktozidaz'ın aktivitesini hesaplamak için de bu yöntemden yararlanılmaya çalışılmıştır. Fakat ölçüm sonuçlarında ortamdaki laktoz miktarının değişmediği görülmüş ve yöntemin hassasiyetinden şüphe edilmiştir. Bu nedenle immobilize β-Galaktozidaz'ın laktozu hidroliz edip etmediğini belirleyebilmek için çok daha hassas bir yöntem olan HPLC yöntemi kullanılmıştır.

Şekil 4.19'da laktoz standartı için elde edilen kromatoğram görülmektedir. Bu şekilden de görüleceği gibi laktoz standartı için alıkonma süreleri farklı olan iki pik elde edilmiştir. Alıkonma süresi kısa olan pikin (7.5 dakika) alanının, alıkonma süresi uzun olan pikin (11 dakika) alanına oranı yaklaşık 0,056'dır. β-Galaktozidaz ile etkileştirilen laktoz örnekleri için şekil 4.20, şekil 4.21, şekil 4.22 ve şekil 4.23'de verilen HPLC sonuçlarında standart laktoz çözeltisi için elde edilen HPLC sonuçlarına benzer şekilde belirgin iki pikin bulunduğu, ancak bu piklere ek olarak glukozun alıkonma süresine (13 dakika) denk gelen bölgede 3. bir küçük bir pikin de bulunduğu görülmektedir. Bu üç pik arasında alıkonma süresi en kısa olan pikin alanının alıkonma süresi 11 dk olan pikin alanına oranları şekil 4.20, şekil 4.21, şekil 4.22 ve şekil 4.23 için sırasıyla 0.250, 0.246, 0.258 ve 0.242 olarak hesaplanmıştır. Standart laktoz çözeltisi için belirlenen orana (0.056) göre β-Galaktozidaz ile muamele edilen örnekler için görülen bu orandaki artış laktozdan daha büyük bir molekülün muhtemelen bir oligosakkaritin sentezlenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde β-Galaktozidaz'ın hidrolitik aktivitesinin yanı sıra bir de transgalaktozilasyon aktivitesinin görüldüğü çalışmalar bulunmaktadır (Iwasaki ve ark., 1996; İsmail ve ark., 1999). Bu nedenle bu pikin bir oligosakkarite ait olduğu düşünülmüştür. Şekil 4.17, şekil 4.18, ve şekil 4.19'dan da görüleceği gibi sırasıyla galaktoz, glukoz ve laktozun alıkonma süreleri birbirine çok yakındır. Bu nedenle laktozun enzimatik hidrolizi sonucu glukozun alıkonma süresine denk gelen bölgede görülen küçük glukoz pikinin laktoza ait olan pik tarafından çakışmasıyla kapatıldığı söylenebilir.

Bu çalışmada uyguladığımız deneysel koşullar altında immobilize β-Galaktozidaz'ın hidrolitik aktivitesinin düşük olduğu ancak hidrolitik aktivitesine ek olarak beklenenin aksine daha büyük oranda transgalaktozilasyon aktivitesini gösterdiği saptanmıştır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Serbest ve immobilize GI'ın en yüksek aktivite gösterdikleri pH değerleri 7.0 olarak belirlenmiş olup immobilizasyon işleminin enzimlerin % aktivite- pH profilini etkilemediği belirlenmiştir.

2. İmmobilize GI'ın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60ºC olarak belirlenmiştir.

3. İmmobilize GI için V_{max} değeri serbest GI'ın V_{max} değerinin yaklaşık 20 katı bulunurken, immobilize GI'ın K_M değeri serbest enziminin K_M değerinin yaklaşık 6 katı olarak bulunmuştur. GI'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonu sonucunda katalitik etkinliğinin serbest GI'a göre 3 kat arttığı belirlenmiştir.

