

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Cu (II) BAĞLI POLİ (HEMA-MAH) MİKROKÜRELER ÜZERİNE
 α - AMİLAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU,
OPTİMİZASYONU VE KİNETİK PARAMETRELERİNİN
İNCELENMESİ

Ayşegül AYL A

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Haziran 2011

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Ayşegül AYLA tarafından yapılan “Cu (II) Bağlı Poli (HEMA-MAH) Mikroküreler Üzerine α - Amilaz Enziminin İmmobilizasyonu, Optimizasyonu ve Kinetik Parametrelerinin İncelenmesi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. M.Çetin AYTEKİN

Üye : Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL (Danışman)

Üye : Doç. Dr. Fikret UYAR

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 23/06/2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

/ /2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalıőmanın gerçekleşmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen, gösterdiği ilgi ve emek ile çalıőmanın sonuca ulaőmasını sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Zübeyde Baysal' a teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarımda yakın ilgisini gördüğüm, bilgi ve tecbelerinden faydalandığım Biyokimya Anabilim Dalı Baőkanı Prof. Dr. M. etin Aytekin' e teşekkür ederim.

Hacettepe niversitesi' nin olanaklarından faydalanmamı sağlayan Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü ğretim yesi Prof. Dr. Adil Denizli ve Biyokimya alıőma grubuna teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarım süresince bilgisini benimle paylaőan Arő. Gör. Dr. Murat Yavuz' a teşekkür ederim.

Çalıőmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Aynur avuő' a ve diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu alıőmaya DÜBAP-09-FF-66 no' lu araştırma projesi olarak maddi destek veren DÜBAP' a teşekkür ederim.

Her türlü maddi ve manevi özveride bulunarak, beni her konuda destekleyen sevgili aileme, sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
ÇİZELGE LİSTESİ	VIII
ŞEKİL LİSTESİ	IX
EK LİSTESİ	XI
KISALTMA VE SİMGELER	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. İmmobilizasyon.....	1
1.2. Enzim İmmobilizasyonu.....	3
1.3. α - Amilaz.....	4
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Enzimler.....	5
2.1.1. Enzimatik Reaksiyonları Etkileyen Faktörler.....	6
2.2. İmmobilizasyon Yöntemi.....	7
2.2.1. İmmobilizasyonun Tarihçesi.....	7
2.2.2. Enzim İmmobilizasyonu.....	8
2.2.3. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları.....	9
2.2.4. Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri.....	10
2.2.4.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemi.....	11
-İyonik Bağlanma Yöntemi.....	11
-Kovalent Bağlanma Yöntemi.....	12
-Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi.....	13

2.2.4.2. Çapraz Bağlanma Yöntemi.....	14
2.2.4.3. Tutuklama Yöntemi	15
-Jel Tutuklama Yöntemi.....	16
-Fiber Tutuklama Yöntemi.....	16
-Mikrokapsülleme Yöntemi.....	17
-Lipozom Tipi Tutuklama Yöntemi.....	17
-Membran Tipi Tutuklama Yöntemi.....	17
2.2.5. Uygun İmmobilizasyon Desteğinin Seçimi.....	18
2.2.6. İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Materyaller.....	19
2.3. Polimerler.....	21
2.3.1. Eş Boyutlu Partiküller.....	21
2.3.1.1. Emülsiyon Polimerizasyonu.....	22
2.3.1.2. Dispersiyon Polimerizasyonu.....	22
2.3.1.3. Çöktürme Polimerizasyonu.....	23
2.3.1.4. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu.....	23
2.4. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi.....	23
2.5. α - Amilazın Özellikleri.....	25
2.5.1. α - Amilazın Etki Mekanizması.....	27
2.5.2. α - Amilazların Endüstriyel Kullanım Alanları.....	30
2.5.2.1. α - Amilazların Ekmekçilikte Kullanımı.....	31
2.5.2.2. α - Amilazların Nişastayı Sıvılaştırmada ve Şekerlemede Kullanımı.....	31
2.5.2.3. α - Amilazların Deterjan Sanayinde Kullanımı.....	31
2.5.2.4. α - Amilazın Tıp ve Klinik Kimyada Kullanımı	31
2.5.2.5. α - Amilazın Tekstil Sanayinde Kullanımı.....	32
2.6. Önceki Çalışmalar.....	32

3. MATERİYAL VE METOT	37
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	37
3.2. Kullanılan Cihazlar	37
3.3. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması	37
3.4. Tampon Çözeltiler	37
3.5. MAH Sentezi	37
3.5.1. P(HEMA-MAH) Mikrokürelerinin Hazırlanması	38
3.6. Şişme Testi	39
3.7. Yüzey Morfolojisi Deneyi	39
3.8. P(HEMA-MAH) Mikroküreler Üzerine Cu(II) Bağlanması	40
3.9. α - Amilaz Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları	40
3.10. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivite Tayini	41
3.11. Standart Maltoz Eğrisi	41
3.12. pH ve Sıcaklığın Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi	41
3.13. Serbest Enzimin Özelliklerinin Belirlenmesi.....	42
3.13.1. Optimum pH' ın Belirlenmesi.....	42
3.13.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....	42
3.14. İmmobilize Enzimin Özelliklerinin Belirlenmesi	42
3.14.1. Optimum pH' ın Belirlenmesi	42
3.14.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	42
3.15. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	42
3.16. Tekrar Kullanılabilirlik	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1. Şişme Deneyi	45
4.2. Yüzey Morfolojisi	45
4.3. Standart Maltoz Eğrisinin Belirlenmesi	46

4.4. pH' nin Enzim Adsorpsiyonu Üzerine Etkisi	47
4.5. Sıcaklığın Enzim Adsorpsiyonu Üzerine Etkisi	48
4.6. Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine pH' nin Etkisi	50
4.7. Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	51
4.8. İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine pH' nin Etkisi	52
4.9. İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	53
4.10. α - Amilaz İçin Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	54
4.11. Tekrar Kullanılabilirliğin Belirlenmesi	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
6. KAYNAKLAR	65
EKLER	77
ÖZGEÇMİŞ	79

ÖZET

Cu (II) BAĞLI POLİ (HEMA-MAH) MİKROKÜRELER ÜZERİNE α - AMİLAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU, OPTİMİZASYONU VE KİNETİK PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül AYLA

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2011

Son yıllarda enzimlerin ve biyolojik bileşiklerin immobilizasyonu gıda, ilaç sanayi ve biyomedikal uygulamalarda giderek önem kazanmaktadır. Bu enzimlerden biri olan α -amilaz önemli biyoteknolojik enzimler arasındadır. Amilazlar besin, deterjan ve tekstil sanayiinde nişastanın hidrolizi için kullanılmaktadır.

Bu çalışmada α -amilaz mikroküreler üzerine immobilize edildi. Bu amaçla Cu(II) bağlı poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-L-histidin metil ester) [P(HEMA-MAH)-Cu(II)] mikroküreler hazırlandı. MAH, Hacettepe Üniv. Fen Fak. Kimya Bölümü, Biyokimya Ana Bilim Dalı' nda Prof. Dr. Adil Denizli ve çalışma grubu tarafından metakriloil klorür ve L-histidin metil esterden sentezlendi. Hazırlanan p(HEMA-MAH)-Cu(II) mikrokürelerin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile analiz edildi. Ayrıca su tutma kapasitesi belirlendi.

Enzim immobilizasyonu için α -amilaz p(HEMA-MAH)-Cu(II) mikrokürelere immobilize edildi. pH ve sıcaklığın enzim immobilizasyonu üzerine etkisi incelenerek maksimum amilaz immobilizasyonu pH 6.0 ve 25 °C' de bulundu. Immobilize enzimin optimum pH ve sıcaklığı pH 6.0 ve 30 °C olarak belirlendi. Immobilize enzimin kinetik parametreleri (K_m , V_{max}) hesaplanarak serbest enzimin kinetik parametreleri ile karşılaştırıldı. Immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği de araştırıldı.

Elde edilen sonuçlar p(HEMA-MAH)-Cu(II) mikrokürelerin α -amilaz immobilizasyonu için uygun olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: α - amilaz, p(HEMA-MAH)-Cu(II), mikroküre, enzim immobilizasyonu

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF α - AMYLASE ONTO POLY (HEMA-MAH)-Cu(II) MICROBEADS, OPTIMIZATION AND DETERMINATION OF KINETIC PARAMETERS

MSc THESIS

Ayşegül AYLA

UNIVERSITY OF DICLE
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

2011

In recent years immobilization of enzymes and biological compounds is gaining importance due to its wide variety of applications in the food and drug industries and biomedical applications. One of the these enzymes, α -amylase is important between biotechnological enzymes. Amylases are used food, detergent, textile industry for hydrolysing of starch.

In this study α -amylase was immobilized onto microbeads. For this aim Cu(II) attached poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-methacryloyl amido histidine)[P(HEMA-MAH)-Cu(II)] microbeads were prepared. MAH was synthesized using methacryloyl chloride and L-histidine methyl ester by Hacettepe University Faculty of Science Dept. of Biochemistry Prof.Dr. Adil Denizli's group. L-histidine groups of the p(HEMA-MAH) were then chelated with Cu^{2+} ions. Morphological properties of the microbeads were determined by using scanning electron microscopy. Water uptake studies were also determined.

In the enzyme immobilization, α -amylase was immobilized onto p(HEMA-MAH)-Cu(II) microbeads. The effect of pH and temperature on enzyme immobilization was investigated. The maximum enzyme immobilization was found at pH 6.0 and 25 °C. Optimum pH and temperature of immobilized enzyme were found to be pH 6.0 and 30 °C. Kinetic parameters (K_m , V_{max}) of the immobilized enzyme was determined and compared to the kinetic parameters that of free enzyme. Repeated use activity of immobilized enzyme was also investigated.

These results showed that the p(HEMA-MAH)-Cu(II) microbeads are suitable for α -amylase immobilization.

Key words: α - amylase, p(HEMA-MAH)-Cu(II), microbead, enzyme immobilization

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.	Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyaller	20
Çizelge 3.1.	P(HEMA-MAH) mikroküreleri hazırlamak için polimerizasyon şartları	38
Çizelge 4.1.	Enzim adsorpsiyonu üzerine pH' nın etkisi	47
Çizelge 4.2.	Enzim adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisi	49
Çizelge 4.3.	Serbest enzim aktivitesi üzerine pH' nın etkisi	50
Çizelge 4.4.	Serbest enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	51
Çizelge 4.5.	İmmobilize enzim aktivitesi üzerine pH' nın etkisi	52
Çizelge 4.6.	İmmobilize enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	53
Çizelge 4.7.	Serbest ve immobilize α -amilaz için K_m ve V_{max} değerleri	56
Çizelge 4.8.	İmmobilize enzimin tekrar kullanımının aktivite üzerine etkisi	56

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Enzim kararlılığı üzerine immobilizasyonun etkisi	2
Şekil 2.1. İmmobilizasyon süreci	9
Şekil 2.2. Enzimin taşıyıcıya bağlanması	11
Şekil 2.3. Kovalent bağlanma	12
Şekil 2.4. Fiziksel adsorpsiyon	14
Şekil 2.5. Çapraz bağlanma	15
Şekil 2.6. Enzimin bir taşıyıcı içerisinde tutuklanması	16
Şekil 2.7. Enzimin bir kapsül içinde tutuklanması	17
Şekil 2.8. α - Amilazların yapı organizasyonları	26
Şekil 2.9a. α - Amilazın etki mekanizması	28
Şekil 2.9b. α - Amilazın etki mekanizması	29
Şekil 2.10. Kovalent bağ içeren α -(1-4) glikozit bağının PPA ile hidrolizi için çifte yerdeğişim mekanizması	30
Şekil 3.1. P(HEMA-MAH) mikrokürelerinin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon sistemi	39
Şekil 4.1. P(HEMA-MAH) mikrokürelerinin SEM görüntüsü	45
Şekil 4.2. P(HEMA-MAH) mikrokürelerinin molekül yapıları	46
Şekil 4.3. Standart maltoz eğrisi	47
Şekil 4.4. Enzim adsorpsiyonu üzerine pH' nın etkisi	48
Şekil 4.5. Enzim adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisi	49
Şekil 4.6. Serbest enzim aktivitesi üzerine pH' nın etkisi	50
Şekil 4.7. Serbest enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	52
Şekil 4.8. İmmobilize enzim aktivitesi üzerine pH' nın etkisi	53
Şekil 4.9. İmmobilize enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	54
Şekil 4.10. Serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği	55

Şekil 4.11. İmmobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği 55

Şekil 4.12. İmmobilize enzimin tekrar kullanımının aktivite üzerine etkisi 57

EKLER

Ek.1. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması	77
Ek.2. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	78

KISALTMA VE SİMGELER

PMMA	Poli metil metakrilat
HEMA	2-Hidroksietil metakrilat
GMA	Glisidil metakrilat
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
HEMA-MAH	2-Hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-histidinmetilester
ECH	Epiklorohidrin
St-HEMA	Stiren-2-hidroksietil metakrilat
NaOH	Sodyum hidroksit
CTMAB	Setil trimetil amonyum bromür
MAH	N- metakriloil-(L)-histidin metilester
CDI	Karbodiimid
EDA	Etilen diamin
HMDA	Hekzametilen diamin
VIM	Vinil imidazol
PVA	Poli vinil alkol
BPO	Benzoil peroksit

1. GİRİŞ

Amilazlar nişastayı hidrolizleyerek, dekstrin, oligosakkarid ve glukoz molekülleri gibi ürünlere parçalayan endüstriyel öneme sahip hidrolitik enzimlerdir (Mukherjee ve ark. 2009). Bu enzimler günümüzde gıda ve tekstil endüstrisinden, kağıt endüstrisine kadar çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda önemli bir yer edinmiş olup, bitki, hayvan ve mikroorganizma içeren kaynaklarda bulunurlar (Pandey ve ark. 2000).

Amilaz grubu enzimlerden biri olan α -amilaz, nişasta ve ilgili diğer substratlarda α -1,6 glikozidik bağlarına etki etmeyip, α -1,4 glikozidik bağlarını hidrolizleyen bir endo enzimdir (Windish ve Mhatre 1965), (Fogarty ve Kelly 1979), (Vihinen ve Mantsala 1989), (Lonsane ve Ramesh 1990).

1.1. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon, katı, çözünmeyen destek materyallere enzim, mikroorganizma ve organeller gibi biyolojik moleküllerin yerleştirilmesi (bağlanması) olarak tanımlanabilir. İmmobilizasyonun en önemli avantajı, biyoreaktörlerin çalışmasını devamlı hale getirmesidir. Bu da özellikle tarımsal ve endüstriyel atıkların biyomuamelesinde ve iyi kimyasalların üretiminde yararlıdır (Mosbach ve ark. 1976), (Yoshida ve ark. 1979), (Arica ve ark. 1999), (Arica ve ark. 2004), (Arica ve Bayramoğlu 2004). Günümüzde immobilizasyon teknolojisi biyomedikal bilimi ve biyoteknolojide çok önemli bir alan haline gelmiştir. İlaçlar, proteinler, bitki ve hayvan hücreleri, çeşitli sınıflara ait mikroorganizmalar gibi biyoaktif maddelerin büyük bir çoğunluğu, uygun destek materyaller üzerinde yüksek verimli ürünlerle başarılı bir şekilde immobilize edilirler (Krajewska 2004), (Linderholm ve ark. 2004), (Phadtare ve ark. 2004). Bu immobilize olan ürünlerin çoğu yapay organ sistemlerinde, biyosensörlerde ve biyoreaktörlerin yapımında da kullanılmıştır (Pozniak ve ark. 1995), (Fernandes ve ark. 2004), (Zheng ve ark. 2004). İmmobilize enzimler ise endüstriyel uygulamaların dışında, laboratuvar ölçekte organik sentezlerde, analitik ve medikal uygulamalarda kullanılmaktadır.

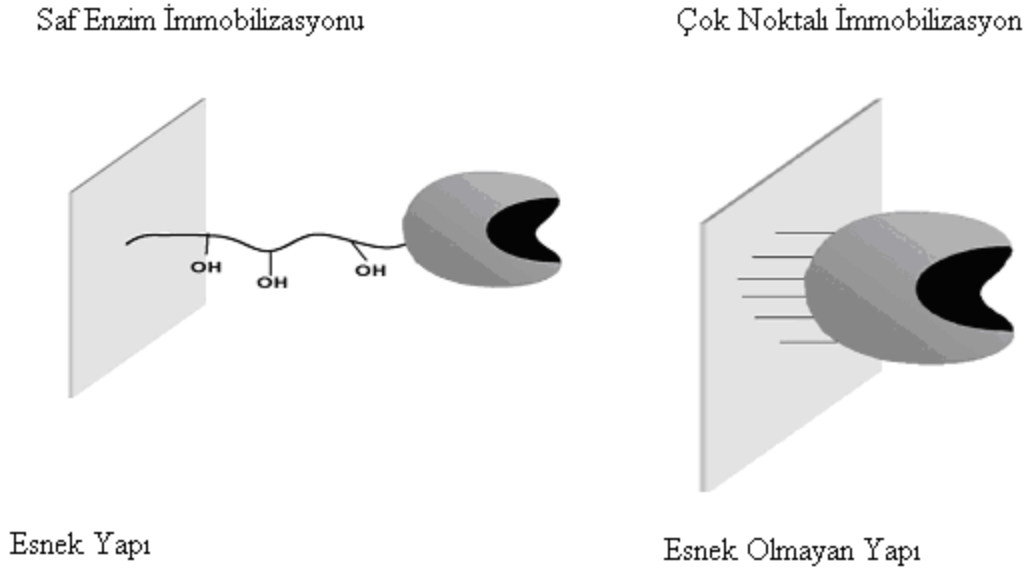
Ticari amaçlı bir prosesin gerçekleştirilmesinde, kimyasal bir katalizör mü, yoksa enzim mi kullanılacağına, serbest enzim mi yoksa immobilize enzim mi kullanılacağına karar verilirken sağlık ve çevresel faktörlerin yanında ekonomik

1. GİRİŞ

koşullar da dikkate alınmaktadır. Bazı durumlarda, immobilize enzimlerin kullanıldığı prosesler, kimyasal bir katalizörün ya da serbest enzimin kullanıldığı proseslere oranla geniş ölçekte üretim sağlayarak daha ekonomik olabilmektedir (Uludağ 2000), (Kırkköprü ve Alpaslan 2004), (Kasavi 2006).

İmmobilizasyonda çoğunlukla iyi akış özellikleri, mekanik kuvvetleri ve rejenerasyon özellikleri nedeniyle inorganik taşıyıcılar kullanılmaktadır (Liang ve ark. 2000). İmmobilizasyonun etkisi; yüzey alanı, enzim yüzeyine ulaşılabilirlik, protein üzerinde fonksiyonel grup bağlanması için uygunluk, destek materyal üzerinde fonksiyonel grupların bulunması, uzatıcı kolun kullanımı, destek yüzeyi ile bağlı enzim arasındaki mesafe ve aktif merkezin sterik yönelmesi gibi birçok parametreye bağlıdır. Bir desteğe enzimin bir ya da birçok yerden bağlanması, destek materyal üzerine proteinin kimyasal afinitesi immobilizasyonu etkileyen en önemli faktörlerdir (Klibanov 1979), (Klibanov 1983), (Gupta 1991).

Enzim kararlılığı üzerine immobilizasyonun etkisi Şekil 1.1' de gösterilmiştir:



Şekil 1.1. Enzim kararlılığı üzerine immobilizasyonun etkisi (Mateo ve ark. 2007)

İmmobilizasyon yönteminin bazı avantaj ve dezavantajları vardır. İmmobilizasyondan sonra enzimin aktivitesi, optimum pH ve sıcaklığı, substrata ilgisi ve kararlılığı değişmektedir. Genellikle enzimin aktivitesi ve substrata ilgisi immobilizasyondan olumsuz yönde etkilenirken, optimum sıcaklığı ve kararlılığı

olumlu yönde etkilenmektedir. Enzimdeki bu değişiklikler enzimin yapısına, taşıyıcının tipine, immobilizasyon yöntemine ve şartlarına göre değişmektedir (Uludağ 2000).

1.2. Enzim İmmobilizasyonu

Bir katıya tutundurulduktan sonra üzerinden geçen substratların ürünlere dönüşmesini sağlayan enzimlere “immobilize enzimler” denir. Enzim immobilizasyonu, enzimin katalitik aktivitesi devam ederken, hareketinin önemli ölçüde kısıtlandığı bir prosestir (Bickerstaff 1997).

Enzim immobilizasyonu, enzim moleküllerinin, adsorpsiyon, kovalent bağlama veya kapsülleme yöntemleri yardımıyla, geniş yapıların içine veya üzerine takılmasını içerir (Tischer ve Kasche 1999), (Livage ve ark. 2001).

Enzimler reaksiyonlar sonucunda modifiye olmazlar. Bu nedenle aynı enzim bir kereden fazla kullanılabilir, ancak enzimin reaktanlar ve/veya ürünler ile birlikte bir çözelti içerisinde bulunması, enzimin çözülden ayrılmasını zorlaştırmaktadır. Böyle durumlarda enzimin bir katıya tutundurulması sağlanarak, ürünler ortamdaki alınmakta ve enzim tekrar kullanılabilir bir hale gelmektedir. Enzimlerin bir katıya tutturularak immobilize edilebilmeleri defalarca kullanılmalarını sağlar (Gangadharan ve ark. 2009).

Endüstriyel ve analitik proseslerin çoğu, sulu ortamda gerçekleşir. Bu proseslerde enzimler, substrat çözeltisi ile karıştırılarak, ortamda ürün elde edildikten sonra ekonomik olarak geri kazanılmazlar. Ayrıca sürekli üretim proseslerinde serbest enzimler kullanılmamaktadır. Enzimlerin pahalı ve sadece bir kere kullanılmaları nedeniyle, bu proseslerin maliyetleri oldukça yüksektir. Bu nedenle enzimler suda çözünmeyen bir desteğe immobilize edilerek defalarca kullanılabilen, böylece, önemli miktarda ekonomik kazanç elde edilmektedir. Günümüzde pek çok immobilize enzim endüstride kullanılmaktadır (Karadağ 2001), (Doğan 2008).

İmmobilize enzimlerin çevresel etkilere karşı yüksek stabilite, tekrar kullanılabilirlik, ürünü kolayca ayırabilme, çok adımlı reaksiyonlarda daha yüksek verimlilik gibi avantajları vardır (Aksoy ve ark. 1998).

Bir immobilize enzimin aktivitesi, immobilizasyonun ve destek materyalin türüne göre değişebilir (Manecke ve ark. 1970), (Goldstein ve ark. 1971).

1.3. α - Amilaz

Amilazların tarihi, ilk olarak Kirchhoff' un 1811 yılında nişastayı parçalayan enzimi keşfetmesiyle başladı. Bunu takiben malt ve sindirim amilazları ile ilgili birkaç rapor yayınlanmıştır. Daha sonra 1930' da Ohlsson malttaki amilazların nişastayı parçalaması sonucu oluşan şeker türlerine göre amilazların α - amilaz ve β - amilaz şeklinde sınıflandırılmasını önerdi (Gupta ve ark. 2003).

α - Amilaz nişasta, glikojen ya da bunların parçalanma ürünleri gibi polisakkaritlerdeki α -(1-4) glikozidik bağımlı hidrolizler (Robyt ve French 1970a, 1970b), (Thoma ve ark. 1971), (Larson ve ark. 1994).

α - Amilaz bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı kaynaklardan elde edilebilmesine rağmen ticari ihtiyaçları karşılamada genellikle mikrobiyal enzimler tercih edilir. Günümüzde mikrobiyal amilazların büyük bir kısmı ticari olarak üretilmekte ve hemen hemen tamamı nişastanın kimyasal hidrolizinde önemli role sahip olmaktadır (Pandey ve ark. 2000).

Amilazlar için farklı substratlar bulunur. Bunlar arasında, başta doğada bol miktarda bulunan patates, buğday, mısır, pirinç gibi bitkilerden elde edilen ham nişasta yer alır. Enzim substratını kullanarak önce dekstrine, son ürün olarak da glukoz, maltoz ve maltoz üniteleri içeren karbohidratlara dönüştürür (Somers ve ark. 1995). Nişastanın α - amilaz tarafından hidrolizi sonucu oluşan maltooligosakkaritler gıda, ilaç ve kimya endüstrilerinde önemli özelliklerinden dolayı kullanım alanı bulmuşlardır. Bunlar çocuklar ve yaşlılar için yüksek oranda besleyici gıdalar olup, kalori eksikliği çeken kişilerde besin olarak kullanılmaktadır (Kandra 2003). α - Amilazlar tarafından nişastanın düşük molekül ağırlıklı şekerlere hidrolizi en önemli ticari enzimatik süreçlerden biridir (Okada ve ark. 1992), (Kumari ve Kayastha 2011).

