

T.C.
SİİRT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SACCHAROMYCES CEREVISIAE İNVERTAZIN KARBOKSİLENMİŞ ÇOK
DUVARLI KARBON NANOTÜPLER ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE AKALAN
(173108009)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Yakup ASLAN

Şubat-2019
SİİR

TEZ KABUL VE ONAYI

Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Merve AKALAN tarafından hazırlanan “*Saccharomyces cerevisiae* invertazın karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüpler üzerine immobilizasyonu” adlı tez çalışması 25/02/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç. Dr. Nevzat KONAR

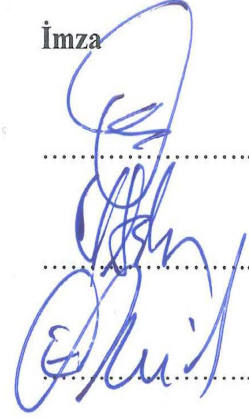
Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Yakup ASLAN

Üye

Doç. Dr. Emre BAKKALBAŞI

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Doç. Dr. Fevzi HANSU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2018-SİÜFEB-076 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında *Saccharomyces cerevisiae* invertaz enzimi ilk olarak ticari immobilizasyon matrisi olan karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edildikten sonra karakterize edilmiş ve invert şeker üretimi için sükrozun hidrolizinde kullanılmıştır.

Öncelikle, bu tez çalışmamı 2018-SİÜFEB-076 nolu proje ile destekleyen Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İkinci olarak, tez çalışmalarım boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yakup ASLAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca, laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım sürecim boyunca manevi desteğini eksik etmeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Sait İZGİ'ye teşekkür ederim.

Aynı zamanda tüm çalışmalarım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Merve AKALAN

SIIRT-2019



ÖNSÖZ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	2
2.1. İnvvertaz Enzimi	2
2.2. Sükroz	3
2.3. İnvvert Şeker	4
2.4. Glukoz	4
2.5. Fruktoz	5
2.6. Enzim İmmobilizasyonu	6
2.6.1. Enzim İmmobilizasyon Metotları	7
2.7. c-MWCNT'ler ile Enzim İmmobilizasyonu	9
2.8. c-MWCNT ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	11
2.9. SCI'nın İmmobilizasyonu ile İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar	12
3. MATERYAL VE METOT.....	16
3.1. Materyaller	16
3.2. Metotlar	16
3.2.1. SCI'nın c-MWCNT'ler ile immobilizasyonu	16
3.2.2. Protein (enzim) tayini	16
3.2.3. SCI aktivitesinin tayini	17
3.2.4. İmmobilizasyon ve aktivite verimlerinin hesaplanması	17
3.2.5. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu	18
3.2.6. Serbest ve İmmobilize SCI'nın karakterizasyonu	19
3.2.7. İmmobilize SCI'nın kullanım kararlılığı.....	21
3.2.8. İmmobilize SCI'nın depolama kararlılığı	21
3.2.9. İmmobilize SCI kullanarak sükrozdan invert şeker üretimi.....	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	22
4.1. Protein Tayini	22
4.2. Enzim Aktivitesinin Tayini	22
4.3. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu	22
4.3.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi.....	22
4.3.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi	23
4.3.3. Martiks miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi	24
4.4. Serbest ve İmmobilize SCI'nın Karakterizasyonu.....	25
4.4.1. Optimum pH.....	25
4.4.2. Optimum sıcaklık	25

4.4.3. pH kararlılığı	26
4.4.4. Isıl kararlılığı	27
4.4.5. Kinetik sabitler	27
4.5. İmmobilize SCI'nın Kullanım Kararlılığı.....	29
4.6. İmmobilize SCI'nın Depolama Kararlılığı	29
4.7. Sükrozdan İvert Şeker Üretimi.....	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	32
5.1. Sonuçlar.....	32
5.2. Öneriler	32
6. KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	36



TABLULAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Adsorpsiyonla immobilizasyonda kullanılan adsorbentler.....	8
Tablo 4.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi.....	23
Tablo 4.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi.....	24
Tablo 4.3. c-MWCNT miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi.....	24



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Sükrozun molekül yapısı.....	3
Şekil 2.2. İntertaz enzimi katalizörlüğünde sükrozun glukoz ve fruktoza parçalanması..	4
Şekil 2.3. Glukozun molekül yapısı.....	5
Şekil 2.4. Fruktozun molekül yapısı.....	5
Şekil 2.5. Enzim immobilizasyon metotları.....	8
Şekil 2.6. Karbon nanotüpler.....	11
Şekil 2.7. Adsorpsiyon yöntemi ile c-MWCNT üzerine enzim immobilizasyonu.....	11
Şekil 3.1. BSA standart grafiği.....	17
Şekil 3.2. Glukoz standart grafiği.....	18
Şekil 4.1. SCI'nın aktivitesine pH'nın etkisi.....	26
Şekil 4.2. SCI'nın aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	26
Şekil 4.3. SCI'nın kararlılığına pH'nın etkisi.....	27
Şekil 4.4. SCI'nın kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	28
Şekil 4.5. Serbest ve immobilize SCI'nın Lineweaver-Burk grafiği.....	28
Şekil 4.6. İmmobilize SCI'nın kullanım kararlılığı.....	29
Şekil 4.7. İmmobilize SCI'nın depolama kararlılığı.....	30
Şekil 4.8. İntert şeker üretimine sükroz derişiminin etkisi.....	31
Şekil 4.9. İntert şeker üretimine immobilize SCI miktarının etkisi.....	31
Şekil 4.10. İntert şeker üretimine hidroliz süresinin etkisi.....	31

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
SCI	: Saccharomyces cerevisiae invertaz
BSA	: Bovine Serum Albumin
c-MWCNT	: Karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp
g	: Gram
IU	: Uluslararası Enzim Birimi
L	: Litre
M	: Molarite
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
$^{\circ}\text{C}$: Celsius
pH	: $-\log[\text{H}^+]$
rpm	: Dakikadaki dönme sayısı
UV	: Ultraviyole
v	: Hacim
w	: Kütle

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SACCHAROMYCES CEREVISIAE İNVERTAZIN KARBOKSİLENMİŞ ÇOK
DUVARLI KARBON NANOTÜPLER ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU**

Merve AKALAN

**Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yakup ASLAN
2019, 36+x sayfa**

Endüstriyel bir enzim olan invertaz, sükrözün hidrolizini katalize eden bir glikoproteindir ve gıda sanayisinde invert şeker üretiminde kullanılmaktadır. 1:1 oranında glukoz ve fruktoz karışımından oluşan invert şeker, granüler sükrözden daha tatlı ve daha çözünür olmasından dolayı gıda sanayisinde önemli bir bileşendir. Özellikle şeker üreticilerinin yüksek viskoziteli solüsyonlarda şekerin kristalleşmesini geciktirmek amacıyla kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, *Saccharomyces cerevisiae* invertazın immobilizasyonu, ticari immobilizasyon matrisi olan karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp üzerine adsorpsiyon yöntemiyle gerçekleştirildi. Immobilizasyon koşulları optimize edilerek, % 100 immobilizasyon verimi ve % 177.69 aktivite verimi elde edildi. Enzimin optimum pH'ı (4.5) ve optimum sıcaklığı (55°C) immobilizasyon sonrasında değişmemiştir. Ayrıca serbest ve immobilize enzim için kinetik sabitleri Linereaver-Burk grafiği kullanılarak belirlendi. Substrat olarak sükröz kullanıldığında serbest ve immobilize enzim için K_m değerleri sırasıyla 215.5 mM ve 140.9 mM olarak hesaplanırken, V_{max} değerleri ise sırasıyla 0.0339 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{dk}$ ve 0.0481 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{dk}$ olarak hesaplandı. Immobilize enzim, peş peşe tekrarlanan yirmi kullanım sırasında ve yirmi günlük depolama sırasında, başlangıç aktivitesini kaybetmemiştir. 150 rpm çalkalama hızındaki bir orbital çalkalayıcı ve ısıtmalı bir inkübatörde, optimum koşullarda (pH 4.5 and 55 °C), immobilize enzim kullanılarak sükrözün hidrolizi 6 saat boyunca izlendiğinde, hidrolizin 4 saatte tamamlandığı anlaşıldı.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp üzerine immobilize *Saccharomyces cerevisiae* invertazın, invert şekerin endüstriyel üretiminde kullanılabileceği söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Adsorpsiyon, Immobilizasyon, İvert Şeker, İvertaz, Karbon Nanotüp, Sukroz.

ABSTRACT

MS THESIS

IMMOBILIZATION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIA* INVERTASE ON CARBOXYLATED MULTI WALLED CARBON NANOTUBES

Merve AKALAN

The Graduate School of Naturel and Applied Science of Siirt University
The Degree of Master of Science
Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Yakup ASLAN
2019, 36+x Pages

The invertase, an industrial enzyme, is a glycoprotein that catalyzes the hydrolysis of sucrose and is used in the production of invert sugar in the food industry. Invert sugar, consisting of 1: 1 mixture of glucose and fructose, is more sweet and soluble than sucrose and is an important component in the food industry. It is especially used for the purpose inhibit the crystallization of sugar in high viscosity solutions of sugar based products.

In this study, the immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* invertase was carried out by adsorption method on the carboxylated multi-walled carbon nanotube, which is a commercial immobilization matrix. By optimizing the immobilization conditions, 100% immobilization efficiency and 177.69% efficiency were obtained. The optimum pH (4.5) and optimum temperature (55 ° C) of the enzyme did not change after immobilization. In addition, kinetic constants for free and immobilized enzyme were determined using Linereaver-Burk graph. When sucrose was used as the substrate, the K_m values for the free and immobilized enzyme were calculated as 215.5 mM and 140.9 mM, respectively, while the V_{max} values were 0.0339 $\mu\text{mol} / \text{mg}\cdot\text{min}$. and 0.0481 $\mu\text{mol} / \text{mg}\cdot\text{min}$. The immobilized enzyme did not lose its initial activity during repeated use and also during twenty days of storage. When the hydrolysis of sucrose was monitored for 6 hours using the immobilized enzyme at optimum conditions (pH 4.5 and 55 ° C) with an orbital shaker and heated incubator at a shaking rate of 150 rpm, the hydrolysis was completed in 4 hours.

In conclusion, it can be said that *Saccharomyces cerevisiae* invertase immobilized on the carboxylated multilevel carbon nanotube obtained in this thesis study can be used in the industrial production of invert sugar.

Keywords: Adsorption, Carbon Nanotube, Immobilization, Invert Sugar, Invertase, Sucrose

1. GİRİŞ

İnvert şeker, eş molar glukoz ve fruktozdan oluşan, sükrozun enzim veya asitle hidrolizi sonucu elde edilen, sükrozdan daha tatlı ve daha çözünür olmasından dolayı gıda endüstrisinde tercih edilen bir bileşendir. Yapay bal üretimi, tatlıların doldurulması ve yumuşaklığın korunması gibi uygulamalarda kristalleşmeyi önlemede etkili olduğundan şekerleme endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İnvvertazlar, sükrozun hidrolizinden sorumlu olan, endüstriyel uygulamalar için genel olarak maya suşlarından elde edilen enzimlerdir. Endüstride en yaygın olarak kullanılan invvertaz, yüksek aktivitesi nedeniyle *Saccharomyces cerevisiae* invvertaz (SCI)'dir.

İmmobilizasyon, enzimlerin suda çözünmeyen bir polimerin üzerine veya içerisine kimyasal bağlanma veya fiziksel adsorpsiyon ile bağlanarak çözünmez hale getirilmesidir. İmmobilize enzimler gıda biyoteknolojisinde geçmişten günümüze yaygın olarak kullanılmaktadır. Çapraz bağlama, entrapment, kovalent bağlama ve adsorpsiyon yöntemleri ile günümüze kadar çok sayıda endüstriyel enzim immobilize edilerek kullanılmaktadır. İmmobilize enzim kullanmanın, süzerek reaksiyon ortamından ayrılmasıyla tekrar tekrar kullanılması, düşük ürün maliyeti, daha saf ürün elde edilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Literatürde SCI'nın immobilizasyonu ile ilgili çok çeşitli materyallerin ve metotların kullanıldığı çalışmalar yer almasına rağmen, elde edilen aktivite verimleri genellikle yüzde yüzün altındadır. Karbon nanotüpler yüksek enzim bağlama kapasiteleri, kararlılıkları ve enzimlere karşı doğal afiniteleri nedeniyle ilk icat edildikleri 1993 yılından beri enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanım alanı bulmuştur. Karboksile edilmiş çok duvarlı karbon nanotüp (c-MWCNT) üzerine immobilize edilen enzimlerin aktivitelerinde serbest enzimlere göre beş ile on iki kat aktivite artışı elde edildiği bildirilmiştir.