4. İmmobilize GI için hem oda sıcaklığında hem de 5°C'de belirlenen depolama kararlılıklarına göre immobilize enzimin 5°C'deki depolama kararlılığının daha yüksek olduğu saptanmıştır.

5. İmmobilize GI'ın belirlenen optimum koşullarında, 18 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %85'ini koruduğu belirlenmiştir.

6. İmmobilize GI'ın çeşitli sıcaklıklardaki farklı inkübasyon süreleri sonunda kalan aktiviteleri incelendiğinde, 5°C'de 18 saat inkübasyon sonunda başlangıç aktivitesinin %97'sini koruduğu belirlenmiştir.

7. Sonuç olarak immobilize GI'ın kullanılmasının serbest GI kullanımına göre daha uygun olduğu söylenebilir.

8. Eupergit C 250 L üzerine immobilize edilen β-Galaktozidaz'ın denenen koşullarda hidrolitik aktivitesinin düşük olduğu ve bunun yanısıra transgalaktozilasyon aktivitesinin daha belirgin bir şekilde görüldüğü saptanmıştır.

9. İmmobilize β-Galaktozidaz ile etkileştirilen %5'lik (w/v) laktoz çözeltisinin HPLC analizi sonuçlarında şekil 4.20, şekil 4.21, şekil 4.22 ve şekil 4.23'de görülen kromatoğramlarda glukoza ait olduğunu düşündüğümüz 3. pikin laktoza ait olan büyük pik ile örtüştüğü düşünülmektedir.

5.2. Öneriler

1. İmmobilize GI'ın farklı reaktör sistemleri ve farklı çalışma koşullarında kullanılmasıyla verimliliği ve kinetik özelliği araştırılabilir.
2. Serbest veya immobilize GI'ın farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri, içerisindeki depolama kararlılıkları araştırılabilir.
3. GI'ın Eupergit C 250 L'ye farklı ara kollar kullanılarak immobilizasyonları sağlanabilir ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri ve kararlılıkları karşılaştırılabilir.
4. β-Galaktozidaz ile etkileştirilen %5'lik (w/v) laktoz çözeltisinin HPLC analizi sonuçlarında görülen glukoza ait olduğu düşünülen küçük pikin laktoza ait pik tarafından perdelenmesinin önlenmesi için substrat çözeltisi olarak daha düşük derişimlerde laktoz çözeltisinin kullanılması önerilebilir. Bölümümüzde bulunan HPLC cihazının yoğun olarak kullanılmasından dolayı bu konuda yeterli sayıda deneme yapılamamıştır. Bu nedenle çeşitli pH ve tampon derişimlerinde hazırlanan farklı konsantrasyonlarda laktoz içeren substrat çözeltileri kullanılarak immobilize β-Galaktozidaz'ın hidroliz ve transgalaktozilasyon aktiviteleri tekrar incelenmelidir.

KAYNAKLAR

BANDLISH, R.K., HESS, J.M.,EPTING, K.L., VIEILLE, C., 2002. .Glucose to Fructose Conversion at High Temperatures with Xylose (Glucose) Isomerases from *Streptomyces Murinus* and to *Hyperthermophilic Thermotoga Species*. Biotechnology and Bioengineering, 80(2):185–194.

BASUKI, W., IIZUKA, M., ITO, K., FURUICHI, K., and MINAMIURA N., 1992. Evidence for the Existence of Isoenzymes of Glucose Isomerase from *Streptomyces phaeochromogenes*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 56**:**180–185.

BHOSALE, S.H., RAO, M.B., DESPHANDE, V.V., 1996. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase . Microbological Reviews, 60: 280–300.

BOLLER, T., MEIER, C., MENZLER, S., 2002. Eupergit Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis. Organic Process Research & Development, 6: 509–519.

BOON, M.A., JANSSEN, A.E.M., VAN'T RIET, K., 2000. Effect of Temperature and Enzyme Origin on the Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides. Enzyme and Microbial Technology, 26: 271–281.