Bu çalışmada, α - amilaz mikroküre üzerine immobilize edildi. Bu amaç için p(HEMA-MAH) mikroküreleri hazırlandı ve daha sonra bu mikrokürelere Cu(II) bağlandı. Hazırlanan mikrokürenin bazı yapısal analizleri incelendiği gibi enzim aktivitesi üzerinde immobilizasyon sürecinin etkisi ve enzimin kinetik parametreleri araştırıldı. Bunların yanı sıra, immobilize α - amilazın tekrar kullanılabilirlik özelliği de analiz edildi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Enzimler

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan (hemen hemen hepsi denilebilecek kadar büyük çoğunluğu) protein yapısında olan biyokatalizörlerdir. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenlerler. Yeterli koşulların sağlanması halinde etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanma imkanı sunmaktadır. Bu nedenle çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar.

Enzimatik tepkimeler geri dönüşümlüdür. Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek, zor ve uzun sürede gerçekleşecek olan tepkimeleri çok kısa sürede ve daha az enerjiyle yapmayı sağlarlar. İlgili reaksiyonları ılımlı koşullarda çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizlerler.

Genel olarak enzimler protein yapısında olan moleküllerdir. Ancak çoğu durumda söz konusu proteine protein olmayan daha küçük yapıları organik veya inorganik moleküllerin bağlanmasıyla oluşmuş proteid yapısı gözlenir. Bu son durumda enzimin protein kısmına 'Apoenzim' protein olmayan parçasına da 'Prostetik grup' veya 'Koenzim' denir. Apoenzim kısmı enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar, koenzim kısmı ise enzimde esas işlev gören kısımdır. Genel olarak bütün vitaminler hücrede enzimlerin koenzim kısmı olarak işlev görürler. Bazı enzimler ortamda sadece belli iyonlar varsa etkinlik gösterirler. Yani bazı durumlarda enzimin etkin olabilmesi için canlı hücrede az miktarda bulunan Zn, Fe, Cu gibi bazı metal iyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tür metal iyonlarına 'Kofaktör' adı verilmektedir.

Enzimin etki ettiği bileşiğe "Substrat", enzimin saniyede etki ettiği substrat molekül sayısına "Enzimin Etkinlik Değeri= Turnover sayısı" denir (Telefoncu 1997).

Enzimler, özgüllükleri sayesinde pek çok uygulama alanına sahiptirler. Bu nedenle besin endüstrisinde, deterjan ve ilaç sanayiinde, biyosensörlerde, kimyasal sentezlerde, klinik ve kimyasal analizlerde ligand olarak, tekstilde, bakteriyel kontaminasyonun tespiti ve eliminasyonunda, besin maddelerinin kalitelerini belirlemede kullanılmaktadırlar (Li ve ark. 2004).

2.1.1. Enzimatik Reaksiyonları Etkileyen Faktörler

Enzimatik reaksiyonları etkileyen bazı unsurlar vardır. Bunlar:

Sıcaklık: Her enzimatik reaksiyonun optimal bir sıcaklık seviyesi vardır. İnsanda bu sıcaklık 36.5 °C' dir. 0 °C' de enzimler etkin değildir ve bu sıcaklıkta yapıları bozulmaz, aktivitelerini korurlar. Genel olarak enzimler 60 °C ve üstü sıcaklıklarda denatüre olurlar.

pH: (asitlik-bazlık oranı): Her reaksiyonun gerçekleşebilmesi ortamın pH' ını belirleyen belli oranda H⁺ ve OH⁻ iyonları konsantrasyonu olmasına bağlıdır.

Substrat Konsantrasyonu: Ortamda reaksiyon hızını artırıcı yapılardan biri de enzim ve substrat miktarıdır. Her ikisinin miktarı belirli oranlarda artırılırsa reaksiyon hızı artar.

Su: Enzimatik reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ortamda belirli oranda su olması gerekir. Çünkü moleküllerin birbirine çarparak reaksiyonu gerçekleştirebilmesi için hareketi sağlayacak sıvı bir ortamın olması gerekir (Demirsoy 2000).

Enzim kararlılığını arttırmak için pek çok yaklaşım vardır. Bunlar;

- Enzim immobilizasyonu
- Enzim modifikasyonu
- Protein mühendisliği

Enzim immobilizasyonu, enzim moleküllerinin, adsorpsiyon, kovalent bağlama veya kapsülleme yöntemleri yardımıyla, geniş yapıların içine veya üzerine takılmasını içerir (Tischer ve Kasche 1999), (Livage ve ark. 2001). Genellikle, enzim molekülünün destek materyale pek çok bölgeden bağlanması protein katlanmasını azaltır ve böylece kararlılık sağlanır (Mozhaev 1993).

Enzim modifikasyonu ise enzim moleküllerindeki kovalent tepkimeler ile tanımlanır. Enzim moleküllerinin yüzeyine fonksiyonel gruplar ve polimerler eklenmesi, enzimin yüzey özelliklerini değiştirebilir ve böylece kararlılık sağlanabilir (Mozhaev ve ark. 1990), (Mozhaev 1993), (Desantis ve Jones 1999), (Govardhan 1999).

Protein mühendisliği, moleküler biyoloji tekniklerinde kullanılmak üzere daha kararlı yapılar elde etmek için enzim moleküllerindeki amino asit gruplarını

değiştirmeyi içerir (Arnold ve ark. 2001), (Lehmann ve Wyss 2001), (Brannigan ve Wilkinson 2002).

2.2. İmmobilizasyon Yöntemi

2.2.1. İmmobilizasyonun Tarihçesi

1916 yılında Nelsen ve Griffin, odun kömürü üzerine adsorbe edilmiş maya invertazın (E.C.3.2.1.26) sukrozu hidrolizlediğini belirtmişlerdir. Bu gelişmenin ardından aktif proteinlerin kovalent bağlanma ile çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu üzerine çok çeşitli raporlar yayınlanmıştır. Bütün bu çalışmalara rağmen 1953 yılında Grubhofer ve Schleith' in karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz gibi çeşitli enzimleri diazolanmış poliaminostiren reçinesi üzerine kovalent bağlanmayla immobilize etmelerine kadar immobilizasyon pratikte kullanılmamıştır. Daha sonra 1956 yılında Mitz, katalazın (E.C.1.11.1.6) DEAE-selüloz üzerine iyonik bağlanmayla immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. 1963 yılında Bernfeld ve Wan tripsin (E.C.3.4.21.4), papain (E.C.3.4.22.2) amilaz ve ribonükleazın, poliakrilamid jel içine tutuklanmasını sağlamış, 1964 yılında Quijochó ve Richards karboksipeptidaz A'nın (E.C.3.4.17.1) glutaraldehit ile çapraz bağlanmasını gerçekleştirmiştir. Ayrıca, 1964 yılında Chang karbonik anhidrazın (E.C.4.2.1.1) mikrokapsüllemesini, 1971 yılında da Gregoriadis amiloglukozidaz (E.C.3.2.1.3) içeren lipozomlar hazırlamışlardır. Bu her iki çalışma günümüzde enzim terapisinde kullanılmaktadır. Bu sırada Katchalski-Katzir ve arkadaşlarının immobilize enzimlerin teorik olarak anlaşılmasında büyük yararları olmuştur. 1969' da Chibata ve arkadaşları, ilk defa immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarında başarı sağlamış kişilerdir. Fungal aminoaçilazı (E.C.3.5.1.14) iyonik bağlanma yöntemi ile DEAE Sephadex'e immobilize etmişler ve bu immobilize enzimi N-açil-D,L-amino asitleri L-amino asitlere ve N-açil- D-amino asitlere dönüştürmekte kullanmışlardır. 1973 yılında, Chibata ve arkadaşları tarafından mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunun ilk endüstriyel uygulamaları gerçekleştirilmiş olup, poliakrilamid jelle tutuklanmış, yüksek aktivitede aspartaz (E.C.4.3.1.1) içeren *Escherichia coli* hücreleri ile amonyum fumarattan L-aspartat üretimini sağlamışlardır (Aehle 2004).

2.2.2. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim yapısındaki bütün proteinler, sulu ya da susuz çözeltilerde kolayca deforme olurlar (Fusi ve ark. 1989). Bu yüzden enzimolojideki araştırmaların temel konularından biri, enzim moleküllerinin kararlılığını sağlamaktır (El-Batal ve ark. 2005). İmmobilizasyon, enzimleri kararlı kılmak için uygulanan yöntemlerden biridir (Bayramoğlu ve ark. 2004), (Gopinath ve Sugunan 2007), (Reshmi ve ark. 2007). Enzimlerin immobilizasyonu için çeşitli metotlar vardır. İmmobilizasyon; matriks ile enzim arasında iyonik ya da kovalent bağlanma, adsorpsiyon ya da katı bir destek materyali üzerinde enzimin tutuklanması şeklinde meydana gelebilmektedir. Bu destek bir jel matriks, membran yapısında inorganik veya polimerik bir katı ya da mikroküre olabilir (Goldstein ve ark. 1971).

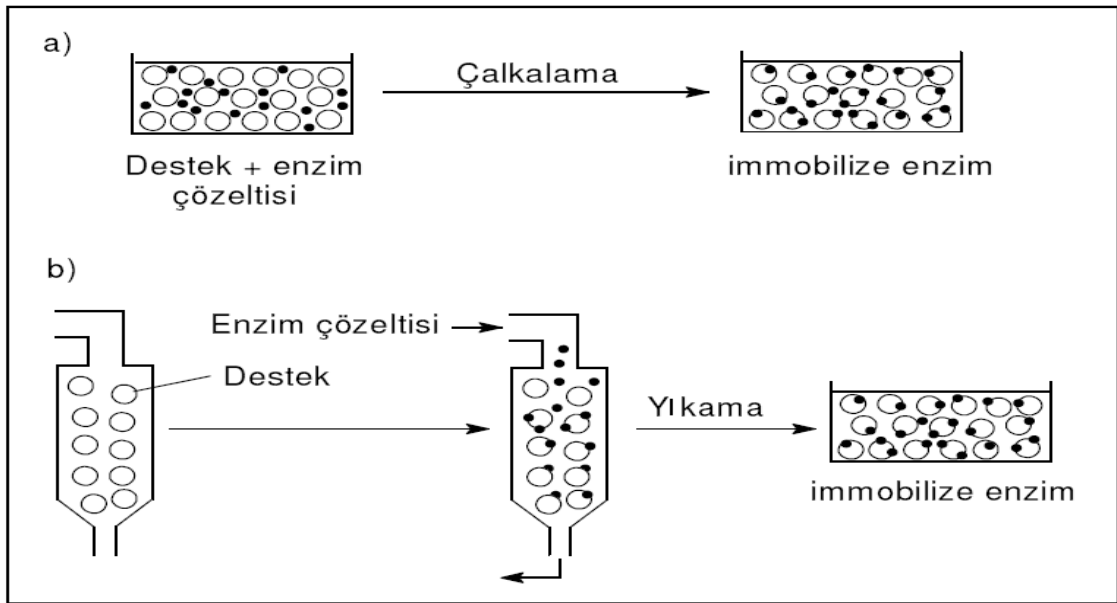
Enzimlerin hem organik hem de inorganik katı destekler üzerine immobilizasyonu, enzimin işlevsel yaşam ömrünü ve kararlılığını artırmak için çok etkili bir yoldur (Kahraman ve ark. 2007), (Singh ve Kumar 2011). Bunların yanı sıra immobilizasyon, reaksiyon ortamından enzimin kolayca uzaklaştırılmasını sağlar, böylece enzimlerden son ürün saflaştırması ve uzaklaştırılması daha güvenilir ve daha etkili olur (Bajpai ve Bhanu 2003).

İmmobilize enzim sistemlerinde en önemli ölçüt, reaksiyon ortamı içinde enzimatik reaksiyonlar için hedef moleküller olan substratın difüzyonudur. Substratın dağılma gücü dikkatlice değerlendirilmeli ve enzimatik reaksiyon sistemlerinin yapımının uygun bir şekilde yerine getirilmesi gerekmektedir (Shao ve ark. 2007), (Arıca ve ark. 2009). Desteğin birim kütlesi başına yüklenen enzim miktarı genellikle düşükken, enzimlerin yüzeylerine bağlandığı gözeneksiz maddeler minimum difüzyon sınırlamasına maruz kalırlar. Buna karşın gözenekli maddeler, yüksek enzim yükleme özelliğine sahip olabilirler, fakat substrat molekülü büyük olduğu zaman daha geniş difüzyonel sınırlamaya ihtiyaç duyulur (Bayramoğlu ve ark. 2005a), (Arıca ve Bayramoğlu 2006), (Yang ve ark. 2008). Öte yandan, bir enzim polimerik desteğe direkt olarak bağlanırsa, destek yüzeyi ile immobilize enzim arasında sterik engel meydana gelebilir (Fernandez-Lorente ve ark. 2007). Bu nedenle enzim moleküllerinin bir uzatıcı kol kullanarak bir kısmının destekten uzaklaştırılması gerekir (Arıca ve ark. 2004).

İyi bir immobilizasyon işlemi gerçekleştirebilmek için gerekli optimum koşullar aşağıdaki özelliklere bağlıdır:

- ❖ pH
- ❖ Çapraz bağlanma için kullanılan ajanın konsantrasyonu ve yapısı
- ❖ İyonik kuvvet
- ❖ Enzimin yapısı ve konsantrasyonu
- ❖ Reaksiyon süresi
- ❖ Sıcaklık

İmmobilizasyon süreci Şekil 2.1 'de gösterilmiştir:



Şekil 2.1. İmmobilizasyon süreci (Doğan 2008)

2.2.3. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları

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

- Enzim bir çok kere kullanılabilir ve bu da maliyeti düşürmektedir.
- Enzimin ortamdaki uzaklaştırılması sonucu reaksiyonun hızlı bir şekilde durdurulması sağlanabilmektedir.
- Oluşan ürünlerde enzim kalıntıları bulunmamaktadır (Özellikle gıda ve ilaç sektörleri için enzimin kirletici içermemesi çok önemlidir).
- Enzimin kararlılığı artmaktadır.
- Enzimin ortamdaki ayrılması kolaylaşmaktadır.

- Sürekli sistemde çalışılabilmektedir.
- Ürünün kolayca ayrılması sağlanmaktadır.
- Atık sıvı miktarı azalmaktadır.
- Bazı durumlarda enzimin aktivitesi artmaktadır.
- Enzimin yarılanma ömrü uzamaktadır (Ashly ve ark. 2011).

2.2.4 Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri

İmmobilizasyon işlemi sırasında veya immobilizasyondan sonra enzimin aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem seçilmelidir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Bu koruma görevi bazen substrat bazen de yarışmalı inhibitör tarafından sağlanır. İmmobilizasyon yönteminin seçiminde güvenilirlik, maliyet, aktivitenin korunması ve kararlılık gibi dört ana özellik göz önüne alınmalıdır (Goldstein 1970), (Öztürk 2006).

İmmobilize enzimin performansı, büyük ölçüde taşıyıcının yapısına ve karakterine bağlıdır (Brady ve Jordan 2009). Bu nedenle taşıyıcı seçiminde bazı ölçütler vardır. Bunlardan biri de immobilizasyon yöntemi iyonik veya kovalent bağlama ile gerçekleştirilecekse taşıyıcının gruplar içermesi gibi özelliklerin göz önüne alınmasıdır. Yüklü taşıyıcının kullanılması, enzim optimum pH' ının 1–2 birim, K_m değerinin ise 10 kata kadar değişmesine sebep olabilirler (Goldstein 1970).

İmmobilizasyon yöntemleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır:

1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemi

- İyonik Bağlanma Yöntemi
- Kovalent Bağlanma Yöntemi
- Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi

2. Çapraz Bağlanma Yöntemi

3. Tutuklama Yöntemi

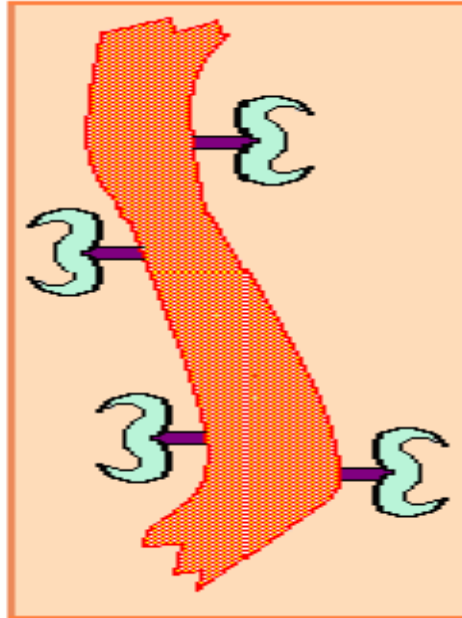
- Jel Tutuklama Yöntemi
- Fiber Tutuklama Yöntemi
- Mikrokapsülleme Yöntemi

- Lipozom Tipi Tutuklama Yöntemi
- Membran Tipi Tutuklama Yöntemi

2.2.4.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemi

Taşıyıcıya bağlama en eski immobilizasyon yöntemidir. Taşıyıcıya bağlama, biyokatalizörün suda çözünmeyen taşıyıcıya kovalent bağlar, iyonik bağlar, fiziksel adsorpsiyon veya biyospesifik etkileşimler ile bağlanmasına dayanan bir yöntemdir. Enzime göre taşıyıcı seçimi çok önemlidir. Taşıyıcı seçiminde; partikül büyüklüğü, toplam yüzey alanı, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi ölçütler esas alınır (Tanaka ve Kawamoto 1999).

Enzimin taşıyıcıya bağlanması Şekil 2.2’de gösterilmiştir:



Şekil 2.2. Enzimin taşıyıcıya bağlanması

- **İyonik Bağlanma Yöntemi**

İyonik bağlama ile immobilizasyon, enzimin yüklü grupları ile taşıyıcının karşıt yükleri arasındaki çekim kuvvetlerine dayanır. Enzim, iyon değiştirme yeteneğine sahip ve suda çözünmeyen taşıyıcıya iyonik olarak bağlanır. İyonik bağlama yöntemi birçok enzimin immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Prosedür çok basit olup taşıyıcının yenilenmesi ve enzimin taşıyıcıdan geri kazanımı çok kolaydır (Chibata ve ark. 1972).

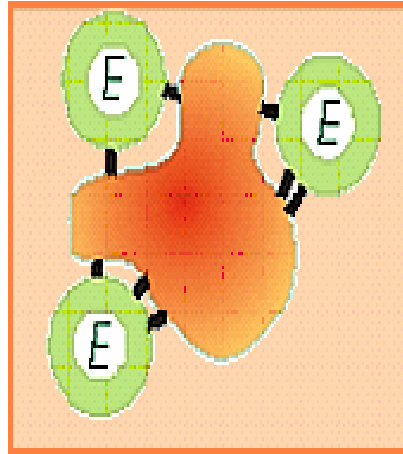
Genellikle taşıyıcı olarak iyon değiştirici merkezleri bulunan polisakkaritler ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Taşıyıcılar, iyon değiştirici kalıntılarına bağlı

olarak anyonik veya katyonik değiştirici olarak isimlendirilirler. Fiziksel adsorpsiyonda olduğu gibi iyonik bağlanmada da immobilizasyon işlemi kolaylıkla gerçekleşmektedir. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetleri fiziksel adsorpsiyondan daha kuvvetli ancak kovalent bağlanmadan daha zayıftır. Bu nedenle de değişik pH'larda ve yuksek iyonik kuvvetteki substrat çözeltisinde taşıyıcıdan enzim sızma ihtimali olmaktadır. İyonik bağlanmada operasyon koşulları kovalent bağlanmadakine göre daha kolaydır, enzimin konformasyonunda ve aktif merkezindeki değişiklik azdır. Bu nedenle genellikle immobilize edilen enzimin aktivitesi yuksek olmaktadır (Aehle 2004), (Kasavi 2006).

- **Kovalent Bağlanma Yöntemi**

Bu yöntem, enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Bağlanma genellikle, enzimin nükleofilik grubuyla taşıyıcının fonksiyonel grubu arasında gerçekleşmektedir. Bağlanmada rol alan fonksiyonel gruplar; amino grubu (-NH₂), karboksil grubu (-CO₂H), sülfhidril grubu (-SH), hidroksil grubu (-OH), imidazol grubu, fenolik grup, tiyol grubu ve indol grubudur (Tischer ve Wedekind 1999), (Bickerstaff 1997).

Enzimin kovalent bağlanma yöntemi ile taşıyıcıya immobilize edilmesi Şekil 2.3' te görlmektedir:



Şekil 2.3. Kovalent bağlanma

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeniyle bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki amino asitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir.

Bazı durumlarda immobilize enzimin verimini arttırmak için enzimin reaktif kalıntılarının sayısını arttırmak mümkündür. Böylece enzimatik aktivite için gerekli olan alternatif reaksiyon bölgeleri sağlanmaktadır (Telefoncu 1997).

- **Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi**

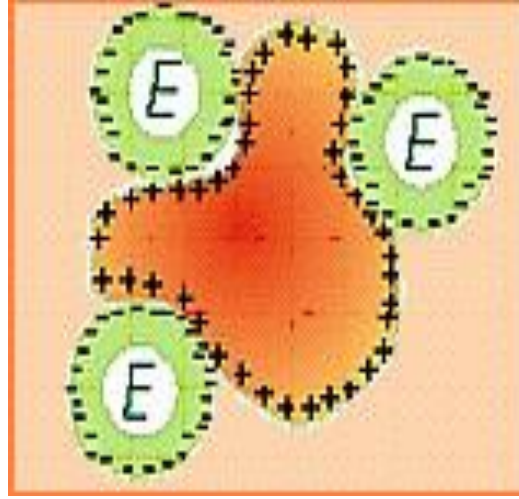
Bu metot, enzim immobilizasyonu için enzim proteininin suda çözünmeyen taşıyıcının yüzeyinde fiziksel adsorpsiyonuna dayanır. Ayrıca enzimin aktif merkezinin yapısı ve enzimin konformasyonel yapısı ya hiç değişmez, ya da çok az değişir. Eğer uygun bir taşıyıcı bulunursa bu metot hem ucuz hem de kolaydır (Nanduri ve ark. 2007).

Enzim ile taşıyıcı arasında tersinir bir yüzey etkileşimi gerçekleşmektedir. Adsorpsiyon, en basit ve uygun taşıyıcı kullanıldığı durumlarda ucuz bir immobilizasyon metodudur. Bu yöntemde hidrofobik bağlanma gerçekleşebilmekte, ayrıca van der Waals kuvvetleri, iyonik ve hidrojen bağları gibi kuvvetler de etkili olmaktadır. Enzim, hiçbir modifikasyon gereksiz immobilize olmasına rağmen, fiziksel etkileşimler iyonik bağlardan daha zayıftır ve sıcaklık, çözünen madde derişimi gibi çevresel faktörlere karşı daha duyarlıdır. Hüresel organeller ve değişik tipteki hücreler bu yöntem ile kolaylıkla immobilize edilebilir.

Adsorpsiyon yönteminin bazı avantajları vardır. Bu yöntem daha basit, daha ucuz ve yüksek katalitik aktivite korunduğu için diğer metotlardan daha yüksek bir ticari potansiyele sahiptir. Ayrıca bu yöntemle immobilize olan enzimin inaktivasyonundan sonra pahalı destek materyallerin tekrar kullanılabilirliği mümkün olmaktadır (Amounas ve ark. 2002), (Bayramoğlu ve Arica 2004), (Bellezza ve ark. 2003). Yöntemde immobilizasyondan sonra, enzim aktivitesinin kararlılığı, farklı amaçlar için destek materyalinin ve enzimin tekrar kullanılabilirliği sağlanır (Kara ve ark. 2005). Bu yöntemin, optimum immobilizasyon koşullarının saptanmasının çok güç olması, enzim ile taşıyıcı arasındaki bağın çok güçlü olmamasından dolayı yıkama ve

diğer işlemler sırasında adsorplanan enzimin reaksiyon ortamına geçmesiyle ürünü kirlenmesi gibi dezavantajları da vardır (Bayramoğlu ve ark. 2005b).

