

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMOBİLİZE GLUKOAMİLAZ
KULLANILARAK GLUKOZ ÜRETİMİ

Zehra ÖLÇER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2004

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMOBİLİZE GLUKOAMİLAZ
KULLANILARAK GLUKOZ ÜRETİMİ

Zehra ÖLÇER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd.Doç.Dr. Aziz TANRISEVEN

GEBZE
2004

ÖZET

Glukoamilaz, nişasta ve maltodekstrinlerin α -1,4 ve α -1,6-glukozidik bağlarının indirgen olmayan uçlarından hidroliz ederek glukoz üreten bir exo-enzimdir. *Aspergillus niger*' den üretilen glukoamilaz, endüstriyel enzimler arasında en önemli olanıdır ve endüstride nişastanın glukoz hidrolizinde kullanılır. Bu çalışmada, enzimlerin immobilizasyonu için yeni bir metod geliştirildi: *Aspergillus niger* glukoamilaz polyglutaraldehit ile aktive edilmiş jelatine kovalent bağlanarak %85 verimle immobilize edildi. İmmobilize ve serbest enzim için optimum koşullar ise; sıcaklık 65 °C ve pH 4 olarak bulundu. Kinetik sabitler (K_m ve V_m), serbest enzim için %0,75 g maltodekstrin/L ve 0,02 mmol Glc/dak. μ L enzim, immobilize enzim için ise %1,01 g maltodekstrin/L ve 0,016 mmol Glc/dak. μ L enzim olarak bulundu. İmmobilize enzim 30 batch (tekrar kullanım) ve 30 gün boyunca aktivitesini korumuştur. Ayrıca immobilize enzim 60 ve 90 gün sonunda aktivitesinin sırasıyla % 90 ve % 75' ini korumuştur.

SUMMARY

Glucoamylase is an exo-enzyme, producing glucose by hydrolysis of α -1,4 and α -1,6-glucosidic bonds from non-reducing end of starch and maltodextrins. Glucoamylase from *Aspergillus niger* is one of the most important industrial enzymes used for the industrial production of glucose from starch. In this study, a novel method was developed for the immobilization of enzymes: *Aspergillus niger* glucoamylase immobilized covalently onto polyglutaraldehyde activated gelatin resulted in 85% activity yield. For the immobilized and soluble enzymes, optimum temperature and pH were found 65°C and 4. Kinetic parameters (K_m and V_m) for soluble enzyme were 0,75 g/L, and 0,02 mmol Glc/min. μ L enzym respectively, whereas K_m and V_m for immobilized enzyme were 1,01 g/L, and 0,016 mmol Glc/min. μ L enzym respectively. Immobilized enzyme retained its activity during 30 batch reaction and 30 days. In addition, the immobilize enzyme retained 90 and 75 % of its activity at the end of 60 and 90 days, respectively.

TEŞEKKÜR

Tez konusunu bana öneren, çalışmalarım boyunca desteğini ve ilgisini esirgemeyen, tüm imkanları sağlayan, fikirleriyle bilimsel düşüncelerimi şekillendiren değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Aziz TANRISEVEN' e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kimya Bölüm Başkanımız Prof.Dr. Adem KILÇ' a, Yrd.Doç.Dr. Erhan DEMİRBAŞ' a ve G.Y.T.E. Fen Fakültesi Kimya ve Biyoloji Bölümündeki tüm arkadaşlarıma,

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgileriyle bana güç veren aileme içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	IV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLOLAR DİZİNİ	XI
GRAFİKLER DİZİNİ	XII
1.GİRİŞ	1
2.KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Enzimlerin İmmobilizasyonu	3
2.1.1. Adsorpsiyon	5
2.1.2. Hapsetme (Entrapment)	6
2.1.2.1. Kalsiyum Alginat ile İmmobilizasyon	6
2.1.2.2. Polyakrilamid ile İmmobilizasyon	6
2.1.3. Bifonksiyonel Reaktiflerle Çapraz Bağlanma	7
2.1.4. Kovalent Bağlanma	8
2.2. Matriks Aktivasyon Yöntemleri	10
2.2.1. Cynogen Bromide	10
2.2.2. Karbodiimid	10
2.2.3. Diazotizasyon	10
2.2.4. Alkilasyon ve Arilasyon	11
2.2.5. Aldehit Kondenzasyon	11
2.3. Glutaraldehit	11
2.3.1. Glutaraldehit' in Yapısı	11
2.3.2. Polyglutaraldehit	14
2.3.3. Glutaraldehit ve Polyglutaraldehit ile İmmobilizasyon	17
2.4. Jelatin	18
2.4.1. Kollajenin ve Jelatinin Yapısı	18
2.4.2. Jelatinin Özellikleri	19

2.4.2.1. Jelasyon ve Su Bağlama	20
2.4.2.2. Köpük Oluşumu	20
2.4.2.3. Emülsülfide Özellik	20
2.4.2.4. Kristalizasyona Karşı Kolloidal Koruma	21
2.4.3. Jelatin Üretimi	21
2.4.4. Jelatinin Kullanım Alanları	21
2.5. Nişasta	23
2.5.6. Maltodekstrin	24
2.5.7. Glikoz	25
2.5.8. Nişastanın Hidrolizi	25
2.6. Glukoamilaz	26
2.6.1. Glukoamilaz ile Yapılan Çalışmalar	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Gereçler	30
3.2. Kullanılan Maddeler	30
3.3. Kullanılan Aletler	31
3.2. Enzim	31
3.3. Yöntem	32
3.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi ile Glukoz Tayini	32
3.3.2. Glukoamilazın İmmobilizasyonu	32
3.3.2.1. PGA Çözeltilisinin Hazırlanması	32
3.3.2.2. Jelatinlerin Aktivasyonu	32
3.3.2.3. GA'nın Jelatin Üzerine İmmobilizasyonu	33
3.3.3. Sıcaklık-Aktivite Deneyleri	33
3.3.4. Ph-Aktivite Deneyleri	33
3.3.5. Km ve Vm Tayini	34
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	35
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

GA	Glukoamilaz
GTA	Glutaraldehit
PGA	Polyglutaraldehit
IEP	İzoelektrik nokta
TLC	İnce tabaka kromatografisi
μm	Mikrometre
MA	Molekül ağırlığı
PEG	Polyetilenglikol

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İmmobilizasyon çeşitleri	4
2.2. Enzimlerin Alginat ile immobilizasyonu	7
2.3. Eupergit C ile enzim reaksiyonu	9
2.4. Sulu çözeltilerdeki GTA yapıları	12
2.5. Polimerik GTA ve bazik koşullarda proteinlerle reaksiyonları	14
2.6. Cannizzaro reaksiyonu sonunda oluşan polimerik GTA yapıları	16
2.7. Kollajenin yapısı	20
2.8. Nişastanın amiloz bileşeni	23
2.9. Nişastanın amilopektin bileşeni	24

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Adsorpsiyonda kullanılan adsorbentler	5
3.1. Deneyde kullanılan kimyasal maddeler	30
3.2. Deneyde kullanılan cihazlar	31

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
4.1.İmmobilize GA için tekrarlanan reaksiyon sayısı (Batch)-Aktivite grafiği	37
4.2. İmmobilize GA için gün-aktivite grafiği	38
4.3. Serbest ve immobilize GA için pH-aktivite grafiği	39
4.4. Serbest ve immobilize GA için sıcaklık-aktivite grafiği	40
4.5. Serbest ve immobilize GA için Lineweaver-Burk grafiği	41

1.GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşturmada, % 100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler protein yapısındadırlar ve proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu oluştururlar. Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim tanımlanmış, bir çoğu saf halde elde edilip, kinetikleri incelenmiş ve 200' den fazlası da kristallendirilmiştir. Yapılan genetik çalışmalar, daha tesbit edilmemiş bir çok enzimin varlığını göstermektedir.

Organik reaksiyonların tamamına yakını ve inorganik reaksiyonların da bir çoğu, bir veya bir dizi enzim tarafından katalizlenir. Endüstride, bu reaksiyonların bir çoğu biyolojik olmayan kimyasal katalizörlerle de katalizlenmesi mümkündür. Fakat enzimlerin, biyolojik olmayan katalizörlerin eksiklerine karşın birçok olağanüstü özellikleri mevcuttur. Bu özellikler de enzimlerin endüstride tercih edilen katalizörler olmasını sağlar. Enzimler, son derece yüksek katalitik aktiviteye sahiptirler ve bu aktivite tek bir substrata özgüdür. Bu nedenle, istenmeyen reaksiyonlar oluşmaz. Reaksiyon için çok yüksek sıcaklık, yüksek basınç, susuz ortam gibi zor şartlar gerekli değildir.

Enzimler suda çözünür moleküllerdir ve bu özellikleri de endüstride dezavantaj olmaktadır. Çünkü, substrat ve ürünlerden ayrılıp tekrar kullanımları oldukça zordur. Enzimlerin yalnızca bir defa kullanılması endüstride yüksek maliyet getirmektedir. Bu problemler, enzimolojide immobilizasyon yöntemlerinin gelişmesiyle aşılmıştır ve artık enzimler, endüstriyel uygulamalarda immobilize olarak kullanılmaktadır.

Deri, tekstil, kağıt, deterjan, gıda ve nişasta endüstrilerinde enzimler (proteazlar, lipazlar, selülozlar, amilazlar) yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Deri ve tekstil endüstrisinde; enzim kullanımıyla, atık sular yüzünden oluşan çevre problemleri engellenmektedir. Kağıt endüstrisinde; ağartma amaçlı klor kullanımı en aza indirilmektedir. Deterjan endüstrisinde ise; enzim kullanımı, çevreye zararlı güçlü kimyasalların yerini almaktadır.

Gıda endüstrisinde; istenmeyen renklendirici, kıvam artırıcı ve koruyucu kimyasalların gıda maddeleri üzerine olumsuz etkileri vardır. Enzimler, bu kimyasalların birçoğunun yerini alabilir ve gıda üretimi daha doğal hale getirilebilir.

Enzimlerin nişasta endüstrisinde kullanımıyla, nişastanın asit ile hidroliz yönteminin yerini, enzimatik yöntemler almıştır. 1960' larda, gıda endüstrisinde ilk enzim olarak glukoamilazın kullanımı dönüm noktası olmuştur. Çünkü, glukoamilaz nişastayı tamamen glukoza parçalayan enzimdir. 1970' de bulunan, kaynama noktasının üzerindeki sıcaklıklarda kararlı olan Termamyl amilazla nişasta sıvılaştırmak önemli bir adımdır. Enzimler kullanılarak, glukoz şurubu (HGS-High Glucose Syrup) ve fruktoz şurubu (HFCS-High Fructose Corn Syrup) üretilir. Fruktoz şurubu üretiminde; glukoamilaz ile nişasta tamamen glukoza parçalandıktan sonra, glukoz izomeraz ile glukozlar fruktoza dönüştürülür.

Endüstride değişik metodlarla immobilize edilen glukoamilaz kullanılmaktadır. Yapılan bu çalışmada glukoamilaz enzimi, polyglutaraldehit ile aktive edilip ve glutaraldehit ile çapraz bağlanıp sağlamlaştırılan jelatin parçacıkları üzerine kovalent bağlanarak immobilize edildi ve kinetik parametreleri incelendi.

2.KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

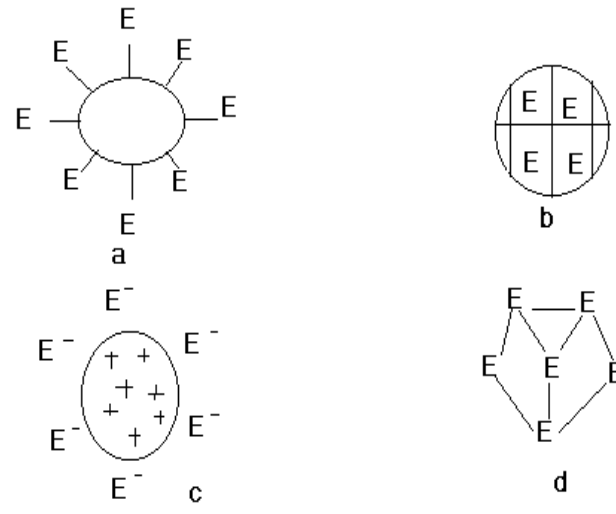
2.1. Enzimlerin İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon, enzimlerin suda çözünür hareketli fazdan, suda çözünmeyen sabit faza dönüşümü olarak tanımlanır [Klibanov, 1983]. Endüstride enzimler, birçok avantaj sağladığı için immobilize edilerek kullanılırlar. Bunun yanında immobilizasyon işlemi enzimin özelliklerinde değişikliklere neden olur. İmmobilizasyonun avantajları ve etkileri şunlardır:

- Ürünler saf olarak elde edilir
- Enzimler defalarca kullanılabilir ve sürekli üretim yapılabilir
- Operasyon süresi kısadır, üretim maliyetleri düşer
- Enzimin katalitik aktivitesi immobilizasyondan etkilenebilir
- Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri değişebilir
- Km değerleri immobilizasyondan etkilenebilir

Enzimlerin immobilizasyon metodları başlıca 4 grupta toplanır:

- Adsorpsiyon
- Bir polimerik jel içine hapsedme
- Bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlama
- Kovalent bağlanma



E: Enzim

Şekil 2.1. İmmobilizasyon Çeşitleri

- a.** Kovalent Bağlanma
- b.** Hapsetme (Entrapment)
- c.** Adsorpsiyon
- d.** Çapraz Bağlanma

2.1.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon metodu, enzimin zayıf çekim kuvvetleriyle inert bir matrice bağlanmasıdır. (Şekil 2.1.c) Adsorpsiyon oldukça basit ve ekonomik bir immobilizasyon yöntemidir. Immobilizasyon, enzim çözeltisinin uygun pH ve sıcaklıkta matrixle karıştırılmasıyla yapılır.