BORGES DA SİLVA, E.A., ULSAN DE SOUZA, A.A., DE SOUZA, S.G.U., RODRİGUES, A.E., 2006. Analysis of the High Fructose Syrup Production Using Reactive SMB Technology. Chemical Engineering Journal, 118:167–181.

BRENA, B.M., IRAZOQUI, G., GIACOMINI, C., BATISTA-VIERA, F., 2002. Effect of Increasing Co-solvent Concentration on The Stability of Soluble and Immobilized β-Galactosidase. Journal of Moleculer Catalysis B: Enzymatic, 757: 1–5.

BROUN, G.B., MONCKE, G., WİNGARD L.B., 1978. Enzyme Engineering. Plenum Press, New York.

BUCKE, C**.,** 1983. Glucose Transforming Enzymes, W. Fogarty, Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishers, London. p. 93–127.

CHAİNG, L.C., HSİAO, H. Y., UENG, P.P., CHEN, L. F. and TSAO, G.T., 1981. Ethanol Production from Xylose by Enzymic Isomerisation and Yeast Fermentation. Biotechnological Bioengineering Symp. 11: 263–274.

CHANG, T.M.S., 1976. Microencapsulation of enzymes and biologicals. K., MOSBACH. Methods Methods in Enzymology. pp:201–218. Academic Pres, New York.

CHAUTHAIWALE, J. V., and RAO, M. B., 1994. Production and Purification of Extracellular D-xylose Isomerase from an Alkaliphilic, Thermophilic *Bacillus* sp. Applied Environmental Microbiology, 60: 4495–4499.

CHEN, W. P., ANDERSON, A. W. and HAN, Y. W., 1979. Production of Glucose Isomerase by *Streptomyces flavogriseus* Applied Environmental Microbiology, 37:324–331.

CHEN, W.P., 1980. Glucose Isomerase. Process Biochemistry, 15: 30–35.

CHIBATA, I., 1978. Immobilized Enzymes. Research and Development. Kodansha, Tokyo.

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.

CREMONESİ , P., ANGİURO, L. D, 1983. Kinetic and Thermal Characteristics of Enzyme-Graft Copolymers.Biotechnology and Bioengineering, 25 (3): 735-744.

D'ANNIBALE, A., STAZI, S.R., VINCIGUERRA, V., SERMANNI, G.G., 2000. Oxirane-immobilized Lentinula Edodes Laccase: Stability and Phenolics Removal Efficiency in Olive Mill Wastewater. Journal of Biotechnology, 77: 265–273.

DEMİREL, G., ÖZÇETİN, G., ŞAHİN, F., TÜMTÜRK, H., AKSOY, S., HASIRCI, N., 2006. Semi-interpenetrating Polymer Networks (IPNs) for Entrapment of Glucose Isomerase. Reactive & Functional Polymers, 66: 389–394.

DEVECİ, R., 2006. Glikoz İzomeraz Enziminin Sıkıştırılmış Yatak Reaktörler ve Akışkan Yatak Reaktörlerde Çalışma Kinetiklerinin İncelenmesi ve Karşılaştırılması ve Reaktörler Boyunca Fruktoza Dönüşüm Profillerinin

Çıkarılması.Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 46 sayfa.

GARMAN, J., COOLBEAR, T., SMART, J., 1996. The Effect of Cations on the Hydrolysis of Lactose and the Transferase Reactions Catalysed by β-galactosidase from Six Strains of Lactic Acid Bacteria. Applied Microbiol. Biotechnology, 46**:** 22–37.

GAUR, R., PANT, H., JAIN, R., KHARE, S.K., 2006. Galacto-oligosaccharide Synthesis by Immobilized *Aspergillus oryzae* β-Galactosidase. Food Chemistry, 97: 426–430.

GEKAS, V., LOPEZ-LEVIA, M., 1985. Hydrolysis of Lactose: A Literature Review. Process Biochemistry, 20: 2–12.