Enzimin taşıyıcıya fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmesi Şekil 2.4' te görölmektedir:

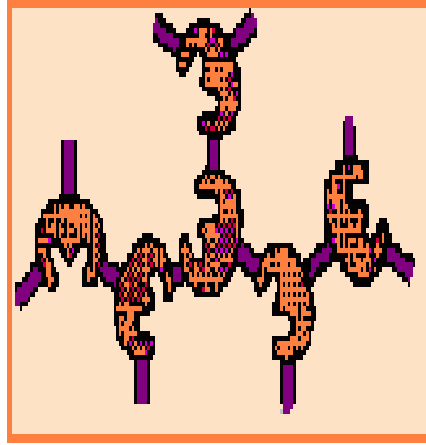


Şekil 2.4. Fiziksel adsorpsiyon

2.2.4.2. Çapraz Bağlanma Yöntemi

Enzimlerin çapraz bağlanma ile immobilizasyonu, diğer protein moleküllerine ya da çözünmeyen bir taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplara, proteinin moleküller arası çaprazlanmasıyla sağlanmaktadır. Bir enzimin kendisi üzerine çapraz bağlanması pahalı ve uygun olmayan bir yöntemdir, çünkü bu durumda proteinin bir kısmı taşıyıcı gibi davranmakta ve bu da enzimatik aktivitenin düşmesiyle sonuçlanmaktadır. Genellikle çapraz bağlanmanın diğer immobilizasyon metotlarından biriyle kullanılması daha uygundur. Enzimin kovalent bağlanmayla immobilizasyonu gerçekleştirilirken çapraz bağlanma da uygulandığında desorpsiyon çok az olmaktadır. Adsorplanmış enzimleri stabilize etmek ve poliakrilamid jellerden sızıntıyı önlemek, çapraz bağlanmanın sıklıkla kullanıldığı alanlardır.

Enzimin taşıyıcıya çapraz bağlanması Şekil 2.5' te gösterilmiştir:



Şekil 2.5. Çapraz bağlanma

Çapraz bağlanma ile immobilizasyon yönteminin en büyük avantajı basit ve hızlı prosedürlerde immobilize enzimlerin sadece ajanın varlığında hazırlanabilmeleridir. Ayrıca bu yöntemin 2 önemli dezavantajı bulunmaktadır. Birincisi, çapraz bağlanma reaksiyonlarının daha sert koşullarda gerçekleşmesi ve kolaylıkla kontrol edilememesidir. Koşulların enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişikliğe yol açabilmesi ve bunun da önemli miktarda aktivite kaybı ile sonuçlanabilmesidir. İkincisi ise immobilizasyon için çapraz bağlanma uygulanarak hazırlanan taşıyıcının jelatinimsi yapısının bir çok uygulamaya sınırlama getirmesidir (Enzyme Immobilization, 2004. <http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/enzymatic/appendix/immob.html>).

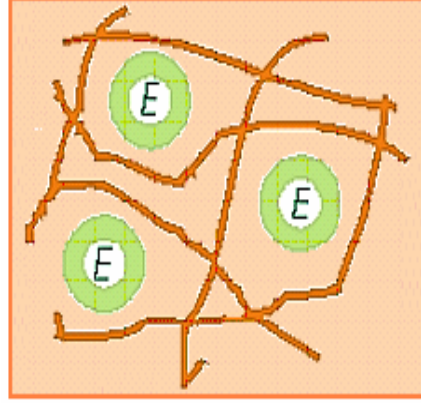
2.2.4.3. Tutuklama Yöntemi

Bu yöntem, polimerik matris yapılarında veya yarı geçirgen membranlarda mikrokapsülleme ve miseller ile enzimin hapsedilmesine dayanır (Arıca ve Hasırcı 1987).

Enzim sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözünür. Polimer oluşumu ve/veya çapraz bağlanma ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınlarıyla başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir. (Michael 1980), (Arıca ve Hasırcı 1987). Tutuklama metodunun en önemli avantajı tek tip enzimlerin dışında değişik tipte enzim, organel ve hücrelerin de hemen hemen aynı prosedürle immobilize edilebilir olmasıdır. Ayrıca biyokatalizörlerin çeşitli modifikasyonlara uğramamaları ve immobilizasyonun yüksek molekül ağırlıklı enzim inhibitörlerinin etkisini elimine etmesi de yöntemin avantajları arasında sayılmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı

substratların enzime zorlukla tutunmaları ve taşıyıcıların yeniden elde edilemez olması yöntemin dezavantajlarından biridir (Kasavi 2006).

Enzimin bir taşıyıcı içerisinde tutuklanması Şekil 2.6'da gösterilmiştir:



Şekil 2.6. Enzimin bir taşıyıcı içerisinde tutuklanması

- **Jel Tutuklama Yöntemi**

Jel tutuklama metodunda tutuklama; monomer (akrilamid), oligomerik ve polimerik (jelatin, kalsiyum aljinat) maddelerden elde edilen, suda çözünmeyen polimer jellerde gerçekleşir. Tutuklama sırasında iyonik şiddet, pH değişir ve çapraz bağlanma reaksiyonu oluşur. Monomerlerin toksik etkisi ve reaktörde basınç düşmelerine yol açmaları nedeniyle endüstriyel uygulamalarda bunların kullanımına yönelik bazı sınırlamalar yapılmaktadır (Enzyme Immobilization, 2004 <http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/enzymatic/appendix/immob.html>).

- **Fiber Tutuklama Yöntemi**

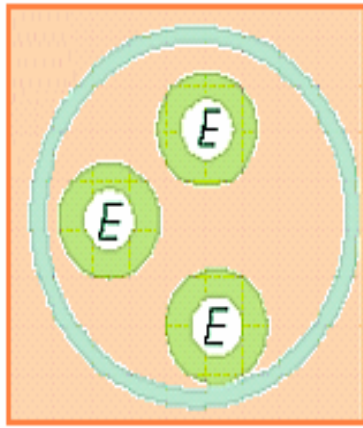
Fiber tutuklama metodu, enzimin selüloz, triasetat gibi fiber formundaki bir polimere tutuklanması sonucunda gerçekleşir. Fiberlerin zayıf asit, alkali ve bazı organik çözücülere karşı dirençli olması ve yüksek iyonik kuvvete sahip olması bu yönteme çeşitli avantajlar sağlamaktadır, ancak düşük molekül ağırlıklı substratlarla kullanımı sınırlanmaktadır. Ayrıca polimer çözücüsü olarak suda çözünmeyen sıvıların kullanılması enzimin inaktif olmasına neden olabilmektedir (Enzyme Immobilization, 2004. <http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/enzymatic/appendix/immob.html>).

- **Mikrokapsülleme ile Tutuklama Yöntemi**

Mikrokapsül tipi tutuklamada enzim yarı geçirgen polimer membran içerisinde tutulur. Bu metodun avantajları substratla enzime geniş yüzey alanı sağlaması ve değişik tipte enzimlerin de hemen hemen aynı prosedürle immobilize edilebilir olmasıdır. Metodun yüksek molekül ağırlıklı substratlara uygulanamaması, bazı durumlarda enzimin inaktif olması, membran duvarına yapışması ve mikrokapsüllerden damlaması yöntemin dezavantajları arasında sayılmaktadır (Enzyme immobilization, 2004

<http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/enzymatic/appendix/immob.html>).

Enzimin bir kapsül içinde tutuklanması Şekil 2.7' de gösterilmiştir:



Şekil 2.7. Enzimin bir kapsül içinde tutuklanması

- **Lipozom Tipi Tutuklama Yöntemi**

Lipozom tipinde, lipitlerden oluşmuş amfipatik sıvı-yüzey aktif madde membranı içine tutuklama yapılır (Tanaka ve Kawamoto 1999).

- **Membran Tipi Tutuklama Yöntemi**

Membran tipinde biyokatalizör, reaksiyon çözeltisinden ultrafiltrasyon membranı, mikrofiltrasyon membranı veya hollow-fiber ile ayrılmıştır (Tanaka ve Kawamoto 1999).

2.2.5. Uygun İmmobilizasyon Desteğinin Seçimi

Uygun bir destekte bulunması gereken bazı özellikler şunlardır: (Mateo ve ark. 2007)

- Destek, enzimin yüzeyi ile geometrik uyum içerisinde olmalı, eğer destek materyal proteinden daha küçük, çok ince fiberlerden oluşursa enzim ile destek materyal arasında az etkileşim olacaktır.
- Destek çok sayıda reaktif gruplara sahip olmalı, ancak destek üzerinde çok reaktif gruplar bulunursa, protein yüzeyinde fazla sayıda kovalent bağlanma gerçekleşir
- Protein ve destek üzerindeki reaktif gruplar, reaksiyonda minimum sterik engele sahip olmalı
- Destekteki reaktif gruplar, enzim yüzeyindeki başka gruplarla reaksiyona girebilmeli
- İmmobilizasyonu içeren reaktif gruplar, uzun süreli enzim-destek reaksiyonuna izin verecek kadar yeterli kararlılığa sahip olmalı

Bunların dışında immobilizasyonda kullanılacak destek materyalinde,

- Hidrofilik karakter
- Ucuzluk
- Zehirsizlik
- Mekanik dayanıklılık ve uygun partikül büyüklüğü
- Kimyasal ve termal dayanıklılık
- Mikroorganizmalara karşı dirençli olma
- Gözenekli yapı
- Suda çözünmeme
- Rejenere olabilme
- Kovalent bağlanmada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı

gibi bazı özellikler aranmaktadır (Carr ve ark. 1980).

Özet olarak; iyi bir destek materyali büyük yüzeyel alan, geçirgenlik, hidrofilik karakter, çözünmezlik, kimyasal, mekanik ve termal kararlılık, yüksek tutuculuk, uygun

biçim ve parça büyüklüğü, mikrobiyolojik saldırılara karşı direnç, sertlik, rejenerasyon kabiliyeti gibi özelliklere sahip olmalıdır.

2.2.6. İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Materyaller

Destek materyaller olarak polimerik mikroküreler farklı çeşitlilikteki düzenlemeleriyle kolayca üretilebilmeleri, farklı ligandlarla biyomoleküllerin immobilizasyonu ve çeşitli aktivasyon metotlarını tanıtarak immobilizasyon sistemleri için modifiye edilebilmelerinden dolayı çok fazla ilgi çekmişlerdir (Coradin ve Livage 2003), (Yodoya ve ark. 2003), (Demirel ve ark. 2004), (Deng ve ark. 2004), (Li ve ark. 2004), (Magnan ve ark. 2004). Mikrokürelerden p(HEMA) mikroküreler hidrofilik yapısı, yüksek mekanik ve kimyasal kararlılık, mikrobiyal ve enzimatik etkilere karşı dayanıklılık gibi özelliklerinden dolayı çok yönlü ve elverişli destek materyalleridir (Bajpai ve Sachdeva 2002), (Arıca ve ark. 2004).

Polistiren ve poliakrilamid gibi sentetik organik polimerler, dekstran ve selüloz gibi doğal polisakkarit içerikli hidrofilik biyopolimerler yaygın bir şekilde çalışılan polimerik desteklerdendir. Silikajel, alüminyum oksit ve apatit ise inorganik destek materyaller olarak tercih edilir. Organik polimerik taşıyıcılar, enzimlerle gerekli etkileşimi sağlayan zengin fonksiyonel gruplarına sahip olduğundan çok çalışılan materyaller olmuştur. Bununla birlikte organik destekler; atık konusu, organik çözücüler ve mikrobiyal saldırılara karşı zayıf kararlılık gibi problemler oluşturmaktadır.

Organik destekler; doğal polimerler, proteinler, aktif karbon ve sentetik polimerler olarak sınıflandırılabilir. Organik desteklere fazla sayıda ve çeşitli fonksiyonel gruplar katılabildiği için ticari olarak kullanılan pek çok immobilize enzim sistemi bu desteklerle hazırlanır (Chen ve ark. 1996). Yaygın olarak kullanılan polisakkarit desteklerinden olan yosunlar ve selülozlar (agaroz, dekstran, selüloz türevleri) enzimleri bağlamada ve aljinat ile karregenana ise hapsedme amacıyla kullanılır (Cabral ve ark. 1991), (Bachman ve ark. 2006). Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan polisakkarit türevlerinin en büyük avantajı hidroksil gruplarına sahip olmalarıdır. Polisakkarit desteklerde hidroksil grupları enzimlerin elektrofilik grupları ile etkileşerek enzim immobilizasyonu sağlanır. Bununla birlikte polisakkarit desteklerin nükleofilik özelliklerinin zayıf olması nedeni ile aktivasyon, alifatik veya aromatik, karboksil veya tiyol grupları ilavesi ile sağlanır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sentetik polimerler fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak çok kullanılırlar. Sentetik polimerler mikroorganizmaların saldırılarına karşı dirençlidirler ve saflıklarını korurlar. Yaygın olarak kullanılan sentetik taşıyıcılar polistiren, vinil ve allil polimerler, poliamitler, poliakrilatlar, polimetakrilatlar ve bunların türevleridir. Akrilik polimerler enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan asidik sentetik polimerlerdir. Bu polimerler, enzim hapsedme veya kovalent bağlama amacıyla kullanılmıştır. Poliakrilat ve polihidroksi alkil metakrilat ve bunların türevlerinin ticari olarak bulunması, enzim immobilizasyonu amacıyla kullanılmasına olanak sağlamıştır. Poliakrilat ve polimetakrilat, akrilik asit ve metakrilik asitlerin polimerizasyonu ile elde edilir. Akrilatlar esas olarak daha hidrofobik veya negatif yüklü matrislerin hazırlanmasında diğer organik bileşiklerle kopolimer oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Polihidroksi alkil metakrilatlar, hidrofilik organik matris olarak hidroksil gruplarının sayısına göre geliştirilmiş mekanik özelliklere sahiptirler ve biyolojik dirençleri yüksektir (Kennedy ve Cabral 1985), (Doğan 2008). Çizelge 2.1’ de enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri verilmiştir:

Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyaller (Kaetsu ve ark. 1979)

Doğal Polimer	Sentetik Polimer	Anorganik
Selüloz	Stiren esaslı polimerler	Kil
Nişasta	Akrilamid esaslı polimerler	Cam
Aljinat	Naylon	Silika jel
Karragenan	Vinil ve allil polimerler	Ponza taşı
Kollagen	Akrilat esaslı polimerler	Metaller
Jelatin	İyon değiştirici reçineler	Metal oksitler
Albümin	Maleik anhidrit polimerleri	Bentonit
İpek		

Bunların dışında enzim immobilizasyonunda nanofiberler ve nanopartiküller de kullanılmaktadır.

2.3. Polimerler

Monomerler birbirlerine kovalent bağla bağlanarak büyük moleküller oluşturabilen küçük mol kütleli kimyasal maddelerdir. Polimerler ise çok sayıda monomerin kovalent bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturduğu makromoleküllerdir. Tek tip monomerden elde edilen polimerlere *homopolimer* iki farklı monomerden elde edilen polimerlere ise *kopolimer* adı verilir.

Polimerlerin çok büyük moleküller olabileceğine yönelik ilk görüş 1920' de Staudinger tarafından ortaya atılmıştır. Staudinger' in bu önerisi 10 yıl sonra bilimsel alanda kullanılmaya başlanmıştır. Günlük hayatımızın hemen hemen her alanında kullanılan polimerlerle ilgili çalışmalar zaman içinde hızla gelişerek ayrı bir öneme sahip olmuştur (Saçak 2005).

2.3.1. Eş Boyutlu Partiküller

Protein adsorpsiyonu için adsorbent olarak kullanılan destek materyalin yapısı oldukça önemli bir faktördür. Çünkü partikül boyutu, toksisite, su alma kapasitesi, biyoyumluluk, hidrofilite ve hidrofobite gibi fiziksel ve kimyasal özellikler destek materyalin protein ile etkileşiminde oldukça önemlidir (Uzun ve ark. 2008). Son yıllarda, doğal veya sentetik polimerlere dayalı teknikler oldukça etkili ve ekonomik yöntemler olarak düşünülmektedir. Özellikle eş boyutlu partiküllerin üretimi için uygulanan polimerizasyon yöntemleri büyük bir önem arz etmektedir.

Eş boyutlu polimerik partiküller 10-100000 nm aralığında farklı polimerizasyon teknikleri ile sentezlenebilmektedir. Bu amaçla emülsiyon, dispersiyon, çöktürme çok-basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu teknikleri kullanılmaktadır. Eş boyutlu polimerik partiküller, biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalarda yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Çünkü küçük olmaları, spesifik yüzey alanına sahip olmaları, ucuz, yüksek mekanik özellikleri, proteinlerin immobilizasyonunda büyük bir kolaylık sağlamaktadır.

Eş boyutlu polimerik partikül üretimine yönelik farklı polimerizasyon teknikleri mevcuttur. Bunlar:

- Emülsiyon polimerizasyonu
- Dispersiyon polimerizasyonu
- Çöktürme polimerizasyonu
- Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu şeklindedir.

2.3.1.1. Emülsiyon Polimerizasyonu

En çok bilinen klasik emülsiyon polimerizasyonu mikron altı boyuta sahip eş boyutlu polimerik partikül eldesi için kullanılan en eski yöntemdir. Bu sistem aşağıdaki bileşenleri içerir:

- * Monomer
- * Dağıtma ortamı (su)
- * Suda çözünen başlatıcı (çoğunlukla ısı, anyonik veya katyonik özellikte)
- * Emülsiyon yapıcı madde (çoğunlukla anyonik, bazı durumlarda katyonik veya nötral polimerik yapıda).

2.3.1.2. Dispersiyon Polimerizasyonu

Bu yöntemde elde edilen partiküllerin boyutu emülsiyon polimerizasyonuna göre daha büyüktür. Genellikle alkol (metanol, etanol, n-bütanol gibi) ve alkol-su karışımları dağıtma ortamı olarak kullanılır. Dağıtma ortamının en önemli özelliği monomerin bu ortamda çözünmesi, oluşan polimerik partiküllerin ise çözünmemesidir. Polimerizasyon için genellikle alkol bazlı dağıtma ortamı içerisinde çözünebilir formda, benzoil peroksit (BPO), azobisisobütironitril (AIBN) gibi başlatıcılar kullanılır. Stabilizatör olarak dağıtma ortamı içerisinde çözünebilme özelliğine sahip polar polimerik yapılar (polivinil pirolidon, polivinil alkol gibi) kullanılır.

Isı etkisi ile polimerizasyonun başlaması ile başlatıcı-monomer radikalleri dağıtma ortamı içerisinde oluşur ve monomer birimlerinin eklenmesiyle radikal zincir uzunluğu artmaya başlar. Belli bir kritik molekül ağırlığına ulaşıldığında, oluşan radikalik oligomer zincirleri ortamda çözünmez hale gelir ve dağıtma ortamında çözülmüş formda olan polimerik stabilizör zincirlere dolaşarak, dağıtma ortamından küçük partiküller halinde ayrılırlar. Bu olay “çekirdeklenme”, oluşan yapılar da “birincil partiküller” olarak adlandırılır. Bu çökme olayı sırasında, stabilizör zincirlerine radikalik atak oluşumu da gerçekleşebilir ve stabilizör zincirleri bu mekanizma ile

çöken oligomerik zincirlere kovalent olarak da bağlanabilir. Bu aşamadan sonra polimerizasyon, oluşmakta olan partiküllere dağıtma ortamından monomer difüzyonu ile devam eder. İdeal bir dispersiyon sisteminde çekirdeklenme olayının bir kez ve hızlı olması istenir. Bu sayede ortamdaki bütün birincil partiküller aynı anda ve aynı monomer dönüşümünde oluşur. Bu durum sonuç ürünün eş boyutlu olmasını sağlar.

2.3.1.3. Çöktürme Polimerizasyonu

Çöktürme polimerizasyonu, genelde bir çapraz bağlayıcının varlığında yapılan dispersiyon polimerizasyonu şeklinde tanımlanır. Bu yöntemde polimerizasyon ya organik bazlı bir dağıtma ortamında gerçekleştirilmekte ya da suda çözünebilir çapraz bağlayıcı varlığında, su bazlı dağıtma ortamında uygulanmaktadır.

2.3.1.4. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu

Bu yöntemle sentezlenen monodispers-gözenekli partiküller özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Yöntemde öncelikle “lateks” adı verilen ve sulu ortamda kararlı formda dağılmış mikron altı boyutlu, küresel ve eş boyutlu polimerik bir çıkış maddesine ihtiyaç vardır. Genel olarak bu amaç için ortalama boyutu 1-4 µm aralığında olan eş boyutlu polistiren partiküller çıkış lateksi olarak kullanılmaktadır.

Polimerik yapılar hazırlama yöntemlerinden biri de süspansiyon polimerizasyonu şeklindedir. Bu yöntemde monomer uygun bir dağıtma ortamında süspansiyon haline getirilir, dağıtma ortamı genellikle sudur. Kontrol edilen sıcaklık programı ile monomerler küresel polimer partikülleri haline dönüşür. Bu yöntemle 10 µm’ den 10 mm’ ye kadar çok değişik boy aralığı ve dağılımında mikrotanecikler üretilebilmektedir (Denizli ve Küfrevioğlu 2009).

2.4. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (İMAK)

İmmobilize metal afinite kromatografisi, sabit bir destek üzerinde kovalent olarak bağlanmış şelat yapıcı bir grup tarafından tutulan bir metal iyonuna, sistein, histidin ve triptofan gibi dışarı ulaşabilen ve elektron verebilen amino asitlere sahip proteinleri bağlayarak işlev görür.

İmmobilize metal afinite kromatografisi' nin başlangıcı, Helfferich' in küçük moleküllerin 'ligand değişim kromatografisi' ni öne sürdüğü 1961' e kadar uzanmaktadır. Bu tekniğin temeli ve uygulamaları, Davankov ve Semechkin tarafından ayrıntılı bir biçimde gözden geçirilmiştir (Davankov ve Semechkin 1977). Daha sonra Porath, ligand değişimine de içine alan metal şelat etkileşim kromatografisinin genel ilkelerini kapsayan 'immobilize metal iyon afinitesi' terimini ileri sürmüştür (Porath ve ark. 1975). Porath bir protein molekülünün, metal iyon afinite etkileşimleri ile metal iyonlarına bağlanarak, saflaştırılabildiğini gözlemlemiştir.

Katı bir destek üzerine metal iyonunu immobilize etmek için şelatlayıcı bir ajanın kullanımı, protein-metal etkileşimlerinin serbestlik derecesini azaltır. Bu kısıtlama proteinlerin saflaştırılması ve ayrılmasına olanak sağladığı gibi, denatürasyonu azaltabilir ve aktivitesini koruyabilir.

İMAK, enzimler, hormonlar, nükleik asitler, peptidler ve terapötik proteinler için analitiksel ve preparatif ayırmada etkilidir. Ayırım, protein yüzeyindeki bir elektron akseptör grubuyla, bir şelatlayıcı metal iyonu, bir Lewis asidinin etkileşimine dayanır. Proteinlerin sistenin tiyol grubu, triptofanın indol grubu ve histidinin imidazol grupları üzerinden etkileşime girdiği varsayılmaktadır. Komşu amino asit zincirleri ile bölgesel yapı arasındaki etkileşim, protein bağlanmasında önemli rol oynar. Ayrıca aromatik amino asitler ve peptidlerin N-terminal ucu da bu bağlanmaya katkıda bulunur (Akgöl ve ark. 2009).

Metal afinite adsorpsiyonunda triptofanın indol, sistenin tiyol ve histidinin imidazol grubu gibi yüzeyde bulunan elektron verici amino asit kalıntıları, immobilize metalin bağlanmasına katkıda bulunurlar. Polimere ligandın bağlanması, metal şelasyonunun yanı sıra elektrostatik, hidrofobik ve van der Waal's etkileşimlerini de içermektedir. Proteinler, immobilize metal ile aralarındaki afinite sabitini azaltan bazı koşulların oluşması durumunda, komplekslerinden ayrılabilirler. Tuz derişimi ve pH değişimi veya bağlanmada görev alan amino asit kalıntılarına benzerliği bulunan yarışmacı bir ajanın ortama eklenmesi, proteini bağlı bulunduğu kompleksten uzaklaştırabilir (Odabaşı 2009).