İyon değiştiriciler kolaylıkla birçok proteini adsorbe ederler ve bu özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonu için yaygın olarak endüstride kullanılırlar. Aşağıda verilen tabloda adsorpsiyon için kullanılan adsorbentler yer almaktadır. Bunların dışında silikajel, alumina, nişasta ve kil de adsorpsiyonda kullanılır. Enzimle matrix arasında zayıf bağlar (Van der Waals ve hidrojen bağları) oluşur ve enzimler matrixten kolaylıkla ayrılırlar.

Tablo 2.1. Adsorpsiyonda kullanılan adsorbentler

Etkileşme	Adsorbentler
Fiziksel Adsorpsiyon	Aktif karbon, silika jel, alumina, cam Nişasta, kil Modifiye Matrixler: Concanavalin A-, Sepharose Tannin-, aminoheksyl sellüloz Fenoksiasetil sellüloz
İyonik Bağlanma	Kasyon Değiştiriciler: CM-sellüloz Dowex 50 Amberlite CG-50 Anyon Değiştiriciler: DEAE-sellüloz DEAE-sephadex Amberlite

2.1.2. Hapsetme (Entrapment)

Bu metod ile enzimler jellerin veya polimerlerin içine hapsedilir. (şekil 2.1.b) Enzim, monomer çözeltisine jel oluşmadan önce ilave edilir. Sonra sıcaklık değişimi ya da jel oluşturuucu kimyasalın eklenmesiyle jel meydana gelir. N,N¹-metilen bisakrilamid ile çapraz bağı polyakrilamid ve kalsiyum alginat endüstride kullanılan jellerdendir.

2.1.2.1.Kalsiyum Alginat ile İmmobilizasyon

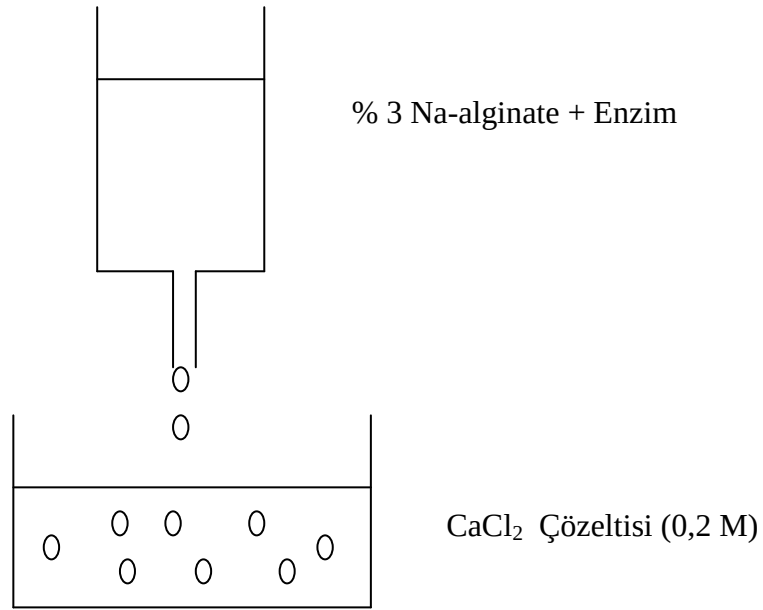
Alginat, α -(1→4)-L-gluronik asit ve β -(1→4)-D-mannuronik asit birimlerinden oluşmuş bir polimerdir. Basit immobilizasyon işlemiyle oluşturulan, boyutları değişmeyen ve kontrol edilebilir bead'lerden dolayı en çok kullanılan polimerdir [Uhm, et al. 1984].

Alginat ile enzimlerin immobilizasyonunda, sodyum alginat çözeltisine enzim ilave edilir ve sonra bu çözelti 0.2M CaCl₂ çözeltisine damlatılarak suda çözünmeyen kalsiyum alginat bead'leri oluşturulur. Sodyum alginat, CaCl₂ ile temas ettiğinde Na-Ca iyon değişimi nedeniyle Ca-Alginat bead'leri oluşur ve enzim molekülleri bu bead'lerin içinde bulunur. (şekil 2.2)

Kalsiyum-alginat bead'leri enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcılardan biridir.

2.1.2.2.Polyakrilamid ile İmmobilizasyon

Polyakrilamid jel yönteminde; enzim buffer çözeltisinde akrilamid ve bir çapraz bağlayıcı reaktif (N,N¹-metilen bisakrilamid) ile karıştırılır. Polimerizasyon, potasyum persülfat ile başlatılabilir. Fakat başlatıcı potasyum persülfat, sülfidril gruplarının oksidasyonu ile enzim aktivitesini azaltabilir. Glutasyon ve sistein gibi indirgen maddelerin kullanımıyla bu etkiden enzim korunabilir [Bernath, et al.]. Polimerleşmeden sonra, enzim molekülleri fiziksel olarak polimerin içinde hapsedilirler.

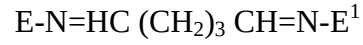
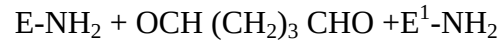


Şekil 2.2. Enzimlerin Alginat İle İmmobilizasyonu

2.1.3. Bifonksiyonel Reaktiflerle Çapraz Bağlanma

Sulu çözeltilerde çözünabilen proteinler, çapraz bağlanma olarak adlandırılan bir yöntemle çözünemez yapılabilirler [Chu and Wan,1997]. Glutaraldehit bu amaç için kullanılan çapraz-bağlayıcı reaktiflerden biridir [Klibanov, 1983]. Bifonksiyonel glutaraldehit molekülündeki aldehit grupları, enzimlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek enzimlerle çapraz bağlanır (şekil 2.1.d).

Çapraz bağlanma moleküller arası veya molekül içi oluşabilir ve protein çöker. Çapraz bağlı protein santrifüj ile kolaylıkla ayrılabilir.

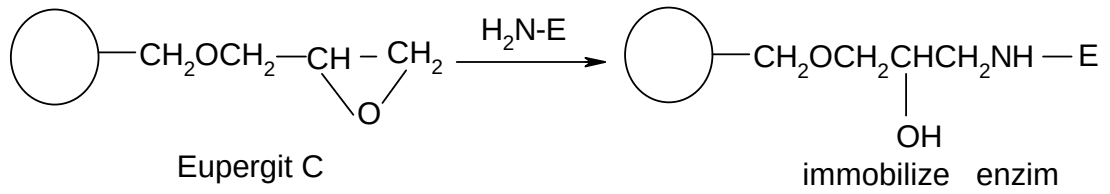


2.1.4. Kovalent Bağlanma

Enzimler, matrikse genellikle amino ya da karboksil gruplarıyla kovalent olarak bağlanırlar. (şekil 2.1.a) İmmobilizasyonda enzimlerin sülfidril, hidroksil veya imidazol grupları da kullanılabilir. İmmobilizasyonda ilk adım; matriksin aktivasyonu, daha sonra enzimin aktive olan matrikse bağlanmasıdır.

İmmobilizasyonda kullanılan matriksler, yapılarında enzimlerle kovalent reaksiyon verebilen gruplar ihtiva eder.

Röhm Pharma (Almanya) firması tarafından hazırlanan oksiran akrilik kopolimeri olan Eupergit C bead'leri bu matrixlerden biridir [Katzir and Kramer, 2000]. (Şekil 2.3.)



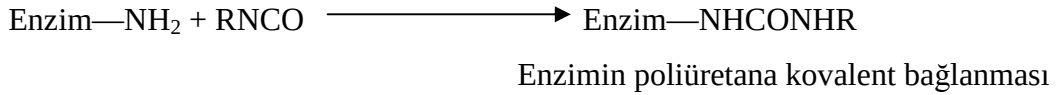
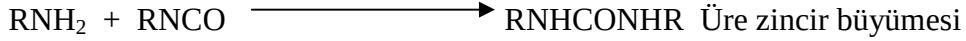
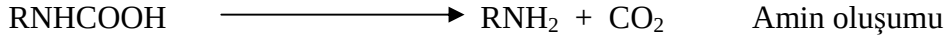
Şekil 2.3. Eupergit C ile enzim reaksiyonu

Ph=7-8 arasında oksiran grubu, enzimlerin serbest amino ve sülfidril gruplarıyla kovalent olarak bağlanır. Asidik pH' larda ise; imidazol, tyrosil ve triptofenil gruplarıyla kovalent olarak bağlanır. Eupergit C bead' leri geniş bir pH aralığında oldukça kararlıdır.

Glycidyl metakrilat (%70)-etilen dimetilakrilat kopolimeri ve polyacrolein bead'leri enzim immobilizasyonunda kullanılan çok yönlü polimerlerdendir [Bernath, et al.]

Bir diğer kovalent immobilizasyon polimeri de hidrofilik üretan prepolimerleridir. Prepolimerler, diisocyanate türevlerinin çeşitli aktif hidrojen ihtiva eden bileşiklerle (glykol, polyglykol, polyol) reaksiyonlarıyla elde edilirler ve yapılarında izosiyanat' lar mevcuttur. Diizosiyanat prepolimerleri su ile muamele edildiğinde süngerimsi yapıda polimer meydana gelir. Ortamda enzim bulunduğunda, enzimin aktif hidrojen bulunduran gruplarıyla, izosiyanat grupları kovalent bağlar oluştururlar.

Diisocyanate prepolimerlerinin polimerleşme mekanizması:



Tampon çözelti içinde bulunan enzim, prepolimere ilave edilir ve karıştırma işlemi sonunda oluşan polimer köpüğe enzim kovalent bağlarla bağlanır. Mikroorganizmalar da bu metodla immobilize edilebilir.

2.2.Matrix Aktivasyon Yöntemleri

2.2.1.Cynojen Bromide

Cynogen bromide (CNBr) ile çeşitli polisakkaritlerin hidroksil grupları aktive edilerek, enzimlerin amino gruplarıyla kovalent bağ oluşturmaları sağlanır.[Bernath, et al.]

2.2.2.Karbodiimid

Matrixlerin karboksil grupları karbodiimid'ler (RNCNR^1) ile aktive edilerek enzimlerin immobilizasyonunda kullanılırlar. Bu reaktifler zayıf asidik ortamda ($\text{pH}=4,75-5$) matrixi aktive ederler.

2.2.3.Diazotizasyon

Diazonyum türevi olan matrixlerle enzimlerin fenolik, imidazol veya serbest amino grupları reaksiyon vererek kovalent bağ oluşturur.

2.2.4. Alkilasyon ve Arilasyon

Matrixlerde bulunan fenolik, süfidril veya serbest amino grupları alkilenerek matrixler aktif duruma getirilirler.

2.2.5. Aldehit Kondenzasyon

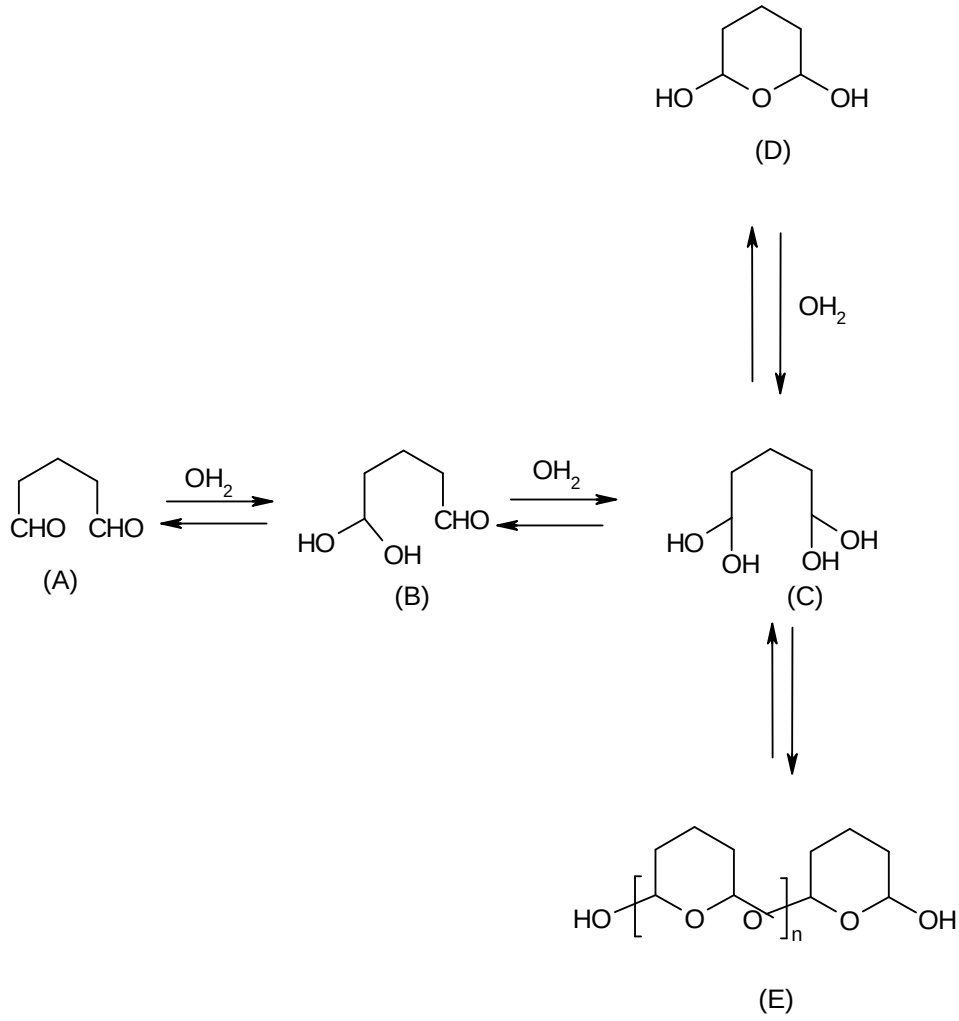
Amino grupları içeren matrixler monomerik yada polimerik glutaraldehit ile aktive edilerek, enzimlerin matrixe kovalent olarak bağlanması sağlanır. Ticari olarak kullanılan, aldehit türevi çapraz bağlayıcı reaktifler arasında, hızlı ve etkili bir protein bağlayıcı olduğu için glutaraldehit en çok tercih edilen reaktiftir.