GIACOMINI, C., VILLARINO, A., FRANCO-FRAGUAS, L., BATİSTA-VIERA, F., 1998. Immobilization of β-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on Silica and Agarose: Comparison of Different Methods. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 4: 313–327.

GODFREY, T., WEST, S., 1996. Industrial Enzymology 2nd. Ed.

HERNAIZ, M.J., CROUT D.H.G.,2000. Immobilization/Stabilization on Eupergit C of the β-Galactosidase from *B. Circulans* and an α-Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Enzyme and Microbial Technology, 27: 26-32.

HOSTEAUX, P.,1992. D-xylose Isomerase uit *Actinoplanes Missouriensis*: Katalytische Eigenschappen na Mutagenese Van Het Actief Centrum. phD Thesis. University of Ghent.

ISMAIL, A., LİNDER, M., GHOUL, M., 1999. Optimization of Butylgalactoside Synthesis by β-galactosidase from *Aspergillus Oryzae*. Enzyme and Microbial Technology, 25: 208–213.

IWASAKI, K., NAKAJIMA, M., NAKAO, S., 1996. Galacto-oligosaccharide Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using β-Galactosidase. Process Biochemistry, 31: 69–76.

KATCHALSKI-KATZIR, E., KRAEMER, D.M., 2000. Eupergit C, a Carrier for Immobilization of Enzymes of Industrial Potential. Journal of Moleculer Catalysis B: Enzymatic, 10: 157–176.

KENNEDY, J.F., CABRAL J.M.S. and SCOUTEN W.H., 1983. Immobilized Enzymes in Solid Phase Biochemistry (W. H., SCOUTEN). Chemical Analysis. John Wiley and Sons. New York, p. 253–392.

KIRK, O., BORCHERT, T.V., FUGLSANG, C.C., 2002. Industrial Enzyme Applications, Current Opinion in Biotechnology, 13:1-6.

LADERO, M., RUIZ, G., PESSELA B.C.C., VIAN, A., SANTOS, A., GARCİA-OCHOA, F., 2006. Thermal and pH Inactivation of an Immobilized Thermostable β-galactosidase from *Thermus* sp strain T2: Comparison to the free Enzyme. Biochemical Engineering Journal, 31 (1):14–24.

LANTE, A., MONNI, S., SPETTOLI, P., ZANNONI, S., LOMOLINO, G., TOFFANO, P., POVOLO, S., CASELLA, S., 2003. Lactose hydrolysis by Maxilact Immobilized on Eupergit Reactor. Enzyme Engineering XVII, Santa Fe, New Mexico, USA.

LEE, C., ZEIKUS J.G., 1991. Purification and Characterization of Thermostable Glucose Isomerase from *Clostridium Thermosulfurogenes* and *Thermoanaerobacter* strain B6A. Biochemical Journal, 273:565-571.

LEE, S.H. and HONG, J., 2000. Kinetics of Glucose Isomerization to Fructose by Immobilized Glucose Isomerase: Anomeric Reactivity of D-glucose in Kinetic Model. Journal of Biotechnology, 84: 145–153.

LEE, S.J., LEE, D.W., CHOE, E.A., HONG, Y.H., KIM, S.B., KIM, B.C., 2005. Characterization of a Thermoacidophilic L-arabinose Isomerase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*: Role of Lys-269 in pH Optimum. Applied Environmental Microbiology, 72: 7888–7896.

LEHMACHER, A., BISSWANGER H., 1990. Comparative Kinetics of D-Xylose and D-Glucose Isomerase Activities of the D-Xylose Isomerase from *Thermus aquaticus* HB8. Biological Chemistry, 371: 527–536.

LIU, S.Y., WIEGEL, J., GHERARDINI, F.C., 1996. Purification and Cloning of a Thermostabil Xylose (Glucose) Isomerase with an Acidic pH Optimum from *Thermoanaerobcterium* strain JW/SL-YS 489. Journal of Bacteriology, 178:5938-5945.