Dolayısıyla, bu tez çalışmasının en büyük varsayımı, c-MWCNT üzerine immobilize edilecek olan SCI enziminin invert şeker üretiminde daha verimli kullanılabileceği ihtimalidir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında SCI enziminin c-MWCNT üzerine adsorpsiyon yöntemiyle yüzde yüz bağlanma verimi ve mümkün olan en yüksek aktivite verimi elde etmek için immobilizasyon koşullarının ve immobilize SCI kullanılarak sükrozdan invert şeker üretimi koşullarının optimizasyonu amaçlandı.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. İvertaz Enzimi

Enzimler hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştiren, çoğunlukla protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler günümüzde çeşitli endüstriyel amaçlar için kullanılmaktadır. Serbest enzimlerin katalizledikleri reaksiyon sonunda üründen ayrılarak geri kazanılmaları ve tekrar kullanılmaları çok pahalı bir dizi karmaşık teknikleri gerektirmektedir. Bu da ürün maliyetini artırdığı için üründen ayrılmayıp genellikle ürünle beraber tüketilmektedirler. Ancak, bazı enzimlerin ürünle beraber tüketilmeleri sağlık açısından sakıncalar doğurabilmektedir. Ayrıca, enzimlerin sadece bir kez kullanılmaları, pahalı olmaları nedeni ile prosesleri ekonomik olmaktan çıkmaktadır. Bu nedenle, enzimlerin immobilize edilerek defalarca kullanılmaları, sürekli proseslerin oluşturulması açısından önem arz etmektedir. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır.

Endüstriyel olarak öneme sahip enzimlerden biri invertaz enzimidir. Invertaz (β -D-fruktofuranosidaz, sakarraz, invertin, sükröz; EC 3.2.1.26), hidrolaz grubuna aittir ve sükrozun, indirgen şekerler olarak bilinen eş molar glukoz ve fruktoz karışımına hidrolizinden sorumludur. Gıda ve içecek endüstrisinde yaygın olarak kullanılan, genellikle mayalardan elde edilen bir enzimdir. Sükrozun invertaz ile enzimatik hidrolizi, sükrozun α -(1,4) glikozid bağlarının parçalanması, invert şeker olarak bilinen bir eş molar glukoz ve fruktoz karışımının oluşumu ile sonuçlanır (Milovanovic ve ark., 2007).

İvertaz enzimi memeliler, sebzeler, böcekler, bakteriler ve mantarlarda da bulunmaktadır ancak, endüstriyel invertazlar genellikle mayalardan elde edilmektedir (David, 2006). Endüstriyel invertaz, *Saccharomyces cerevisiae* tarafından üretilir (Rashad ve ark., 2006). Sükroz hidrolizi için majör özgülüğe sahip olan SCI, sükrozun hidrolizini katalize eden bir glikoproteindir ve gıda endüstrisinde invert şeker üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Tanrıseven ve Doğan, 2001). Bu reaksiyon sonucunda, α -D-glukoz ve α -D-fruktoz elde edilir. Fruktoz sükrozdan daha tatlı olduğu için, invert şekerin tatlılık derecesi daha yüksektir. Kristalleşmenin önlenmesi, tatlıların doldurulmasında, yumuşaklığın korunmasında önemli rol oynar. Ayrıca, invertaz,

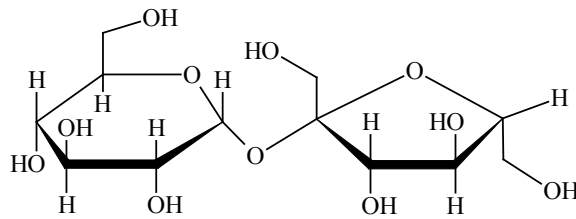
sükrozun substrat olduğu zaman suni bal üretimi, şeker üretimi için nemlendirici madde üretimi, kozmetik, kağıt ve ilaç üretimi gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda da kullanılmaktadır (Kotwal ve Shankar, 2009).

Maya invertazları diğer birçok enzimin aksine, glikoprotein olması nedeniyle, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında nispeten yüksek aktivite sergilerler ve asidik pH aralığı (3.5-5.5) ile 55-70 °C sıcaklık aralığında daha aktiftirler. Bu enzimler, sükroz inversiyonu için immobilize formda da büyük ölçekte kullanılabilir (Vitolo ve ark., 1999).

2.2. Sükroz

Sükroz, bir glukozun α -(1,2) glikozidik bağı ile bir fruktoza bağlanması sonucu oluşan bir disakkarittir (Şekil 2.1). Sükroz doğal bir tatlandırıcı olup çoğu sebze ve meyvelerde bulunur. Endüstriyel üretiminde şeker kamışı ve şeker pancarı kullanılmaktadır. Sofra şekeri olarak kullanılmasının yanında, gıda üretiminde tatlandırıcı ve koruyucu olarak da kullanılır (Aslan, 2005). Sükrozun invertaz ile hidrolizinden invert şeker karışımı elde edilir. Molekül ağırlığı 342.3'tür (Doğan, 2000).

Enzimatik sükroz hidrolizinde, serbest invertazlarının yanında immobilize formda invertazlar da kullanılmaktadır. Serbest ve immobilize edilmiş formlardaki invertaz katalizli hidroliz ile, asit hidroliziyle elde edilen renkli versiyona kıyasla, düşük konsantrasyonlarda 5-hidroksimetil-2-furfural (HMF) ve renk gelişimi olmaksızın yüksek kalitede şurup üretilmektedir (Kang, 2000).



Sükroz

Şekil 2.1. Sükrozun molekül yapısı

2.3. İvert Şeker

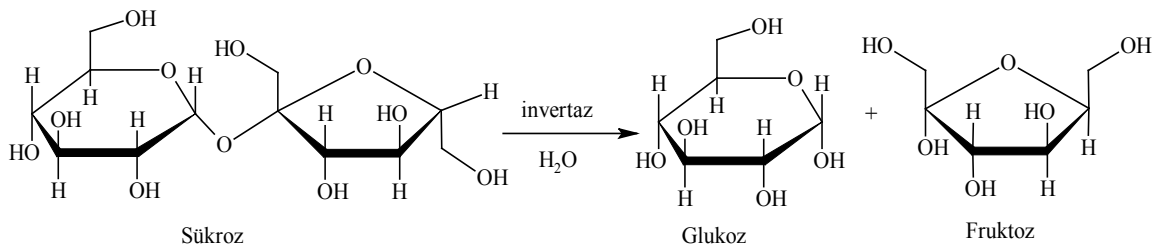
Bir disakkarit olan sükröz, invert şeker olarak bilinen 1:1'lik eş molar glukoze ve fruktoza karışımına ayrılabilir. İvert şeker, granüler sükrözden daha tatlı ve daha çözünür olmasından dolayı şekerleme endüstrisinde çok önemli bir bileşendir. Özellikle şeker üreticilerinin yüksek viskoziteli solüsyonlarda şekerin kristalleşmesini geciktirmek amacıyla kullanılmaktadır (Toppare ve ark., 2003).

Enzim katalizöründe elde edilen invert şeker karışımı, asit hidroliziyle elde edilen renkli ürünlerin aksine, renksiz olma avantajına sahiptir ve kullanılan yüksek konsantrasyonlarda sükrözden daha düşük bir kristalliteye sahiptir. Bu bağlamda, immobilize invertaz kullanımı cazip bir seçenektir çünkü enzimin yeniden kullanımı ve katalizörün stabilitesi ve aktivitesindeki artış maliyet düşmesine yol açabilmektedir (Mazi ve ark., 2006).

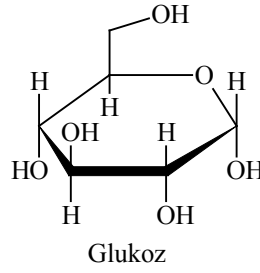
İvertaz enzimi Şekil 2.2'de görülen, sükrözün invert şeker adı verilen eş molar glukoze ve fruktoza parçalanma reaksiyonunu katalizler. Aynı reaksiyon, ortamda invertaz bulunmaması durumunda da gerçekleşir, ancak invertazın katalizör etkisi sonucu reaksiyon hızı çok büyük oranda artar. Bu özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmasının yanında, şekerleme ürünlerinin raf ömrünü uzatmak amacıyla katkı maddesi olarak da kullanılır (Doğan, 2000).

2.4. Glukoze

Şekil 2.3'te görüldüğü gibi D-Glukoze (D-glukopiranoz), ($C_6H_{12}O_6$; MA=180.159 g/mol) altı karbondan oluşmuş bir şekerdir. Nişasta ve selüloz sırasıyla, anhidroglukopiranoz ünitelerinin α - ve β - bağları ile bağlanarak uzun zincirli polimer oluşturması ile meydana gelir. İnsan diyetinin büyük bölümünü glukozun serbest veya polimerleşmiş hali oluşturur.



Şekil 2.2. İvertaz enzimi katalizöründe sükrözün glukoz ve fruktoza parçalanması



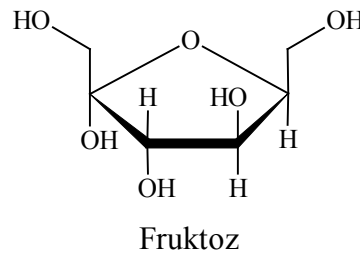
Şekil 2.3. Glukozun molekül yapısı

Glukoz ve glukoz içeren ürünler, endüstriyel olarak nişastadan üretilmektedir. Bu işlem için genelde mısır kullanılır. Mısır nişastası haricinde arpa, buğday, pirinç, patates nişastası veya diğer nişastalar da kullanılmaktadır. Dünyada üretilen mısır nişastasının % 70'i glukoz içeren tatlandırıcılara dönüştürülür (Doğan, 2000).

2.5. Fruktoz

Molekül yapısı Şekil 2.4'te görülen D - fruktoz, D - glukozdan sonra en önemli monosakkarittir. Fruktoz doğada özellikle meyvelerde (elma ve armut) serbest monosakkarit halinde bulunmaktadır. Serbest kristal β -D fruktopiranoz'un erime noktası 105 °C'dir. Fruktoz çözeltisinin tatlılığı sıcaklık, konsantrasyon ve asit miktarına bağlıdır. % 10'luk fruktoz çözeltisinin tatlılığı oda sıcaklığında sükrozdan 1.3 kat daha fazladır.

Fruktoz, endüstriyel olarak sükroz, nişasta ve inülden elde edilmektedir. Fruktoz düşük kalorigen ve diyabetik olarak üretilen pek çok gıda ürünüde kullanılmaktadır. Diğer yapay tatlandırıcılara kıyasla acımsı bir tadı yoktur. Ayrıca, fruktoz pişmiş gıdalardaki su kaybını engelleyerek raf ömrünün de uzatmaktadır. Sükrozdan daha tatlı olması, düşük sıcaklıktaki yüksek çözünürlüğü, yüksek donma noktası sayesinde dondurma üretiminde de rahatlıkla kullanılmaktadır (Doğan, 2000).