2.3. Glutaraldehit

2.3.1. Glutaraldehit' in Yapısı

Glutaraldehit (1,5- pentandial; $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$), enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan bir reaktiftir.

Glutaraldehit'in (GTA), kimyasal özellikleri çözelti şartlarına bağlı olarak değişir. Yapılan çalışmalar ticari GTA çözeltilerinin (%25 ya da %70) farklı yapılar içeren karışımlar olduğunu göstermektedir. GTA'nın sulu çözeltilerinin pH'ı 3,1 dir ve bu durum bazı aldehit gruplarının karboksilik asitlere kısmi okside olmasıyla açıklanır. NMR analizleri sudaki GTA' in beş değişik formda olduğunu göstermiştir: (Şekil 2.4.) Serbest GTA (A), lineer mono (B) ve dihidratlar (C), halkasal (cyclic) hemiasetal (D) ve oligomerler (E) [Agayn and Walt, 1994].



Şekil 2.4. Sulu çözeltilerdeki GTA yapıları

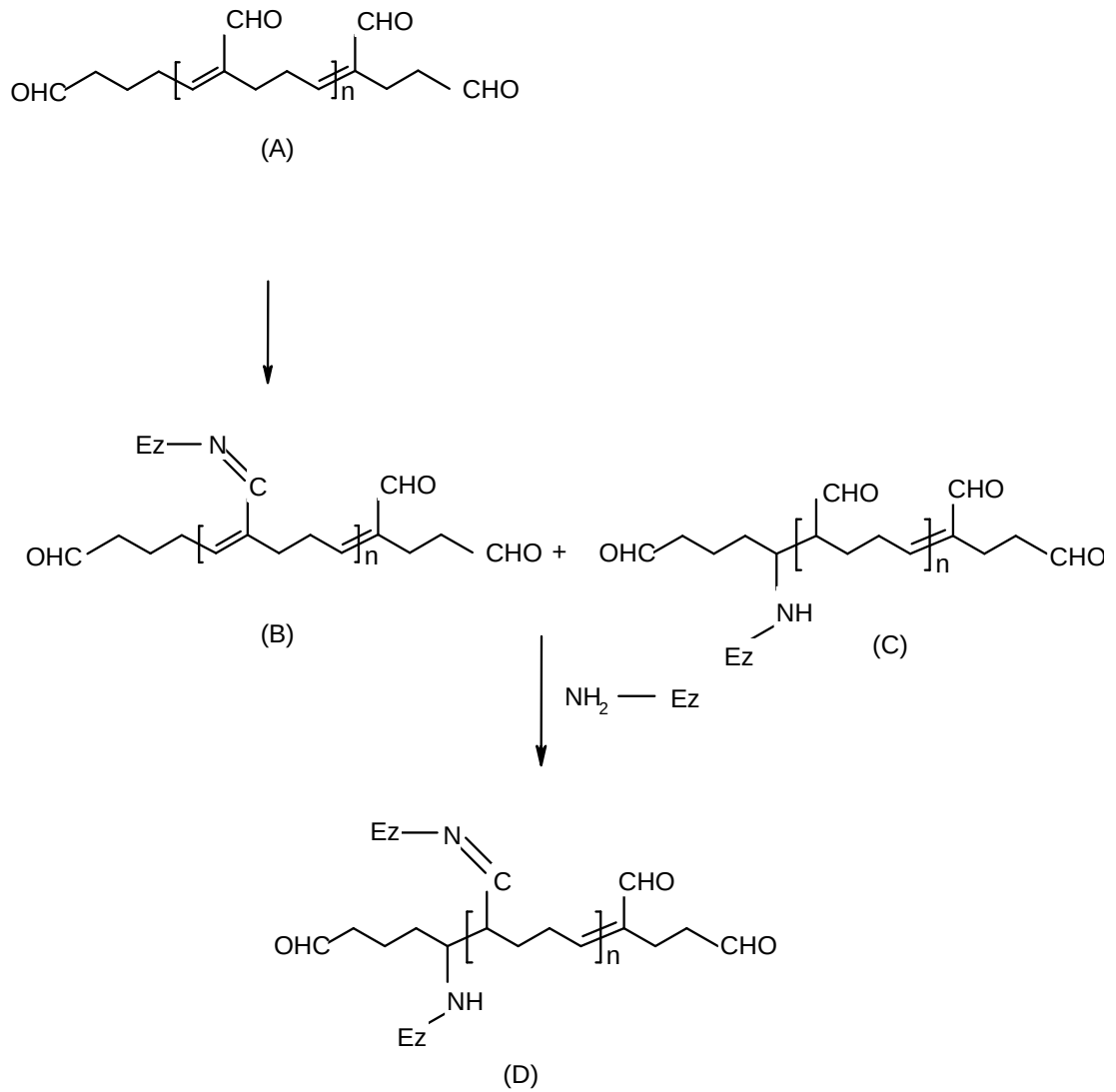
Sıcaklığın artmasıyla cyclic hidrat miktarında artış olur [Agayn and Walt, 1994]. Konsantrasyonu %25'ten yüksek, daha derişik çözeltilerde ve asidik durumlarda cyclic hemihidrat multimerleri oluşur. Distile su ile seyreltmeyle bu polimerik materyaller, hidrasyon reaksiyonunun tersine dönmesiyle monomerik GTA'e dönüşür. Bu nedenle, seyreltik çözeltilerin monomerik GTA miktarı daha fazladır.

Her yapı, çapraz-bağlanma reaksiyonlarına farklı katılır ve farklı ürünler verir. Aldehitler, proteindeki lisin gruplarıyla Schiff bazları oluştururlar. Schiff bazları asidik şartlar altında kararsızdırlar ve tekrar aldehit ve amin oluşturmak üzere bozunurlar. Bu nedenle, Schiff bazlarının geri dönüşümünü önlemek için bu çifte bağın indirgenmesi gerekir. Bu indirgeme reaksiyonu cyclic hemiasetal ve oligomerlerin ürünlerinin reaksiyonlarını kararlı yapmak için gerekli değildir.

GTA' in proteinlerle diğer bir ürünü de quarterner piridinyum bileşiğidir. Proteinlerdeki lisin grupları ve GTA arasında oluşan ürün için deliller bulunmaktadır. Quarterner piridinyum bileşiği izole edip tanımlanmıştır.

2.3.2.Polyglutaraldehyt

Bazik şartlarda GTA hızla intermoleküler aldol kondenzasyonuna uğrar ve α,β -doymamış oligomerik aldehytler oluşur (şekil 2.5.). Bu ürünlerin oluşumu 235nm' de absorbanstaki artışla gözlenir. Bu dalga boyunda GTA absorbans göstermez. Saf GTA 280 nm' de absorbans gösterir.



Şekil 2.5. Polimerik GTA ve bazik şartlarda proteinlerle reaksiyonları

Polimerizasyon pH ve sıcaklığın artmasıyla artar, çözeltide sarı renk oluşur. Fakat oda sıcaklığında ve nötral pH' ta bu proses haftalar sürer. Yapı (A), bazik şartlarda GTA' in protein ile reaksiyonu için önerilmiştir. Reaksiyon ürünlerinde iç aldehit grupları, C-C çifte bağları ve bu pozisyonlarda oluşan Schiff bazlarının birleşmesiyle oluşur (Yapı B). Bu noktada bileşik rezonans ile kararlı olur, böylece bileşiğin asit kararlılığı da açıklanabilir. NaBH_4 ile indirgeme kararlı bir ikincil amin oluşturur. Aşırı amin durumunda, çifte bağa Michael katılması gibi ikinci bir reaksiyon mümkün olur. Bu reaksiyon rezonans kararlılığının bozulmasıyla ve Yapı D ürününün oluşmasıyla sonuçlanır.

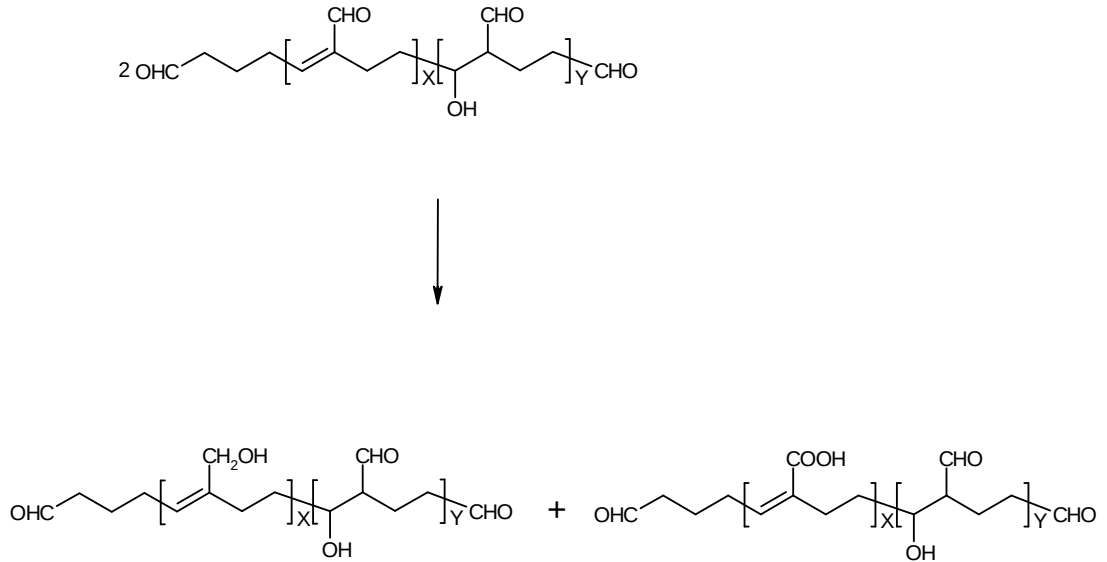
Proteinlerde, amino gruplarıyla alfa,beta-doymamış aldehit polimerinin reaksiyon ürünü IR spektrumunda gözlenmiştir [Margel and Rembaum, 1980]. Polimerik doymamış aldehit, Michael tarzında reaksiyon verir ve asit hidrolizine kararlı Yapı C ürünü oluşur.

GTA çözeltilerinin aldol kondenzasyonu sırasında, oligomerik yapılar da oluşur [Agayn and Walt, 1994]. GTA' in alkali çözeltilerinde, bileşen olarak dimerik yapılar da bulunur. Bu yapıların proteinlerle reaksiyonu, çifte bağa Michael katılması şeklinde olur. Eğer bu reaksiyonlar meydana gelirse, stabilizasyon için NaBH_4 ya da NaB(CN)H_3 ile indirmek gerekli değildir.

Distile GTA, tek başına ya da kloroformda çözüldüğünde camsı bir katı vermek üzere hızla polimerleşir ve vakum altında 45 °C' de ısıtıldığında ise monomer formuna geri döner [Margel and Rembaum, 1980].

Suda çözünür PGA, suda çözünmeyen PGA' ten daha fazla miktarda karboksil grubu içerir. Ayrıca argon ortamı dışında hava ortamında polimerizasyon yapılırsa karboksil grubu içeriği daha fazla olur. Reaksiyon argon ortamında yapıldığında, reaksiyon sonunda pH= 8' e düşer (pH=10' dan). Hava ortamında yapılan reaksiyonda ise pH=7' ye düşer. pH' daki bu azalmanın nedeni; Cannizzaro reaksiyonları ve hava oksidasyonu sonucu karboksilik grupların oluşumudur [Margel and Rembaum, 1980].