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.

LUISI, P.L. AND MAGID, L.J., 1986. . Solubilization of Enzymes and Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar Solutions. Critical Reviews in Biochemistry 20 (4): 409–474.

MAHONEY R.R., 1998. Galactosyl-oligasaccharide Formation During Lactose Hydrolysis: A Review. Food Chemistry, 63 (2): 147–154.

MANJON, A., OBON, J.M. CASTELLAR, M.R. IBORRA, J.L., 1999. β-Galactosidase Immobilization for Milk Lactose Hydrolysis: a Simple Experimental and Modelling Study of Batch and Continuous Reactors. Biochemical Education, 28: 164–168.

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

MARTIN, M.T., PLOU, F.J., ALCALDE, M., BALLESTEROS, A., 2003. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyl transferase (CGTase) and Properties of the Immobilized Biocatalyst. Journal of Moleculer Catalysis B: Enzymatic, 21: 299–308.

MATEO, C., FERNANDEZ-LORENTE, G., ABIAN, O., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUISAN, J.M., 2000. Multifunctional Epoxy-supports: A New Tool to Improve the Covalent Immobilization of Proteins . The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports Before Their Covalent Linkage. Biomacromolecules, 1: 739–745.

MCRARY, W. L. & SLATTERY, M. C. 1945. The Colorimetric Determination of Fructosan in Plant Material. Journal of Biological Chemistry, 157: 161–167.

MENG, M., BAGDASARIAN, M., ZEIKUS, J.G., 1993. Thermal Stabilization of Xylose Isomerase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*. Biological Technology, 11: 1157–1161.

NELSON, J.M. and GRIFFEN, E.G., 1916. Adsorption of Invertase. Journal of the American Chemical Society, 38: 1109–1115.

NICKERSON, T.A., VUJICIC, I.F., LIN, A.Y., 1974. Colorimetric Estimation of Lactose and its Hydrolytic Products. Journal of Dairy Science, 59: 386–390.

NUMANOĞLU, Y., SUNGUROGLU. S., 2003. β-galactosidase from *Kluyveromyces Lactis* Cell Disruption and Enzyme Immobilization Using a Cellulose-gelatin Carrier System. Process Biochemistry, 39: 703–709.

OVSEJEVI, K., GRAZU, V., CUADRO, K., BATISTA-VIERA F., 2004. Enzyme Reduction on Solid Phase as a Tool for the Reversible Immobilization of Yeast β-galactosidase onto a Thiol-reactive Support. Enzyme and Microbial Technology, 35: 203–209.

PALAZZI, E., CONVERTI, A., 1999. Generalized Linearization of Kinetics of Glucose Isomerization to Fructose by Immobilized Glucose Isomerase. Biotechnology and Bioengineering, 63(3): 273–284.

PANESAR, R., PANESAR, P.S., SINGH, R.S., KENNEDY, J.F., BERA, M.B., 2007. Production of Lactose-Hydrolyzed Milk Using Ethanol Permeabilized Yeast Cells. Food Chemistry, 101: 786–790.

PESSELA, B.C.C., VİAN, A.C., MATEO, FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GARCÍA, J.L., GUİSAN J.M., CARRASCOSA. A.V.. (2003). The Immobilization of a Thermophiylic β-Galactosidase on Sepabeads Supports Decrases Product Inhibition Complete Hydrolysis of Lactose in Dairy Products. Enzyme and Microbial Technology, 33: 199–205.

PESSELA, B.C.C., DELLAMORA-ORTIZ, G., BETANCOR, L., FUENTES, M., GUISAN, J.M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., 2007. Modulation of the Catalytic Properties of Multimeric β-Galactosidase from E. Coli by Using Different Immobilization Protocols. Enzyme and Microbial Technology, 40: 242–248.