Şekil 2.4. Fruktozun molekül yapısı

2.6. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon, enzim aktivitesini uzun süre korumak için, suda çözünmeyen bir matris adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama veya matris içine hapsederek enzimin hareketinin sınırlandırılması işlemidir. Bir enzimin immobilizasyonu, hareketliliğini kimyasal veya fiziksel yöntemlerle kısıtlayarak elde edilir. Kontrollü salım sistemleri, çevresel kirleticilerin belirlenmesi ve biyosensör tasarımı gibi alanlarda uygulamalar için enzim özelliklerinin artırılmasında kullanılır. Enzimin aktivitesi immobilizasyon işlemi sırasında düşerse de, basitleştirilmiş ayırma, immobilize edilmiş enzimlerin reaksiyon ortamından kolay geri kazanılması gibi birçok avantaja sahiptir ve bunlar işletme maliyetini azaltmak için tekrar tekrar kullanılabilir. Ayrıca enzimler immobilizasyon ile kararlı hale getirilebilirler. Enzim immobilizasyonunda organik ve inorganik yapıda çok sayıda doğal veya yapay matris kullanılmaktadır (Eupergitler, karbon nanotüp, v.b.). Destek malzemeleri, optimum pH ve sıcaklık gibi parametreleri değiştirebilir (Birnbaum ve ark., 1993).

İmmobilize enzim kullanmanın avantajları;

- Reaksiyon ortamından basit yöntemlerle ayrılabilir.
- Yüksek sıcaklık ve pH'ya karşı daha dayanıklıdır.
- Sürekli proseslerin uygulanmasını mümkün kılar.
- Defalarca kullanılabilir.
- Saklama şartlarında aktivitelerini aylarca koruyabilir.
- Ürün maliyetini düşürür.
- Saf ürün elde etmeyi mümkün kılar.
- Seçici olarak bazı malzemelerin sentezi mümkün olur.
- Ürün inhibisyonu önlenir.

İlk enzim immobilizasyonu 1916 yılında Nelson ve ark. tarafından invertaz enzimi ile yapılmıştır. Günümüze kadar, konu ile ilgili, on binlerce makale ve patent yayınlanmıştır.

2.6.1. Enzim İmmobilizasyon Metotları

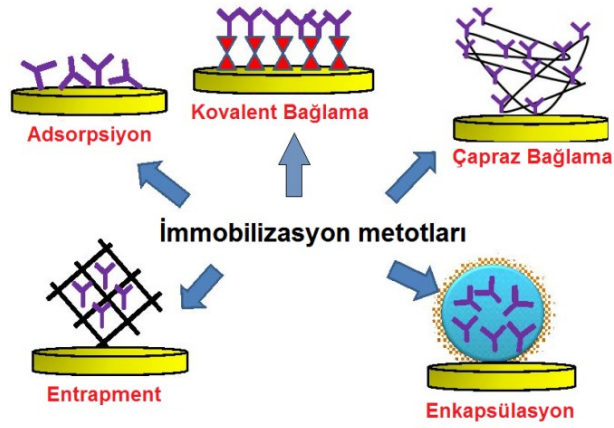
İmmobilizasyon metotlarında farklı sınıflandırmalar yapılabilmesine rağmen genellikle bağlanma reaksiyonun tipine göre sınıflandırma yapılmaktadır. Adsorpsiyon, entrapment (bir polimerik jel veya kapsül içine hapsetme), bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanma ve kovalent bağlanma olmak üzere dört ana gruba ayrılır (Şekil 2.5). İmmobilizasyon metodunun seçimi, enzimin ve matrisin yapıları, kullanılacakları prosesler gibi parametrelere bağlıdır. İmmobilize enzimler, kullanılan matrisin yapısına ve immobilizasyon metoduna bağlı olarak, serbest enzimlere göre optimum şartları, kinetik sabitleri ve ürün bileşimleri bakımından farklı özellikler gösterebilirler.

2.6.1.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon metodu, enzimin en zayıf çekim kuvvetleriyle inert bir matrise bağlanmasını esas alan, oldukça basit ve ekonomik bir immobilizasyon yöntemidir. İmmobilizasyon, enzim çözeltisinin uygun pH ve sıcaklıkta matrisle karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Enzimle matris arasında van der Waals ve hidrojen bağları gibi zayıf bağlar oluşur ve böylece enzimler matristen kolaylıkla ayrılırlar. İyon değiştiriciler kolaylıkla proteinleri adsorbe ederler ve enzim immobilizasyonu için endüstride yaygın olarak kullanılırlar (Aslan, 2005). İmmobilizasyon teknikleri arasında, adsorpsiyon diğer yöntemlerden daha yüksek bir ticari potansiyele sahiptir, çünkü adsorpsiyon işlemi daha basit ve daha ucuz bir yöntemdir. Ayrıca aktiviteyi korur ve en önemlisi, immobilizasyondan sonra destek materyali de tekrar tekrar kullanılabilir (Marquez ve ark., 2008). Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonda yaygın olarak kullanılan adsorbentler Tablo 2.1'de görülmektedir.

2.6.1.2. Çapraz bağlama

Sulu çözeltilerde çözünebilen enzimler, bifonksiyonel çapraz-bağlayıcı reaktifler kullanılarak birbirlerine kovalent olarak bağlandıklarında çözünmez hale gelirler (Chui ve Wan, 1997). Glutaraldehit bu amaç için kullanılan çapraz-bağlayıcı reaktiflerden biridir (Klibanov, 1983). Bifonksiyonel glutaraldehit molekülündeki aldehit grupları, enzimlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek enzimleri çapraz bağlar. Çapraz bağlanma moleküller arası veya molekül içi oluşabilir ve protein çöker. Çapraz bağlı protein santrifüj ile kolaylıkla ayrılabilir.



Şekil 2.5. Enzim immobilizasyon metotları (Dutra, 2015)

Tablo 2.1. Adsorpsiyonla immobilizasyonda kullanılan adsorbentler

Etkileşme	Adsorbentler
Fiziksel Adsorpsiyon	Doğal Matiksler Aktif Karbon Silika jel Aluminyum Cam Nişasta Modifiye Matiksler Konkanavalin A Sefaroz Tannin Amino heksil selüloz Fenoksiasetil selüloz
İyonik Bağlanma	Kasyon Değişiriciler CM-selüloz Doveks 50 Amberlit CG-50 Anyon Değişiriciler DEAE-selüloz DEAE-sefadeks Amberlit

2.6.1.3. Entrapment (Hapsetme)

Bir polimerin oluşumu sırasında, enzimin oluşan polimer içerisine hapsedilmesine entrapment denir (O'Driscoll, 1976). Bu metot için en yaygın olarak kullanılan polimerlerden birisi aljinik asittir. Aljinatlar, toksik olmayan doğal ve ekonomik polimerlerdir. Aljinat jellerinin (bead, kapsül, fiber) gözeneklerinin büyük olması, fosfat gibi bazı anyonlar içeren reaksiyon ortamlarında kararlılığının düşük olması, kullanılmalarını sınırlayan faktörlerdendir. Aljinat kullanılarak enzimler değişik metotlarla immobilize edilebilir. Enzim, aljinat çözeltisiyle karıştırılarak kalsiyum klorür çözeltisine damlatıldığında kalsiyum aljinat beadleri oluşur. Enzim, kalsiyum

klorür ile karıştırılarak aljinat çözeltisine damlatıldığında ise kalsiyum aljinat kapsülleri oluşur. Enzim-Aljinat-gliserol karışımı, kalsiyum klorür çözeltisine şırınga ile iplik şeklinde enjekte edildiğinde, kalsiyum aljinat fiberleri oluşur. Oluşan bead, fiber veya kapsülün gözenek büyüklüğü, kullanılan aljinat ve kalsiyum klorür çözeltisinin derişimine bağlıdır. Molekül kütlesi 300 kDA'dan küçük olan enzimler aljinat jellerinden kaçabilmektedir. Bu nedenle, kalsiyum aljinat ile immobilizasyon genellikle hücrelerin immobilizasyonunda kullanılır (Blandino ve ark., 2000; Hayashi ve ark., 1994).

2.6.1.4. Kovalent bağlama

Enzimler genellikle amino, sülfidril, karboksil, hidroksil veya imidazol gruplarıyla, doğal ve yapay çok sayıda katı matris kovalent bağlanmayla immobilize edilebilirler. Üzerinde aktif gruplar bulduran matrisler, uygun tampon çözeltide enzimlerle muamele edilerek enzim immobilizasyonu gerçekleştirilir (Katchalski-Katzir ve Kraemer, 2000).

Üretan prepolimerler kovalent immobilizasyonda yaygın olarak kullanılan matrislerindendir. Prepolimerler, diizosiyanat türevlerinin, aktif hidrojen bulduran çeşitli bileşiklerle (glikol, poliglikol, poliöl) reaksiyonlarından elde edilirler ve yapılarında izosiyanatlar bulunur. Prepolimerler su ile muamele edildiğinde süngerimsi yapıda polimerler meydana gelir. Ortamda enzim bulunduğunda, enzimin aktif hidrojen bulduran gruplarıyla, izosiyanat grupları kovalent bağlar oluştururlar.

2.7. c-MWCNT'ler ile Enzim Immobilizasyonu

İmmobilizasyon prosedürleri, temel olarak biyokatalizörlerin ayrılması, tekrar kullanılması ve sürekli işlemlerin geliştirilmesi amacıyla kararlılıklarının iyileştirilmesi için geliştirilmiştir. Son yıllarda, enzim immobilizasyon teknolojisinin odağı nanoyapılı malzemelerin kullanımına yönelmiştir. Nanomalzemeler enzim immobilizasyonu için destek olarak yoğun ilgi kazanmıştır, çünkü yüksek yüzey alanı enzim yükünü ve immobilize edilmiş enzimin katalitik davranışını olumlu yönde etkilemektedir (Stamatis ve ark., 2010).

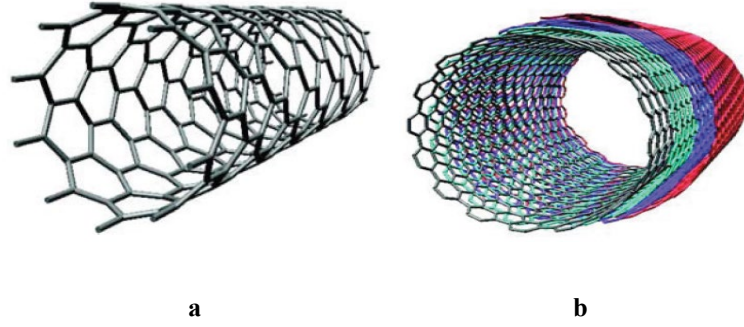
Enzimlerin yapısı gereği denatürasyonunun gerçekleşebilmesine rağmen, CNT'ler yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücülerde geleneksel düz desteklerden çok daha fazla kararlılık sağlayabilirler (Asuri ve ark., 2006).

Karbon nanotüpler, tek duvarlı veya çok duvarlı grafen levhaların kesintisiz silindirlere yuvarlanmasıyla oluşturulmuş iki türe ayrılmaktadır. Şekil 2.6'da görüleceği üzere, bu silindirik yapılar tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) olarak adlandırılmaktadır (Yellampalli, 2011). Tek duvarlı karbon nanotüp, yaklaşık 1-2 nm çapında, tek bir grafen tabakasının fulleren uçları ile kendi etrafında döndürülmüş halidir. Çok duvarlı karbon nanotüpler ise, farklı çaplara sahip tek duvarlı karbon nanotüplerin iç içe geçmesi ile oluşan formdur. Tek duvarlı nanotüpün avantajı, yüksek spesifik yüzey alanına sahip olması iken çok duvarlı nanotüplerin avantajı kolay ayrıştırılmasıdır (Weiser D., 2015). c-MWCNT'lerin enzim immobilizasyonunda avantajları aşağıda gösterilmiştir.

- Geniş spesifik yüzey alanı
- Daha yüksek miktarda enzim bağlama kapasitesi
- Yüksek spesifik aktivite
- Yüksek kullanım ve saklama kararlılığı
- Yüksek iletkenlik kararlılığı

Nanopartiküller yüksek yüzey alanına ve immobilizasyon işlemi için önemli özelliklere ve mekanik kararlılığa sahip olduklarından enzim immobilizasyonu için mükemmel matrislerdir (Prlainovic ve ark., 2013). Literatürde enzim immobilizasyonu için adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemlerinde tek duvarlı karbon nanotüplerin (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT') kullanımı hakkında çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Şekil 2.7'de görüldüğü gibi, adsorpsiyonla immobilizasyon, enzim ile matrisin tampon çözeltide inkübe edilmesiyle gerçekleştirilir (Garlet ve ark., 2014).