Poliglutaraldehit, GTA' in pH=7,0-13,5' da polimerleşmesiyle meydana gelir, çözünen ve çözünmeyen polimerler içerir. Bu polimerler, etilenik zincirlerle konjuge olabilen, hidratlı ya da hidratsız değişen miktarlarda aldehit grupları içerirler. Aldol ürünlerinin tamamlanmamış dehidrasyonundan dolayı ikincil hidroksil grupları oluşabilir. Bu polimerlerde birincil hidroksil ve karboksilik asit gruplarının her ikisini üreten serbest aldehit gruplarıyla Cannizzaro reaksiyonları da meydana gelir (şekil 2.6.)



Şekil 2.6. Cannizzaro reaksiyonu sonunda oluşan Polimerik GTA yapıları

2.3.3. Glutaraldehit ve Polyglutaraldehit ile İmmobilizasyon

GTA ile immobilizasyon, amino grubu içeren matrix aktive edilerek ya da enzim GTA ile çapraz bağlanarak yapılır. İmmobilizasyon için taşıyıcı aktivasyonu düşük pH' ta yapılırken, nükleofilik etkiyi ve immobilizasyonu arttırmak için protein kaplama yüksek pH' ta bitirilir. PGA , monomerik GTA' ten daha etkili bir çapraz bağlayıcıdır. PGA taneciklerine kovalent bağlandıktan sonra alginat beadlerine immobilize edilen D-hydantoinase ile %95 ürün dönüşümü sağlanmıştır. [Fan and Lee, 2001]. GTA ile çapraz bağlandıktan sonra alginat ile immobilize edilen trypsin ise aktivitesinin yarısını çapraz bağlanmanın etkisiyle kaybetmiştir [Chui and An, 1997].

Enzim kovalent bağlarla bağlandığı ve enzimin kaçma tehlikesi olmadığı için, bir çok uygulamada katı matrice enzim bağlanarak immobilizasyon tercih edilmektedir. Bu yöntemde, inorganik matrikslerin amino ($-NH_2$) gruplarının iki fonksiyonel grubu bulunan GTA ile reaksiyonu sonucu taşıyıcı matrix üzerinde enzimin kovalent bağlanabileceği aldehit grupları oluşturulur. Bu reaksiyonlarda dikkat edilmesi gereken taşıyıcı aktivasyonu sırasında; GTA miktarı, pH ve reaksiyon süresi, enzim immobilizasyonu sırasında ise; enzim miktarı, inkübasyon süresi ve pH' ır. [Chae, et al. 1998].

2.4.Jelatinin

Jelatin, molekül ağırlığı yaklaşık 15000 g/mol' den 250000 g/mol' e değişen bir polipeptittir. Asidik (Tip A) ya da bazik (Tip B) şartlarda, hayvanların deri ve kemiklerinden elde edilen kollajenin hidroliziyle üretilir. Jelatin bütün etkili aminoasitleri (triptofan hariç) içerir, saf sindirilebilir bir protein olduğundan dolayı gıda içeriklerinde kullanım için uygundur. Jelatin konsantrasyonu ağırlıkça en az %1 olan çözeltilerde 35°C civarında, jelatin ilk önce hızla şişer, sonra viskoz çözelti oluşturmak üzere çözünür.

2.4.1.Kollajenin ve Jelatinin Yapısı

Kollajenin aminoasit spektrumu %30 glisin, %22 prolin ve hidroksiprolin ve %45'i diğer 17 aminoasitin bileşiminden oluşur. Glisin ve prolin konsantrasyonunun yüksek olması, kollajenin aminoasit bileşiminin karakteristiğindendir. Bu durum, prolin-glisin-X dizisinin tekrarından oluşur. X-diğer aminoasiti temsil eder. Dizinin tekrarı ve bağlanma açısı, kollajenin helikal yapısını açıklar.

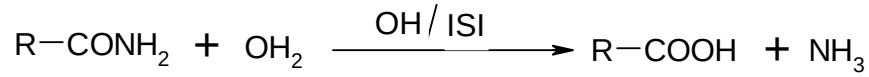
Şu an, spesifik fonksiyonları olan 20 farklı kollajen bilinmektedir. Birinci tip kollajen, deri ve kemik yapısının temel maddesi olan lifli bir proteindir. Diğer kollajen yapıları, bağ dokularında damar ve yemek borusu yapısında bulunur. Birinci tip kollajen, her biri yaklaşık 1.000 aminoasit içeren ve yaklaşık 100.000 molekül ağırlıklı alfa-zinciri birimlerinden oluşan büyük bir polimerdir. Bu protein gly-X-Y üçlü aminoasitlerinden oluşur. X ve Y diğer aminoasitlerdir. Fakat, yaygın olarak prolin ve 4-hidroksiprolindir [Bailey and Light, 1989].

Jelatinin, düzgün, elastik, ısı-geri dönüşümlü jeller oluşturmasının en önemli nedeni olduğu için prolin-glisin-X yapısı önemlidir. Memeli jelatini, molar olarak yaklaşık %22 prolin ve hidroksiprolin içerir, buna karşılık balık derisi jelatini yalnızca %17 prolin ve hidroksiprolin içeriğiyle düşük jelleşme kapasitesine sahiptir.

Jelatinin birincil yapısının bir diğer önemi; belirgin miktarlarda bazik (%2,5 lysine, %5 arginine) ve asidik (%7,2 glutamic asit ve %4,7 aspartic asit) aminoasitler

içermesidir. Ayrıca jelatinin alfa zinciri üzerinde non-polar aminoasitler de bulunmaktadır.

Kollajende, glutamic ve aspartic asitlerin %30'u asit amid şeklinde bulunurlar ve nötral kollajenin izo-elektrik noktası 9,2'dir.



Jelatin oluşturma prosesinde, asit amidlerin çoğu asitlere dönüşür ve jelatinin izo-elektrik noktası 9,2 ve 4,8 arasında değişir.

A tipi jelatin genel olarak altı aydan büyük olmayan hayvanların kemiklerinden üretilir ve çapraz bağlı jelatin minimal düzeydedir. Kollajen, 50°C' de, yaklaşık pH=4'te asidifikasyonla denatüre edilir. Kollajen, süre ve sıcaklığa bağlı olarak pI=7-9 civarında jelatin vermek üzere bozunur.

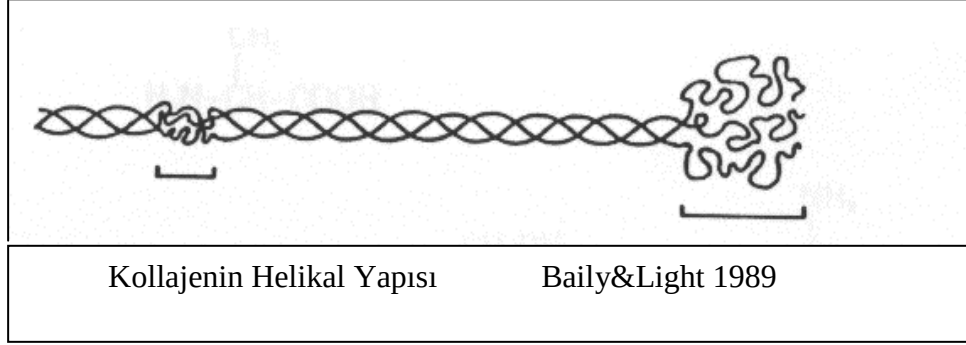
B tipi jelatin ise genellikle inek-deri ve kemiklerinden üretilir. Daha yaşlı hayvanlar kullanıldığından dolayı, kollajenin alkali ile ön muamele edilmesi gerekir. Böylece, kollajendeki çapraz bağlı yapılar hidroliz edilir ve pI değerleri 4,8-5,2 arasında olan jelatine dönüşür. Eğer moleküler yük önemli ise, jelatinin A veya B tipi olduğu önemlidir. Fakat daha çok jelatinin jel-gücü (bloom strength) önemlidir. Yüksek jel gücü olan jelatinler (>200g bloom), düşük olan jelatinlere göre çok daha fazla su absorblama özelliğine ve yüksek jel oluşturma sıcaklığına sahiptirler.

2.4.2. Jelatinin Özellikleri

Jelatin zaten denatüre bir protein olduğu için, denatürantlardan hemen hemen hiç etkilenmeyen çok ilginç moleküler yapı özelliklerine sahiptir [Cole, 2001]. Jelatinin bu özellikleri özet olarak anlatılmıştır.

2.4.2.1.Jelasyon ve Su Bağlama

Kollajen prolin ve hidroksiprolinin pyrrolidin halkalarının bükülmesiyle oluşan, lifli bir ipe benzer alfa zincir sarmallarından meydana gelmiş bir proteindir.



Şekil 2.7. Kollajenin Yapısı

Kollajen denatüre olduğu zaman, alfa zincirlerinin helikal bölgeleri 3 boyutlu su tutma ağları oluşturarak, kollajen heliksini yeniden oluştururlar; bu da bildiğimiz jelatin jeldir. Bu jel oldukça elastik bir yapı gösterir. Aynı zamanda jel ısı-geri dönüşümlüdür. Fakat jelatinin bu özellikleri gösterebilmesi, zamana bağlı bir olaydır ve jelleşme yaklaşık 16 saat içinde tamamlanır.

2.4.2.2.Köpük Oluşumu

Çok sayıda protein gibi jelatin de suda kıvam oluşturur ve jelatinin diğer proteinlere göre mükemmel bir köpük oluşturma özelliği vardır. Bu özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde, özellikle dondurma ve marsmallow yapımında kullanılır.

2.4.2.3.Emülsüfiye Özellik

Protein zincirinin non-polar bölümlerinden dolayı jelatinin yağlarla suyu karıştırma özelliği vardır ve bu özellik jelatini düşük yağ karışımlarında kullanma imkanı verir. Sıcaklıkla bozunan doğal süt proteinlerinin yerine jelatin kullanılır.

2.4.2.4.Kristalizasyona Karşı Kollaidal Koruma

Jelatin, kristalizasyonu engelleyen kolloid özelliğe sahiptir. Özellikle dondurma ve şekerlerde, donma sırasında çok iyi kristal oluşumuyla bu özelliği gözlenir. Jelatin stabilizasyonu sağlar ve zamanla laktozun yavaş kristallenmesiyle kumlu, taneli yapı oluşumu engellenmiş olur.

2.4.3.Jelatin Üretimi

o **Asit prosesi (A tipi jeletin):** 24-48 saat süreyle kollajen seyreltik HCL veya H_2SO_4 ile $50^\circ C$ ’ de $pH=4$ ’ de hidroliz edilir.

o **Alkalın prosesi (B tipi jelatin):** Hidroliz, $[Ca(OH)_2]$ kullanılarak yapılır. Kemik, deri temelli düşük temelli materyaller kullanılır. Alkali muamele birkaç haftalık sürede gerçekleşir ve kollajen yapı yavaşça bölünür.

Jelatin çözeltisi ekstraksiyon prosesinden elde edilir, sonra yüksek performanslı ayırıcılardan çözeltide halen az miktarda bulunan yağları uzaklaştırmak için geçirilir. Mekanik temizleme filtrasyon yapılarak tamamlanır. Bölgesel tuzlar iyon değiştiricilerle uzaklaştırılır. Sonra jelatin çözeltisi vakum evaporatörlerde konsantre hale getirilir. Suyun bir kısmı uzaklaştırılır ve jelatin konsantrasyonu %5’ den %30’a arttırılmış olur. Bu saflaştırılmış ve konsantre jelatin, daha sonra güvenlik nedeniyle, yüksek-sıcaklık muamelesi ve özel soğutucularda katılaştırma işlemi yapılarak sterilize edilir. Sonra delici disklerde preslenme ve eriştaye benzer forma getirme işlemi yapılır ve jelatin parçaları kurutulur [E.Dick, 2002].

2.4.4.Jelatinin Kullanım Alanları

Jelatin ilaç endüstrisinde çok geniş uygulama alanına sahiptir. Hazırlanması kolay olduğundan biyomedikal uygulamalarda, biyomateryal olarak kullanılır. Jelatin sulu çözeltielerde çözünür olduğundan dolayı, uzun süreli biyomedikal uygulamalarda kullanılabilmesi için çapraz bağlanması önerilir. Böylece mekanik ve ısı kararlılığı artırılmış olur. Kimyasal çapraz bağlayıcılar arasında en geniş kullanım alanı olan

glutaraldehit. Glutaraldehit' in aldehit grupları ile polypeptit zincirinin lysine ve hidroksilysine aminoasitlerinin serbest amino grupları reaksiyona girer ve çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleşir [Bigi, et al. 2001].

Jelatinin bir ilaç taşıyıcı matrix olarak kullanılmasının nedeni; kollajenden üretim yöntemine bağlı olarak değişen, doğal elektriksel yapısındanadır. Örneğin, alkalın proste kollajenin amid gruplarının hidroliziyle oluşan jelatinde karboksil grupları yoğundur, bu nedenle jelatin negatif yüklüdür. (IEP = 5) Buna karşılık asit prosesinde, kollajenin amid gruplarıyla reaksiyon daha az olduğundan oluşan jelatinin izoelektrik noktası kollajenle aynıdır. Eğer taşınacak protein ilaç asidik ise, izoelektrik noktası 9,0 olan bazik jelatin tercih edilir. İzoelektrik noktası 5,0 olan asidik jelatin ise bazik protein ilaçlar için kullanılır. Ayrıca jelatin biyo-güvenilir bir matrix olduğu için bu uygulamalarda tercih edilir [Tabata et al. 1998].