PIVARNIK, L.F., SENECAL, A.G., RAND, A.G., 1995. Hydrolytic and Transgalactosylic Activities of Commercial β-Galactosidase (Lactase) in Food Processing. Advances in Food and Nutrition Research, 38: 1-102.

POMERANZ Y., 1964. Lactase (beta-D-Galactosidase) I. Occurrence and Properties. Food Technology,18 (5):690–697.

RICHMOND, M.L.,1981. β-galactosidase: Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns and İmmobilization Journal of Dairy Science, 64: 1759-1771.

RHIMI, M., MESSAOUD, E.B., BORGI, M.A., KHADRA, K.B., BEJAR, S., 2007. Co-expression of L-arabinose Isomerase in *E.coli* and Development of an Efficient Process Producing Simultaneously D-tagose and D-fructose. Enzyme and Microbial Technology, 40: 1531–1537.

ROSE, I. A., O'CONELL, E. L. and MORTLOCK, R. P., 1969. Stereochemical Evidence for a Cis-enediol Intermediate in Mn-dependent Aldose Isomerases. Biochemical and Biophysical. Acta, 178:376.

ROUWENHORST R.J, PRONK J.T., VAN DİJKEN J.P., 1989. The Discovery of _-galactosidase. *TIBS* 14: 416–418.

SRIPRAPUNDH, D., VIEILLE, C., ZEIKUS, J.G., 2000. Molecular Determinants of Xylose Isomerase Thermal Stability and Activity: Analysis of Thermozymes by Site-directed Mutagenesis. Protein Engineering, 13:259–265.

STRANDBERG, G.W., SMILEY, K.L., 1971. Free and Immobilized Glucose Isomerase from *Streptomyces phaechromogenes.* Applied Microbiology, 21(4): 588–593.

SZCZODRAK, J., 2000. Hydrolysis of Lactose in Whey Permeate by Immobilized β-Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 10: 631–637.

TANRISEVEN, A., ASLAN, Y., 2005. Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to Produce Fructooligosaccarides. Enzyme and Microbial Tecnology, 36: 550–554.

TANRISEVEN, A. DOGAN, S., 2002. A Novel Method for the Immobilization of Beta-galactosidase. Process Biochemistry,30: 406-409.

TAKASAKI, Y. and TANABE, O., 1966. Studies on Isomerisation of Sugars by Bacteria. IX. NAD-linked D-glucose Isomerizing and D-mannose Isomerizing Enzyme from *Paracolobacterium aerogenoides*. Agriculture Biological Chemistry, 30: 220–225.

TAKASAKI, Y., KANBAYASHI, A., KASUGI, Y., 1969. Studies on Sugar Isomerizing Enzyme. Agriculture of Biological Chemistry, 33:1527-1534.

TELEFONCU, A., 1997. Enzimoloji. Yüksek Lisans Yazokulu. 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. p. 416.

UHLIG, H., 1998. Industrial Enzymes and Their Applications. Wiley, New York

VIEILLE, C., ZEIKUS, J., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses and Molecular Mechanisms for Thermostability. Microbiological Molecular Biology Reviews, 65: 1-43.

WALLENFELS, K., MALHOTRA, O.P., 1961. Advances in Carbohydrate Chemistry, 16: 239-298.

WANG, S.S., 1993. Chemistry of Protein Congution and Cross Linking. CRC Press, Boca Raton, USA.

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

ZABORSKY O.R., 1973. Immobilized Enzymes. CRC Press, Cleveland, Ohio. p. 175.

ZHOU, Q.Z.K., CHEN X.D., 2001.Immobilization of β-Galactosidase on Graphite Surface by Glutaraldehyde. Journal of Food Engineering, 48: 69–74.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Düzce'de doğdum. İlköğrenimimi Doğubeyazıt/Ağrı'da tamamladım. Orta ve lise öğrenimimi Nizip/Gaziantep'te tamamladıktan sonra 1999 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde üniversite eğitimime başladım ve 2003 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümünde Yüksek Lisans eğitimime başladım.