2.5. α - Amilaz' ın Özellikleri

Mikroorganizmalar nişastayı parçalayan değişik enzimler üretirler. Bu sınıfa giren amilolitik enzimler endo amilazlar ve ekso amilazlar olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılırlar. Bir endo amilaz olan α - amilaz (endo- 1,4- α - D glukon glukonohidrolaz E.C.3.2.1.1) polisakkaritlerin iç kısmında bulunan α - 1 \rightarrow 4- o - glikozidik bağların hidrolizini katalizleyen ekstrasellüler bir enzimdir (Sivaramakrishnan ve ark. 2006). Bu grup enzimler aktiviteleri, yapı sağlamlığı ve stabiliteleri için kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duyarlar (Gupta ve ark. 2003). α - Amilaz bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı kaynaklardan elde edilebilmesine rağmen ticari ihtiyaçları karşılamada genellikle mikrobiyal enzimler tercih edilir. Günümüzde mikrobiyal amilazların büyük bir kısmı ticari olarak üretilmekte ve hemen hemen tamamı nişastanın kimyasal hidrolizinde önemli role sahiptirler (Gupta ve ark. 2003).

Amilazlar için farklı substratlar bulunur. Bunlar arasında, başta doğada bol miktarda bulunan patates, buğday, mısır, pirinç gibi bitkilerden elde edilen ham nişasta yer alır. Enzim substratını kullanarak önce dekstrine, son ürün olarak da glukoz, maltoz ve maltoz üniteleri içeren karbohidratlara dönüştürür (Somers ve ark. 1995). Nişastanın α - amilaz tarafından hidrolizi sonucu oluşan maltooligosakkaritler gıda, ilaç ve kimya endüstrilerinde önemli özelliklerinden dolayı kullanım alanı bulmuşlardır. Bunlar çocuklar ve yaşlılar için yüksek oranda besleyici gıdalar olup, kalori eksikliği çeken kişilerde besin olarak kullanılmaktadır (Kandra 2003).

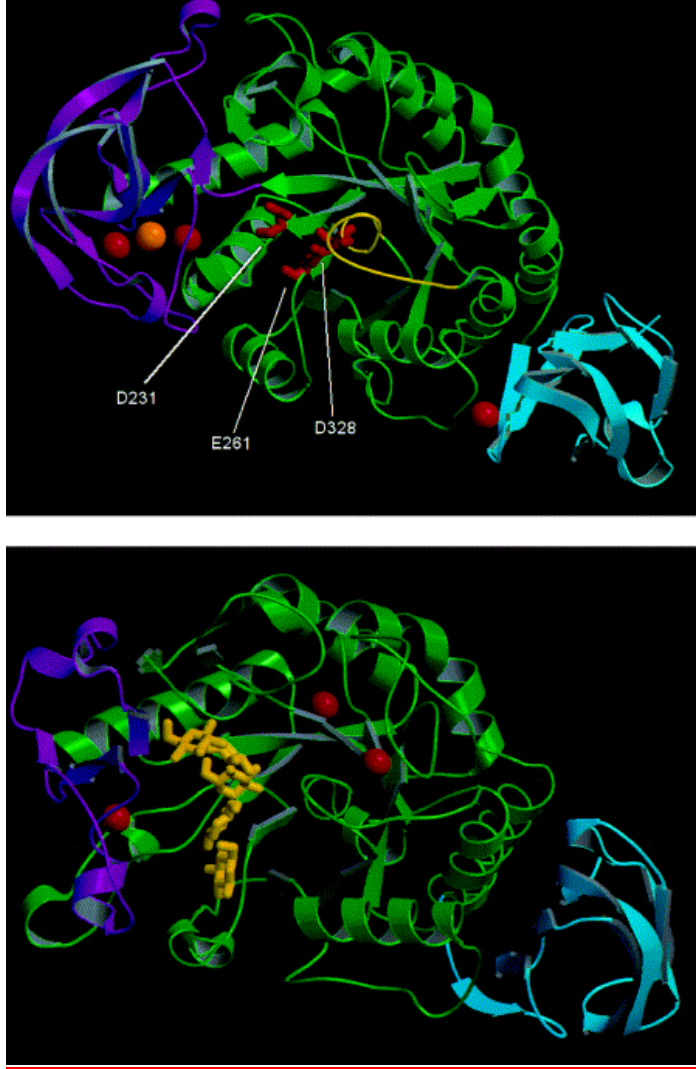
Amilazların optimum pH' ı pH : 2-12 arasında değişiklik gösterir (Vihinen ve ark. 1989). Bakteri ve mantarlarda bulunan α - amilazlar genel olarak asidik ve nötral pH' ta maksimum aktivite gösterirler (Van der Maarel ve ark. 2002). Bu enzimler genelde pH: 4-11 aralığında stabildirler, aynı zamanda düşük bir pH aralığında da stabil oldukları belirtilmiştir (Hamilton ve ark. 1999a), (Hamilton ve ark. 1999b), (Coronado ve ark. 2000).

α - Amilazların molekül ağırlıkları 10 kDa' dan 210 kDa' ya kadar çeşitlilik gösterir. Genel olarak mikrobiyal α - amilazların molekül ağırlıklarının ise 50-60 kDa aralığında olduğu belirlenmiştir (Vihinen ve ark. 1989).

Bir ekso amilaz olan β - amilaz (E.C.3.2.1.2) nişastanın indirgen olmayan ucundan başlayarak glikozidik bağları hidrolizler. Bir glukamilaz olan δ - amilaz

(E.C.3.2.1.3) amilopektinin dallanma noktalarındaki glikozidik bağları kırar (Sinnott 1990).

α - Amilazın yapısı Şekil 2.8' de gösterilmiştir:



Şekil 2.8. α -Amilazların yapı organizasyonları.

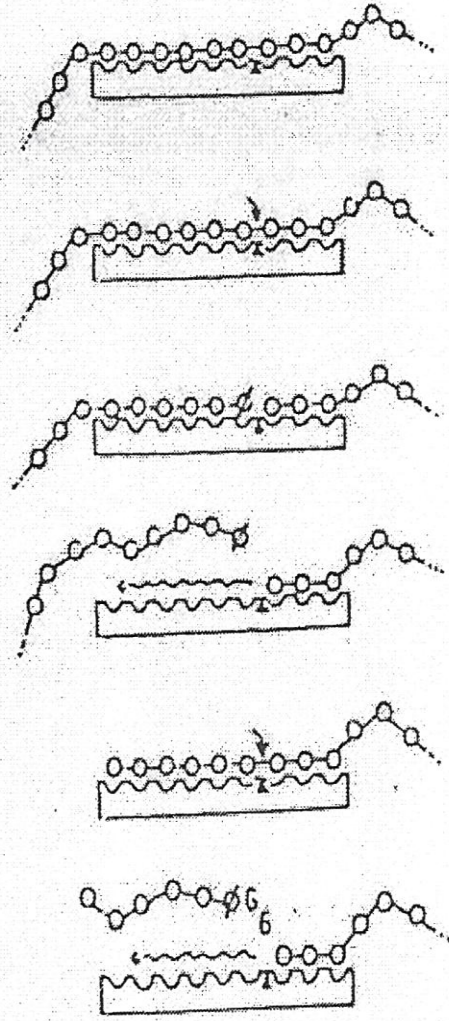
A bölgesi yeşil, B bölgesi morumsu ve C bölgesi turkuaz renkte görülmektedir. Sırasıyla kalsiyum iyonları ve sodyum iyonları kırmızı küre ve turuncu küre olarak gösterilmektedir. (A) *B. licheniformis* α -amilazıdır (PDB:1BLI). Aktif merkezde bulunan Asp231, Glu261 ve Asp328 aminoasitleri kırmızı renkte görülmektedirler. Sarı renkle gösterilerin bölge lobun $\beta 7'$ den $\alpha 7'$ e olan bağlanmasını ifade eder. (B) *B. subtilis* α -amilazını göstermektedir. Aktif merkezine maltopentoz (sarı renkte) bağlıdır (Bu

şekiller Molscript ve Raster3D programları ile hazırlanmıştır (Muralikrishna ve Nirmala 2005), (Richard ve ark. 2007).

2.5.1. α - Amilazın Etki Mekanizması

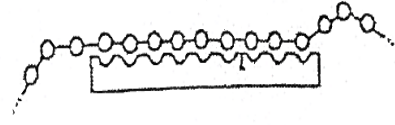
1963 yılına kadar α - amilazın nişastayı hidrolizleyip, glukoz moleküllerine dönüştürdüğü düşünülürken, *Bacillus* türü α - amilazların, amiloz üzerine etkisini konu alan çalışmada, maltotrioz (G3) ve maltoheksoz (G6)' un baskın olduğu bir karışımın ele geçtiği ortaya konmuştur (Robyt 1989). Böylece α - amilazın nişasta üzerine etkisinin rastgele olmadığı ortaya konmuştur. Şekil 2.9a ve 2.9b' de görüldüğü gibi, bu mekanizmaya göre α - amilaz üzerinde 9 glukoz kalıntısının bağlanabileceği bağlanma merkezleri bulunur. α - (1→4) bağı hidrolizleyen aktif merkezin, 3-4 nolu glukoz kalıntılarının bağlandığı bağlanma merkezleri üzerinde kaldığı belirtilmektedir. Buna göre, hidroliz işleminden sonra soldaki grup enzim üzerinden ayrılırsa, boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere, nişasta zinciri kendiliğinden sola doğru hareket eder, ürün olarak G6 oluşur. Hidrolizden sonra zincirin sağ tarafı ayrılırsa, nişasta zinciri boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sağa doğru kayar ve ürün olarak G3 meydana gelir. Amilopektinde ise, benzer mekanizma ile maltoz (G1), maltodiyoz (G2), maltotrioz (G3), maltoheksoz (G6) meydana gelir (Robyt 1989).

- Enzim-substrat kompleksi oluşur.
- Glikozidik bağ hidrolizlenir.
- Zincirin sol tarafı ayrılır.
- Zincirin sağ tarafı kendiliğinden bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sola kayar.
- G_6 ürününü vermek üzere glikozidik bağ hidrolizlenir.
- G_6 yi yeniden ürün olarak vermek üzere 4. ve 5. adımlar tekrarlanır.

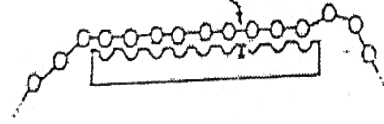


Şekil 2.9a. α - Amilazın etki mekanizması

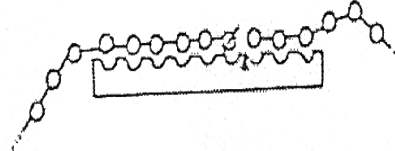
- Enzim-substrat kompleksi oluşur.



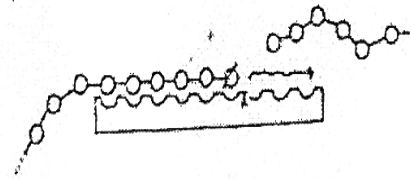
- Glikozidik bağ hidrolizlenir.



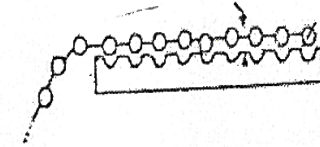
- Zincirin sağ tarafı ayrılır.



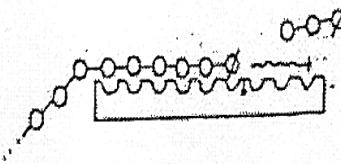
- Zincirin sol tarafı kendiliğinden bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sağa kayar.



- G₃ ürününü vermek üzere glikozidik bağ hidrolizlenir.



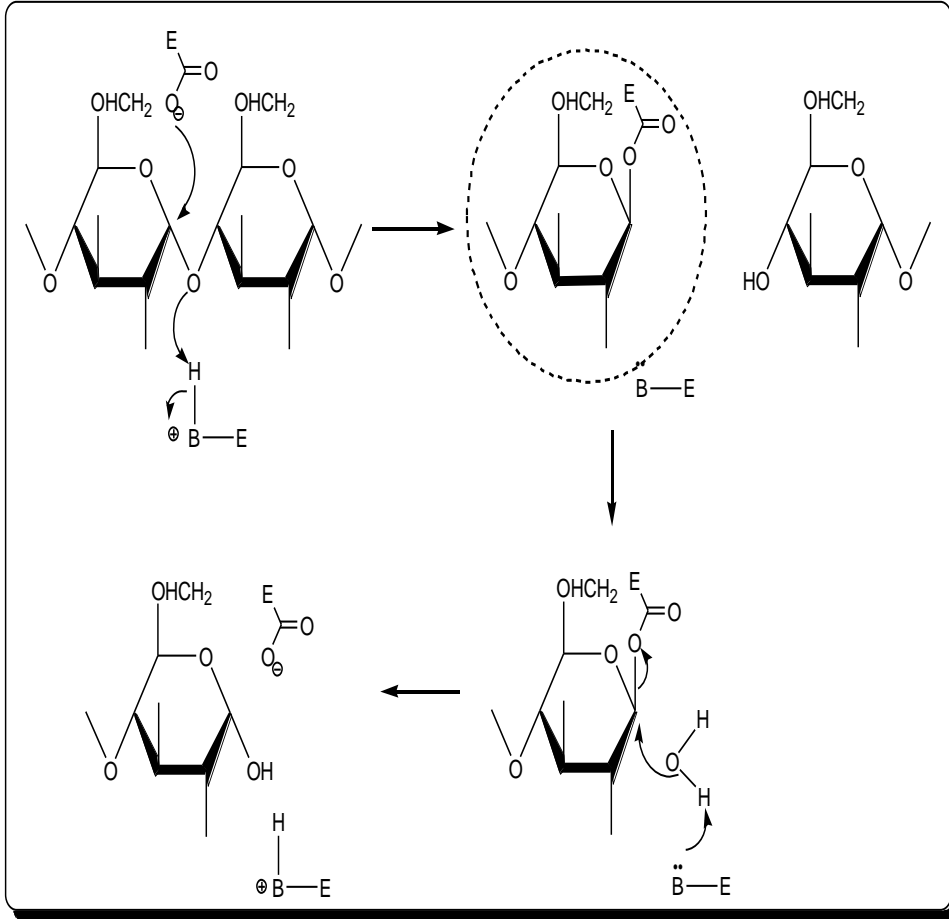
- G₃ ü ürün olarak vermek üzere 4. ve 5. adımlar tekrarlanır.



Şekil 2.9b. α - Amilazın etki mekanizması

Robyt, PPA (Porcine Pancreatic Amylase)' nin etki biçimini ^{13}C ile zenginleştirilmiş maltotetroz substratını kullanarak belirlemiştir. Bu yöntem, β -karboksil asetal ester varlığını ortaya çıkardı. Bu da α - (1 \rightarrow 4) glikozidik bağının hidroliz mekanizmasında görev alan glikozil bir enzimin işlev gördüğünün kanıtıdır. Burada PPA için çifte bir kovalent bağ yer değişimi söz konusudur ki bu enzimin aktif merkezinde bir karboksilat grubu, β - karboksil asetal vermek üzere α - (1 \rightarrow 4) glikozidik bağın 1 nolu karbonuna atak yapar. Bu da hemiasetal hidroksil grubu için bir α - konfigürasyonuna sahip bir ürün vermek üzere su tarafından hidrolizlenir (Şekil 2.10). Bu kovalent mekanizmanın sadece PPA için gösterilmesine rağmen, α -

amilazların katalitik gruplarını içeren yapısal özelliklerinin korunması, hidroliz mekanizmasının farklı α -amilazlar için de benzer olduğunu desteklemektedir.



Şekil 2.10. Kovalent bağ içeren α -(1-4) glikozit bağının PPA ile hidrolizi için çifte yerdeğişim mekanizması

E enzime, B ise elektrofilik katalitik gruba karşılık gelmektedir. Bir karboksilat anyonu β -karboksil asetal ester (daire içine alınan yapı) vermek üzere α -(1-4) bağlarını kıran karbon -1'e atak etmekte, bunun sonucunda α -konfigürasyonuna sahip bir ürün oluşmaktadır (Robyt 1989).

2.5.2. α -Amilazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Toplam enzim piyasasının en büyük grubunu oluşturan amilazlar, nişastayı temel alan endüstriler için en önemli enzimler arasındadır. Dünya genelinde 2005 yılı için enzim piyasasındaki değeri yaklaşık 2 milyar dolar olarak hesaplanmıştır (Burhan ve ark. 2003), (Erem ve ark. 2006).

Amilazlar tekstil, gıda, deterjan, kliniksel ve tıbbi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

2.5.2.1. α - Amilazların Ekmekçilikte Kullanımı

Amilazlar, ekmekçilikte fermentasyon sürecinin hızlanması, hamur vizkozitesinin azaltılması, ekmek hacminin artması, kaliteli kızarma ve daha yumuşak ekmek oluşumu amacıyla kullanılır (Dağışan 1997), (Gupta ve ark. 2003).

2.5.2.2. α - Amilazların Nişastayı Sıvılaştırmada ve Şekerlemede Kullanımı

α - Amilaz nişastayı hidrolizledikten sonra oluşan dekstrinler glukoamilazların etkisiyle glukozlara dönüşür. Bu işlem alkol, şeker ve biracılık endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Reddy ve ark. 2003).

2.5.2.3. α - Amilazların Deterjan Sanayinde Kullanımı

α - Amilazlar nişasta içeren kir ve lekelerin temizlenmesinde yardımcı olmaktadır. Ayrıca bulaşık makineleri deterjanlarına amilaz katılarak, nişasta içeren kurumuş yemek artıklarının çözünmesi sağlanmaktadır. Beyazlatıcı olarak kullanılan deterjanlarda amilaz enzimi oksidasyon sonucu stabilitesini kaybetmektedir. Bunu önlemek için son yıllarda bilim adamları, gen mühendisliğinde oksidasyona duyarlı aminoasitlerin yerini, oksidasyona dayanıklı aminoasitlerle değiştirerek enzimin stabilitesini sağlamışlardır. *B.licheniformis* tarafından salgılanan α - amilazın 197. pozisyonunda bulunan metionin aminoasidini lözin aminoasidi ile yer değiştirerek enzimin oksidasyona dayanıklı olması sağlanmıştır (Gupta ve ark. 2003).

2.5.2.4. α - Amilazın Tıp ve Klinik Kimyada Kullanımı

α - Amilaz pankreas ve tükürük bezlerinde salgılanır. Akut karın ağrılarının ayırıcı tanısında çok önemlidir. Akut pankreatitlerde değeri çok yükselir. Akut böbrek yetmezliğinde amilaz değeri normal üst değerin 5 katı veya üstünde değerlere çıkar. Oysa kronik böbrek hastalığında orta derecede artışlar söz konusudur.

Amilaz düzeyinde yükselme yapan nedenler ;

- Perfore peptik ülser
- Tükürük bezi hastalıkları
- Miyokard enfarktüsü

Akut alkol intoksifikasyonu

Diabetik ketoasidoz

şeklinde yazılabilir (Tokullugil ve ark. 1998).

2.5.2.5. α - Amilazın Tekstil Sanayinde Kullanımı

Tekstil ürünlerinin işlenme sürecinde dokumanın sertleştirilmesi ve gerilmesi önemli bir etkidir. α - Amilaz sıklıkla, bu işi gören çözüner nişasta içindeki dekstrin moleküllerini temizleyerek, nişastanın fazlasının uzaklaştırılması işlemini sağlar. Ayrıca α - amilazların kullanılmasıyla tekstil ürünlerindeki dokuma eğriliği düzeltilebilmektedir (Bruinenberg ve ark. 1996), (Schaechter 2009).

2.6. Önceki Çalışmalar

Arıca ve ark. (1998) çalışmalarında pHEMA/EGDMA mikroküreleri üzerine glukoamilazın immobilizasyonunu yapmışlardır. Çapları 50-100 μm ve 100-200 μm olan iki farklı boyuttaki pHEMA/EGDMA mikroküreler üzerine glukoamilaz kovalent olarak immobilize edildi. Küçük çaplı mikroküre üzerindeki enzim aktivitesinin, büyük çaplı mikroküreye göre neredeyse 2 kat daha fazla olduğu saptandı. Küçük çaplı mikroküre üzerinde yüklenen enzim miktarı 0.64 mg/g iken, büyük çaplı mikroküre için yüklenen enzim miktarı 0.40 mg/g olarak bulundu. Glukoamilazın K_m değerinin, immobilizasyondan sonra yaklaşık 5 kat arttığı, V_{max} değerlerinin ise büyük bir substrat olan dekstrinde, küçük bir substrat olan maltozunkinden daha yüksek bir değerde olduğu görüldü. 120. saatte bile immobilize glukoamilaz aktivitesinin sadece %9' unu kaybettiğinden dolayı, enzimin oldukça fazla kararlılık gösterdiği belirtildi.

Tümtürk ve ark. (2000) ECH ile aktive edilen p(St – HEMA) ve p(HEMA) mikroküreleri üzerine α - amilazı kovalent olarak immobilize ederek, enzim aktivitesi üzerine Ca^{2+} iyonlarının etkisini incelemişlerdir. Immobilize enzimin özelliklerini serbest enzimininki ile karşılaştırmışlardır. Analizleri 25 °C' de ve pH: 6.9' da yapmışlardır. Enzim aktivitesini ECH- p(HEMA) için % 61.7, p(St-HEMA) için ise % 67 olarak bulmuşlardır. Maksimum aktiviteyi düşük pH' larda ve yüksek sıcaklıklarda elde etmişlerdir. P(HEMA) ve p(St-HEMA) için serbest enzimin K_m değerlerini sırasıyla 2.51, 22.4, 6.62 g dm^{-3} , V_{max} değerlerini ise 1.67×10^{-3} , 1.63×10^{-3} , 1.35×10^{-3} g $\text{dm}^{-3} \text{dak}^{-1}$ olarak hesaplamışlardır.

Bir hafta saklamadan sonra, enzim bağı ECH ile aktive edilen p(HEMA) için enzim aktivitesini % 38.9 olarak bulmuşlardır. Öte yandan serbest enzimin 20 günde aktivitesini tamamiyle kaybettiğini gözlemlemişlerdir.

İmmobilizasyon, saklama kararlılığı ve tekrar kullanılabilme kapasitesi deneylerini, daha yüksek kararlılık gösteren Ca^{2+} iyonları varlığında da gerçekleştirmişlerdir. Ca^{2+} iyonları varlığında, 30 gün sonrasında bile enzim aktivitesini sırasıyla ECH ile aktive edilen p(HEMA) ve p(St-HEMA) için % 90.7 ve % 80 olarak bulmuşlardır.

Ayhan ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada p(EGDMA-HEMA) mikroküreler hazırlayarak üreaz enzimi için bazı kinetik parametreleri hesaplayıp, bu enzimin optimizasyonunu çalışmışlardır. İmmobilizasyon sıcaklığını 37 °C, pH'ı 5.5 olarak bulmuşlardır. Ayrıca 75 gün sonra bile enzimin % 75 orijinal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmada immobilize enzim için V_m : 3.318×10^{-4} $\mu\text{mol/sn}$, K_m : 15.94 mM serbest enzim için ise V_m : 1.074 $\mu\text{mol/sn}$, K_m : 14.49 mM olarak bulunmuştur.

Safarikova ve ark. (2003) organik faz olarak suya doygun olan 1- pentanol kullanarak, mikroemülsiyon yöntemi ile manyetik özellik taşıyan aljinat mikroküreler (çapı 25-60 μm) hazırlamışlardır. Hazırlanan aljinat mikroküreleri α - amilazın spesifik saflaştırılması için, manyetik afinite adsorbenti olarak kullanmışlardır. *Bacillus* ve domuz pankreasından α - amilazı, sırasıyla % 88 ve % 96 aktivite ile saflaştırmışlardır.

Bayramoğlu ve ark. (2004) reaktif membranlar üzerine termostabil α - amilazı immobilize ederek, kinetik parametreleri çalışmışlardır. Epoksi grubu içeren HEMA ve GMA'dan oluşturulan membranlar UV ile fotopolimerizasyon sonucu oluşturuldu. Destek maddesi üzerindeki epoksi grupları ve α - amilazın amino grupları arasında oluşan amid bağı aracılığıyla, enzim, p(HEMA-GMA) üzerine immobilize edildi. Membranın yapısındaki GMA miktarı arttıkça, α - amilazın immobilizasyon kapasitesinin de arttığı gözlemlendi. α - Amilazın optimum pH değerinin immobilizasyondan etkilenmediği, fakat pH profilinin geniş olduğu gözlemlendi. Immobilize α - amilazın K_m değerinin, serbest enziminkinden yaklaşık 2.3 kat daha yüksek olduğu, V_{max} değerinin ise serbest enziminkinden daha düşük olduğu görüldü. 120. saat ve 35 °C'de immobilize α - amilazın başlangıçtaki aktivitesinin sadece % 4'ünü kaybettiği belirtildi.