SCI son 90 yıl boyunca her türlü immobilizasyon tekniği ile çok sayıda farklı destekler ile immobilize edilmesine rağmen c-MWCNT üzerine immobilizasyonu ile ilgili bir çalışma literatürde bulunamadı.



Şekil 2.6. Karbon nanotüpler. **a.** Tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT), **b.** Çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT).



Şekil 2.7. Adsorpsiyon yöntemi ile c-MWCNT üzerine enzim immobilizasyonu.

2.8. c-MWCNT ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Wang ve ark. (2011)'in çalışmalarında c-MWNT üzerine *genview* kaynaklı papain immobilizasyonu sonucu % 18.8 bağlanma verimi, % 78.9 aktivite verimi elde etmişler ve 7 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 61'ini koruduğunu göstermişlerdir.

Rastian ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada c-MWCNT üzerine *Candida rugosa* lipaz enzimi immobilize etmişler ve çalışma sonunda % 52 bağlanma verimi alırken % 48 aktivite verimi elde etmişlerdir.

Garlet ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada *Aspergillus niger* inulinazı c-MWCNT üzerine immobilize ederek % 90 bağlanma verimi sağlamışlardır ve immobilize enzimin 5 hafta sonunda dahi başlangıç aktivitesini koruduğu sonucuna varmışlardır.

Rastian ve ark. (2014) yaptıkları bir başka çalışmada ise c-MWCNT üzerine *Candida rugosa* lipaz enzimini immobilize ederek % 86.7 bağlanma verimi ve % 492.5 aktivite verimi elde etmişlerdir. Çalışmanın devamında immobilize enzim 7 kullanım sonrasında başlangıçtaki aktivitesinin % 123.7'e indiğini bildirmişlerdir.

Azevedo (2014), c-MWCNT üzerine fungal peroxidase enzimini immobilize ettiği çalışmanın sonucunda % 100 bağlanma verimi elde etmiştir. Immobilize enzimin 9 kullanım sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği, 40 gün sonrasında ise aktivitenin % 34'e düştüğünü bildirmişlerdir.

Feng ve ark. (2015), c-MWCNT üzerine α -Amylase ve glucoamylase enzimini immobilize ederek % 95.1 aktivite verimi elde etmişlerdir. Immobilize enzimin 8 kullanım sonrasında aktivitesini kaybetmediğini göstermişlerdir.

Jamie ve ark. (2016), c-MWCNT üzerine *Candida rugosa* lipaz enzimini immobilize etmişler ve % 85.6 bağlanma verimi, % 500 aktivite verimi elde etmişlerdir.

Zniszczol ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada c-MWCNT üzerine *Pseudomonas fluorescens* lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. Immobilizasyon sonunda % 59 bağlanma verimi elde ederken % 1200 aktivite verimi elde etmişlerdir. Immobilize enzimin 8 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 60'a düştüğünü göstermişlerdir.

c-MWCNT geniş spesifik yüzey alanı nedeniyle daha yüksek miktarda enzim bağlama kapasitesine, yüksek spesifik aktiviteye ve yüksek kullanım ve depolama kararlılığına sahip olduğundan diğer matrislerle yapılan immobilizasyon çalışmalardan daha yüksek aktiviteye ve kararlılığa sahip immobilize SCI elde edilmesi mümkündür. Bu özellik ise immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarında aktivitenin uzun süre korunabilmesi ve enzim maliyetinin düşürülmesi açısından çok önemlidir.

2.9. SCI'nın İmmobilizasyonu ile İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar

Tarihte ilk SCI immobilizasyonu bilim insanları Nelson ve Grift (1916) tarafından yapılmıştır. Bu immobilizasyonda adsorpsiyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda mayadan elde edilen invertazın aktivitesinin enzimin odun

kömürüne veya bir kolloide adsorbe olup olmamasından etkilenmeyeceğini kanıtlamışlardır.

Tanrıseven ve Doğan (2001), yaptıkları çalışmada SCI'ı aljinat kapsüller içine immobilize ederek, immobilizasyon veriminin yüksek (% 87) ve enzim aktivitesinde de azalma olmaksızın 36 gün aktif olduğu sonucuna varmışlardır.

Tanrıseven ve ark. (2001), invert şeker üretmek için poli (3-metiltienil metakrilat)/poli (3-tiofenasetik) (PMTM-PTAA) immobilizasyon matrisini SCI'nın kovalent immobilizasyonunda kullanmış ve çalışma % 87 immobilizasyon verimliliği ile sonuçlanmıştır. Ayrıca aktivite için optimum koşulların immobilizasyondan etkilenmediğini ancak immobilize enzimin daha yüksek pH ve sıcaklık değerlerinde daha kararlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Akgöl ve ark. (2001), yaptıkları çalışmalarında, yeni geliştirilen manyetik poli (vinilalkol) (PVAL) mikrokürecikler üzerine sükrözün hidrolizi için SCI enzimini kovalent bağlanma ile ve % 74 aktivite verimiyle immobilize etmişlerdir. Optimum sıcaklığın ise immobilize enzim için serbest enzimden 5 °C daha büyük olduğu saptanırken, optimum pH değeri ise serbest enzim için 5.0 iken immobilize enzim için 5.5 olarak bulunmuştur. Ayrıca, ısıl kararlılık ve depolama kararlılığının immobilizasyon ile arttığı belirtilmiştir.

Mansour ve Dawoud (2003), SCI'ı celite ve poliakrilamid üzerine immobilize ederek aktivite veriminin sırasıyla % 92 ve % 81 olduğunu, hem serbest hem de immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklığın sırasıyla 4.6 ve 60 °C olduğunu ve immobilize edilen enzimin 90 gün boyunca oda sıcaklığında saklandığında ve peş peşe 20 kez kullanıldığında başlangıç aktivitesini kaybetmediğini bildirmişlerdir.

Bayramoğlu ve ark. (2003), çalışmalarında SCI enzimini kovalent bağlanma ile poli(hidroksietil metakrilat-co-glisidil metakrilat) poli (HEMA-GMA) film üzerine immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin optimum sıcaklığı serbest enzime göre 5 °C artış gösterirken optimum pH değerinin aynı kaldığı saptanmıştır. Immobilize enzimin aktivitesinin serbest emsallerine göre daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. Depolanma kararlılığı olarak 28 günün sonunda immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin % 32'sini kaybettiği belirlenmiştir. Kolay immobilizasyon protokolü, epoksi gruplarının yoğunluğundan dolayı ve bunun kolaylıkla değiştirilerek

monomer/komonomer oranının ayarlanabilir olması, daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında yüksek immobilizasyon kapasitesine sahip olması, biyoteknolojik çalışmalar için iyi bir mekanik dayanıklılık göstermesi gibi özelliklerin uygulama avantajları gösterilebileceği kanıtlanmıştır.

Milovanovic ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada, kalsiyum aljinat boncukları içine SCI'nın immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda 40 ardışık döngüden sonra bile invertaz aktivitesinin % 90'ını koruduğunu göstermişlerdir.

Hertz ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada, SCI'yı iyonotropik jelasyon yöntemiyle hazırlanan ve glutaraldehit ile aktive edilen kitosan nanopartiküller üzerinde kovalent olarak immobilize etmiş ve immobilizasyon sonunda termal ve depolama stabiliteleri, enzimin optimum pH ve sıcaklığının değişmediğini, K_m 'nin 3 kat arttığını V_{max} 'ın ise değişmediğini göstermişlerdir.

Tanrıseven ve ark. (2013), yaptıkları bir başka çalışmada ise, SCI'nın supermacroporous poliakrilamid kriyojel içinde immobilizasyonu için yeni bir yöntem geliştirilmiş ve invert şeker üretmek için kullanılmıştır. Yöntemin % 100 immobilizasyon ve % 74 aktivite verimiyle sonuçlandığı, immobilize invertazın, başlangıç aktivitesini 30 gün boyunca ve peş peşe 30 kullanım sonunda koruduğu fakat immobilizasyonun optimum sıcaklık üzerinde etkisi olmadığı ve hem serbest hem de immobilize enzim için 60 °C olduğu sonucuna varmışlardır.

Tanrıseven ve ark. (2008)'nin, yaptıkları bir başka çalışmada SCI'nın poli (3-metiltiyenil metakrilat) - poli (3-tiofenasetik asit) (PMTM-PTAA) üzerine kovalent immobilizasyonu % 87 immobilizasyon verimi ile sonuçlanmış ve enzimin optimum pH (4.5) ve sıcaklık (55 °C) değerlerinin immobilizasyondan etkilenmemiştir. Ancak immobilize SCI'nın yüksek pH ve sıcaklıklarda daha aktif olduğu görülmüştür. Serbest ve SCI için kinetik parametreler Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak belirlenmiş ve K_m değerleri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 35 ve 38 mM olarak belirlenmiştir. V_{max} değerleri ise serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 29 ve 24 mg glukoz/mg enzim olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda, sükrözdan glukoz ve fruktoz üretimi için immobilize enzim kullanılabilceği kanısını varılmıştır. 50 kez peş peşe tekrarlanan reaksiyonlarda ve bir ay boyunca depolanma sonucunda da tüm aktivitesini koruduğu gösterilmiştir.

Sugunan ve Sanjay (2006), yaptıkları çalışmada invertazı mikro gözenekli asitle aktive edilmiş montmorillonit kil (K-10) üzerine hem adsorpsiyon hem de kovalent bağlama yöntemi ile immobilize etmişler ve daha sonrasında immobilize enzim ile sükröz hidrolizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda immobilize edilmiş enzimlerin daha yüksek pH ve sıcaklıkta da kararlı olduklarını ve optimum pH ve sıcaklığın yükseldiğini belirtmişlerdir. İmmobilize edilen enzimin 20 gün boyunca aktivitesinde önemli bir kayıp olmaksızın 5 °C'de pH 5 ve 6 tamponunda depolanabilir olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Literatür araştırmamızın bir sonucu olarak, SCI enzimi bir çok farklı matiks ve metot kullanılarak immobilize edildiği, ancak aktivite verimlerinin % 100'ün altında olduğu görülmektedir. Ayrıca, SCI enziminin bu zamana kadar c-MWCNT üzerine immobilizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı. Dahası, c-MWCNT'lerin geniş yüzey alanları dolayısıyla daha fazla enzim bağlama kapasitesine sahip olması, yüksek kararlılık nedeniyle mekanik darbelere dayanıklı olması, sulu çözeltilerde çok iyi dağılmaları ve çözeltinin her tarafına doğru Brown Hareketi yapması, substrat ve ürünler için kütle transferi problemi göstermemesi gibi nedenlerden ötürü bazı enzimlerin aktivitesinin immobilizasyon sonucu 5-12 kat arttığı bildirildiğinden, bu tez çalışmasında SCI'nın c-MWCNT üzerine immobilizasyonunda da serbest enzime göre daha yüksek aktivite verimi elde edilebilme ihtimalinin varlığı bizi bu tez çalışmasına yönlendirdi. Yaptığımız tez çalışmasında SCI'nın c-MWCNT üzerine immobilizasyon koşulları ve immobilize SCI kullanılarak sükrözden invert şeker üretimi koşullarının optimizasyonu amaçlandı.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

Saccharomyces cerevisiae invertaz Bio-Cat firmasından hediye olarak temin edildi. UV-VIS Spektrometresi (VWR, UV-6300PC), pH metre Hanna Instruments (HI11310) Woonsocket, Rhode Island, saf su cihazı (MDM, Mini Pure 1, MDM-0170), MDM Co. Ltd. (Suwon-si, South Korea) firmasından, USA firmasından, magnetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard) Heidolph UK-Radleys (Shire Hill, UK) firmasından, hassas terazi (Shimadzu-ATX224) Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan) firmasından, orbital çalkalayıcılı ısıtmalı inkübatör (Mipro-MCI) Protek Lab Group; professional laboratory solutions company (Ankara, Turkey) firmasından, vakum pompası (Biobase, GM-0.50A) Biobase Biodustry Co. Ltd. (Shandong, China) firmasından, Bovin Serum Albumin (BSA), sodyum dihidrojen fosfat, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, sodyum sülfid, fenol ve D-glukoz Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) firmasından, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) Alfa Aesar (Kandel, Germany) firmasından, sodyum potasyum tartarat (Rochelle salt) VWR Prolabo Chemicals (Leuven Belgium) firmasından. Sodyum azid ve sükröz Merck Millipore (Darmstadt, Germany) firmasından, karbon nanotüpler (iç çapı 5-15 nm, dış çapı 28-48 nm, uzunluk 10-25 µm) Nanografi Co. Ltd. (Ankara, Türkiye) şirketinden temin edildi.