Jelatinin aldehitlerle muamele edilerek yapılan kapsülleri çözünemediğinden, ilacın salıverilmesi yavaşlatılır. Ayrıca çapraz bağlayıcı reaktif ile ilaç arasında istenmeyen reaksiyonlar ve toksik etkiler oluşabilir. Şekerler veya şeker türevi bileşikler ve oksitlenmiş polysakkaritlerin jelatini çapraz bağlayıcı olarak kullanımı daha uygundur [Cortesi et al. 1999].

Jelatin, formaldehit ve glutaraldehit ile çapraz bağlanarak çözünemez yapılabildiğinden mikrobial hücre ve enzimlerin immobilizasyonunda tercih edilen bir matrixtir. Jelatinin çapraz bağlanarak kullanılması mekanik kararlılığını artırır ve entrapment (hapsetme) yöntemi kullanıldığında difüzyon dengesi sağlar [Alteris et al. 1990]. Jelatin ve alginat karıştırılarak yapılan immobilizasyonda bead' lerin porları kontrol edilebilir [Tsai et al. 1998]. Jelatin beadlerinin porları alginat ile kontrol edilerek ve GTA ile çapraz bağlanarak E.coli hücreleri 6-aminopenicillanic asit üretimi için immobilize edilmiştir [Norouzian, et al. 2002].

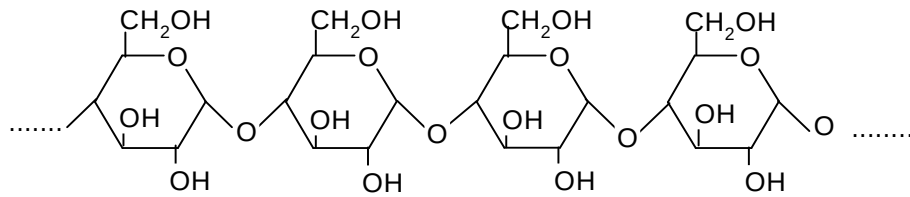
Jelatinin çapraz bağlayan glutaraldehit ve formaldehit reaktiflerinden -çapraz bağlama özelliği açısından- en iyisinin glutaraldehit olduğu kanıtlanmıştır. GTA ile çapraz bağlanan jelatin filmleriyle yapılan immobilizasyonda, aktivitenin formaldehite göre daha iyi olduğu bulunmuştur [Ray et al. 1995]. Jelatinle

immobilizasyon çapraz bağlayıcı reaktif kullanmadan, organik solventte kararlı hidrojeller oluşturularak da yapılabilir [Hedström et al. 1998].

Biyosensör yapımında, enzim elektrotlarının hazırlanmasında da jelatin kullanılır. Enzim, jelatin ve GTA kullanılarak immobilize edilir ve elektrot yapımında kullanılır [Srivastava, et al. 2001] [Akyılmaz ve Dinçkaya, 1999].

2.5.Nişasta

Nişasta, bütün yeşil bitkilerin ürettiği ve depoladığı enerji kaynağıdır. Kloroplastlar ve amyloplastlar gibi özel organellerde küçük granüller (1-100µm) şeklinde depolanır. Bu küçük beyaz granüller soğuk suda çözünmez. Nişasta granülleri, bütün bitki kaynaklarında türden türe değişen fiziksel özelliklere ve farklı ölçülere sahiptirler. Kimyasal özellikleri ise belirgin farklılıklar göstermez. Bazı nişastalar, örneğin patates az miktarda (% 0,2) kovalent bağlı fosfat içerir. Fakat bu fosfat nişastanın fiziksel özelliklerinde önemli bir değişikliğe neden olmaz ve hidrolizini etkilemez.

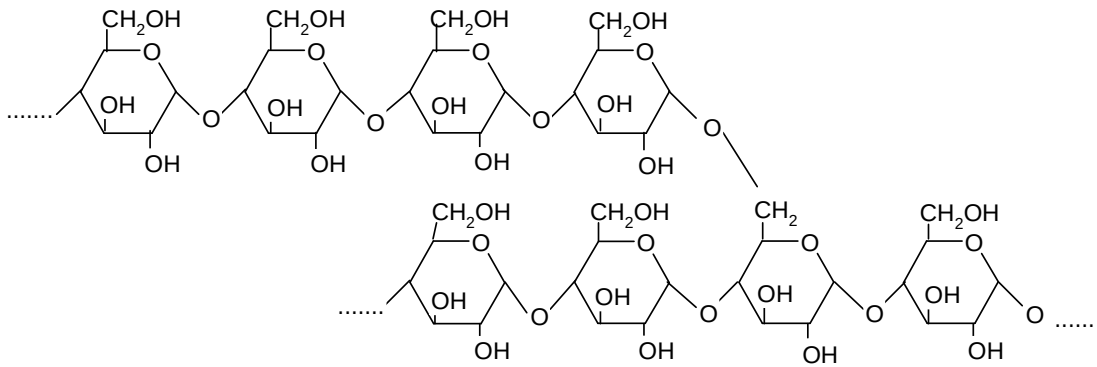


Şekil 2.8. Nişastanın Amiloz Bileşeni

Nişasta, α -(1→4) ve dallanma noktalarında α -(1→6) glukozidik bağlarıyla bağlanmış D-glukoz monosakkaritlerinden oluşmuş bir polimerdir.(Şekil 2.8.) Amiloz ve amilopektin olarak adlandırılan iki bileşenden oluşur. Amiloz, D-glukoz moleküllerinin α -(1→4) glikozid bağlarıyla oluşturdukları düz yapıda bir moleküldür. Molekül ağırlıkları birkaç binden 500.000'e kadar değişir. Amiloz suda

tamamen çözünemediği halde, hidratlaşmış miseller oluştururlar ve bu misellerde polisakkarit zinciri proteinlerdeki gibi sarmal yapıya sahiptir.

Amilopektin ise dallanmış yapıda bir polimerdir. (Şekil 2.9.) Dallar 24-30 glukoz uzunluğundadır ve nişastanın kaynağına göre değişebilir. Zincir omurgası α -(1→4) glikozid bağlarıyla oluşur ve dallanmalar α -(1→6) glikozid bağlarıyla meydana gelir. Amilopektin de koloidal veya miselli çözeltiler oluşturur ve amilopektinin molekül ağırlığı bir milyona kadar çıkabilir.



Şekil 2.9. Nişastanın Amilopektin Bileşeni

2.5.6.Maltodekstrin

Jelatinleşmiş nişastanın α -amilazla hidroliz edilmesiyle maltodekstrinler meydana gelir. Hidroliz bu noktada durdurulup ürün saflaştırılır ve kurutulur. Maltodekstrinler (DE 15-25) maltoz, maltotrioz, maltotetraoz, maltopentaoz vs.'den meydana gelmiş tatlı olmayan sakkaritlerdir. Dolgu, kararlılık ve yapışkan özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde çok geniş kullanım alanları vardır [Wang and Wang, 2000].

2.5.7.Glukoz

Tabiatta en bol bulunan monosakkarit, altı karbonlu bir şeker olan D-glukozdur. Diğer bütün şeker molekülleri D-glukozdan türemiştir ve canlıların bünyelerinde bulunan polisakkaritlerin tamamına yakını bu molekülün polimerleridir. Glukoz pek çok organizma için en büyük enerji kaynağıdır ve doğada çeşitli polimerik hallerde bulunur. (Selüloz, nişasta ve glikojen). Selüloz ve nişasta yüksek bitkilerde üretilir, glikojen ise hayvanlarda temel şeker deposu olan polimerdir.

Bütün basit monosakkaritler gibi glukoz da beyaz kristal yapıdadır, suda kolay çözünür ve tatlıdır. Glukoz, endüstride nişastanın hidroliziyle elde edilir. Fermantasyon ürünlerinde glukoz şurupları kullanılır. Ayrıca glukoz, fruktoz şuruplarının üretiminde de kullanılır.

2.5.8.Nişastanın Hidrolizi

Nişasta, glukoz birimleri arasındaki glikozid bağlarının asit veya enzim kullanarak koparılmasıyla hidroliz edilir. Nişasta endüstrisinde, glukoz ve fruktoz şuruplarının maltodekstrinden üretiminde nişastanın hidrolizi büyük önem taşır.

Nişastanın asit ile hidrolizinde; nişasta asit ile muamele edilerek pH yaklaşık 2' ye düşürülerek reaktörde basınç ve sıcaklık ayarlanarak hidroliz gerçekleştirilir. Asit ile hidrolizin, reaktörde aşınmaya neden olma, çözeltide renk oluşturma, nötralizasyondan sonra tuz oluşumu, ısıtma için daha fazla enerji gerektirmesi ve ürün oluşumunun kontrol edilememesi gibi dezavantajları vardır.

Nişastanın enzimatik hidrolizi 3 aşamada oluşur:

1. Jelatinleşme 2. Sıvılaştırma ve 3. Sakkarifikasyon

Jelatinleşme, nişastanın su ile ısıtılarak enzim ile sıvılaştırmaya hazırlandığı adımdır. α -amilaz ilave edilir ve sıcaklık 105 °C' de 5 dakikada nişastanın kısmi sıvılaştırması yapılır. Sıcaklık 90-100 °C' ye düşürülerek 1-2 saat süreyle enzimin

reaksiyonlarını tamamlaması sağlanır. α -amilaz nişastadaki α -(1→4) bağlarının hidrolizini yapar [Nielsen and Borchert, 2000], jelin viskozitesi hızla azalır ve maltodekstrinler oluşur. Maltodekstrinlerden (DE 15-25) glikoamilaz ya da α -amilaz kullanılarak sakkarifikasyonla ileri hidroliz ürünleri üretilebilir. β -amilaz, pullulanaz enzim karışımları uygulanarak oluşan ürün içerikleri kontrol edilebilir.

DE = Dekstroz Eşitliği (Dextrose Equivalent) İndirgen şeker miktarının (glukoz) toplam karbohidrata oranıdır. Hidrolizin derecesi, indirgen şeker miktarındaki artış ile ölçülür.

2.6.Gluukoamilaz

Glukoamilaz (GA) [amiloglukosidaz (EC. 3.2.1.3)], endüstride nişastanın glukozu hidrolizinde kullanılan bir exo-enzimdir. Nişasta ve ilgili oligosakkaritlerin indirgen olmayan uçlarından α -(1→4) ve α -(1,→6)-glukozidik bağlarını hidroliz ederek β -D-glukoz birimlerini açığa çıkarır. Aspergilli türlerinden elde edilen glukoamilazlar iki doğal formdan meydana gelirler; G1 ve G2. *Aspergillus niger*' den (Ala-1-Arg-616) elde edilen G1 O-glikozil bağlanma bölgesi bir nişasta bağlama ve bir katalitik bölgeden meydana gelmiştir [Christensen, 2000]. G1' in molekül ağırlığı 82500' dür. G2 formunda nişasta bağlanma bölgesi bulunmaz ve nişasta hidroliz aktivitesi G1' e göre daha düşüktür. Fakat her iki formun da oligosakkaritleri hidroliz aktiviteleri aynıdır. İnaktivasyon kinetikleri de benzerdir, yalnız G1 molekülü bir adımda geridönüşümsüz açılırken (aktivasyon enerjisi 253 kJmol^{-1}) G2 ise iki adımda geridönüşümsüz açılır (aktivasyon enerjileri 208 ve 289 kJmol^{-1}) [Polakovic and Bryjak, 2002].

Aspergillus awamori X100' den elde edilen GA' nın bağlayıcı ve katalitik bölgelerinin üç boyutlu yapısı bilinmektedir. *A.awamori* ve *A.niger* organizmalarından elde edilen glukoamilazların aminoasit dizileri %95 benzerlik gösterir ve iki glukoamilazın katalitik bölgeleri farklılık göstermez [Christensen, 2000].

Glukoamilaz, nişastanın α -(1→4) bağlarının yanında α -(1→6) bağlarını da hidroliz etme yeteneğinden dolayı nişasta endüstrisindeki önemi büyüktür. Glukoz üretiminde, glukoamilaz biyoreaktöre nişastanın maltodekstrinlere parçalanmasından sonra ilave edilir. Enzim, maltodekstrinlerin tamamını glukoza hidroliz eder. Nişastanın enzimatik hidrolizinde dikkat edilmesi gereken husus glukoamilaz basamağında ortamın pH' ının ve sıcaklığın düşürülmesidir (pH=4,5 60 °C). Glukoamilazın termostabilitesi α -amilaza göre daha düşüktür. Bu nedenle glukoamilazın proste immobilize olarak kullanılmasının önemi artmaktadır.

2.6.1. Glukoamilaz ile Yapılan Çalışmalar

Gıda endüstrisinde geniş uygulama alanı olan GA' ın yüksek maliyeti nedeniyle kullanımı güçleşmektedir. Ayrıca, enzim reaksiyon ürünlerinden kolaylıkla ayrılamaz ve ürünün eldesi zorlaşır. GA, bu sebeple çeşitli yollarla immobilize edilmiştir.