Li ve ark. (2004) üzerinde aldehit grupları taşıyan, yaklaşık 7 µm çapındaki (PMMA) mikrokürelerini sentezleyip, enzim immobilizasyonu için destek maddesi olarak kullanmışlardır. İmmobilize enzim özelliklerinin yanı sıra, immobilizasyon davranışlarını da çalışmışlardır. Destek maddesine bağlı enzim miktarını 76.8 mg/g olarak hesaplamışlardır.

Bayramoğlu ve ark. (2005b) p(HEMA-MAH) mikrokürelerini yüzey süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlayarak, sulu çözeltiden p (HEMA-MAH)-Ni(II) ve p (HEMA-MAH) mikroküreleri üzerinde üreazın immobilizasyonunu yapmışlardır. P(HEMA-MAH) ve p(HEMA-MAH)-Ni(II) mikroküreleri üzerinde immobilize olan üreaz miktarını sırasıyla, 47.8 mg/g ve 66.1 mg/g olarak hesaplamışlardır. Her iki şekilde immobilize edilen üreaz enzimlerinin K_m değerlerini serbest enzime kıyasla daha yüksek, V_{max} değerlerini ise daha düşük olarak bulmuşlardır. P(HEMA-MAH)-Ni(II) mikroküreleri üzerine immobilize edilen üreazın enzim kararlılığının zamanla arttığını görmüşlerdir. İmmobilize edilen her iki üreaz için optimum sıcaklığın, serbest enziminkinden 5 °C daha yüksek ve sıcaklık profilinin daha geniş olduğunu saptamışlardır. Bu mikrokürelere immobilize edilen enzim için, enzim aktivitesini ve adsorpsiyon kapasitesini kaybetmeden 5 defa tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir.

Park ve ark. (2005) çalışmalarında α -amilaz ve glukoamilazı değişik taşıyıcı yüzeyler üzerinde immobilize etmişlerdir. Çalışmada aljinat mikroküreleri üzerinde tutunan hidrofilik silikajel ve DEAE-selüloz en etkili taşıyıcı olarak seçildi. Taşıyıcıların hidrofilik ve hidrofobik karakterleri, sırasıyla polietilenimin ve silanlaştırma ile yapıldı. Hidrofilik taşıyıcılar üzerinde immobilize olan bütün koenzimlerin, her bir modelde en yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Hidrofilik silikajel için K_m : 0.102 mg/ml, mikroküreye tutunan DEAE-selüloz için K_m : 0.099 mg/ml olarak bulundu ve bu değerlerin serbest enzimin K_m (0.199 mg/ml) değerinden daha düşük olduğu gözlemlendi. Serbest enzimin bu K_m değerinin yüksek olması, immobilize enzimin substrata olan yüksek affinitesinden kaynaklandığı belirtildi. Nişastanın hidrolizi gerçekleştiğinde, immobilizasyondan sonra pH'nın 5'ten 5.5'e, optimum sıcaklığın 50 °C'den 60 °C'ye olan değişiminin, taşıyıcıların poliyonik karakterlerinden ve kovalent bağlanma yapısından ileri geldiğini belirlemişlerdir. Mikroküreye tutunan DEAE-selüloz üzerinde immobilize olan enzim ve silikajel

üzerinde immobilize olan enzimin, 10 kez kullanımdan sonra bile başlangıçtaki aktivitesini sırasıyla %88.9 ve %92.3 koruduğunu saptamışlardır.

Arıca ve ark. (2009) çalışmalarında gözeneksiz p(GMA/EGDMA) mikrokürelere süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlayıp, bu mikrokürelere bağlı uzatıcı bir kol üzerine lakkaz enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Düz (mikroküreye bağlı uzatıcı kolu olmayan) ve mikroküreye bağlı uzatıcı kol üzerindeki immobilize enzim miktarını sırasıyla 5.6 ve 4.9 mg/g olarak saptamışlardır. Lakkazın maksimum aktivitesini (V_{max}) ve Michaelis sabitini (K_m) sırasıyla 77.6 U/dak. ve 0.47 mM olarak bulmuşlardır.

Konieczna-Molenda ve ark. (2009) p(vinilformamid) ve p(vinilamin) destek maddeleri üzerine α -amilazı immobilize ederek, enzimin bu destekler üzerindeki performansını incelemişlerdir. α -Amilazı, değişik teknikler ve çapraz bağlayıcılar kullanarak polimerize edilen üç farklı p(vinilformamid) ve altı farklı p(vinilamin) hidrojelleri üzerinde immobilize etmişlerdir. Enzimi, spacer olarak glutaraldehit kullanarak destek maddesi üzerine kovalent olarak bağlamışlardır. Sıcaklık, pH, reaksiyon düzeni ve kullanılan taşıyıcı türleri gibi faktörleri çalışarak immobilizasyon sürecini optimize etmişlerdir. İmmobilizasyon ürünü ve kararlılığının yanı sıra immobilizasyondan önceki ve sonraki enzim aktivitesini değerlendirmişlerdir. İmmobilize edilen α -amilazın kararlılığı ve aktivitesi için, taşıyıcı seçiminin önemli olduğunu belirleyerek nişastanın hidrolizi için, çeşitli uygulamalarla sağlanan yüksek aktiviteli biyokompozit örnekleri tasarlamışlardır.

Sedaghat ve ark. (2009) setil trimetilamonyum bromür (CTMAB) ile modifiye edilmiş bentonit ve Na-bentonit üzerine α -amilazın immobilizasyonunu yapmışlardır. Serbest ve immobilize α -amilaz için en yüksek enzim aktivitesi 0.1 M pH: 6.2 fosfat tamponunda elde edildi. İmmobilize α -amilaz ile nişasta hidrolizinin kinetik çalışmaları yapılarak, serbest α -amilaz ile karşılaştırıldı. Na-bentonit üzerinde immobilize olan α -amilaz için K_m 'de 4.2 kat artma, V_{max} 'ta 6.2 kat azalma; CTMAB ile modifiye edilen bentonit üzerine immobilize edilen α -amilaz için ise K_m 'de 4.2 kat artma, V_{max} 'ta 7.1 kat azalma gözlemlendi.

Çorman ve ark. (2010) *Trametes versicolor* lakkaz immobilizasyonu için histidin içeren nanokürelere kullanmışlardır. Bunun için serbest emülsiyon polimerizasyonu ile

ortalama 158.2 nm boyutunda p(HEMAH) nanokürelerini hazırlamışlardır. MAH, metakroil klorür ve L-histidin metil ester kullanarak sentezlendikten sonra nanokürelere metal ligand olarak Cu (II) iyonları bağlandı. P(HEMAH) nanokürelerinin spesifik yüzey alanı 1454 m²/g olarak bulundu. P(HEMAH) nanoküreleri taramalı elektron mikroskobu ve infrared spektroskopisi ile karakterize edildi. Maksimum lakkaz adsorpsiyonunun pH 6.0' da olduğu gözlemlendi. Lakkazın p(HEMAH)-Cu(II) nanoküreleri ile adsorpsiyon kapasitesini kaybetmeden defalarca kullanılabilirdiği saptandı.

Sarı ve ark. (2011) poli(etilenglikol dimetakrilat-N-metakroil-(L)-histidin) [poli(EDMA-MAH)] mikroküreler hazırlayarak insülin adsorpsiyonunu incelemişlerdir. Çalışmada mikrokürelerin karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM), FTIR, şişme testi, element analizi gibi parametrelerle belirlendi. Adsorpsiyon deneyleri pH, sıcaklık, protein konsantrasyonu ve iyonik şiddet gibi farklı koşullarda gerçekleştirildi. Maksimum insülin adsorpsiyon kapasitesi 24.7 mg insülin/g poli(EDMA-MAH) olarak bulundu. Protein için 10 kez tekrarlanabilir sonuç elde edildi.

Kumari ve ark. (2011) çitosan ve amberlit MB-150' den hazırlanan mikroküreler üzerine soya fasülyesinden saflaştırılan α -amilaz enzimini immobilize ederek, optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Çitosan ve amberlit MB-150 ile maksimum immobilizasyon sırasıyla, %62 ve %70.4 olarak bulundu. Çitosan ve amberlit MB-150 üzerine immobilize olan α -amilaz için optimum pH sırasıyla, 8.0 ve 7.0, serbest enzim için ise optimum pH 5.5 olarak bulundu. Serbest enzim ve çitosan üzerinde immobilize olan enzim için optimum sıcaklık 70 °C, amberlit MB-150 üzerinde immobilize olan enzim için ise optimum sıcaklık 75 °C bulundu. Amberlit üzerinde immobilize olan α -amilaz için K_m : 2.5 mg/ml, çitosan üzerinde immobilize olan α -amilaz için ise K_m : 4 mg/ml olarak bulundu. Çitosan ve amberlit için 10 kez kullanımdan sonra enzim aktivitelerini sırasıyla, %38 ve %58 olarak bulmuşlardır.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Amilaz (From *Bacillus sp.* Type II-A), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), etilenglikoldimetakrilat (EGDMA), toluen, benzoil peroksit, polivinil alkol (PVA), $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, etanol, çözünen nişasta, NaOH, etilasetat, 3,5-dinitrosalisilik asit

3.2. Kullanılan Cihazlar

Mekanik karıştırıcı (Heidolph)
Hassas terazi (Gec Avery)
pHmetre (Mettler-Toledo)
Sıcaklık kontrollü çalkalayıcı (Julabo, SW23)
Manyetik karıştırıcı (Heidolph)
Spektrofotometre (UV mini 1240 UV-Vis spectrophotometer Shimadzu)
Atomik absorpsiyon spektrometresi (Unicam, model 929)
Santrifüj (MSE MISTRAL 2000)

3.3. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması

Bernfeld reaktifinin hazırlanması Ek-1 kısmında verilmiştir.

3.4. Tampon Çözeltiler

Tampon çözeltiler Ek-2 kısmında verilmiştir.

3.5. MAH Sentezi

MAH, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı tarafından aşağıdaki prosedüre göre sentezlenmiştir: (Garipcan ve Denizli 2002).

5.0 g L-histidin metilester ve 0.2 g hidrokinon 100 ml diklorometan içinde çözüldü. Çözelti 0 °C'de soğutulduktan sonra 12.7 g trietilamin ilave edildi. Ardından 5 ml metakriloil klorür yavaşça bu çözeltiliye katılarak 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon sonunda, reaksiyona girmeyen metakriloil klorür % 10 NaOH ile ekstrakte

edildi. Sulu faz evapore edildikten sonra MAH etanol ve etilasetat içinde kristallendirildi.

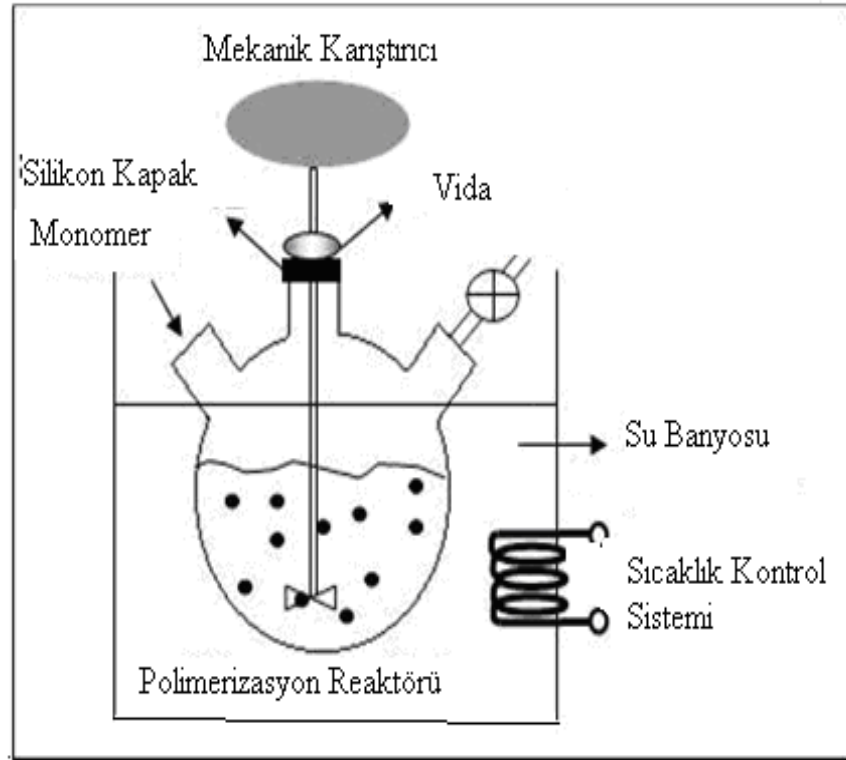
3.5.1. P (HEMA-MAH) Mikrokürelerinin Hazırlanması

Komonomerler HEMA ve MAH, başlatıcı ve stabilizatör olarak sırasıyla benzoil peroksit (BPO) ve polivinilalkol (PVA) kullanılarak polimerleştirildi. Toluen por oluşturucu, EGDMA ise karşıt-bağlayıcı olarak ortama ilave edildi. Çözelti önce 65 °C’ de 4 saat, ardından 90 °C’ de 2 saat 600 rpm’de karıştırılarak polimerizasyon gerçekleştirildi. Çizelge 3.1’ de polimerizasyon koşulları verilmektedir. Polimerizasyon reaksiyonu sonunda oluşan mikroküreler su ve etanol ile yıkanarak reaksiyona girmeyen maddeler ortamdaki uzaklaştırıldı.

P(HEMA-MAH) mikrokürelerinin hazırlanması için kullanılan polimerizasyon sistemi Şekil 3.1’ de verilmektedir:

Çizelge 3.1. p(HEMA-MAH) mikroküreleri hazırlamak için polimerizasyon şartları

Sulu dispersiyon faz	Organik faz	Polimerizasyon şartları
Saf su: 50 ml PVA: 0.2 g	MAH: 500 mg HEMA: 4.0 ml EGDMA: 8.0 ml Toluene: 12 ml BPO: 0.1 g	Reaktör hacmi: 100 ml Karıştırma hızı: 600 rpm Sıcaklık ve zaman: ilk 4 saat 65 °C, daha sonra 2 saat 90 °C



Şekil 3.1. p(HEMA-MAH) mikrokürelerinin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon sistemi (Yılmaz 2007)

3.6. Şişme Testi

P(HEMA) ve p(HEMA-MAH) mikroküreler için su bağlama kapasitesi saf su içinde yapıldı. Mikroküreler tartılarak 15 ml' lik falkon tüplere bırakıldı ve 3 ml saf su ilave edilerek 25 °C' de 2 saat bekletildi. Mikroküreler sulu ortamdan alınarak filtre kağıdıyla süzüldü ve tekrar tartıldı. Kuru ve ıslak mikrokürelerin ağırlıkları belirlenerek su içerikleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Şişme derecesi: } (W_s - W_o / W_o) \cdot 100 \quad (3.1)$$

W_o ve W_s sırasıyla mikrokürenin su bağlamadan önceki ve sonraki ağırlıkları olarak gösterildi.

3.7. Yüzey Morfolojisi Deneyi

Mikrokürelerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopunda (JEOL, JEM 1200EX, Tokyo, Japan) gözlendi. Bunun için mikroküreler oda sıcaklığında kurutuldu

ve vakum altında ince bir altın tabaka (100 Å kadar) ile kaplandı. Taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntülendi.

3.8. P(HEMA-MAH) Mikroküreler Üzerine Cu (II)' nin Bağlanması

P(HEMA-MAH)-Cu(II) bağlı mikrokürelerin hazırlanması için, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ile 1000 ppm'lik Cu(II) çözeltisi hazırlandı.

1.0 g mikroküre 50 ml, 50 ppm Cu^{+2} (pH: 5.0, 0.1 HCl veya NaOH ile ayarlanmış) çözeltisi ile oda sıcaklığında 24 saat 100 rpm'de karıştırıldı. 1000 ppm'lik standart çözelti için Cu^{+2} iyon kaynağı olarak kullanıldı. Daha sonra Cu^{+2} konsantrasyonu AAS ile tayin edildi. Adsorbe olan Cu^{+2} miktarı başlangıç çözeltisi ve 24 saat sonra alınan örnek çözeltiden yararlanarak bulundu. Mikrokürelerden Cu^{+2} sızıntısı olup olmadığı pH 5.0- 8.0 ve 0.1 M NaCl içeren 0.1 M fosfat tamponu (pH: 7.0) ile araştırıldı. Bunun için mikroküre süspansiyonu 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra üst sıvıdan Cu^{+2} konsantrasyonu AAS ile ölçüldü (Kara ve ark. 2005).

3.9. α - Amilaz Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

P(HEMA-MAH)-Cu(II) mikrokürelere α - amilazın adsorpsiyonu için, mikroküreler 4 ml α - amilaz çözeltileri (0.5 mg/ml) ile 120 dak. 150 rpm' de karıştırıldı. İmmobilizasyon deneylerinde enzim adsorpsiyonu üzerine pH ve sıcaklığın etkisi, immobilize enzim aktivitesi üzerine pH ve sıcaklığın etkisi, kinetik parametreler (K_m , V_{max}), tekrar kullanılabilirlik gibi parametreler incelendi. Çözelti ortamındaki α - amilaz derişimi 280 nm' de okundu.

α - Amilazın adsorpsiyon kapasitesi aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplandı.

$$Q = (C_o - C) \cdot V/m \quad (3.2)$$

Q: Mikroküre üzerine adsorbe olan amilazın miktarı (mg/g)

C_o : Mikroküre ile amilaz etkileştirilmeden önceki enzim derişimi (mg/ml)

C: Mikroküre ile amilaz etkileştirildikten sonraki enzim derişimi (mg/ml)

V: Hacim (ml)

m: Kullanılan mikrokürenin ağırlığı (g)

Deneysel aşamalar sonunda mikroküreye bağlı α - amilaz 1 M NaCl içeren 0.1 M fosfat tamponu (pH: 8.0) ile desorbe edilerek, mikroküreler tekrar kullanıldı.

3.10. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivite tayinleri Bernfeld yöntemine göre yapıldı (Bernfeld 1955). Enzim immobilize olan mikroküreler 5 dak. 5000 rpm' de santrifüjlenerek üst sıvı ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra mikroküreler 0.1 M fosfat tamponu (pH: 6.0) ile çözeltide enzim aktivite görülme-yene dek yıkandı (yaklaşık 3 kez). 0.1 M fosfat tamponu (pH: 6.0) içinde hazırlanan nişasta çözeltisinden (%0.1 w/v) 5 ml alınarak enzim immobilize edilen mikrokürelere katılarak 25 °C' de 30 dak. karıştırıldı. Daha sonra ortamdaki alınan örneğe 400 µl DCA ilave edilerek 5 dak. kaynar su banyosunda bırakıldı. Tüpler oda sıcaklığına geldikten sonra üzerlerine 8 ml saf su ilave edilerek karıştırıldı. Her örneğin 489 nm' de absorbans değerleri okundu.

Serbest enzim aktivitesi için 150 µl enzim çözeltisi ile 250 µl nişasta çözeltisi (%0.1; pH: 6.0) 25 °C' de 30 dak. inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivite tayini yukarıdaki prosedüre göre yapıldı.

Bir enzim ünitesi, standart koşullarda dakikada 1 µmol maltoz oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.11. Standart Maltoz Eğrisi

Belli bir derişimde hazırlanan (1 mg/ml)maltoz çözeltisinden farklı miktarlarda alınarak DCA ile etkileştirildikten sonra 489 nm' de absorbans değerleri okundu.

Maltoz derişimlerine karşılık absorbans değerleri grafiğe geçirilerek standart maltoz eğrisi elde edildi (Şekil 4.3).

3.12. pH ve Sıcaklığın Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi

Eşit miktarlarda (0.5 g) tartılmış ve 2 saat uygun tamponda bekletilmiş mikroküreler ortamda tampon çözelti uzaklaştırıldıktan sonra aynı pH' da 4 ml enzim çözeltileri (0.5 mg/g) ile 2 saat 150 rpm' de farklı pH' larda (5.0-6.0-6.5-8.0) karıştırıldı. İmmobilizasyon öncesi ve immobilizasyon sonrası 280 nm' de okunmuş olan protein miktarından yararlanarak pH' a bağlı olarak mikrokürelere tutunmuş olan enzim miktarı (3.2) numaralı eşitliğe göre hesaplandı.

Eşit miktarlarda (0.5 g) tartılmış ve 2 saat uygun tamponda bekletilmiş mikroküreler ortamda tampon çözelti uzaklaştırıldıktan sonra aynı pH' da 4 ml enzim çözeltileri (0.5 mg/ml) ile 2 saat 150 rpm' de farklı sıcaklıklarda (15-25-30-37 ve 40°C)

karıştırıldı. İmmobilizasyon öncesi ve immobilizasyon sonrası 280 nm’ de okunmuş olan protein miktarından yararlanarak sıcaklığa bağlı olarak mikrokürelere tutunmuş olan enzim miktarı (3.2) numaralı eşitliğe göre hesaplandı.

3.13. Serbest Enzimin Özelliklerinin Belirlenmesi

3.13.1. Optimum pH’ın Belirlenmesi

Serbest enzimin optimum pH’ ı relatif aktivitesinin ölçülmesiyle belirlendi. Farklı pH’ larda (0.1 M asetat tamponu, pH: 5.0 ; 0.1 M fosfat tamponu, pH: 6.0-6.5-7.0-8.0) hazırlanmış olan enzim çözeltisinden (0.5 mg/ml)150 µl alınarak aynı pH’ larda hazırlanan 250 µl, % 0.1 nişasta çözeltisi ile etkileştirilerek 25 °C’ de 30 dak. inkübasyona bırakıldı. Enzim aktivitesi daha önce belirtilen şekilde 489 nm’ de okundu.

3.13.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Serbest enzimin optimum sıcaklığı relatif aktivitesinin ölçülmesiyle belirlendi. Uygun pH’ da hazırlanmış olan enzim ve nişasta çözeltisi 20-25-30-37-40 ve 50°C’ lerde 30 dak. inkübe edilerek enzim aktivitesi ölçüldü.

3.14. İmmobilize Enzimin Özelliklerinin Belirlenmesi

3.14.1. Optimum pH’ın Belirlenmesi

İmmobilize enzimin optimum pH değeri 25 °C’ de pH:5.0-6.0-6.5-7.0-8.0 arasında amilaz aktivitesinin ölçülmesiyle saptandı. İmmobilize enzimlere farklı pH’ larda (5.0-6.0-6.5-7.0-8.0) hazırlanan % 0.1 nişasta çözeltileri eklenerek inkübasyona bırakıldı. Ardından 489 nm’ de enzim aktivitesi ölçüldü.

3.14.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

İmmobilize enzimler farklı sıcaklıklarda (20-25-30-37-40 ve 50°C) % 0.1 nişasta çözeltisi ile birlikte inkübasyona bırakıldı. Enzim aktivitesi deney prosedürüne göre ölçülerek immobilize enzimin optimum sıcaklık değeri belirlendi.

3.15. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize α- amilaz için maksimum hız (V_{max}) ve Michaelis sabiti (K_m) 0.1 M fosfat tamponunda (pH: 6.0) aynı deney koşulları altında hızların

ölçülmesiyle hesaplandı. Bu amaçla, serbest ve immobilize α -amilaz % 0.075-0.1-0.125-0.150 ve 0.175' lik nişasta çözeltileri ile etkileştirilerek, enzim aktivite tayini yapıldı.

3.16. Tekrar Kullanılabilirlik

Tekrar kullanılabilirliğin belirlenebilmesi için immobilize enzim 25 °C' de pH: 6.0, 0.1 M fosfat tamponu içinde hazırlanmış % 0.1 nişasta çözeltisi ile 25 °C'de 30 dak. inkübasyona bırakıldı ve reaksiyon sonunda aktivitesi ölçüldü. Daha sonra bu enzim, immobilizasyon işlemi sırasında kullanılan 0.1 M fosfat tamponuyla (pH: 6.0) yıkanarak tekrar 25 °C' de % 0.1 nişasta çözeltisi ile inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivite tayini yapıldı. Bu işlem arka arkaya 5 kez tekrarlandı ve immobilize enzimin aktivitesini kaçınıcı kullanımdan sonra kaybetmeye başladığı belirlendi.