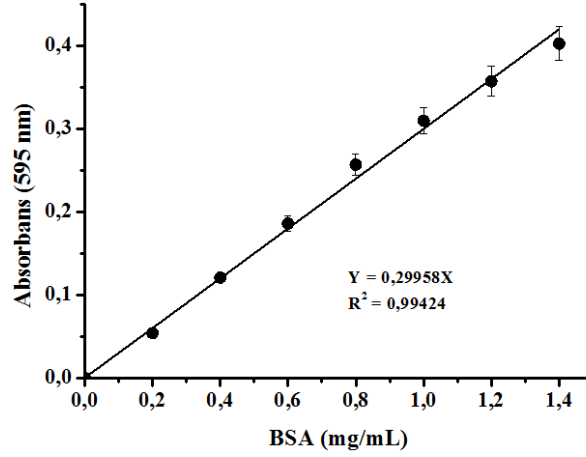
3.2. Metotlar

3.2.1. SCI'nin c-MWCNT'ler ile immobilizasyonu

Enzim immobilizasyonunda bağlanma verimini ve aktivite verimini etkileyen koşullar (immobilizasyon çözeltisinin pH'sı ve molaritesi, Martiks miktarı ve immobilizasyon süresi) sırasıyla değiştirilerek optimize edildi.

3.2.2. Protein (enzim) tayini

Protein derişimleri, Bradford (1976) metoduna göre, 0.25-1.4 mg/mL aralığındaki derişimlerde hazırlanan Bovine Serum Albümin standart çözeltilerinin çift ışık yollu UV spektrometresinde 595 nm dalga boyunda ölçülen absorbansları kullanılarak oluşturulan standart grafiğine (Şekil 3.1) ait doğru denklemine (3.1) göre hesaplandı.



Şekil 3.1. BSA standart grafiği

$$Y = 0.29958X \quad (3.1)$$

3.2.3. SCI aktivitesinin tayini

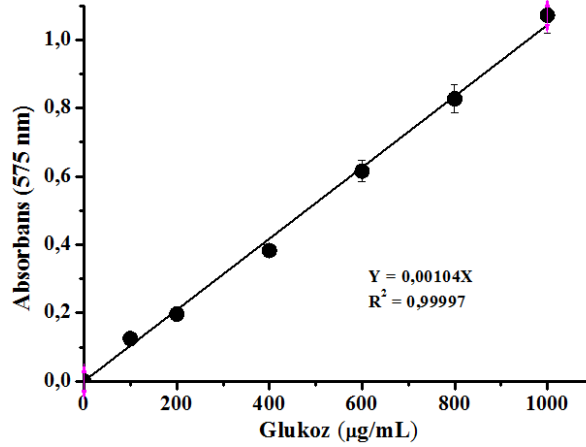
İnvertaz aktivitesi, 200 μ L serbest SCI ve 5 mL % 1 (w/v)'lik sükrözün standart koşullarda (pH 4.5; sıcaklık 55°C; süre 30 dakika ve çalkalama hızı 150 rpm) yapılan reaksiyonu ile tayin edildi. Oluşan indirgen şeker derişimleri Şekil 3.2'de görülmekte olan D-Glukoz derişimi Miller'in (1959) metoduna göre standart grafiğine ait doğru denkleminde (3.2) hesaplandı. Bir IU SCI aktivitesi, standart koşullarda, 5 mL % 1 (w/v)'lik sükröz çözeltisinde 1 dakikada 1 μ mol D-Glukoz oluşturan enzim miktarı (mg) olarak tanımlandı. SCI aktivitesi 3.3 eşitliğine göre hesaplandı.

$$Y = 0.00104X \quad (3.2)$$

$$\text{Aktivite } (\mu\text{mol/mg.dk}) = \frac{\text{İndirgen şeker } (\mu\text{mol})}{\text{Kullanılan enzim (mg) x reaksiyon süresi (dk)} \quad (3.3)$$

3.2.4. İmmobilizasyon ve aktivite verimlerinin hesaplanması

İmmobilizasyon immobilizasyon çözeltileri ve süzüntülerdeki enzim miktarları kullanılarak bağlanma ve aktivite verimleri Aslan ve Ömerosmanoğlu (2018)'nin metoduna göre sırasıyla Denklem (3.4) ve Denklem (3.5) kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.2. Glukoz standart grafiği

$$\text{İmmobilizasyon verimi (\%)} = \frac{(\text{İmmobilizasyonda kullanılan enzim} - \text{Süzüntüdeki enzim})}{\text{İmmobilizasyonda kullanılan enzim}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\text{Aktivite verimi (\%)} = \frac{\text{İmmobilize enzimin aktivitesi}}{\text{Sıvı enzimin aktivitesi}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.5. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu

3.2.5.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 200'er µL SCI çözeltileri ile 25'er mg c-MWCNT'lerin farklı pH'lardaki (4.0-4.5-5.0-5.5-6.0) 5 mL fosfat tamponları (25 mM) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi.

Aktiviteler, 200 µL serbest ve 0.235 g immobilize SCI'lerin 5 mL %(w/v) 1'lik sükröz çözeltileri (pH 4.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan glukoz miktarları kullanılarak hesaplandı.

3.2.5.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL SCI çözeltileri ile 25'er mg c-MWCNT'lerin, farklı derişimdeki 5 mL fosfat tamponları (pH 4.5) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi.

Aktiviteler, 200 µL serbest ve 235 mg immobilize SCI'lerin 5 mL % (w/v) 1'lik sükröz çözeltileri (pH 4.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

3.2.5.3. Martiks miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki 5'er mL 0.25 M'lık dört ayrı fosfat tampon çözeltilerine (pH 4,5) sırasıyla 25, 50, 75 ve 100 mg c-MWCNT ve 200'er µL (10.31 IU) enzim ilave edilerek, oda sıcaklığında 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 30 dakika süreyle yürütülen reaksiyonla gerçekleştirildi.

İmmobilizasyon sonunda, immobilize enzimler, por büyüklüğü 2 olan sinterli cam süzgeçler kullanılarak vakum altında süzülerek 3 defa 5'er mL 0.1 M'lık fosfat tamponu ile ve 3 defa da 5'er mL saf su ile yıkandıktan sonra immobilizasyon tamponunda ve süzüntülerde UV spektrometresi ile 595 nm'de absorbanslar ölçülerek protein miktarı tayin edildi. Protein miktarları kullanılarak Denklem (3.4)'e göre immobilizasyon verimleri hesaplandı.

Standart aktivite tayin metoduna göre tayin edilen serbest ve immobilize enzimlerin bağıl aktiviteleri kullanılarak da Denklem (3.5)'e göre aktivite verimleri hesaplandı.

3.2.6. Serbest ve İmmobilize SCI'nin karakterizasyonu

İmmobilize enzimin optimum pH ve sıcaklığı, V_{max} ve K_m sabitleri, pH kararlılığı, termal kararlılığı, kullanım kararlılığı ve saklama kararlılığı gibi kinetik özellikleri belirlenerek immobilize enzimin karakterizasyonu sağlandı.

3.2.6.1. Optimum pH

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde 200'er µL (10.31 IU) serbest ve 0.235 g (18.33 IU) immobilize enzimlerin 5'er mL 25 mM'lık farklı pH'lardaki (4.0-4.5-5.0-5.5-6.0-6.5-7.0-8.0) fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1 (w/v)'lik sükröz çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde

oda sıcaklığında 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edildi. Optimum pH aralığı, bağıl aktivite (%) - pH grafiğinden belirlendi.

3.2.6.2. Optimum sıcaklık

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde 200'er µL (10.31 IU) serbest ve 0.235 g (18.33 IU) immobilize enzimlerin 25mM fosfat tamponu (pH 4,5) ile hazırlanmış 5'er mL % 1 (w/v)'lik sükröz çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtılmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (30-40-45-50-55-60-65-70-80°C) 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağıl aktiviteler tayin edilerek, bağıl aktivite (%) - sıcaklık (°C) grafiğinden optimum sıcaklık aralığı belirlendi.

3.2.6.3. pH kararlılığı

200'er µL (10.31 IU) serbest ve 0.235 g (18.33 IU) immobilize SCI'ler 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'ları farklı (3.0-3.5-4.0-4.5-5.0-5.5-6.0-7.0-8.0) olan 1'er mL mL 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 150 rpm hızla çalkalayan ısıtılmalı orbital çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında (25°C), 20 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 100 mM'lık fosfat tamponu (pH 4.5) ile hazırlanmış 4 mL % 1.25 (w/v)'lik sükröz çözeltileri eklenerek 25°C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda, bağıl aktiviteler tayin edilerek, sıvı ve immobilize enzimin kararlı olduğu pH aralığı belirlendi.

3.2.6.4. Isıl kararlılık

200'er µL serbest (10.31 IU) ve 0.235 g (18.33 IU) immobilize SCI, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde pH'ları 4.5 olan 1 mL 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 150 rpm hızla çalkalayan ısıtılmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (30-40-45-50-55-60-65-70-80°C) 20 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 100 mM'lık fosfat tamponu (pH 4.5) ile hazırlanmış 4'er mL % 1.25 (w/v)'lik sükröz çözeltileri eklenerek 55°C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağıl aktiviteler tayin edilerek, sıvı ve immobilize enzimin kararlı olduğu sıcaklık (°C) aralığı belirlendi.

3.2.6.5. Kinetik sabitler

200'er μL serbest (10.31 IU) ve 0.235 g (18.33 IU) immobilize SCI başlangıç aktiviteleri, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'sı 4.5 olan 25 mM'lık fosfat tamponu ile hazırlanmış farklı derişimlerdeki (30-60-90-120-180-240-300 mM) 5'er mL sükröz çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 10 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda başlangıç hızları tayin edilerek, çizilen Lineweaver-Burk Grafiğine ait doğru denkleminde V_{\max} ve K_m sabitleri hesaplandı.

3.2.7. İmmobilize SCI'nın kullanım kararlılığı

İmmobilize enzimin kullanım kararlılığı, standart koşullarda peşpeşe 20 kez kullanımı sonunda tayin edilen bağıl aktiviteleri kullanılarak çizilen grafik ile belirlendi. İmmobilize enzim her kullanımdan sonra sinterli cam süzgeç ve nitroselüloz membran filtreler kullanılarak vakum altında tampon ve saf su ile yıkandı.

3.2.8. İmmobilize SCI'nın depolama kararlılığı

İmmobilize enzimin depolama kararlılığı, 20 gün boyunca iki günde bir, standart metoda göre tayin edilen bağıl aktiviteleri kullanılarak çizilen grafik ile saptandı. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra saf su ile yıkanarak 5 mL 0.25 M'lık fosfat tamponu çözeltisi içerisinde buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.

3.2.9. İmmobilize SCI kullanarak sükrözden invert şeker üretimi

Sükröz derişimi, immobilize SCI miktarı ve hidroliz süresi invert şeker üretiminde verimi etkilediğinden, bu parametreler sırayla değiştirilerek etkileri belirlendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Protein Tayini

Denklem (3.1)'e göre, 200 µL serbest SCI içeren 5.2 mL immobilizasyon çözeltisi içindeki SCI kütlesi 2.16 mg olarak hesaplandı. 1 g toz haldeki ticari enzim preparasyonundaki enzim miktarı ise 539.40 mg olarak hesaplandı.