GA, iyonik ve iyonik olmayan matrixlere tutunma (sorption) ile immobilize edilmiştir. Enzimin matrixe tutunması enzim miktarına, matrix tipine ve immobilizasyon şartlarına bağlıdır. Bu amaçla altı farklı iyon-değiştirici matriks kullanılmış ve maksimum tutunma Stirosorb MkhDE-100 (monokloro dietileter ile çapraz bağlı stiren) ile pH=5 ve 2-4 °C' de elde edilmiştir. İmmobilize GA için optimum şartlar; 65-72 °C ve pH=4,0-5,5' dir ve immobilizasyon geri dönüşümlüdür [Ruadze, et al. 2001]. Başlangıç enzim aktivitesi 3000 U, immobilizasyondan sonra enzim aktivitesi 2816,5 U/g matriks olarak bulunmuştur.

Bir başka adsorpsiyon örneğinde, GA hiçbir çapraz bağlayıcı reaktif kullanmadan aktif karbon üzerine adsorbe edilmiş ve dextrinlerin hidrolizinde kullanılmıştır. İmmobilize GA, serbest enzim ile karşılaştırıldığında %90 aktivite göstermiş ve optimum sıcaklık immobilize ve serbest enzim için sırasıyla 60 ve 70°C' dir. Bu sistemde de immobilizasyon geridönüşümlüdür [Rani, et al. 2000].

Glukoamilazın alginat'a karşı, nişasta bağlanma bölgesinden kaynaklandığı tahmin edilen bir afinitesi vardır. GA' nın bu özelliği *Aspergillus niger*' den hazırlanması işleminde kullanılır [Teotia, et al. 2001]. Glukoamilazın alginat ile

immobilizasyonu, enzimin kalsiyum-alginat beadlerinden kaçması söz konusu olduğundan ek bir işlem yapmadan bitirilmez. Bir çalışmada, kalsiyum-alginat beadlerinde immobilize edilen GA' nın beadlerden kaçışını engellemek amacıyla beadler quatenize poly(etilenimin) ile kaplanmıştır. 10 tekrarlanan reaksiyon sonunda enzim aktivitesinin %65' ini korumuştur [Tanaka, et al. 1984].

Glukoamilaz, gözeneksiz polystiren/poly(sodyum stiren sülfonat) (PS/PNaSS) mikrokürelerine adsorbe edilerek immobilize edilmiştir. 10 dakikada %70 adsorpsiyon, 90 dakikada ise %90 adsorpsiyon sağlanmıştır.

Enzim aktivitesinin, kullanılan matrix ve enzim miktarına bağlı olarak %30-80 arasında olduğu bulunmuştur. Aktivitedeki azalmanın nedeni; matrix yüzeyindeki sülfonatlar ile enzim arasındaki etkileşimin yoğun olmasıdır [T.Oh and Kim, 2000].

Aktif gruplar içeren magnetik poly(stiren) partikülleri üzerine, tek adımda glukoamilaz enzimi immobilize edilmiştir. Termal kararlılık, pH etkileri, kinetik parametreler ve immobilize GA' ın aktivasyon enerjileri belirlenmiş ve serbest GA ile karşılaştırılmıştır. Immobilize GA' ın serbest enzime göre aktivitesi %70' dir ve yarı ömrü 190 saattir (serbest enzim: 33,8 saat). Partiküller magnetik özelliklerinden dolayı reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılırlar ve fluidized-bed reaktörde magnetik alan uygulanarak stabilize edilebilirler [Bahar ve Çelebi, 1998].

Glukoamilaz, invertaz ve sellobiaz enzimleri jelatin partikülleri üzerine GTA kullanılarak başarıyla immobilize edilmiştir. Bu yöntem, jelatin-entrapment immobilizasyonu ile birlikte kullanılmıştır. GA ve invertaz enzimleri birlikte kullanılmış, enzimlerden biri entrapment diğeri jelatin parçalarının yüzeyine GTA ile immobilize edilmiştir. GTA konsantrasyonu ve enzim kaplama süresi enzimlerin aktivitelerini etkilemektedir [Kennedy and Kalogerakis,1984]. Bu çalışmaya benzer bir çalışmada, GA jelatin-entrapment ve yüzeye bağlama yöntemlerinin her ikisi kullanılarak immobilize edilmiş ve α -amilaz ile indirgenmiş nişasta kullanılarak reaksiyonlara etkisi incelenmiştir [Kennedy, et al. 1985].

GA, Amberlit IRA-904 üzerine adsorbe edilerek de immobilize edilmiştir. Nişasta, dekstrin ve maltoz için enzim aktivitesine bakıldığında sırasıyla %2,2

%22,3 ve %28 olarak bulunmuştur. Aktivitenin düşük olmasının nedeni Amberlit' in por büyüklüğüne (ortalama 375 Å) bağlanmıştır [Balakumar, et al. 1998].

Epoksid, izosiyanat, asid klorür ve karboksilik asid ile aktive plastik matrixlere glukoamilaz ve α -amilaz enzimleri ayrı ayrı kovalent immobilize edilmiş ve optimum şartlar belirlenmiştir. En yüksek enzim bağlanma yüzdesi ve aktivite isocyanate-aktive matrixte elde edilmiştir. Bu değerler ise yalnızca %4 ve 28,0 U g^{-1} tür [Roig, et al. 1994].

Selülozun, periyodat ile oksitlenmesiyle oluşan dialdehit selülozun aldehit gruplarının glukoamilazın amino gruplarıyla reaksiyonu sonucu kovalent bağlar oluşturulmuş ve enzim immobilize edilmiştir. Bu çalışmada immobilize ve serbest enzimin optimum pH' ları sırasıyla 3,0-5,0 ve 3,5-5,0 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık immobilizasyondan etkilenmemiştir (60-65 °C). İmmobilize enzimin aktivitesi ilk 7 batch' de, bağlanmadan kalan enzimin uzaklaşmasından dolayı azalmış, sonra %36' da sabit kalmıştır [Varavinit, et al. 2001].

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereçler

3.1.1.Kullanılan Maddeler

Tablo 3.1. Deneyde kullanılan kimyasal maddeler

ADI	ÜRETİCİ FİRMA	KATALOG NO
Jelatin (200 bloom)	PB Gelatine	Nr.30003561
Glutaraldehit	Merck	8.2063.1000
Kalsiyum Asetat	Merck	1.09325.0500
Sodyum Asetat	Merck	1.06265
K ₂ HPO ₄	Fluka	60353
Asetik Asit	Merck	1.00056
HCL	Merck	100.317.2500
NaOH	Fluka	71692
Sodyum Azid	Merck	1.06688.0250
D-(+) Glukoz	Sigma	G-8270
Maltodekstrin 20	Avebe	
α -naftol	Sigma	N-1000
H ₂ SO ₄	Sigma	732.2500
C ₂ H ₅ OH	Merck	1.00030
Asetonitril	Merck	13.2500
Polyetilenglikol 2000	Merck	8.17020.1000
Whatman K5 TLC Plaka		4850-820

3.1.2.Kullanılan Aletler

Tablo 3.2. Deneyde kullanılan cihazlar

ALETİN ADI

Densitometre (Bio-rad GS 670)

Hot plate

Magnetik Karıştırıcı, Heidolph MR 3003

PH Metre, ino-Lab Level 1

3.2.Enzim

Aspergillus niger' den elde edilen glukoamilaz, Novo Nordisk firması tarafından hediye edildi. Enzimin optimum pH değeri 4.5, optimum sıcaklığı 60 °C' dir. enzimin yoğunluğu 1,2 g/mL ve aktivitesi 300 AGU/mL olarak belirtilmiştir.

AGU (One Novo Amyloglucosidase Unit) değeri, aşağıdaki standart şartlarda dakikada 1 mikro-mol maltozu hidroliz eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Substrat	maltoz
Sıcaklık	25 °C
PH	4,3 (asetat tampon çözelti)
Reaksiyon süresi	30 dakika

3.3.Yöntem

3.3.1.İnce Tabaka Kromatografisi ile Glukoz Tayini

Reaksiyon sonunda alınan ve seyreltilen örneklerden 1 μ L Hamilton şırınga kullanılarak Whatman K5 TLC plakalarına damlatıldı ve 85:15 (v/v) oranında asetronitril-su içeren çözelti yürütme sistemi olarak kullanıldı. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, saç kurutma makinası ile plaka kurutuldu. TLC plakaları renklendirme çözeltisine daldırılıp, 110 °C’ de ısıtılmış termoplate üzerinde 10 dakika ısıtıldı. Renklendirme çözeltisi plaka üzerindeki karbohidratları görünür hale getirmek için kullanılır etilalkole sülfürik asit (%5 v/v) ve α -naftol (%0,5 w/v) ilave edilerek hazırlanır.

3.3.2.Glukoamilazın İmmobilizasyonu

3.3.2.1.PGA Çözeltisinin Hazırlanması

GTA çözeltisine (20mL, %25), NaOH (600 μ L, 1M) çözeltisi ilave edilerek pH=10,5’ e ayarlanarak yarım saat karıştırıldı. Daha sonra nötralizasyonu sağlamak amacıyla 1 M HCL çözeltisinden 600 μ L ilave edildi. Oluşan PGA çözeltisinin yüzdesi %23,58’ dir.

3.3.2.2Jelatinlerin Aktivasyonu

Jelatin (2g), 10 mL PGA çözeltisi ve K₂HPO₄ tampon çözeltisinden (25mM, pH=8) 10mL ilave edilerek 15 dakika oda sıcaklığında magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karıştırma işlemi tamamlandıktan sonra jelatinler, distile su ile yıkandı. Jelatinler bekletilmeden, 10mL %25 GTA ve 10mL sodyum asetat tampon çözelti (25mM, pH=6) içeren karışıma ilave edilerek 50 °C’ de yarım saat süreyle karıştırıldı. Süre sonunda jelatinler önce distile su, sonra sodyum asetat tampon çözeltisi ile yıkandı.

3.3.2.3.GA' nın Jelatin Üzerine İmmobilizasyonu

20 mL sodyum asetat tampon çözelti (25mM, pH=6), 1 mL PEG (%25) çözeltisi, 10 mg jelatin, %23,58' lik PGA çözeltisinden 170 μ L (karışımdaki oranı %0,2 olacak şekilde), 50 μ L GA enzimi ve 2 gram aktive edilmiş jelatin ilave edilerek, oda sıcaklığında (25°C) 200 rpm hızda magnetik karıştırıcıda yaklaşık 20 saat karıştırıldı. Daha sonra jelatinler tampon çözelti ile yıkandı ve kullanılıncaya kadar pH=4,3 25 mM kalsiyum asetat çözeltisi içerisinde, buzdolabında bekletildi.

3.3.3.Sıcaklık-Aktivite Deneyleri

İmmobilize (2g) ve serbest enzim (50 μ L), kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25mM, pH=4,5) hazırlanan maltodekstrin (%5 w/v) çözeltisiyle değişik sıcaklıklarda (40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, ,80°C), 5 dakika süreyle reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda alınan 100 μ L numune, içerisinde 900 μ L distile su olan şişelere ilave edilerek reaksiyonun durdurulması için 10 dakika kaynatıldı. Alınan numuneler TLC metodu ile incelenerek glukoz miktarları tayin edildi.

3.3.4.Ph- Aktivite Deneyleri

İmmobilize (2g) ve serbest enzim (50 μ L), kalsiyum asetat tampon çözelti (25mM) ile hazırlanan maltodekstrin (%5 w/v) çözeltisinde değişik pH' larda (3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7) 5 dakika süreyle reaksiyon gerçekleştirildi. 5. dakikanın sonunda alınan 100 μ L' lik numuneler, 900 μ L distile suya ilave edilerek 10 dakika kaynatıldı ve reaksiyon durduruldu. Numuneler TLC metodu ile incelendi ve glukoz miktarı bulundu. pH 3 ve 6 arasındaki çözeltiler için asetat tampon çözeltisi, pH 6 ve 7 arasındaki çözeltiler için fosfat tampon çözeltisi kullanıldı.

3.3.5. Km ve Vm Tayini

Serbest enzim (10µL) ve immobilize enzim (2g), kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25mM, pH=4,5) değişik konsantrasyonlarda (%0,5, 1, 2, 3, 4, 5) maltodekstrin çözeltileriyle 48°C' de muamele edildi. Reaksiyon süresi, serbest enzim için 3 dakika iken, immobilize enzim için 1 dakikadır. Reaksiyon sonunda alınan 100µL numune, içinde 450µL 0,1M NaOH bulunan şişeye ilave edildi. 5 dakika bekletilerek reaksiyon durdurulduktan sonra 450µL 0,1M HCL numune karışımı 1 mL' ye tamamlanmış oldu. Glukoz miktarı, TLC metodu ile tayin edildi.

4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, glukoamilaz yeni bir metod kullanılarak immobilize edildi. Polyglutaraldehit ile aktifleştirilen jelatine, GA kovalent bağlanarak immobilizasyon gerçekleştirildi ve % 85 aktivite verimi elde edildi.