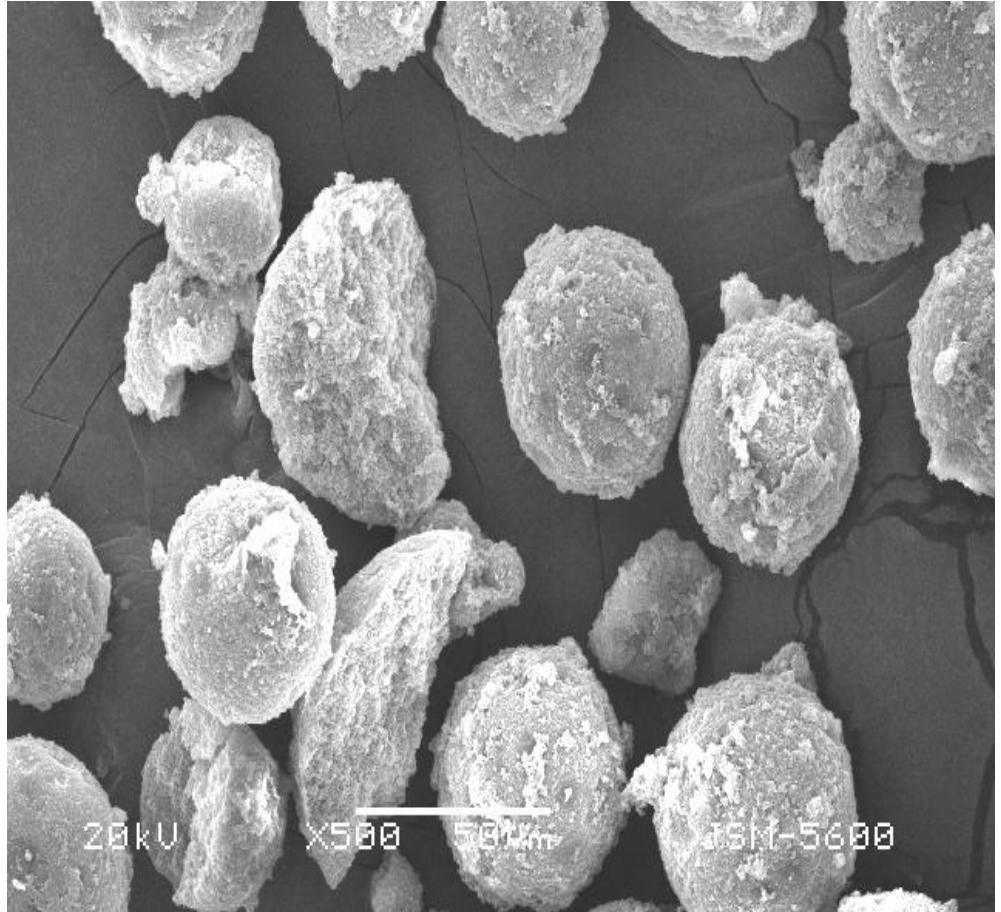
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Şişme Deneyi

Yapılan şişme deneyinde p(HEMA) ve p(HEMA-MAH) için Eşitlik 3.1' den yararlanılarak % şişme dereceleri bulundu. P(HEMA) için şişme derecesi % 40 iken, p(HEMA-MAH) için % 50 olarak hesaplandı.

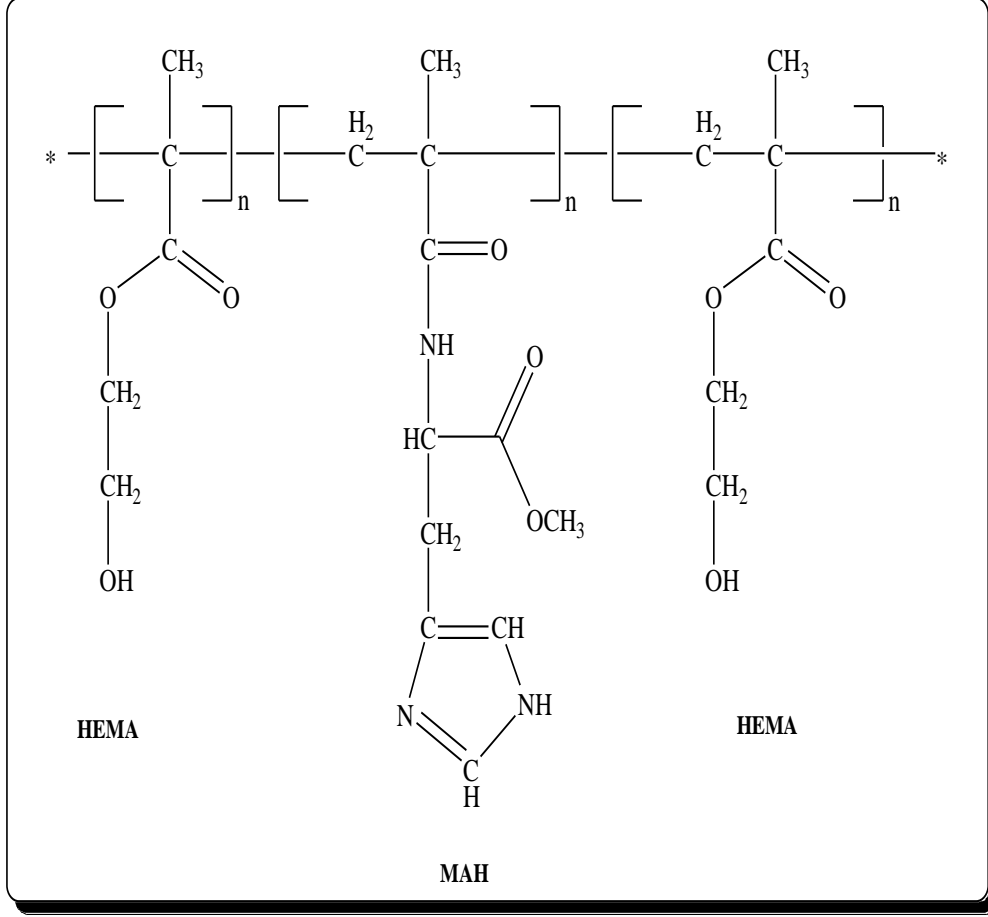
4.2. Yüzey Morfolojisi

SEM analizinde, p(HEMA-MAH) mikrokürelerinin küresel formda ve boyutlarının 40-100 µm olduğu gözlemlendi. Bu mikrokürelerin SEM görüntüleri Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. P(HEMA-MAH) mikrokürelerinin SEM görüntüsü

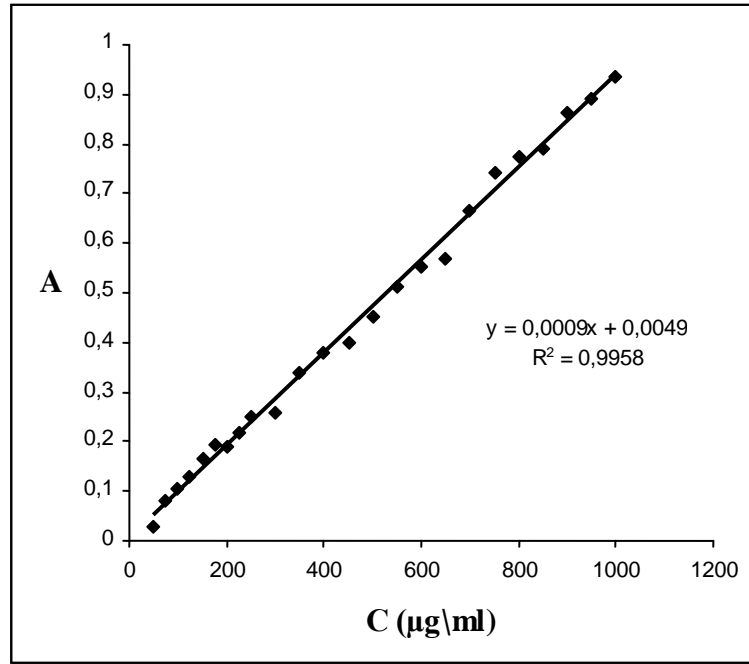
P(HEMA-MAH) mikrokürelerinin olası yapıları Şekil 4.2' de gösterilmiştir:



Şekil 4.2. P(HEMA-MAH) mikrokürelerinin molekül yapıları (Yılmaz 2007)

4.3. Standart Maltoz Eğrisinin Belirlenmesi

Kısım 3.11.' de belirtilen şekilde hazırlanan standart maltoz eğrisi Şekil 4.3' te verilmiştir.

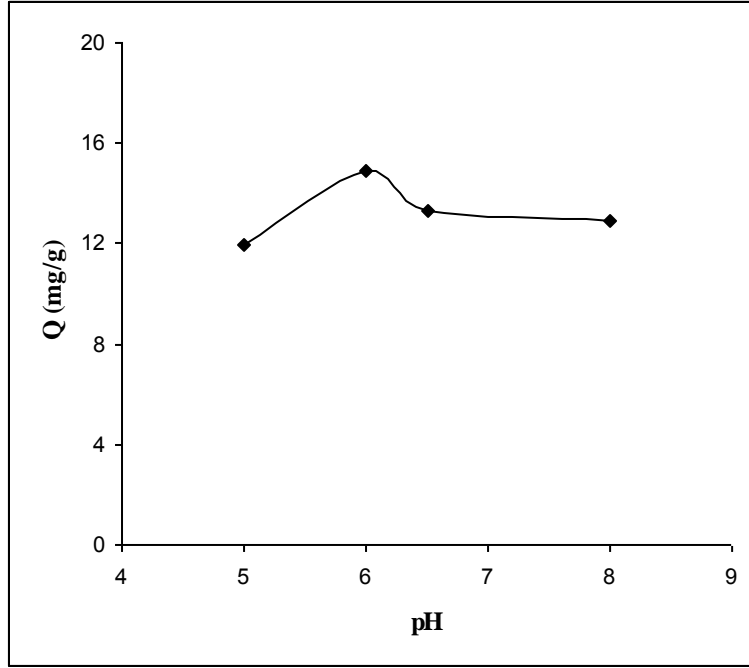


Şekil 4.3. Standart maltoz eğrisi

4.4. pH' nın Enzim Adsorpsiyonu Üzerine Etkisi

Mikrokürelere farklı pH' larda (pH: 5.0-6.0-6.5 ve 8.0) immobilize edilen enzimin başlangıç ve immobilizasyon sonrası protein miktarı 280 nm' de okundu. Daha sonra pH' a bağlı olarak mikrokürelere tutunan enzim miktarları (Q) Eşitlik 3.2' den yararlanılarak hesaplandı. Çizelge 4.1' de pH ve Q (mg\g) değerleri verilmiştir. Elde edilen veriler ise Şekil 4.4' te gösterilmiştir:

Çizelge 4.1. Enzim adsorpsiyonu üzerine pH' nın etkisi	
pH	Q (mg\g)
5.0	11.94
6.0	14.88
6.5	13.29
8.0	12.9



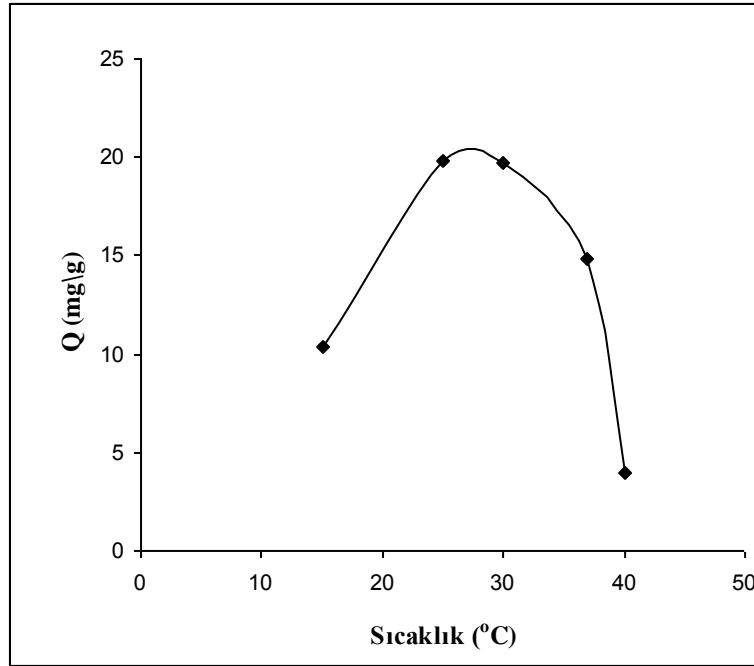
Şekil 4.4. Enzim adsorpsiyonu üzerine pH' nın etkisi

Şekil 4.4' te gürüldüğü gibi enzim adsorpsiyonunun en yüksek olduğu pH, 6.0 olup maksimum adsorpsiyon kapasitesi Q: 14.88 mg\g olarak bulundu. Enzim adsorsiyonunun en düşük olduğu pH 5.0' te ise Q değeri 11.94 mg\g olarak bulundu.

4.5. Sıcaklığın Enzim Adsorpsiyonu Üzerine Etkisi

Kısım 3.12' de belirtildiği gibi, sıcaklığın enzim immobilizasyonu üzerine etkisi 15-25-30-37 ve 40 °C' lerde geręekleŐtirdi. BaŐlangıçtaki ve immobilizasyon sonrasındaki protein miktarı 280 nm' de okunarak, sıcaklığa bağlı olarak mikrokürelere tutunan enzim miktarları (Q) EŐitlik 3.2' den yararlanılarak hesaplandı. Elde edilen veriler izelge 4.2 ve Őekil 4.5' te gűsterilmiŐtir.

Çizelge 4.2. Enzim adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisi	
Sıcaklık (°C)	Q (mg/g)
15	10.32
25	19.84
30	19.68
37	14.88
40	3.99



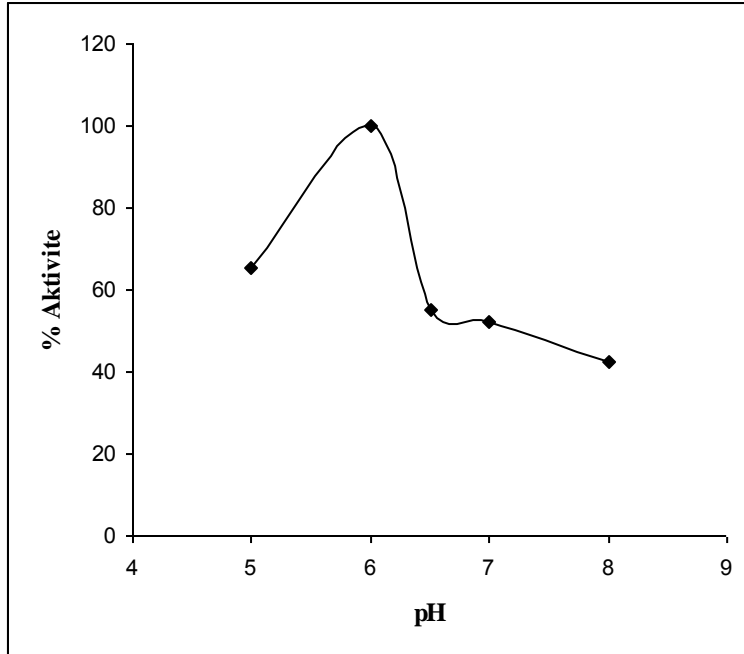
Şekil 4.5. Enzim adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisi

Şekil 4.5’ te görüldüğü gibi enzim adsorpsiyonunun en yüksek olduğu sıcaklık 25°C’ olup, maksimum adsorpsiyon kapasitesi Q: 19.84 mg/g olarak bulundu. Enzim adsorpsiyonunun en düşük olduğu 40°C’ de ise Q değeri 3.99 mg/g olarak bulundu.

4.6. Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi

Farklı pH' larda (pH: 5.0-6.0-6.5-7.0 ve 8.0) hazırlanan enzim çözeltileri aynı pH' larda hazırlanan nişasta çözeltileri ile etkileştirildikten sonra aktivite tayinleri yapıldı. Enzim aktivitesi 489 nm' de elde edilen absorbans değerlerine göre relatif aktivite olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6' da verilmiştir:

Çizelge 4.3. Serbest enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	
pH	% Aktivite
5.0	65.5
6.0	100.0
6.5	55.24
7.0	52.18
8.0	42.58



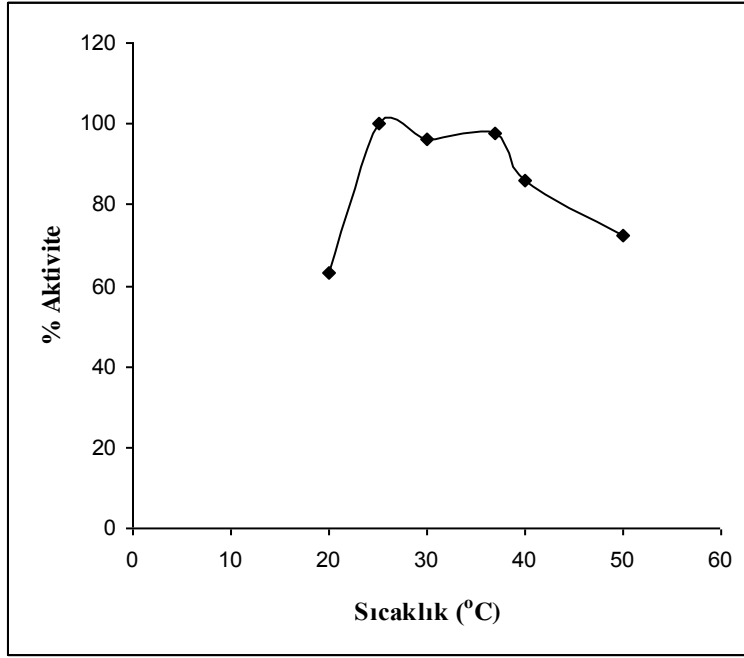
Şekil 4.6. Serbest enzim aktivitesi üzerine pH' nın etkisi

Şekil 4.6' da görüldüğü gibi serbest enzim için maksimum aktivite % 100 baz alınarak pH: 6.0' da gözlemlendi. En düşük aktivite ise % 42.58 ile pH: 8.0' da görüldü.

4.7. Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Belirlenen optimum pH'da (pH: 6.0) etkileştirilen enzim-nişasta çözeltileri farklı sıcaklıklarda 30 dak. inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivite tayini yapılarak sıcaklık- % aktivite değerleri grafiğe geçirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4 ve Şekil 4.7' de gösterilmiştir:

Çizelge 4.4. Serbest enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	
Sıcaklık (°C)	% Aktivite
20	63.03
25	100.0
30	96.36
37	97.86
40	86.2
50	72.34



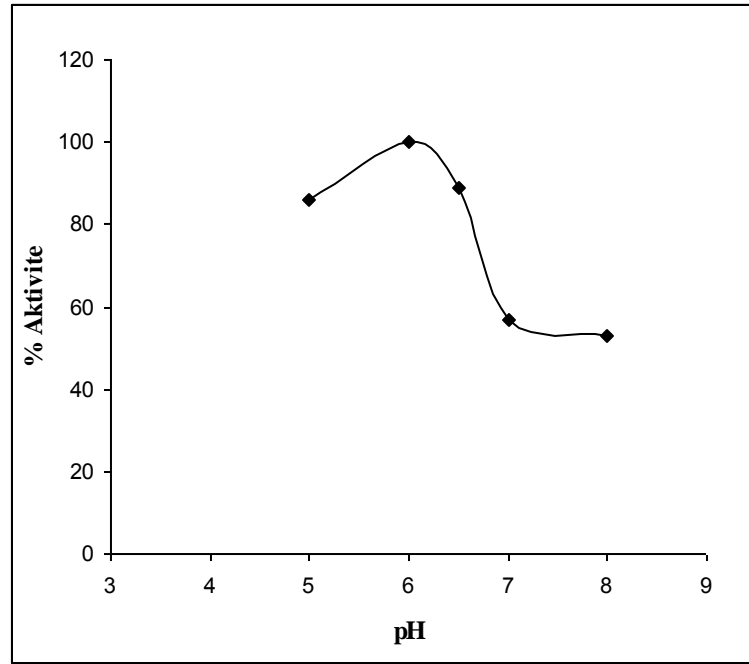
Şekil 4.7. Serbest enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Serbest enzim için optimum sıcaklık 25 °C olarak bulundu. En düşük aktivite ise % 63.03 ile 20°C’ de görüldü.

4.8. İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine pH’ ının Etkisi

İmmobilize enzim aktivitesi üzerine pH’ ının etkisi 25 °C’ de nişastanın hidrolizi ile gerçekleştirildi. Çizelge 4.5 ve Şekil 4.8’ de immobilize enzim için pH- % aktivite değerleri verilmiştir. Maksimum ürün oluşumu pH: 6.0’ da gözlemlendi.