4.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

Optimum aktivite analizi koşullarında 200 µL serbest SCI reaksiyonunun sonunda oluşan indirgen şeker miktarı D-glukoz standart grafiğine ait doğru denklemine (4.2) göre 9.028 µmol olarak bulunmuştur. Serbest SCI aktivitesi, denklem (3.3)'ten 10.31 IU/mg olarak hesaplandı. Aktivite verimimiz % 177.69 olduğundan 235 mg ıslak SCI'nin içerdiği aktivite ise 18.33 IU olarak hesaplandı. Ayrıca 1 g ticari toz SCI preparasyonu 539.40 mg SCI içerdiğinden, toz halinde SCI aktivitesinin substrat olarak sükröz için 2578.29 IU/g olduğu hesaplandı. 1 IU aktivitesine sahip olan serbest SCI miktarı da 4.78 IU/ mg olarak hesaplandı.

4.3. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

4.3.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Tabloya göre immobilizasyon tamponunun pH'sı 4.0 iken % 29.45 olan immobilizasyon veriminin pH 4.5'e çıkarıldığında % 94.77'e yükseldiği ve pH 6.0'a kadar kademeli olarak azaldığı görülmektedir.

Aktivite verimi pH 4.0'da % 98.31 iken pH 4.5'e çıkarıldığında % 141.85 olduğu görülmektedir. Daha yüksek pH değerlerinde ise aktivite veriminin kademeli olarak azaldığı görülmektedir. Genellikle immobilizasyon ve aktivite verimi enzimin optimum pH'sında daha yüksek çıkar. Dolayısıyla Tablo 4.1 sonuçlarımızın literatürdeki genel bilgiyle uyuşmakta olduğunu göstermektedir (Mansour ve ark., 2003).

Tablo 4.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon Tamponu pH'ı	İmmobilizasyon Verimi*(%)	Aktivite Verimi**(%)
4.0	29.45 ± 0.02	98.31 ± 0.02
4.5	94.77 ± 0.04	141.85 ± 0.04
5.0	84.92 ± 0.03	84.92 ± 0.02
5.5	71.04 ± 0.04	51.69 ± 0.02
6.0	55.11 ± 0.05	35.38 ± 0.05

*İmmobilizasyon, pH'sı 4.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL SCI çözeltileri ve 25'er mg c-MWCNT'lerin farklı pH'lardaki 5 mL sodyum fosfat tamponları (25 mM) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi.

**Aktiviteler, pH'sı 4.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200 µL serbest ve 235 mg immobilize SCI'lerin 5 mL % (w/v) 1'lik sükröz çözeltileri (pH 4.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

4.3.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Tablo 4.2'ye göre, immobilizasyon derişimi ile immobilizasyon veriminin doğru orantılı olarak arttığı görülmektedir. 25 mM'lık tampon derişiminde % 94.77 immobilizasyon verim alınırken 100 mM'lık tampon derişiminde % 100 immobilizasyon verimine ulaşılmıştır. Bunun nedeni Martiks miktarı arttıkça Martiks enzim bağlama kapasitesinin artmasıdır.

Aktivite verimi, yani birim kütledeki immobilize enzimden elde edilen en yüksek aktivite ise tampon derişimi ile ters orantılı olarak değişmektedir. 25 mM'da % 141.85 olan aktivite verimi 100 mM'da % 89.54'e düşmüştür. Bunun nedeni, tampon çözeltiler zayıf asit ve tuzdan oluştuğu için tuz derişimi arttıkça enzimin içerisindeki iyonik bağların koparak enzimin üç boyutlu yapısını değiştirmesi ve bu durumun da aktivite kaybına neden olmasıdır (Smalla ve ark., 1988). 25 mM'da enzimin tamamı immobilize olmamasına rağmen aktivite verimi en yüksek olduğundan optimum tampon derişiminin 25 mM olduğu görülmektedir.

Tablo 4.2. Immobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Tampon Derişimi (mM)	İmmobilizasyon Verimi*(%)	Aktivite Verimi**(%)
25	94.77 ± 0.04	141.85 ± 0.04
50	96.45 ± 0.03	105.85 ± 0.01
75	98.39 ± 0.01	99.38 ± 0.04
100	100.00 ± 0.04	89.54 ± 0.02

*İmmobilizasyon, 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200'er µL SCI çözeltileri ile 25'er mg c-MWCNT'lerin, farklı derişimdeki 5 mL fosfat tamponları (pH 4.5) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakikasüreye yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi

**Aktiviteler, 200 µL serbest ve 235 mg immobilize SCI'lerin 5 mL % (w/v) 1'lik süroz çözeltileri (pH 4.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

4.3.3. Martiks miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

c-MWCNT miktarının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi Tablo 4.3'te gösterilmiştir. 25 mg c-MWCNT kullanıldığında % 94.77 olan immobilizasyon verimi 50 mg'a çıkarıldığında %100 olmuştur ve artan miktarlarda da değişmeden %100 verim alındığı görülmüştür. Bu durum kullanılan enzimin tamamının immobilize olduğunun kanıtıdır. Aktivite verimine bakıldığında 25 mg c-MWCNT kullanıldığında %141.85 olan verimin, 50 mg c-MWCNT kullanıldığında % 177.69'a yükseldiği fakat artan miktarda c-MWCNT kullanıldığında ise aktivite veriminin düştüğü görülmektedir. Bu durum c-MWCNT miktarının artmasıyla enzimin martiks üzerindeki fonksiyonel

Tablo 4.3. c-MWCNT miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

c-MWCNT (mg)	İmmobilizasyon Verimi*(%)	Aktivite Verimi**(%)
25	94.77 ± 0.04	141.85 ± 0.04
50	100.00 ± 0.03	177.69 ± 0.03
75	100.00 ± 0.01	161.38 ± 0.04
100	100.00 ± 0.02	105.23 ± 0.01

*İmmobilizasyon, 200 uL SCI'ler ile farklı miktardaki c-MWCNT'lerin, 5 mL 0.250 M'lık sodyum fosfat tamponları (pH 4.5) içinde bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi.

**Aktiviteler, pH'sı 4.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 200 µL serbest ve 235 mg immobilize SCI'lerin 5 mL % (w/v) 1'lik süroz çözeltileri (pH 4.5) ile bir inkübatörde 55 °C'de 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

karboksil gruplarına daha sıkı bağlandığı ve dolayısıyla enzimin üç boyutlu yapısını değiştirmesi ve aktivitesini düşürmesi ile açıklanabilir.

İmmobilizasyon etkinliğine etki eden koşulların optimizasyonu sonucunda % 100 immobilizasyon ve % 177.69 aktivite verimi elde edildi. SCI'nın immobilizasyonu ile ilgili literatürde yer alan çalışmalar arasında elde edilen en yüksek aktivite verimi, Mansour ve Dawoud (2003)'ün, SCI'yı celite üzerine immobilizasyonunda elde ettikleri % 92'lik verimdir. Diğer çalışmalarda elde edilen aktivite verimleri ise daha düşüktür. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında elde ettiğimiz % 177.69 aktivite verimi bugüne kadar elde edilen en iyi sonuçtur.

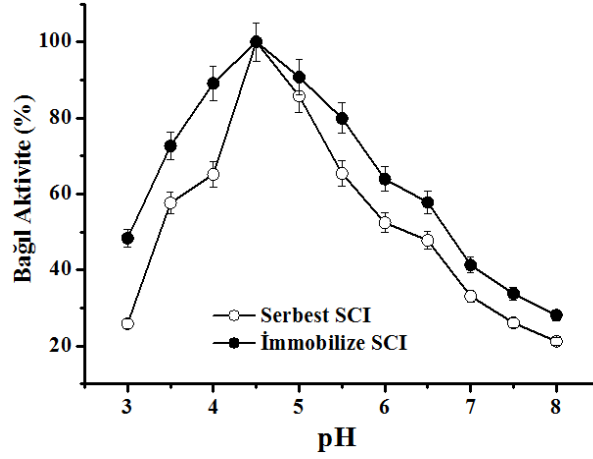
4.4. Serbest ve İmmobilize SCI'nın Karakterizasyonu

4.4.1. Optimum pH

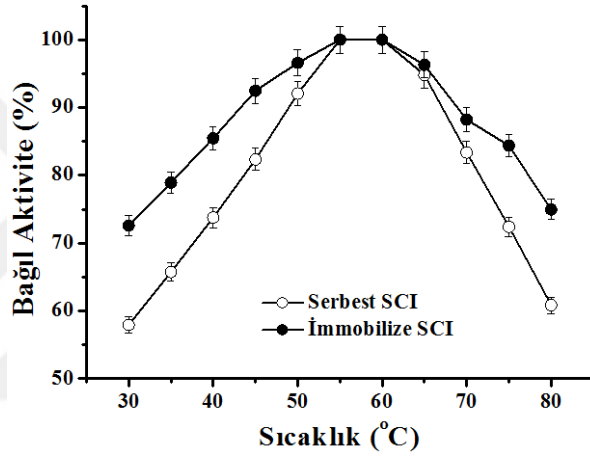
Şekil 4.3'e göre SCI'nın optimum pH'ı immobilizasyondan etkilenmemiştir. Elde edilen bu sonucun, SCI'nın immobilizasyonu ile ilgili literatürde yer alan bazı çalışmalardaki bulgularla kısmen örtüştüğü görülmektedir. Tanrıseven ve ark., (2013), poliakrilamid kriyogel içerisine immobilize ettikleri SCI'nın optimum pH'sının serbest halde 4.5 iken immobilize hale getirildiğinde 5.0 olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın Hertz ve ark. (2013) ise kitosan nanopartikülleri üzerine immobilize ettikleri SCI'nın serbest ve immobilize haldeki optimum pH'nın değişmediğini belirtmişlerdir. Ayrıca şekil 4.3'te dikkat çeken bir diğer sonuç ise SCI'nın denenen bütün pH aralığında suda çözülmüş SCI'dan daha yüksek aktivite gösterdiğiidir.

4.4.2. Optimum sıcaklık

Şekil 4.2'de optimum sıcaklığın (55 °C) immobilizasyondan etkilenmediği görülmektedir. Arıca ve ark. (2003), 2-hidroksietilden oluşan reaktif bir filme invertazın kovalent immobilizasyonu sonucunda immobilize edilmiş invertazın optimum sıcaklığının 5 °C arttığını belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada Mahmoud (2007), ahşap talaş atıklarını kullanarak adsorpsiyon yöntemiyle immobilize ettiği invertazın optimum sıcaklığını (60 °C) koruduğunu belirtmiştir. Şekil 4.2'ye göre ayrıca



Şekil 4.1. SCI'nin aktivitesine pH'nın etkisi

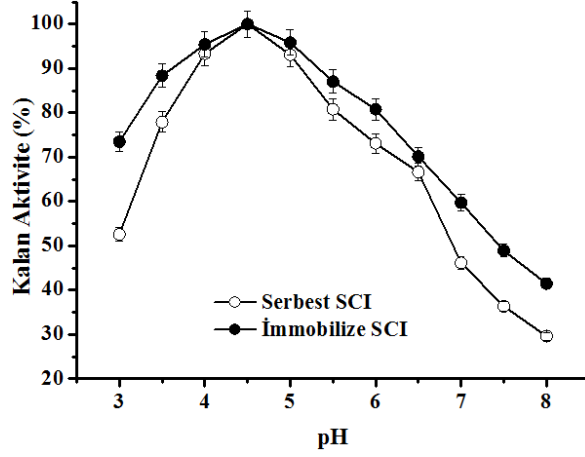


Şekil 4.2. SCI'nin aktivitesine sıcaklığın etkisi

immobilize enzimin denenen bütün sıcaklık aralığında serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. Literatürde, immobilizasyonun enzimin ısıl kararlılığını arttırdığından dolayı yüksek sıcaklıklarda immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre yüksek aktivite gösterdiği bilgisi de grafikteki sonucu pekiştirmektedir (Mansour ve ark., 2003).