İmmobilizasyon teknikleri arasında en etkili olanı, enzim ve matriks arasında kovalent bağlar oluşturmaktır. İmmobilizasyon işleminde dikkat edilecek iki nokta vardır: 1. Bağlanma reaksiyonu, enzim aktivitesinde azalmaya neden olmayacak şartlarda gerçekleştirilmeli. 2. Enzimin aktif bölgesi kullanılan reaktiften etkilenmemeli. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon şartları, fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlanmaya göre daha karmaşıktır. Bu nedenle kovalent bağlanma, enzimin aktif merkezini ve konformasyonal yapısını değiştirebilir ve bunun sonucu olarak enzim aktivitesinde kayıplar meydana gelebilir. Fakat, enzim ve taşıyıcı matriks arasındaki bağın gücü oldukça yüksektir ve substratın varlığında ya da iyonik şiddeti yüksek çözeltilerde enzim kaçıışı oluşmaz.

Bir matrikse kovalent bağlanma, enzimin katalitik aktivitesinde etkili olmayan fonksiyonel gruplarıyla oluşmalıdır. Eğer, enzimin aktif bölgesindeki aminoasit rezidüleriyle inaktivasyon engellenirse yüksek aktivite elde edilir.

Glutaraldehit miktarı fazla olduğunda, enzimin amin gruplarına gelişigüzel bağlanmaya başlar ve enzimin üç boyutlu yapısını değiştirerek aktivitesini kaybetmesine neden olur. Başarılı bir immobilizasyon için aldehit gruplarının inaktivasyonunun en aza indirilmesi gerekir. İmmobilizasyon sırasında koruyucu maddelerin eklenmesi, enzim moleküllerinin kararlı olmasını sağlar [Chae, et al. 2000].

Bu çalışmada, enzimin kararlılığını artırmak amacıyla immobilizasyon ortamına az miktarda jelatin çözünerek ilave edilmiş ve PEG eklenmiştir. Enzim immobilizasyonu sırasında protein ilavesi enzimin kararlılığını artırır. Enzim kararlılığını artırmada kullanılan bir diğer bileşik ise polietilenglikol (PEG)' dir. [Rocha, et al. 1998] [Chae, et al. 2000]. PEG' in koruma etkisi için birkaç açıklama

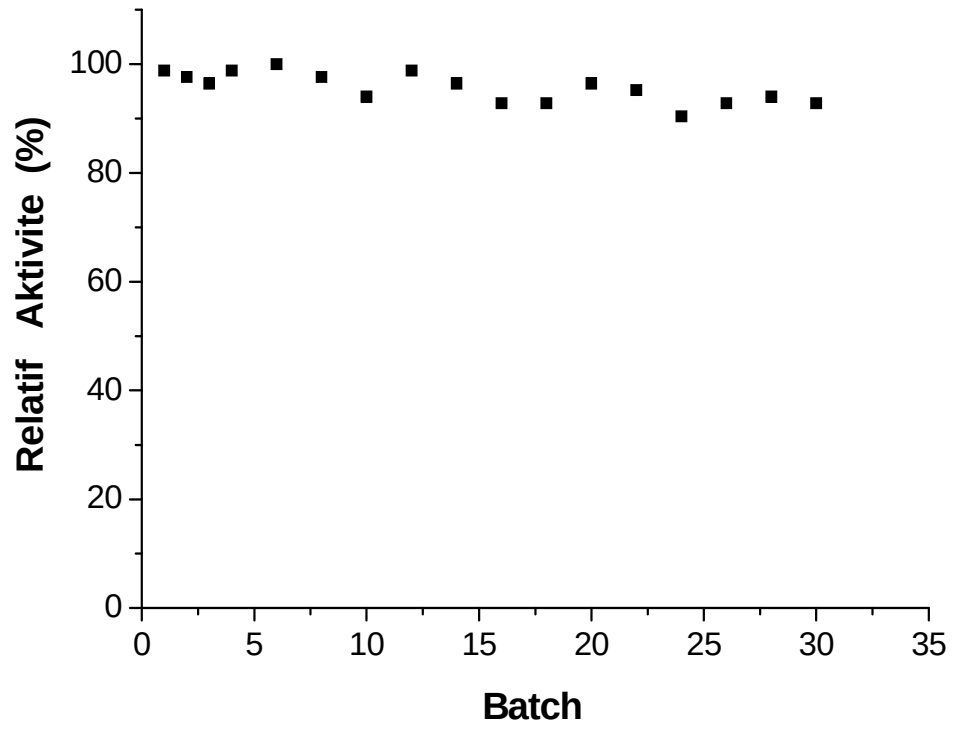
mevcuttur. Bunlar; PEG' in uzun zincirli yapısından dolayı enzimin üç boyutlu yapısının bükülmez oluşudur. PEG kısmi hidrofobiktir ve enzimin hidrofobik aminoasit rezidüleriyle etkileşir. PEG' in ilave edilmesi, enzim molekülünün hidrofobik bölgesinden su moleküllerinin çıkarılmasına neden olur ve böylece enzim daha dayanıklı ve bükülmez olur.

Normal şartlar altında enzimin doğal ve aktif üç boyutlu yapısı, aminoasit rezidülerinin birleşmesiyle oluşur ve hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri ve iyonik etkileşimler gibi farklı kovalent-olmayan güçlerin dengesiyle üç boyutlu yapı korunur. İmmobilizasyon işlemi sırasında, koruyucu maddelerin ilave edilmesi bu yapının korunması amacıyla yapılır.

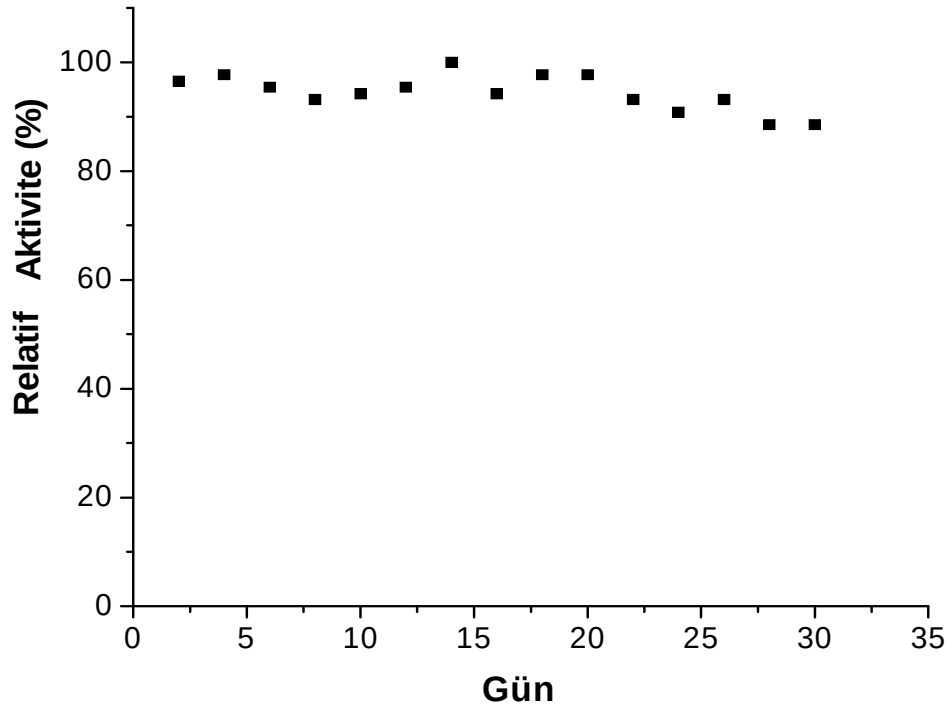
Glutaraldehit, proteinlerin aminogruplarıyla geniş bir pH aralığında reaksiyon verir ($\geq \text{pH } 3$). Reaksiyonlar pH 7 ve 9 aralığında geridönüşümsüz meydana gelir. GTA, bazik şartlar altında aldol kondenzasyonuna uğrayarak aldehit polimerleri oluşturur ve bu polimerlerin proteinlerle, kararlı Schiff bazı oluşumu yoluyla ya da bir Michael katılmasıyla verdiği reaksiyonlar geri-dönüşümsüzdür ve bu noktada rezonans ile bağ kararlı olur, böylece asit kararlılığı da açıklanabilir [Okuda, et al. 1991]. GTA monomerlerinin proteinlerle reaksiyonları ise geri-dönüşümlüdür. GTA ile aktive edilmiş jelatinler üzerine enzim immobilize edildiğinde, protein ve GTA arasındaki reaksiyon geridönüşümlü olduğundan, enzim aktivitesinin büyük çoğunluğunu kaybeder [Ray, et al. 1995].

Bu çalışmada, jelatin partikülleri PGA ile aktive edildiği için jelatine bağlanan glukoamilaz grafik 4.1 ve 4.2' de görüldüğü gibi, 30 tekrarlanan reaksiyon ve 30 gün boyunca aktivitesini korumuştur.

İmmobilize enzim uzun süreli olarak aktivitesini korumaktadır: 60 gün sonunda aktivitesinin % 90' ını ve 90 gün sonunda ise aktivitesinin % 75' ini korumuştur.



Grafik 4.1. İmmobilize GA için Tekrarlanan reaksiyon sayısı (Batch) -Aktivite Grafiği



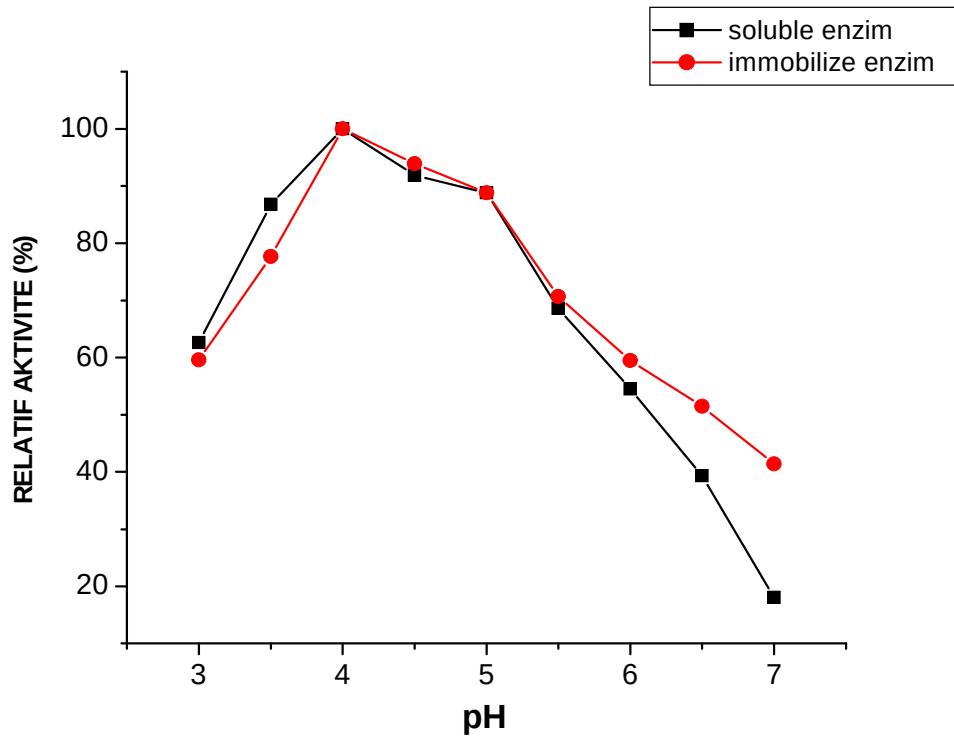
Grafik 4.2. İmmobilize GA için Gün-Aktivite grafiği

Glutaraldehit' in matrikslerin amino-gruplarıyla reaksiyonu iki adımda gerçekleşir. İlk önce, GTA matriksle çok hızlı reaksiyon verir ve reaksiyonun % 90' ı bu ilk adımda gerçekleşir. Karbon içeriği hızla artar ve karbon atomlarının, azot atomlarına oranının enyüksek olduğu an, bu ilk adımdır. Reaksiyonun hızlı adımı ilk 15 dakikada gerçekleşir. Bundan sonraki ikinci adımda, karbon içeriği çok yavaş hızla artar [Monsan, 1977]. PGA ile jelatinlerin aktivasyonu 5, 10, 15 ve 20 dakika süreyle yapıldıktan sonra diğer immobilizasyon işlemleri değiştirilmeden tekrarlandı ve aşağıda gösterilen enzim aktiviteleri elde edildi:

PGA ile Reaksiyon Süresi (dakika)**Enzim Aktivitesi (% Relatif)**

5	46
10	66
15	100
20	38

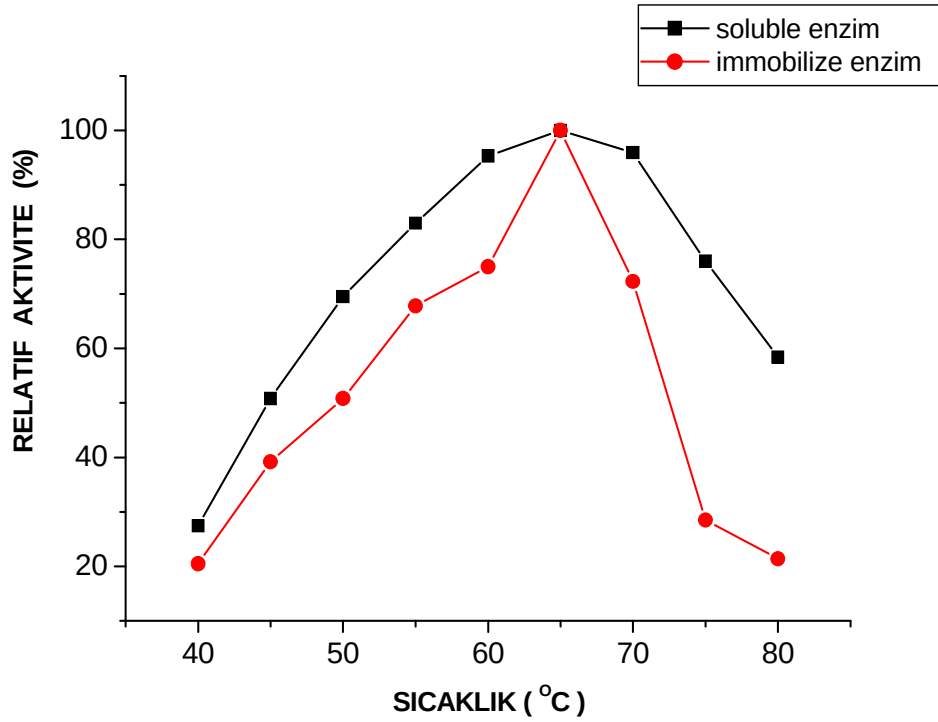
PGA ile reaksiyon süresi artarken, enzim aktivitesinin azalmasının nedeni; reaksiyon hava ortamında yapıldığından, aldehit gruplarının oksidasyona uğraması ve Cannizzaro reaksiyonları sonucu karboksilik grupların oluşumuyla açıklanır.