Çizelge 4.5. İmmobilize enzim aktivitesi üzerine pH’ ının etkisi	
pH	% Aktivite
5.0	86.0
6.0	100.0
6.5	89.0
7.0	57.0
8.0	53.0

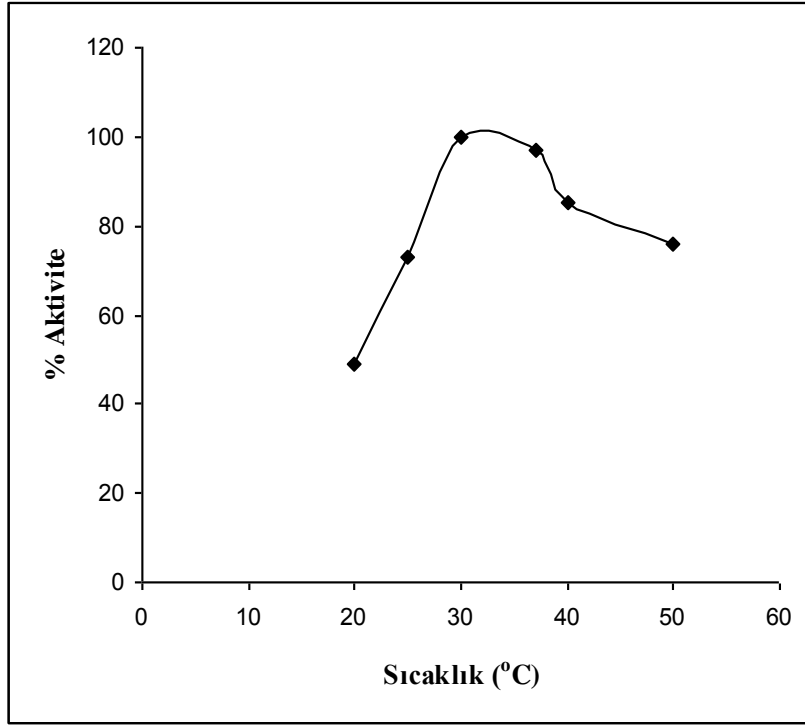


Şekil 4.8. İmmobilize enzim aktivitesi üzerine pH' nın etkisi

4.9. İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

pH: 6.0' da hazırlanan immobilize enzim, bu pH' da hazırlanan % 0.1' lik nişasta çözeltisi ile farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılarak aktivite tayini yapıldı. Farklı sıcaklıklara (20-50°C) karşı % aktivite değerleri grafiğe geçirildi. Çizelge 4.6' da immobilize enzim için sıcaklık ve % aktivite değerleri verilmiştir. Elde edilen optimum sıcaklık ise Şekil 4.9' da gösterilmiştir:

Çizelge 4.6. İmmobilize enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	
Sıcaklık (°C)	% Aktivite
20	49.0
25	73.0
30	100.0
37	97.0
40	85.0
50	76.0

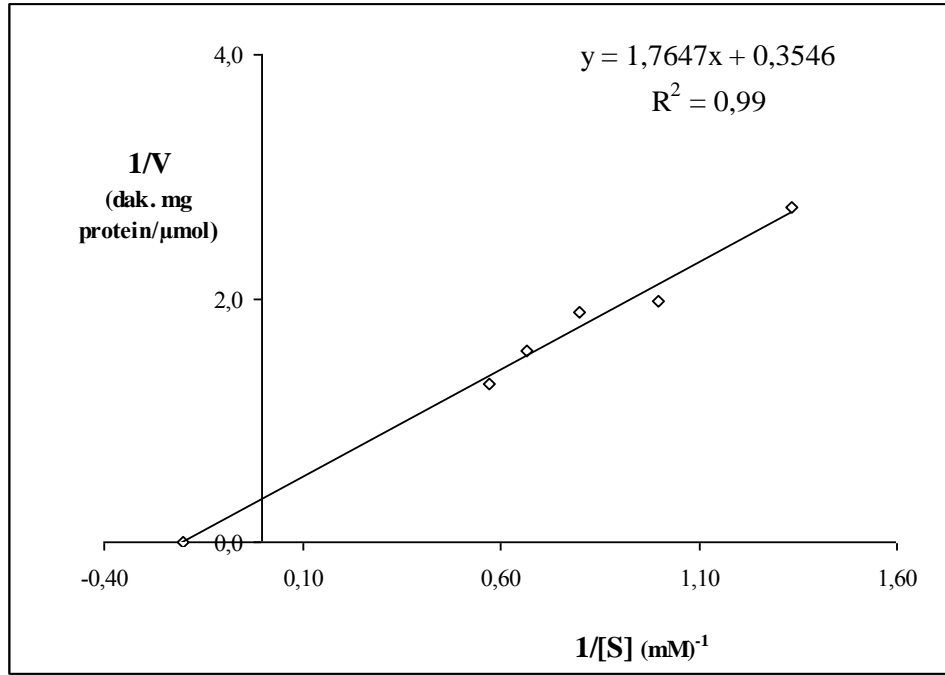


Şekil 4.9. İmmobilize enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

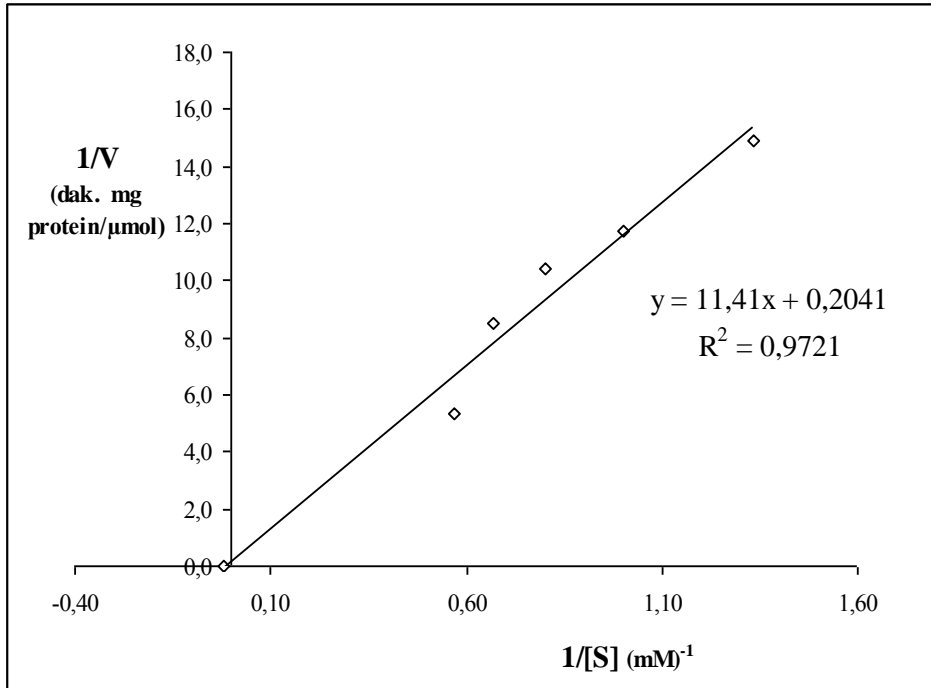
Şekil 4.9' da g r ld ğu gibi maksimum aktivite % 100 baz alınarak 30°C' de bulundu. En d Őuk aktivite ise % 49.0 olarak 20 °C' de görüldü.

4.10. α - Amilaz İçin Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize α - amilaz aktivitesi üzerine substrat deřiŐiminin etkisini incelemek için Kısım 3.15' te belirtildiği gibi farklı nişasta deřiŐimlerinde aktivite tayini yapıldı. Elde edilen verilerden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafikten serbest ve immobilize α - amilaz için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Serbest ve immobilize enzim için grafikler sırasıyla, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11' de gösterilmiştir. K_m ve V_{max} değerleri ise izelge 4.7' de verilmiştir:



Şekil 4.10. Serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.11. İmmobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği

Enzim Şekli	K_m (M)	V_{max} (U/mg)
Serbest α -amilaz	4.977×10^{-3}	2.820
İmmobilize α -amilaz	5.59×10^{-3}	4.90

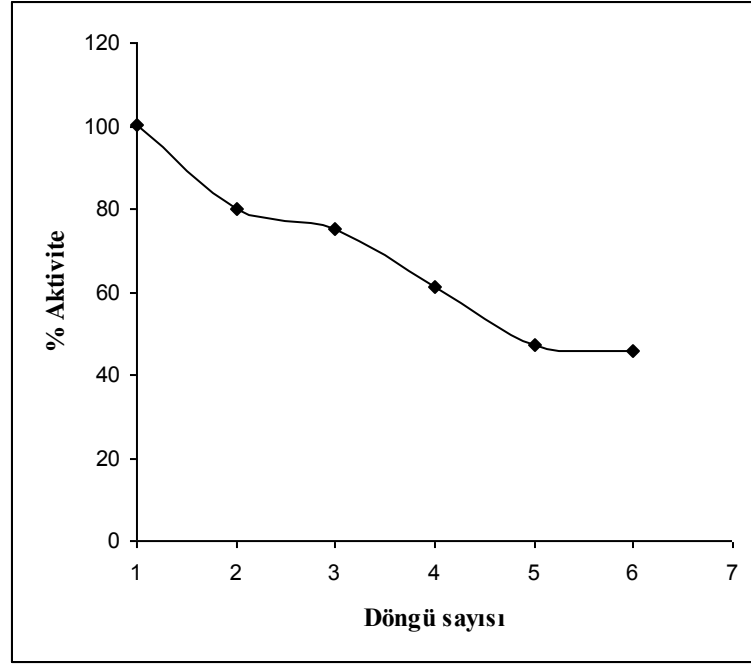
Çizelge 4.7. Serbest ve immobilize α -amilaz için K_m ve V_{max} değerleri

4.11. Tekrar Kullanılabilirliğin Belirlenmesi

İmmobilize enzim için tekrarlanabilirlik deneyi 5 kez yapıp, döngü sayısına karşı 489 nm’ de okunan absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Çizelge 4.8’ de döngü sayısı ile % aktivite değerleri verilmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4.12’de gösterilmiştir:

Şekil 4.12’ de p(HEMA-MAH)-Cu²⁺ mikroküreler üzerine immobilize edilen α -amilaz enziminin ard arda tekrar kullanılması sonucunda relatif aktivitelerindeki değişim görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi arka arkaya 6 kullanımdan sonra mikroküreler üzerine immobilize edilmiş α -amilaz enzimi başlangıç aktivitesinin % 46’ sını korumuştur.

Çizelge 4.8. İmmobilize enzimin tekrar kullanımının aktivite üzerine etkisi	
Döngü Sayısı	% Aktivite
1	100.0
2	80.0
3	75.0
4	61.0
5	47.0
6	46.0



Şekil 4.12. İmmobilize enzimin tekrar kullanımının aktivite üzerine etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda biyoteknoloji alanında önemli gelişmeler olmuştur. Bunlardan biri de bir çok avantaja sahip polimerik materyallerin hazırlanması ve bu materyallerin enzim immobilizasyonunda kullanılmasıdır. Destek matrisi olarak mikroküreler, kolaylıkla üretilebilmeleri, biyomoleküllerin immobilizasyonu için modifiye edilebilmeleri ve geniş bir ligand molekül bağlama kapasitesine sahip olmalarından dolayı büyük önem taşımaktadırlar. Bir çok biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda biyouyumlu oldukları için akrilat polimerler uygun matrisler olarak kullanılmaktadırlar. Bunlar arasında p(HEMA) hidrofilik doğası, yüksek kimyasal ve mekanik kararlılığından dolayı büyük bir önem arz etmektedir (Bayramoğlu ve ark. 2005b).

Özellikle biyomoleküllerle yapılan çalışmalarda, biyoligandların yerine, destek materyallerle birlikte psödo-spesifik ligandlar kullanılmaya başlanmıştır. Psödo-spesifik ligandlarla hazırlanan materyallerde elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimlerin toplam etkileri, seçici ve kuvvetli bir etkileşime neden olmaktadır (Pitiot ve ark. 2000), (Öztürk 2006). Ayrıca bu ligandlar (örneğin aminoasit yapısında olanlar) kararlı bir şekilde, yüksek miktarda ve düşük maliyette rahatça üretilebilmektedir.

İMAK, proteinler, enzimler, nükleik asitler gibi biyolojik moleküller için günümüzde yaygın bir ayırma metodu haline gelmiştir. Bu yöntemde, enzim taşıyıcı materyaller içinde ayırma, genel olarak, adsorplanmış enzimin etkisini artırabilir. Tutucu yüzey varlığında daha küçük parçacıklar, enzimlerin tutunması için, parçacıkların birim kütlesi başına daha geniş bir yüzey alanı bulabilmektedir.

Bu amaçla sunulan bu tezde psödo-spesifik ligand olarak MAH kullanılarak, öncelikle Cu(II) bağlı p(HEMA-MAH) mikroküreler hazırlanmıştır. Ardından bu mikroküreler üzerine α -amilaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirilerek, enzim için bazı optimum koşullar belirlenmiş ve serbest enzim ile karşılaştırılmıştır.

P(HEMA) ve p(HEMA-MAH) mikrokürelerin şişme derecesi sırasıyla %40 ve %50 olarak bulundu. P(HEMA) ve p(HEMA-MAH) mikroküreler çapraz bağlı, hidrofilik özelliğe sahip matrislerdir. Bu yüzden sulu ortamda çözünmeyip yapılarına su alarak şişerler. Bu şişme derecesi çapraz bağlı ağ yapısı ve matrisin hidrofilik

özelliğine bağlıdır. P(HEMA)' ya MAH bağlandığında polimer zincirinde hidrofilik fonksiyonel grup sayısı artmakta ve böylece polimer matrisi içine daha fazla su molekülleri girmekte, bunun sonucu p(HEMA-MAH) mikrokürelerin su tutma kapasitesi daha yüksek olmaktadır (Yılmaz 2007).

Taramalı elektron mikroskobu sonucu elde edilen görüntüler p(HEMA-MAH) mikrokürelerin küresel yapıda, pürüzlü bir yüzeye sahip olduklarını gösterdi. Mikroküre yüzeyinin pürüzlü yapısı, yüzey alanında artma sağlayan çapraz bölümler olarak düşünülebilir.

Proteinler izoelektrik noktalarında net bir yüke sahip değildirler. Böylece sulu çözeltide maksimum adsorpsiyon genellikle izoelektrik noktaları civarındadır. α -Amilazın izoelektrik pH' ı ~ 6 civarındadır. pH' ın bir fonksiyonu olarak p(HEMA-MAH)-Cu (II) mikroküreler üzerine immobilize olan α -amilaz için en yüksek değer Şekil 4.4' te görüldüğü gibi pH: 6.0' da 14.88 mg/g olarak bulundu. α -Amilaz ve p(HEMA-MAH)-Cu (II) arasındaki spesifik etkileşimler (elektrostatik ve koordinasyon gibi) α -amilazın amino asit yan zincirlerinin iyonlaşması ve bu pH' da α -amilazın almış olduğu konformasyonel yapıya bağlı olarak açıklanabilir.

Kara ve ark. (2005) p(EGDMA-VIM)-Cu²⁺ mikroküreler üzerine α -amilazın immobilizasyonunu inceledikleri çalışmada, adsorplanan α -amilaz için adsorpsiyon kapasitesini pH: 4.5' te ve 38.9 mg/g olarak bulmuşlardır.

Çorman ve ark. (2010) p(HEMA-MAH)-Cu (II) mikroküreler üzerine α -amilazdan farklı bir enzim, lakkaz enzimini immobilize etmişler ve bu enzimin aynı mikroküreler üzerine adsorpsiyon kapasitesini pH: 6.0' da 141.9 mg/g olarak bulmuşlardır.

Bayramoğlu ve arkadaşları (2005b) p(HEMA-MAH) ve p(HEMA-MAH)-Ni(II) mikroküreleri üzerinde üreazı immobilize ederek, bu mikroküreler üzerinde adsorplanan maksimum üreaz miktarını pH: 6.5' te ve sırasıyla 47.8 mg/g ve 66.1 mg/g olarak gözlemişlerdir.

Enzim adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisini incelediğimiz çalışmada adsorplanan α -amilaz miktarı en fazla 25 °C' de ve 19.84 mg/g olarak bulundu. Sıcaklığın artmasıyla α -amilaz adsorpsiyonunun azaldığı gözlemlendi. Bu durum, sıcaklık

artışıyla van der Waals etkileşimlerinin azalmasından kaynaklanmış olabilir (Çorman ve ark. 2010).

Akkaya ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada, manyetik p(EGDMA-MAH)-Cu(II) mikroküreler üzerine immobilize edilen sitokrom c miktarının sıcaklık arttıkça azaldığı görüldü. Adsorplanan sitokrom c miktarının en yüksek olduğu sıcaklık 4 °C ve Q değeri 222 mg/g olarak bulunmuştur.

Çorman ve arkadaşlarının (2010) çalışmasında, p(HEMA-MAH)-Cu(II) nanoküreleri üzerine lakkaz immobilize edilmiştir. Artan sıcaklık değerlerinde lakkaz adsorpsiyonunun azaldığı görülmüştür. Lakkazın maksimum olarak adsorplandığı sıcaklık ise 25 °C' de Q: 141.9 mg/g olarak hesaplanmıştır.

Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine pH' nin etkisinde, serbest ve immobilize α -amilaz için maksimum aktivite pH: 6.0' da gözlemlendi. Diğer taraftan immobilize enzimin relatif aktivite değerleri, serbest enziminkinden daha yüksek bulundu. Benzer sonuç Bayramoğlu ve arkadaşları (2004) tarafından da bulunmuştur.

Kahraman ve arkadaşları (2007), α -amilazın cam mikroküreler üzerinde immobilizasyonunu inceledikleri bir çalışmada pH: 5-8 ve 25 °C' de çalışarak maksimum aktiviteyi serbest α -amilaz için pH: 6.5' te, immobilize α -amilaz için ise pH: 5.5' te gözlemlemişlerdir.

Sedaghat ve arkadaşlarının (2009) Na-bentonit üzerinde α -amilazın immobilizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, immobilize α -amilaz ile serbest α -amilazın optimum pH değerinin aynı olduğu bulunmuştur.

Bayramoğlu ve arkadaşları (2004) reaktif membranlar üzerine termostabil α -amilazı immobilize ederek, serbest ve immobilize α -amilaz için en yüksek aktiviteyi pH: 6.5' te bulup, optimum pH' ı pH: 6.5 olarak vermişlerdir.

Kumari ve arkadaşlarının (2011) çitosan ve amberlit üzerinde α -amilazı immobilize ettikleri çalışmada, serbest α -amilaz için optimum pH: 5.5, çitosan üzerinde immobilize olan α -amilaz için optimum pH: 8.0, amberlit üzerinde immobilize olan α -amilaz için ise optimum pH: 7.0 olarak bulunmuştur.

Hasırcı ve arkadaşlarının (2006) α -amilazın kovalent immobilizasyonu için p(dimer asit-ko-alkil poliamin) partiküllerinin aktivasyonunu inceledikleri çalışmada,

serbest α -amilaz için maksimum aktivite pH: 7.5' te; CDI ve EDA ile aktive edilen p(dimer asit-ko-alkil poliamin) partikülleri üzerinde immobilize olan α -amilaz için maksimum aktivite pH: 6.5' te; HMDA ile aktive edilen p(dimer asit-ko-alkil poliamin) partikülleri üzerinde immobilize olan α -amilaz için ise maksimum aktivite pH: 8.0' de bulunmuştur.

Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelediğimizde, serbest α -amilaz için maksimum aktivite 25 °C' de, immobilize α -amilaz için maksimum aktivite ise 30 °C' de bulundu. p(HEMA-MAH)-Cu²⁺ mikroküreleri üzerinde α -amilaz immobilizasyonu ile α -amilazın rijitliği artmıştır ve muhtemelen, immobilize α -amilaz, enzim-substrat kompleksinin oluşumu için daha yüksek sıcaklığa ihtiyaç duymaktadır (Sedaghat ve ark. 2009). Immobilize enzimin optimum sıcaklığında meydana gelen artma, enzimin konformasyonel yapısına da bağlı olabilir (Gancarz ve ark. 2003), (Huang ve ark. 2003). Optimum sıcaklıkta meydana gelen bu artma immobilizasyon ile enzimin kimyasal ve fiziksel özelliklerindeki değişimden de kaynaklanabilir (Bayramoğlu ve ark. 2004), (Li ve ark. 2004).

Kahraman ve arkadaşlarının (2007) cam mikroküreler üzerine α -amilazı immobilize ettikleri çalışmada, serbest α -amilaz için maksimum aktivite 30 °C' de, immobilize α -amilaz için ise maksimum aktivite 50 °C' de bulunmuştur.

Bayramoğlu ve arkadaşlarının (2005b) p(HEMA-MAH) ve p(HEMA-MAH)-Ni(II) mikroküreleri üzerinde üreazın immobilizasyonunu yaptıkları çalışmada, serbest üreaz için maksimum aktivite 45 °C' de, her iki mikroküreye immobilize olan üreaz için ise maksimum aktivite 50 °C' de görülmüştür.

Kumari ve arkadaşlarının (2011) çitosan ve amberlit üzerinde α -amilazı immobilize ettikleri çalışmada, serbest α -amilaz ve çitosan üzerinde immobilize olan α -amilaz için maksimum aktivite 70 °C' de, amberlit üzerinde immobilize olan α -amilaz için ise maksimum aktivite 75 °C' de gözlenmiştir.

Tümtürk ve arkadaşlarının p(HEMA) ve p(St-HEMA) mikroküreleri üzerine α -amilazı immobilize ettikleri çalışmada, serbest enzim için maksimum aktivite 40 °C' de gözlenirken, p(HEMA) ve p(St-HEMA) üzerinde immobilize olan enzim için maksimum aktivite 55 °C' de gözlenmiştir.

Sedaghat ve arkadaşlarının (2009) Na-bentonit üzerinde α -amilazı immobilize ettikleri çalışmada, serbest enzim için maksimum aktivite 40 °C' de, Na-bentonit üzerinde immobilize olan enzim için ise maksimum aktivite 60 °C' de bulunmuştur.

Bryjak (2003) yaptığı bir çalışmada, akrilik taşıyıcılar üzerinde α -amilaz, β -amilaz ve glukoamilazı immobilize etmiştir. Serbest α -amilaz, β -amilaz ve glukoamilaz için optimum sıcaklıklar sırasıyla; 50 °C, 50 °C ve 60 °C olarak verilmiştir. Immobilize olan enzimler için optimum sıcaklıklar yine sırasıyla; 45 °C, 45 °C ve 60 °C olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize enzim için K_m ve V_{max} değerleri substrat olarak çözünen nişasta kullanılarak belirlendi. Sırasıyla K_m değerleri 4.977×10^{-3} M ve 5.59×10^{-3} M, V_{max} değerleri ise 2.820 U/mg ve 4.90 U/mg olarak bulundu. Enzim immobilizasyonunda genel olarak immobilize enzimin K_m değeri serbest enziminkinden daha yüksek, V_{max} değeri ise daha düşüktür. Bu durum enzim immobilize olduğunda substrata olan ilgisinin azaldığının bir göstergesi olabilir. Çünkü immobilizasyon esnasında destek materyalin por boşluklarında substrat rahatça difüze olamamakta, bunun sonucu enzimin aktif merkezi ile rahatlıkla bağlanamamaktadır.

Hasırcı ve ark. (2006) α -amilazın karbodiimid (CDI), etilendiamin (EDI) ve hegzameten diamin(HMDA) ile aktive edilmiş p(dimer asid-ko-alkil-poliamin) üzerine immobilizasyonunda enzim için K_m değerlerini sırasıyla 2.51, 3.13, 3.47 ve 3.17 gdm^{-3} , V_{max} değerlerini ise 1.67×10^{-3} , 6.16×10^{-4} , 7.34×10^{-4} ve 3.30×10^{-4} $\text{gdm}^{-3} \cdot \text{dak}^{-1}$ olarak bulmuşlardır. Tripathi ve arkadaşları (2007) amberlit ve çitosan üzerine immobilize ettikleri α -amilazın K_m değerlerini amberlit için 2.77 mg/ml, çitosan için 5 mg/ml olarak bulmuşlardır. Kumari ve Kayastha (2011) çitosan ve amberlit üzerine immobilize ettikleri α -amilazın K_m değerlerini 4 mg/ml, 2.5 mg/ml V_{max} değerlerini ise aynı, 1.25 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein olarak bulmuşlardır. Serbest enzim için ise K_m değeri 0.71 mg/ml, V_{max} değeri 2 $\mu\text{mol/dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein olarak bulunmuştur. Bu sonuçları enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelen konformasyonel değişikliklerle ve substratın aktif merkeze difüze olmasını engelleyen sterik etkiler ile açıklamışlardır.

Bazı çalışmalarda ise immobilize enzimin K_m değeri serbest enzimin K_m değerine göre daha yüksek çıkarken V_{max} değerinde de serbest enzime göre artış gözlemlenmektedir. Nitekim bizim bulduğumuz gibi, bazı çalışmalarda α -amilaz için

V_{max} değeri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 2.14×10^5 U/mg ve 2.34×10^5 U/mg olarak bulunmuştur (Kara ve ark. 2005). Ramesh ve Singh (1981) ise yaptıkları bir çalışmada serbest α -amilaz için V_{max} değerini $760 \mu\text{moldak}^{-1}\text{L}^{-1}$ immobilize α -amilaz için ise $764 \mu\text{moldak}^{-1}\text{L}^{-1}$ olarak bulmuşlardır. Bunu immobilizasyon işleminin enzimin katalitik aktivitesine etki etmediği şeklinde açıklayabiliriz.

Enzim immobilizasyonunun en önemli avantajlarından biri, immobilize enzimin bir çok kez kullanılması ve bu sayede de maliyetin düşmesidir. Bu yüzden immobilizasyon işleminde immobilize enzimin tekrar kullanılması da önemli bir parametredir. Immobilize α -amilazın tekrar kullanılabilirliği incelendiğinde 6. kullanımda bile enzimin başlangıçtaki aktivitesinin %46' sını koruduğu gözlemlendi. Bu sonuç p(HEMA-MAH)-Cu (II) mikrokürelerin enzim immobilizasyonu için rahatça kullanılabileceğini göstermektedir.

Zaman alıcı ve yüksek maliyetli immobilizasyon yöntemlerine alternatif olarak son yıllarda immobilizasyon işlemlerinde, daha ucuz, basit, şelatlayıcı destek materyallerin kullanıldığı bir yöntem olan İMAK uygulanmaktadır. Bu yöntemin diğer bir avantajı proteinlerin biyolojik aktivitelerini kolay kolay kaybetmemeleri, matriksin de mikrobiyolojik bozunmalara karşı daha dayanıklı olmasıdır.

Bu çalışmada p(HEMA-MAH)-Cu (II) destek materyali kullanılarak adsorpsiyon yolu ile α -amilaz bu destek üzerine immobilize edildi. Yöntemde MAH metal şelatlayıcı ligand olarak kullanıldı. Bu şekilde ekstradan matriksin aktive edilmesine gerek kalmamaktadır. Diğer bir avantajı ise matrikse koordine kovalent bağlı metalin serbest kalmamasıdır. Bu avantajlara sahip p(HEMA-MAH)-Cu (II) mikroküreler enzim immobilizasyon teknolojisinde alternatif bir destek materyali olarak kullanılacak özelliklere sahiptir.