4.4.3. pH kararlılığı

Şekil 4.3'te, incelenen tüm pH değerlerinde (3.0-8.0) immobilize enzimin serbest enzimden daha kararlı olduğu ve optimum pH'da (4.5) en yüksek kararlılığa sahip olduğu görülmektedir. Mansour ve Dawoud (2003), celite ve poliakrilamid üzerine adsorpsiyon yöntemiyle SCI enzimini immobilize ettikleri çalışmalarında,



Şekil 4.3. SCI'nin kararlılığına pH'nin etkisi

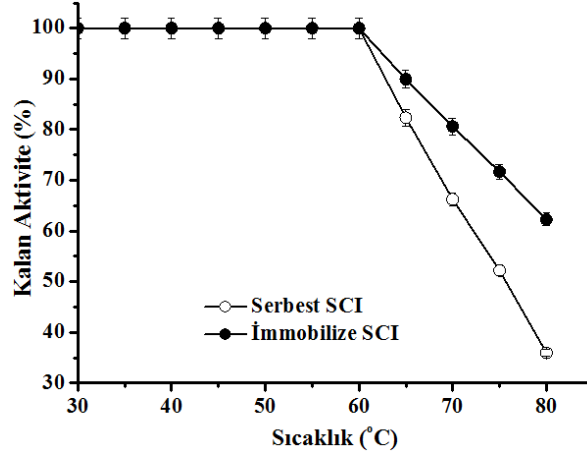
serbest enzimin 4.0 ila 5.5 pH değerinde kararlılık gösterirken, immobilize enzimin ise 4.0 ile 6.5 pH değerleri arasında kararlılık gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Bir başka çalışmada, kalsiyum alginat jel kapsüller içerisine immobilize edilen SCI'nin pH kararlılığı, elde ettiğimiz sonuca paralel olarak bulunmuştur. Tarriseven ve ark (2001), serbest ve immobilize enzimin optimum pH'da (4.5) en yüksek kararlılığa ulaştığını, incelenen tüm pH değerlerinde immobilize enzimin serbest enzimden daha kararlı olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca şekil 4.5'te serbest ve immobilize enzimin asidik pH'larda alkaline pH'lara oranla daha yüksek kararlılığa sahip olduğu görülmektedir.

4.4.4. Isıl kararlılığı

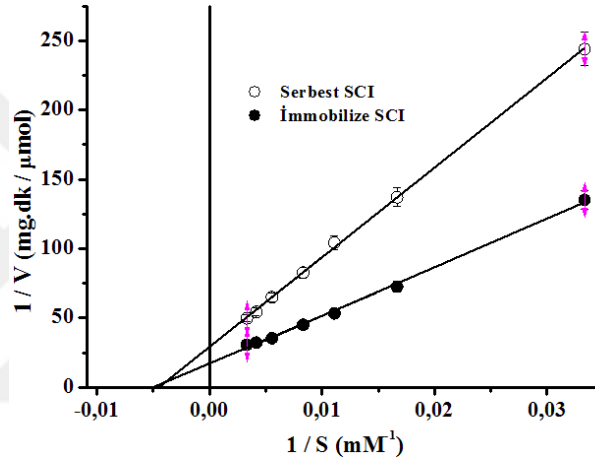
Şekil 4.4 sıcaklığın serbest ve immobilize SCI'nin kararlılığına etkisini göstermektedir. Şekilde, 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda immobilize enzimin serbest enzime göre daha kararlı yapıda olduğu görülmektedir. 80 °C'de serbest enzim aktivitesinin % 65'ini kaybetmişken immobilize enzim aktivitesinin % 60'dan fazlasını korumakta olduğu görülmektedir.

4.4.5. Kinetik sabitler

Serbest ve immobilize enzimin Michaelis-Menten (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) sabitleri Lineweaver-Burk Grafiği (Şekil 4.5) kullanılarak hesaplandı. İmmobilizasyon, K_m sabitinin değerini 215.5 mM'dan 140.9 mM'a düşürürken, V_{max} değerini 0.0339



Şekil 4.4. SCI'nin kararlılığına sıcaklığın etkisi



Şekil 4.5. Serbest ve immobilize SCI'nin Lineweaver-Burk grafiği

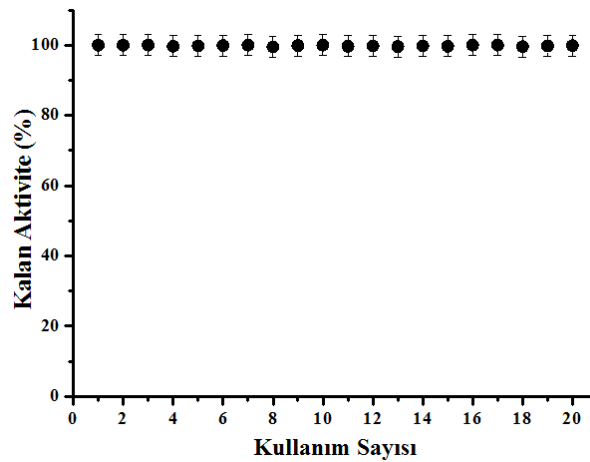
$\mu\text{mol/mg.dk}$ 'dan $0.0481 \mu\text{mol/mg.dk}$ 'ya yükseltmiştir. K_m değeri, bir enzimin substrata olan ilgisini göstermektedir. K_m küçüldükçe enzimin substratına olan ilgisi artar. İmmobilize SCI'nin K_m değerinin serbest enziminkinden küçük, V_{max} değerinin ise büyük olması, immobilize enzimin serbest enzimden % 77.69 daha yüksek aktiviteye sahip olması ile birbirini desteklemektedir. Benzer sonuçlara literatürde de rastlanmaktadır. Tanrıseven ve ark. (2008), invert şeker üretmek için SCI enzimini poli (3-metiltienil metakrilat)/poli (3-tiofenasetik) Martiksine kovalent olarak immobilize ettikleri çalışmada da immobilizasyon enzimin K_m değerini azaltmıştır.

4.5. İmmobilize SCI'nın Kullanım Kararlılığı

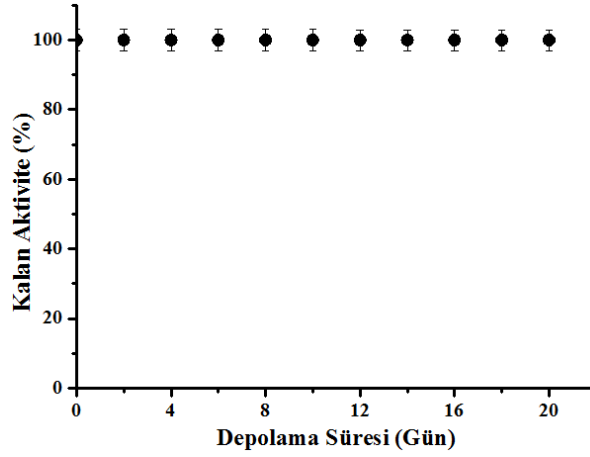
Şekil 4.6'da, immobilize enzimin optimum koşullarda peş peşe tekrarlanan yirmi kullanım süresince aktivitesini kaybetmediği görülmektedir. Literatürde yer alan Mansour ve ark. (2003) da yaptıkları çalışmada poliakrilamid üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize ettikleri SCI enziminin 20 kez kullanımda hala aktivitesini yitirmediğini belirtmişlerdir.

4.6. İmmobilize SCI'nın Depolama Kararlılığı

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, immobilize enzim optimum depolama koşullarında yirmi gün boyunca aktivitesini kaybetmediğinden, immobilize SCI'nın yüksek bir depolama kararlılığına sahip olduğu söylenebilir. İmmobilize enzimlerin endüstride teknolojik faydalarının değerlendirilmesinde en önemli parametrelerden biri depolama kararlılığıdır. Benzer sonuçlara literatürde de rastlanmaktadır (Boncel ve ark., 2016; Garlet ve ark., 2014). İmmobilizasyon sırasında enzimlerin veya proteinlerin denatürasyonunun gerçekleşmesine rağmen, CNT'ler enzimleri yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücülerde konvansiyonel düz yüzeyli desteklerden daha fazla stabilize edebilirler (Asuri ve ark., 2006a; Asuri ve ark., 2006b). CNT'lerin yüksek kıvrımlı yüzeylerinin sert koşullarda enzim denatürasyonu için elverişli olmadığı ve bitişik adsorbe edilmiş enzimler arasındaki yanıl etkileşimleri bastırdığı varsayılmıştır. CNT'lerin artan kıvrımlı yüzeyleri, muhtemelen hareketsizleştirilmiş protein molekülleri arasındaki zararlı etkileşimlerin azalmasına katkıda bulunabilir, bu da CNT'lerde düz yüzeylerdekine kıyasla artan enzim stabilitesine yol açar.



Şekil 4.6. İmmobilize SCI'nın kullanım kararlılığı



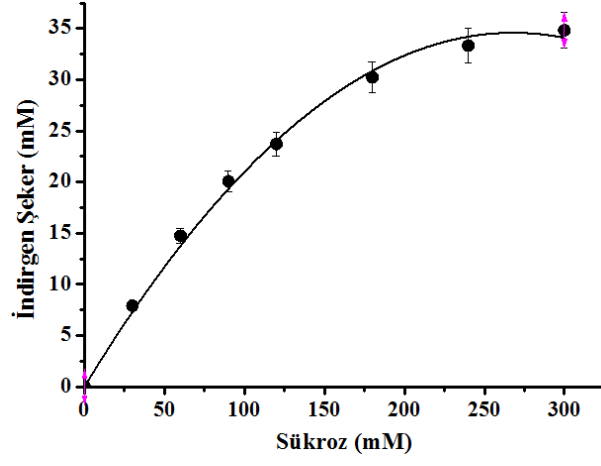
Şekil 4.7. İmmobilize SCI'nın depolama kararlılığı

4.7. Sükrozdan İvert Şeker Üretimi

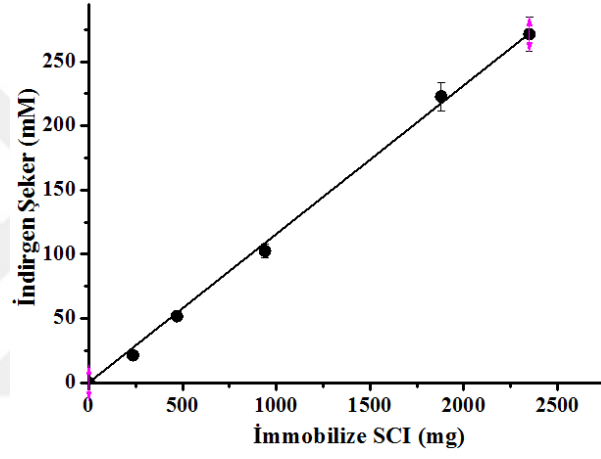
Şekil 4.8'e göre sükroz derişimi arttıkça oluşan indirgen şeker derişimi de artmaktadır. En yüksek indirgen şeker üretimi 300 mM'da elde edildiğinden bir sonraki aşamada sükroz derişimi 300 mM olarak kullanılmıştır.

Şekil 4.9'da ise, 300 mM'lık sükroz çözeltisinde immobilize SCI miktarı arttıkça üretilen indirgen şeker miktarının da doğrusal olarak arttığı görülmektedir. Oluşan sükroz derişimi, immobilize SCI miktarı ile 2350 mg'a kadar doğrusal olarak artarak sabitlendiğinden bir sonraki aşamada optimum immobilize SCI miktarı 2350 mg olarak kullanıldı.

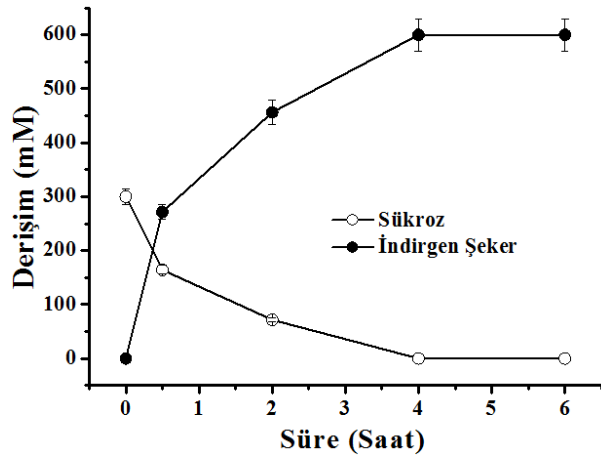
Şekil 4.10'da indirgen şeker üretimi üzerine hidroliz süresinin etkisi görülmektedir. 2350 mg immobilize enzim kullanarak 300 mM'lık sükroz ile reaksiyona koyarak 6 saat boyunca belirli aralıklarla indirgen şeker miktarı tayin edildi. Şekilde görüldüğü gibi, başlangıçta 300 mM olan sukroz derişimi, 4 saat sonra sıfıra inmiştir. Aynı süre içerisinde sükrozun tamamının indirgen şeker olan invert şekere (glukoz ve fruktoz) dönüştüğü görülmektedir. 1 mol sükrozdan 1 mol glukoz ve 1 mol fruktoz oluştuğundan, indirgen şekerin molaritesi sükrozun molaritesinin iki katı olacaktır. Dolayısıyla 300 mM sukrozdan 600 mM indirgen şeker elde edilmiştir. Yani 300 mM glukoz ve 300 mM fruktoz elde edilmiştir.