Grafik 4.3. Serbest ve immobilize GA için pH-Aktivite grafiği

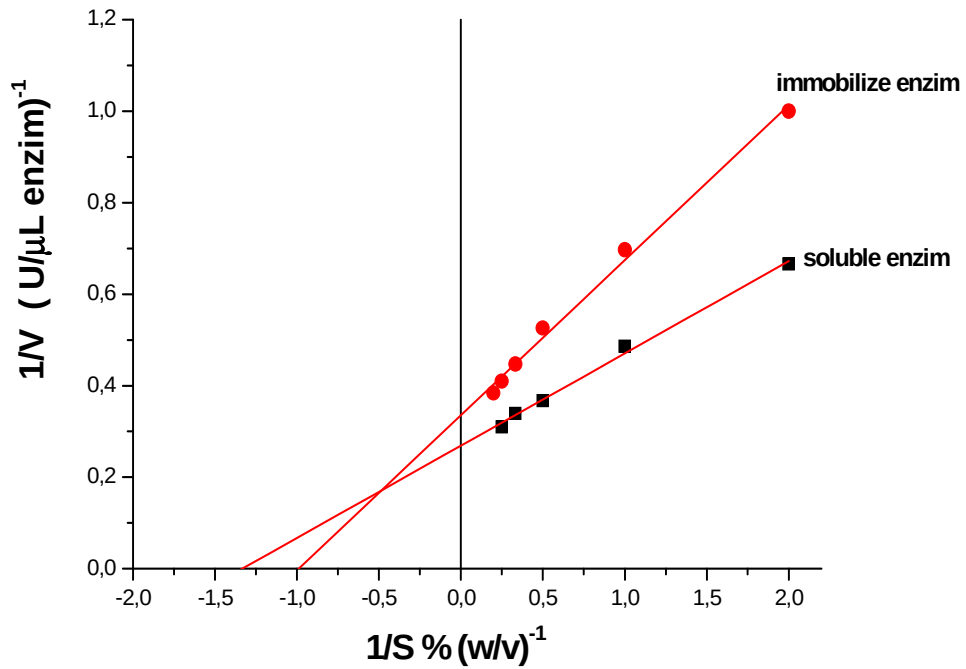
Grafik 4.3' te immobilize ve serbest enzimin pH-aktivite grafiği gör÷lmektedir. İmmobilize ve serbest enzimin optimum pH değeri 4 olarak bulunmuştur. İmmobilize enzimin aktivitesi pH=5 ve pH=7 arasında, serbest enzime oranla daha iyi olduğu bulunmuştur.

Grafik 4.4' te immobilize ve serbest enzimin sıcaklık-aktivite grafiği gör÷lmektedir. Her iki enzim için optimum sıcaklık 65 °C bulundu.



Grafik 4.4. Serbest ve immobilize GA için Sıcaklık-Aktivite grafiği

Grafik 4.5’ te serbest ve immobilize glukoamilaz için Lineweaver-Burk grafiği görülmektedir. Serbest enzim için $K_m = \%0,75$ g maltodekstrin/L , immobilize enzim için $K_m = \%1,01$ g maltodekstrin/L olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için V_m değerleri sırasıyla 0,020 ve 0,016 (mmol Glc / dak.µL enzim) olarak bulunmuştur.



Grafik 4.5. Serbest ve immobilize GA için Lineweaver-Burk grafiği

Bu tez çalışmasında yeni bir immobilizasyon metodu kullanılarak glukoamilaz yüksek bir verimle (%85) immobilize edildi. İmmobilize enzim uzun süreli olarak (90 gün) aktivitesini korumaktadır. Elde edilen immobilize enzim endüstriyel olarak glukoz üretiminde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Klibanov, Alexander M. (1983). Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science* Vol.219, 722-727

Uhm, T.B., Hong, J.S. and Byun, S.M. (1984). Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in calcium alginate gel. *J.Korean Agricultural Chemical Society* Vol.27, No.2, 112-118

Ruggeri, B., Sassi, G., Specchia, V., Bosco, F. And Marzona, M. (1991). Alginate beads coated with polyacrylamide resin: Potential as a biocatalyst. *Process Biochemistry* 26, 331-335

Bernath, F.R. and Venkatasubramanian, K. *Methods of enzyme immobilization.* Chapter 19

Chui, W.K. and Wan, L.S.C (1997). Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres. *J. Microencapsulation* vol.14, no.1, 51-61

Walt, D.R. and Agayn, V.I. (1994). The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends in analytical chemistry* vol.13, no.10, 425-430

Margel, S. and Rembaum, A. (1980). Synthesis and characterization of poly(glutaraldehyde). A potential reagent of protein immobilization and cell separation. *Macromolecules* 13, 19-24

Fan, C.H. and Lee, C.K. (2001). Purification of D-hydantoinase from adzuki bean and its immobilization for N-carbamoyl-D-phenylglycine production. *Biochemical Engineering Journal* 8, 157-164

Saito, T., Yoshida, Y., Kawashima, K., Lin, K.H., Inagaki, H., Maeda, S., Kobayashi, T. (1997). Influence of aldehyde groups on the thermostability of an immobilized enzyme on an inorganic support. *Materials Science Engineering C5* 149-152

Chae, H.J., In, M.J. and Kim, E.Y. (1998). Optimization of protease immobilization by covalent binding using glutaraldehyde. *Applied Biochemistry and Biotechnology*

Bailey, A.J. and Light, N.D. (1989). Molecular and fibre structure of collagen in connective tissue in meat and meat products. Elsevier Applied Science

Cole, C.G.B. (2001). Gelatine: Its properties and its application in dairy products. Dairy Symposium 2001, South Africa

Dick, E. (2002). An introduction to gelatine. Business Briefing: Innovative Food Ingredients, 64-66

Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K. and Roveri, N. (2001). Mechanical and thermal properties of gelatine films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Biomaterials 22, 763-768

Tabata, Y. and Ikada, Y. (1998). Protein release from gelatine matrices. Advances Drug Delivery Reviews 31, 287-301

Cortesi, R., Esposito, E., Osti, M., Squarizoni, G., Manegatti, E., Davis, S.S. and Nastruzzi, C. (1999). Dextran crosslinked gelatin microspheres as drug delivery system. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 47, 153-160

Alteriis, E. and Scardi, V. (1990). Mechanical stability and diffusional resistance of a polymeric gel used for biocatalyst immobilization. Enzyme Microbial Technol. 12, 539-545

Tsai, S.W., Jeng, M.J., Tsay, R.Y. and Wang, Y.J. (1998). Gel beads composed of collagen reconstituted in alginate. Biotechnology Techniques vol.12, 21-23

Norouzian, D., Javadpour, S., Moazami, N. and Akbarzadeh, A. (2002). Immobilization of whole cell penicillin G acylase in open pore gelatine matrix. Enzyme and Microbial Technol. 30, 26-29

Ray, R.R., Jane, S.C. and Nanda, G. (1995). Immobilization of β -amylase from *Bacillus megaterium* B6 into gelatine film by crosslinking. Journal of Applied Bacteriology 78, 157-162

Hedström, G., Backlund, S., Eriksson, F. and Karlsson, S. (1998). Lipase-catalysed stereoselective esterification using gelatine-based hydrogels colloids and surfaces. B:Biointerfaces 10, 379-384

Srivastava, P.K., Kayastha, A.M., and Srinivasan. (2001). Characterization of gelatine-immobilized pigeonpea urease and preparation of a new urea biosensor. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 34, 55-62

Akyılmaz, E. and Dinçkaya, E. (1999). A new enzyme electrode based on ascorbate oxidase immobilized in gelatine for specific determination of L-ascorbic acid. *Talanta* 50, 87-93

Wang, Y.J. and Wang, L. (2000). Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches. *Starch/Stärke* 52, 296-304

Nielsen, J.E. and Borchert, T.V. (2000). Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1543, 253-274

Christensen, U. (2000). pH-dependence of the fast step of maltose hydrolysis catalysed by glucoamylase G1 from *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* 349, 623-628

Polakovic, M. and Bryjak, J. (2002). Modelling of the kinetics of thermal inactivation of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20, 443-450

Ruadze, I.D., et al. (2001). Preparation and characterization of immobilized *Aspergillus awamori* 466 glucoamylase. *Applied Biochemistry and Microbiology* vol.37, no.2, pp.178-183

Rani, A.S., Das, M.L.M. and Satyanarayana, S. (2000). Preparation and characterization of amyloglucosidase adsorbed on activated charcoal. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10, 471-476

Teotia, S., Lata, R., Khare, S.K. and Gupta, M.N. (2001). One-step purification of glucoamylase by affinity precipitation with alginate. *Journal of Molecular Recognition* 14, 295-299

Tanaka, H., Kurosawa, H., Kokufuta, E. and Veliky, I.A. (1984). Preparation of immobilized glucoamylase using Ca-alginate coated with partially quarternized poly(ethyleneimine). *Biotech. And Bioeng.* vol.26, 1393-1394

Oh, J.T. and Kim, J.H. (2000). Preparation and properties of immobilized amyloglucosidase on nonporous PS/PNaSS microspheres. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 356-361

Bahar, T. and Çelebi, S.S. (1998). Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic poly(styrene) particles. *Enzyme and Microbial Technology* 23, 301-304

Kennedy, J.F. and Kalogerakis, B. (1984). Surface immobilization and entrapping of enzymes on glutaraldehyde crosslinked gelatine particles. *Enzyme Microb. Technol.* vol.6, 127-131

Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. and Kalogerakis, B. (1985). Comparison of action patterns of gelatin-entrapped and surface-bound glucoamylase on an α -amylase degraded starch substrate: a critical examination of reversion products. *Enzyme Microb. Technol.* vol.7, 22-28

Balakumar, S., et al. (1998). Improved performance of Amberlite IRA-904 immobilized glucoamylase. *Starch / Starke* 50, Nr.2-3, 93-95

Roig, M.G., Kennedy, J.F. and Garaita, M.G. (1994). Immobilization of carbohydrates on epoxide-, isocyanate-, acid chloride-, and carboxylic acid- activated plastic supports. *Journal Biomater. Sci. Polymer* vol.6, no.7, pp.661-673

Varavinit, S., Chaokasem, N. and Shobsngob, S. (2001). Covalent immobilization of glucoamylase to baggase dialdehyde cellulose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 721-725

Chae, H.J., Kim, E.Y. and In, M.J. (2000). Improved immobilization yields by addition of protecting agents in glutaraldehyde-induced immobilization of protease. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 89, no. 4, 377-379

Rocha, J.M.S., Gil, M.H. and Garcia, F.A.P. (1998). Effects of additives on the activity of a covalent immobilized lipase in organik media. *Journal of Biotechnology* 66, 61-67

Okuda, K., Urabe, I., Yamada, Y. and Okada, H. (1991). Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *Journal of Fermentation and Bioengineering* vol.71, no.2, 100-105

Monsan, P. (1977). Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis* 3, 371-384

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: ZEHRA ÖLÇER

DOĞUM YERİ VE TARİHİ: İzmit 06-04-1978

İLKÖĞRENİM: 50. Yıl Cumhuriyet İlkokulu

ORTAÖĞRENİM: İzmit Merkez Ortaokulu, Atafen Özel Fen Lisesi

YÜKSEK ÖĞRENİM: Kocaeli Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2001)

YÜKSEK LİSANS: Eylül 2001 – Eylül 2002 Ders Dönemi

Eylül 2002 – Ocak 2004 Tez Dönemi