6. KAYNAKLAR

- Aehle, W. 2004. *Enzymes in Industry Production and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Akgöl, S., Öztürk, N., Denizli, A. 2009. New generation polymeric nanospheres for catalase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 114: 962-970.
- Akkaya, B., Uzun, L., Candan, F., Denizli, A. 2007. *N*-methacryloyl-(L)-histidine methyl ester carrying porous magnetic beads for metal chelate adsorption of cytochrome c. *Materials Science and Engineering C*, 27: 180-187.
- Aksoy, S., Tümtürk, H., Hasircı, N. 1998. Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *J. Biotechnol.*, 60: 37-46.
- Amounas, M., Magne, V., Innocent, C., Dejean, E., Seta, P. 2002. Elaboration and chemical reactivity of enzyme modified ion exchanging textiles. *Enzyme Microbial Technol.*, 31: 171-8.
- Arica, M.Y., Hasircı, V.N. 1987. Immobilization for the production of membranes. *Biomaterials*, 8: 489-495.
- Arica, Y., Alaeddinoğlu, N.G., Hasircı, V. 1998. Immobilization of glucoamylase onto activated p(HEMA\EGDMA) microspheres: properties and application to a packed-bed reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 152-157.
- Arica, M.Y., Oktem, Z., Tuncel, A. 1999. Immobilization of catalase in poly(isopropyl acrylamide-co-hydroxyethylmethacrylate) thermally reversible hydrogels. *Polymer International*, 48: 879-884.
- Arica, M.Y., Bayramoglu, G. 2004. Reversible immobilization of tyrosinase onto polyethyleneimine grafted and Cu(II) chelated poly(HEMA-co-GMA) reactive membrane. *Journal of Molecular Catalysis B*, 27: 255-265.
- Arica, M.Y., Bayramoglu, G., Bicak, N. 2004. Characterization of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads. *Process Biochemistry*, 39: 2007-2017.
- Arica, M.Y., Bayramoglu, G. 2006. Immobilization of invertase onto polyethyleneimine grafted poly(GMA-MMA) beads via adsorption. *Journal of Molecular Catalysis B*, 38: 131-138.

Arica, M.Y., Altıntaş, B., Bayramoğlu, G. 2009. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA\EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. *Bioresource Technology*, 100: 665-669.

Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K., Gershenson, A. 2001. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends in Biochemical Sciences*, 26: 100–106.

Ashly, P.C., Joseph, M.J., Mohanan, P.V. 2011. Activity of diastase α -amylase immobilized on polyanilines (PANIs). *Food Chemistry*, 127: 1808-1813.

Ayhan, F., Ayhan, H., Pişkin, E., Tanyolaç, A. 2002. Optimization of urease immobilization onto non-porous HEMA incorporated poly(EGDMA) microbeads and estimation of kinetic parameters. *Bioresource Technology*, 81: 131-140.

Bachman, S., Gebicka, M.L., Gasyna, Z. 2006. Some properties of whole-cell glucose isomerase immobilized in polyacrylamide gel by radiation. *Inter Science*, 33(11): 366-369.

Bajpai, A.K., Sachdeva, R. 2002. Immobilization of diastase onto acid treated bentonite clay surfaces. *Colloid Polym. Sci.*, 280: 892-899.

Bajpai, A.K., Bhanu, S. 2003. Immobilization of alpha-amylase in vinyl-polymer-based interpenetrating polymer network. *Colloid and Polymer Science*, 282(1): 76-83.

Bayramoğlu, G., Arica, M.Y. 2004. Polyethyleneimine-grafted poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) membranes for reversible glucose oxidase immobilization. *Biochem. Eng. J.*, 20: 73-77.

Bayramoğlu, G., Kaya, M., Arica, M.Y. 2005a. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached (GMA-HEMA-EGDMA) beads. *Food Chemistry*, 92: 261-268.

Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Arica M.Y. 2005b. Immobilization of urease via adsorption onto L-histidine-Ni(II) complexed poly(HEMA-MAH) microspheres: Preparation and characterization. *Process Chemistry*, 40: 3505-3513.

Bayramoğlu, G., Yılmaz, M., Arica, M.Y. 2004. Immobilization of a thermostable α - amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. *Food Chem.*, 84: 591-599.

Bellezza, F., Cipiciani, A., Costantino, U. 2003. Esterase activity of biocomposites constituted by lipases adsorbed on layered zirconium phosphate and phosphonates: selective adsorption of different enzyme isoform. *J. Mol. Catal. B Enzyme*, 26: 47-56.

Bernfeld, P. 1955. Amylases, α and β . in *methods in enzymology*. Academic Press, New York, 1: 149-154.

Bickerstaff, G.F., 1997. *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, New Jersey.

Brady, D., Jordan, J. 2009. *Advances in Enzyme Immobilisation*. *Biotechnol. Letters*, 31: 1639-1650.

Brannigan, J.A., Wilkinson, A.J. 2002. Protein engineering 20 years on. *Mol. Cell Biol.*, 3: 964–970.

Bruinenberg, P.M., Hulst, A.C., Faber, A., Voogd, R.H. 1996. European Patent Application EP. 0,690,170.

Bryjak, J. 2003. Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilisation on acrylic carriers. *Biochemical Engineering Journal*, 16: 347-355.

Burhan A., Nisa U., Gökhan C., Ömer C., Ashabil A., Osman G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem.*, 38: 1397-1403.

Cabral, J.M.S., Kennedy, J.F., Kalogerakis, B. 1991. Covalent and coordination immobilization of proteins. *Bioprocess Technol.*, 14: 73- 138.

Carr, P.W., Bowers, L.D. 1980. *Support considerations in chemical analysis*. *Enzymes*, Academic Press, New York, 56: 167-170.

Chen, S., Liu, Y., Yu, P. 1996. Study on column reactor of chitosan immobilized. *Chem. Abstr.*, 127 (4): 127-129.

Chibata I., Tosa T., Sato T., Mori T., Mauto Y. 1972. Preparation and industrial application of immobilized aminoacylases. In: *Proc. 1vth Int. Ferment. Symp.*

Fermentation Technology Today. Society for Fermentation Technology. Japan. 383-389.

Coradin, T., Livage, J. 2003. Mesoporous alginate\silica biocomposites for enzyme immobilization. *Comptes Rendus Chimie*, 6 (1): 147-152.

Coronado M.J., Vargas C., Hofemeister J., Ventosa A., Nieto J.J. FEMS. 2000. Production and biochemical characterization of an α - amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *Microbiol. Lett.*, 183: 67-71.

Çorman, M.E., Öztürk, N., Bereli, N., Akgöl, S., Denizli, A. 2010. Preparation of nanoparticles which contains histidine for immobilization of *Trametes versicolor* laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63: 102-107.

Dağışan L. 1997. Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U) Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, Bölüm 15.

Davankov, V.A., Semechkin, A.V. 1977. Ligand-exchange chromatography. *J. Chromotogr.*, 141: 313-353.

Demirel, D., Ozdural, AR., Mutlu, M. 2004. Preparation and characterization of magnetic duolite-polystyrene composite particles for enzyme immobilization. *J. Food Eng.*, 62: 203-208.

Demirsoy, A. 2000. Enzimlerin Yapısı ve İşleyişi.

Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö. İ. 2009. Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler. Pozitif Matbaacılık Ltd.Şti., 61-71, Ankara.

Deng, H-T., Xu, Z-K., Wu, J., Ye, P., Liu, Z-M., Seta, P. 2004. A comparative study on lipase immobilized polypropylene microfiltration membranes modified by sugar-containing polymer and polypeptide. *J. Mol. Catal. B Enzyme*, 8: 95-100.

Desantis, G., Jones, J.B. 1999. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Cur. Opin. Biotechnol.*, 10: 324-330.

Doğan, G. 2008. Yeni Nesil Polimerik Nanoyapıların Hazırlanması ve Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılması. Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 11-20.

El-Batal, A.J., Atia, K.S., Eid, M. 2005. Stabilization of α -amylase by using anionic surfactant during the immobilization process. *Radiat. Phys. Chem.*, 74: 96-101.

Erem, F., Certel, M. 24-26 Mayıs 2006. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.

Fernandes, KF., Lima, CS., Lopes, FM., Collins, CH. 2004. Properties of horseradish peroxidase immobilized onto polyaniline. *Process Biochem.*, 39: 957-962.

Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Cabrera, Z., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. 2007. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 565-569.

Fogarty, W.M., Kelly, C.J. 1979. Developments in microbial extracellular enzymes. In: Alan Wiseman (ed.), *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. Ellis Horwood Ltd., Publishers, England, 3: 289.

Fusi, P., Ristori, G.G., Calamai, L., Stotzky, G. 1989. Adsorption and binding of protein on 'clean' (homoionic) and 'dirty' (coated with Fe oxyhydroxides) montmorillonite, illite and kaolinite. *Soil Biol. Biochem.*, 21: 911-920.

Gancarz, I., Bryjak, J., Bryjak, M., Poniak, G., Tylus, W. 2003. Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization 1: allyl alcohol plasma. *Eur. Polym. J.*, 39: 1615-1622.

Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Sivaramakrishnan, S., Pandey, A. 2009. Immobilized bacterial α -amylase for effective hydrolysis of raw and soluble starch. *Food Research International*, 42: 436-442.

Garipcan, B., Denizli, A. 2002. A novel chromatographic affinity support material for separation of immunoglobulin-G from human plasma. *Macromolecular Bioscience*, 2(3): 135-144.

Goldstein, L. 1970. Water insoluble derivatives of proteolytic enzymes. *Methods in Enzymology*, 19: 935.

Goldstein, L., Lifshitz, A., Sokolovsky, M. 1971. Water-insoluble derivatives of naringinase. *Int. J. Biochem.*, 2: 448-456.

Gopinath, S., Sugunan, S. 2007. Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Appl. Clay. Sci.*, 35: 67-75.

Govardhan, C.P., 1999. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10: 331–335.

Gupta, M.N. 1991. Thermostabilization of proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 14: 1-11.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 1599-1616.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial α - amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38: 1599-1616.

Hamilton, L., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. 1999a. Production and properties of the raw starch-digesting α - amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. *Process Biochemistry*, 35: 27-31.

Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. 1999b. Purification and properties of the raw starch-degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Biotechnol. Lett.*, 21: 111-115.

Hasırcı, N., Aksoy, S., Tümtürk, H. 2006. Activation of poly(dimer acid-co-alkyl polyamine) particles for covalent immobilization of α -amylase. *Reactive & Functional Polymers*, 66: 1546-1551.

Huang, S.H., Liao, M.H., Chen, D.H. 2003. Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Prog.*, 3: 1095-1100.

Kaetsu, I., Kamura, M. Yoshida, M. 1979. Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low temperature. *Biotechnol. Bioeng.*, 21: 847-849.

Kahraman, M.V., Bayramoğlu, G., Kayaman-Apohan, N., Güngör, A. 2007. α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chemistry*, 104: 1385-1392.

Kandra L. 2003. α -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure (Teochem.)*, 666-667: 487-498.

Kara, A., Osman, B., Yavuz, H., Beşirli, N., Denizli, A. 2005. Immobilization of α -amylase on Cu^{2+} chelated poly(ethylene glycol dimethacrylate-*n*- vinyl imidazole) matrix via adsorption. *Reactive & Functional Polymers*, 62: 61-68.

- Karadağ, H. 2001. Soya Fasulyesi Lipoksijenazının Poliakrilamid Jel Üzerine İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 26-28.
- Kasavi, C. 2006. Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-21.
- Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. 1985. Immobilized enzymes cells. Immobilization of enzyme, (Woodward, 2nd ed.), Oxford Press, U.K., 19-37.
- Kırkköprü, İ., Alpaslan, S.C., 2004. Proteaz Enziminin Değişik Taşıyıcılarda immobilizasyonu, Bitirme Tezi, İ.T.Ü. Kimya-Metalurji Fakültesi, İstanbul.
- Klibanov, A.M. 1979. Enzyme stabilization by immobilization. Anal. Biochem., 93: 1-25.
- Klibanov, A.M. 1983. Approaches to enzyme stabilization. Biochem. Soc. Trans., 11: 19-20.
- Konieczna-Molenda, A., Kochanowski, A., Walaszek, A., Bortel, E., Tomasik, P. 2009. Immobilization of α -amylase on poly(vinylamine) and poly(vinylformamide) supports and its performance. Chemical Engineering Journal, 146: 515-519.
- Krajewska, B. 2004. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilization: a review. Enzyme Microb Technol., 35: 126-139.
- Kumari, A., Kayastha, A.M. 2011. Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto chitosan and amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 69: 8-14.
- Larson, S.B., Greenwood, A., Cascio, D., Day, J., McPherson, A.J. 1994. Refined molecular structure of pig pancreatic α -amylase at 2-1 resolution. J. Mol. Biol., 235: 1560-1584.
- Lehmann, M., Wyss, M. 2001. Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. Curr. Opin. Biotechnol., 12: 371-375.
- Li, S., Hu, J., Liu, B. 2004. Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization. BioSystems, 77: 25-32.
- Liang, J., Li, Y., Yang, V. 2000. Biomedical applications of immobilized enzymes. Journal of Pharmaceutical Sciences, 89: 979-990.

Linderholm, P., Bertsch A., Renaud, P. 2004. Resistivity probing of multilayered tissue phantoms using microelectrodes. *Physiol Meas*, 23: 645-658.

Livage, J., Coradin, T., Roux, C. 2001. Encapsulation of biomolecules in silica gels, *J. of Phys. Conden. Mat.*, 13: R673–R691.

Lonsane, B.K., Ramesh, M.V. 1990. Production of bacterial thermostable α -amylase by solid-state-fermentation: A potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. *Adv. Appl. Microbiology*, 35: 1-56.

Magnan, E., Catarino, I., Paolucci-Jeanjean, D., Preziosi-Belloy, L., Belleville, MP. 2004. Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. *J. Membr. Sci.*, 241: 161-6.

Manecke, G., Gunzel, G., Forster, H.J. 1970. Enzymes covalently bound to various polymers and the effects on the properties of these enzymes. *J. Polym. Sci. Part C*, 30: 607-613.

Mateo, C., Jose, M., Palomo, C.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Tecnology*, 40: 1451-1463.

Michael, D.T. 1980. Immobilized enzyme. *Methods in Enzymology*, John Wiley and Sons, New York, 80-85.

Mosbach, R., Koch- Schmidt, A.-C., Mosbach, K. 1976. Immobilization of enzymes to various acrylic copolymer. *Methods in Enzymology*, 44: 53-65.

Mozhaev, V.V., Melik-Nubarov, N.S., Sergeeva, M.V., Siksness, V., Martinek, K. 1990. High stability to irreversible inactivation at elevated temperatures of enzymes covalently modified by hydrophilic reagents: -Chymotrypsin. *Biocatalysis*, 3: 179–187.

Mozhaev, V.V. 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends in Biotechnol.*, 11: 88–95.

Mukherjee, A.K., Borah, M., Rai, S.K. 2009. To Study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. *Biochemical Engineering Journal*, 43: 149-156.

Muralikrishna, G., Nirmala, M. 2005. Cereal α - amylases- an overview. Carbohydrate Polymers, 60: 163-173.

Nanduri, V., Sorokulova, IB., Samoylov, AM. 2007. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption. Biosensors & Bioelectronics, 22: 986-992.

Odabaşı, M. 2009. İmmobilize Metal İyon Afinitive Kromatografisi. Denizli, A., Küfrelioğlu, Ö.İ. Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler. Pozitif Matbaacılık LTD. ŞTİ., 215-239, Ankara.

Okada, M., Nakakuki, T., in: Schenck (Ed.). 1992. Starch hydrolysis products. VHC Publishers, New York, p. 335.

Öztürk, N. 2006. Hidrofobik Nanoyapılarda *Candida Rugosa* Lipaz İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adnan Menderes Üniversitesi, 69.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, CR., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnol Appl Biochem., 31: 135-152.

Park, D., Haam, S., Jang, K., Ahn, I-S., Kim, W-S. 2005. Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. Process Biochemistry, 40: 53-61.

Phadtare, S., Vinod, V.P., Wadgaonkar, P.P., Rao, M., Sastry, M. 2004. Free-standing nanogold membranes as scaffolds for enzyme immobilization. Langmuir, 20: 3717-3723.

Pitiot, O., Legallais, C., Darnige, L., Vijalayakshmi, M.A. 2000. A potential set up based on histidine hollow fiber membranes for the extracorporeal removal of human antibodies. Journal of Membrane Science, 166: 221-227.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature, 258: 598-599.

Pozniak, G., Krajewska, B., Trochimczuk, W. 1995. Urease immobilized on modified polysulphone membrane: preparation and properties. Biomaterials, 16: 129-134.

Ramesh, V., Singh, C. 1981. Immobilization of *Bacillus-subtilis* alpha-amylase on zirconia-coated alkylamine glass with glutaraldehyde. *Enzyme and Microbial Technology*, 3(3): 246-248.

Reddy, N.S., Nimmagadda, A., Sambasiva, Rao, K.R.S. 2003. An overview of the microbial α - amylase family. *African Journal of Biotechnology*, 2(12): 645-648.

Reshmi, R., Sanjay, G., Sugunan, S. 2007. Immobilization of α -amylase on zirconia: a heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. *Catalysis Communications*, 8: 393-399.

Richard, F., Yousuf, R., Kettliz, B., Röper, H. 2007. Use of commercial protease preparations to reduce protein and lipid content of maize starch. *Food Chemistry*, 105: 926-931.

Roby, J.F., French, D. 1970a. Multiple attack and polarity of action of porcine pancreatic α -amylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 138: 662-670.

Roby, J.F., French, D. 1970b. The action pattern of porcine pancreatic α -amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 245: 3917-3927.

Roby, J.F. 1989. Mechanism and product specificity of α -amylases. *J. Jpn. Soc. Starch Sci. (Denpun Kagaku)*, 36: 287-301.

Saçak, M. 2005. *Polimer Teknolojisi*. Gazi Kitabevi, 1-2, Ankara.

Safarikova, M., Roy, I., Gupta, M.N., Safarik, I. 2003. Magnetic alginate microparticles for purification of α -amylases. *Journal of Biotechnology*, 105: 255-260.

Sarı, M.M., Armutcu, C., Bereli, N. Uzun, L., Denizli, A. 2011. Monosize microbeads for pseudo-affinity adsorption of human insulin. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 84: 140-147.

Schaechter, M. 2009. *Encyclopedia of Microbiology* 3 th San Diego, CA, USA Elsevier Inc. 164-173.

Sedaghat, M.E., Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimani-Zad, S. 2009. Enzyme immobilization. Part 3 immobilization of α -amylase on Na-bentonite and modified bentonite. *Applied Clay Science*, 46: 125-130.

Shao, J., Ge, H., Yang, Y. 2007. Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-SiO₂ gel for removal of aqueous phenol. *Biotechnology Letter*, 29: 901-905.

Singh, V., Kumar, P. 2011. Carboxymethyl tamarind gum-silica nanohybrids for effective immobilization of amylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70: 67-73.

Sinnott, M.L. 1990. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chem.Rev.*, 90 (7): 1171-1202.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., Pandey, A. 2006. α - Amylases from microbial sources-an overview on recent development. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2): 173-184.

Somers W.A.C., Koenen P.H.M., Roize H.J., Visser J., Riet K., Rombouts F.M. 1995. Isolation of α -amylase on crosslinked starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 56-62.

Tanaka, A., Kawamoto, T. 1999. Cell and Enzyme Immobilization. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed. Demain A. L. and Davies J. E., American Society for Microbiology. ISBN 1-55581-128-0. Washington.

Telefoncu, A. 1997. *Enzimoloji*. Ege Üniversitesi Basımevi, 5,198. Aydın.

Thoma, J.A., Spradlin, J.E., Dygert, S. 1971. 6 Plant and animal amylases. *The Enzymes*, 5: 115.

Tischer, W., Kasche, V. 1999. Immobilized enzymes: crystals or carriers. *Trends in Biotechnol.*, 17: 326–335.

Tischer, W., Wedekind, F. 1999. Immobilized enzymes: Methods and Applications. *Topics in Current Chemistry*, 200: 95-126.

Tokullugil, A., Gür, E., Dirican, M., Tuncel, P., Ulukaya, E., Özyener, F., Kurt, A., Cangül, H. 1998. *Klinik Biyokimya*. Nobel & Güneş Tıp Kitabevi bölüm 12, 180.

Tripathi, P., Kumari, A., Rath, P., Kayastha, A.M. 2007. Immobilization of α -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study. *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, 49: 69-74.

Tümtürk, H., Aksoy, S., Hasırcı, N. 2000. Covalent immobilization of α -amylase onto poly(2-hydroxyethylmethacrylate) and poly(styrene-2-hydroxyethyl

methacrylate) microspheres and the effect of Ca^{2+} ions on the enzyme activity. *Food Chemistry*, 68: 259-266.

Uludag, Y.B., 2000. İmmobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.

Uzun, L., Türkmen, D., Yılmaz, E., Bektaş, S., Denizli, A. 2008. Cysteine functionalized poly(hydroxyethyl methacrylate) monolith for heavy metal removal. *Colloid Surf. A*, 330: 161-167.

Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. J. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Biotechnol.*, 94: 137-155.

Vihinen, M., Mantsala, P. 1989. Microbial amylolytic enzymes. *Biochem. Mol. Biol.*, 24(4): 329-418.

Windish, W.W., Mhatre, N.S. 1965. Microbial amylases. In: W.U.Wayne (Ed.), *Advances in Applied Microbiology*, 7: 273-304.

Yang, Z.P., Si, S.H., Zhang, C.J. 2008. Study on the activity and stability of urease immobilized onto nonporous alumina membranes. *Microporous and Mesoporous Materials*, 111: 359-366.

Yılmaz, E. 2007. Romatoid Artrit Tedavisine Yönelik Poli(HEMA-MAH) Adsorbentin Üretimi ve Dolgulu Kolon Dizaynı. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 39.

Yodoya, S., Takagi, T., Kurotani, M., Hayashi, T., Furuta, M., Oka, M., Hayashi, T. 2003. Immobilization of bromelain onto porous copoly(methyl-glutamate/leucine) beads. *Eur. Polymer J.*, 39: 173-80.

Yoshida, M., Kumakura, M., Kaetsu. I. 1979. Immobilization of enzymes by radiation-induced polymerization of glass-forming monomers: 1 Immobilization of some enzymes by poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *Polymer*, 20: 3-8.

Zheng, H., Okada, H., Nojima, S., Suye, S., Hori, T. 2004. Layer-by-layer assembly of enzymes and polymerized mediator on electrode surface by electrostatic adsorption. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 5: 371-376.

Enzyme Immobilization, 2004.

<http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/enzymatic/appendix/immob.html>.

EKLER

Ek.1. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması

Bir beherde 20 g 3,5 dinitrosalisilik asit (DNS veya DCA) üzerine 400 ml saf su ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Başka bir beherde 32 g NaOH üzerine 300 ml saf su ilave edilerek çözünmesi sağlandı. DNS karıştırıcıda karışmaya devam ederken üzerine yavaş yavaş NaOH çözeltisi ilave edildi. Karışım bir süre sıcak su banyosunda bekletilerek, üzerine azar azar 600 g Na-K tartarat eklendi. Son olarak çözeltinin hacmi saf su ile 2000 ml' ye tamamlandı. Bernfeld reaktifi α -amilaz enzim aktivite tayininde reaksiyon durdurucu olarak kullanıldı.

Ek.2. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

pH: 5.0, 0.1 M Asetat Tamponu: 0.1 M CH_3COOH çözeltisinden 14.8 ml ve 0.1 M NaOAc çözeltisinden 35.12 ml alınıp balon jøjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.

pH: 6.0, 0.1 M Fosfat Tamponu: 0.1 M Na_2HPO_4 çözeltisinden 6.15 ml ve 0.1 M NaH_2PO_4 çözeltisinden 43.85 ml alınıp balon jøjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.

pH: 6.5, 0.1 M Fosfat Tamponu: 0.1 M Na_2HPO_4 çözeltisinden 18.75 ml ve 0.1 M NaH_2PO_4 çözeltisinden 31.25 ml alınıp balon jøjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.

pH: 7.0, 0.1 M Fosfat Tamponu: 0.1 M Na_2HPO_4 çözeltisinden 30.5 ml ve 0.1 M NaH_2PO_4 çözeltisinden 19.5 ml alınıp balon jøjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.

pH: 8.0, 0.1 M Fosfat Tamponu: 0.1 M Na_2HPO_4 çözeltisinden 47.35 ml ve 0.1 M NaH_2PO_4 çözeltisinden 2.65 ml alınıp balon jøjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler :

Adı Soyadı : Ayşegül AYLA
Doğum Yeri : Diyarbakır
Doğum Tarihi : 21.10.1986
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) :

Lise : Ziya Gökalp Lisesi \ Diyarbakır- 2003

Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü- 2008

Yüksek lisans : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D.- 2011