Şekil 4.8. İnvirt şeker üretimine sükröz derişiminin etkisi



Şekil 4.9. İnvirt şeker üretimine immobilize SCI miktarının etkisi



Şekil 4.10. İnvirt şeker üretimine hidroliz sürenin etkisi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

SCI immobilizasyon koşullarını optimize ederek en yüksek immobilizasyon verimi (% 100) ve aktivite (% 177.69) verimi ile immobilize edilmiştir.

İmmobilizasyon, enzimin optimum pH'ı (4.5) ve optimum sıcaklığı (55 °C) değiştirmemiştir.

İmmobilizasyon, K_m sabitinin değerini 215.5 mM'dan 140.9 mM'a düşürürken, V_{max} değerini 0.0339 $\mu\text{mol} / \text{mg.dk}$ 'dan 0.0481 $\mu\text{mol} / \text{mg.dk}$ 'ya yükseltmiştir.

İmmobilize enzim, optimum koşullarda yirmi kez tekrarlanan kullanım süresince ve yirmi gün depolama süresince aktivitesini kaybetmemiş, yüksek bir kullanım ve depolama kararlılığı göstermiştir.

Sükroz, 4 saat sonunda tamamen hidrolize olarak invert şekere dönüşmüştür.

5.2. Öneriler

Öncelikle, bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar kamuoyu ile paylaşılabilir.

Ayrıca, SCI için geliştirilen immobilizasyon metoduna ve c-MWCNT üzerine immobilize SCI kullanarak sükrozdan invert şeker üretimi için geliştirilen metoda, ayrı ayrı patent başvurusu yapılabilir.

Son olarak, ülkemizde şeker üreten büyük firmalarla görüşülerek, invert şekerin endüstriyel üretiminin gerçekleştirilmesine çalışılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Akgöl, S., Kaçar, Y., Denizli, A., Arıca, M.Y., 2001. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chemistry*, 74, 281–288.
- Asuri, P., Karajanagi, S.S., Yang, H., Yim, T.J., Kane, R.S., Dordick, J.S., 2006a. Increasing protein stability through control of the nanoscale environment, *Langmuir*, 22 (13), 5833-5836.
- Asuri, P., Karajanagi, S.S., Yang, H., Yim, T.J., Kane, R.S., Dordick, J.S., 2006b. Water-soluble carbon nanotube-enzyme conjugates as functional biocatalytic formulations, *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 804–11.
- Aslan, Y., 2005. Pectinex Ultra SP-L'nin İmmobilizasyonu ve Prebiyotik Üretiminde Kullanımı, Doktora Tezi, *Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü*, Gebze, 3-8.
- Aslan, Y., and Ömerosmanoğlu, D. 2018. Covalent immobilization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Turkish Journal of Biochemistry*, 43 (6), 595-604.
- Azevedo, R.A.M., 2014. Immobilization of peroxidase on functionalized carbon nanotubes for synthesis of biocatalysts with high performance, M.Sc. Dissertation, *Porto University, Faculty of Engineering*, 1-123.
- Bayramoğlu, G., Akgöl, S., Bulut, A., Denizli, A., Arıca, M.Y., 2003. Covalent immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system, *Biochemical Engineering Journal*, 14, 117–126.
- Birnbaum, S., 1993. Immobilisation of Macromolecules and Cells, In: Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D., Sara, M. (Eds.), *Immobilized macromolecules: Application potentials*, Springer-Verlag London, New York, 23-25.
- Blandino, A., Macias, M., Cantero, D., 2000. Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 319-24.
- Boncel, S., and Herman, A. P., 2016. Nitrile N-Oxides in programmable one-pot functionalization of multi-wall carbon nanotubes via 1,3-dipolar cycloaddition, *RSC Advances*, 68, 64129-64132.
- Chui, W.K., and Wan, L.S.C., 1997. Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium Alginate microspheres, *Journal of Microencapsulation*, 14(1), 51-61.
- David, A. E., Wang, N. S., Yang, N. S., A.J. Yang, J., 2006. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes, *Journal of Biotechnology*, 125, 395–407.
- Doğan, Ş., 2000. İmmobilize İvertaz Kullanarak İvert Şeker Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, *Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü*, Gebze, 7-9.
- Dutra, R. F., Mendes, R.K., Ferreira, D.C.M., Menezes, C.E.L., Soares, E.C.L., Cabral, D.G.A., Trindade, E.K.G., Rodriguez, B.A.K., 2015. *Nanomaterials for Advancing the Health Immunosensor*. In: Biosensors - Micro and Nanoscale Applications, edited by T. Rinken. London, IntechOpen, 347-373.
- Feng, W., and Ji, P., 2015. Enzymes immobilized on carbon nanotubes, *Biotechnology advances*, 29, 889–895.

- Garlet, T.B., Weber, C.T., Klaic, R., Foletto, E.L., Jahn, S.L., Mazutti, M.A., Kuhn, R.C., 2014. Carbon Nanotubes as Supports for Inulinase Immobilization, *Molecules*, 19, 14615-14624.
- Griffin, E.G., and Nelson, M.J., 1916. Adsorption of invertase, *Journal of the American Chemical Society*, 38 (5), 1109–1115.
- Hertz, F.P., Rodrigues, C.R., Klein, P.M., Alvas S.J., Valerio, G.S., 2013. High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, 92, 462-468.
- Hayashi, S., Sasao, S., Takasaki, Y., Mada, K., 1994. Long-term continuous reaction of immobilized β -fructofuranosidase, *Biotechnology Letters*, 16(3), 227-8.
- Jamie, A., Alshami, A.S., Maliabari, Z.O., Ateih, M.A., Al Hamouz, O.C.S., 2016. Immobilization and enhanced catalytic activity of lipase on modified MWCNT for Oily Wastewater treatment. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 35(5), 1-9.
- Kang, E.T., Chen, Y., Neoh, K.G., Tan, K.L., 2000. Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid, *European Polymer Journal*, 36, 2095-2103.
- Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M., 2000. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10: 157–176.
- Klibanov A.M., 1979. Enzyme stabilization by immobilization, *Analytical Biochemistry*, 93, 1–25.
- Mansour, H.E., and Dawoud, M.F., 2003. Immobilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absorption procedure, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 446-450.
- Mazi, H., Emregül, E., Rzaev, Z.M.O., Kibarer, G., 2006. Preparation and properties of invertase immobilized on a poly(maleic anhydride-hexen-1) membrane, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17 (7), 821-835.
- Milovanovic, N., and Bozic, Z.V., 2007. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads, *Food Chemistry*, 104, 81–86.
- O'Driscoll K.F., 1976. Techniques of enzyme entrapment in gels. In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, XLIV, 169–183.
- Prlainović, N.Ž., Bezbradica, D.I., Knežević-Jugović, Z.D., Stevanović, S.I., Ivić, M.L. A., Uskoković, P. S., Mijin, D.Ž., 2013. Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on multi walled carbon nanotubes, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(1), 279-285.
- Rashad, M.M.N., Mohamed, U., Abdou, H.M., 2006. Purification and characterization of extra and intracellular beta-fructofuranosidase from *Saccharomyces cerevisiae* growing on *Eichhornia crassipes* leaf extract, *Advances in Food Sciences*, 33, 79–89.
- Rastian, Z., Khodadadadi, A.A., Vahabzade, F., Mortazavi, Y., 2013. Functionalization of multi -walled carbon nanotubes for lipase immobilization. *The Journal of Macro Trends in Technology and Innovation*, 1(1), 65-71.
- Rastian, Z., Khodadadadi, A.A., Vahabzade, F., Bortolini, C., Dong, M., Mortazavi, Y., Mogharei, A., Naseh, M.V., Guo, Z., 2014. Facile surface functionalization of multiwalled carbon nanotubes by soft dielectric barrier discharge plasma: Generate

- compatible interface for lipase immobilization, *Biochemical Engineering Journal*, 90, 16–26.
- Shankar, V., and Kotwal, S.M., 2009. Immobilized invertase, *Biotechnology Advances*, 27, 311-322.
- Smalla, K., Turkova, J., Coupek, J., Hermann, P., 1988. Influence of salts on the covalent immobilization of proteins to modified copolymers of 2-Hydroxyethyl methacrylate with ethylene dimethacrylate, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10(1), 21-31.
- Stamatis, H., Gournis, D., Enotiadis, A., Tsoufis, T., Pavlidis, V., 2010. Functionalized Multi Wall Carbon Nanotubes for Lipase Immobilization, *Advanced Biomaterials*, 12, 5.
- Sugunan, J., and Sangay, G., 2006. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10, *Food Chemistry*, 94, 573-579.
- Tanrıseven, A., and Doğan, Ş., 2001. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules, *Process Biochemistry*, 36, 1081-1083.
- Tanrıseven, A., Yılmaz, F., Günaydın, O., Dizge, N., 2001. immobilization of invertase onto poly (3-methylthienyl methacrylate)/poly (3-thiopheneacetic) matrix, *Biochemical Engineering Journal*, 40, 64-71.
- Tanrıseven, A., Yılmaz, F., Sahin, M., Z., Ozmen, M., M., Olcer, Z., 2013. Highly efficient method towards in situ immobilization of invertase using Cryogelation, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171:2142-2152.
- Tanrıseven, A., Dizge, N., Günaydın, O., Yılmaz, F., 2008. Immobilization of invertase onto poly(3-methylthienyl methacrylate)/poly(3-thiopheneacetic acid) matrix, *Biochemical Engineering Journal*, 40, 64-71.
- Toppare, L., Alkan, S., Işık, S., 2003. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices, *European Polymer Journal*, 39, 2375-2381.
- Vitolo, M., Arruda, L. M. O., 1999. Characterization of Invertase entrapped into calcium alginate beads, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 81, 23-33.
- Wang, Q., Zhou, L., Jiang, Y., Gao, J., 2011. Improved stability of the carbon nanotubes-enzyme bioconjugates by biomimetic silicification, *Enzyme and Microbial Technology*, 49, 11-16.
- Weiser, D., 2015. Nanostructured systems for enzyme immobilization, PhD dissertation, *University of Budapest, Institute of Organic Chemistry and Technology*, Budapest, 3-4.
- Yellampalli, S., 2011. Carbon Nanotubes-Polymer Nanocomposites, *InTech*, Croatia, 1-410.
- Zniszczoł, A., Herman, A.P., Szymanska, K., Mrowiec-Białon, J., and Krzysztof, Z. Walczak, Andrzej J., Sławomir B., 2016. Covalently immobilized lipase on aminoalkyl-, carboxy- and hydroxy-multi-wall carbon nanotubes in the enantioselective synthesis of Solketal, *Enzyme and Microbial Technology*, 87-88, 61–69.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Merve AKALAN
Doğum Yeri ve Tarihi : Batman- 15.06.1990
Telefon : +90 506 488 09 65
E-posta : merveakalan@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Batman Fatih Lisesi	2007
Üniversite	: Mersin Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	: Siirt Üniversitesi	2019

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2014-2017	Boran Unlu Mamuller	Gıda Müh.
2013-2014	Kılıç Bey Gıda	Gıda Müh.

YABANCI DİLLER

İngilizce, Arapça.

PROJELER

1. Aslan Y. (Yürütücü), Akalan M. (Araştırmacı), *Saccharomyces cerevisiae* invertazın karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp üzerine immobilizasyonu, 2018, BAP Projesi. Proje No:2018-SİÜFEB-076 Bütçe: 6.000.000 TL (Tamamlandı).