

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

POLİÜRETAN KÖPÜKLERE EKMEK
MAYASI İMMOBİLİZASYONU

Aişe AKPINAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2004

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

POLİÜRETAN KÖPÜKLERE EKMEK
MAYASI İMMOBİLİZASYONU

Aişe AKPINAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd.Doç.Dr. Aziz TANRISEVEN

GEBZE
2004

ÖZET

Saccharomyces cerevisiae invertaz endüstriyel enzimler arasında en önemli olanıdır ve endüstride sukrozdan invert şeker üretiminde kullanılmaktadır. Bu çalışmada poliglutaraldehitte *Saccharomyces cerevisiae* ekmek mayası hücrelerinin poliüretan köpüklere kovalent bağlanarak %75 verimle immobilize edilmiştir. Immobilize ve serbest enzim için optimum pH 4,5'tur. Immobilize ve serbest enzim için optimum sıcaklık 55°C'dir. Kinetik sabitler (K_m ve V_{max}) serbest invertaz için 43,9 mM ve 9,3 mmolFru/dak.mg maya, immobilize enzim için 68,8 mM ve 6,8 mmolFru/dak.mg maya olarak bulundu. Immobilize enzim 30 tekrar kullanım ve 30 gün boyunca aktivitesini korumuştur.

SUMMARY

Saccharomyces cerevisiae invertase is one of the most important industrial enzymes used for industrial production of invert sugar from sucrose. In this study, *Saccharomyces cerevisiae* bakers' yeast cells immobilized covalently in polyurethane foam by polyglutaraldehyde resulted in %75 activity yield. The optimum pH value for immobilized and soluble enzyme were 4,5. The optimum temperatures for immobilized and soluble enzyme were 55°C. Kinetic parameters (K_m and V_{max}) for soluble enzyme were 43,9 mM ve 9,3 mmolFru/min.mg yeast respectively, whereas K_m and V_m for immobilized enzyme were 68,8 mM ve 6,8 mmolFru/dak.mg yeast respectively. Immobilized enzyme retained its activity during 30 batch reaction and 30 days.

TEŞEKKÜR

Tez konusunu bana öneren, çalışmalarım boyunca fikirleriyle desteğini eksik etmeyen ve bilimsel düşüncelerimin şekillenmesine yardımcı olan değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Aziz TANRISEVEN'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kimya Bölüm Başkanımız Prof.Dr. Adem KILIÇ'a, Prof.Dr. Bülent KESKİNLER'e ve G.Y.T.E. Fen Fakültesi Kimya ve Biyoloji Bölümündeki tüm arkadaşlarıma,

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerini, sevgi ve anlayışlarını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili 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
GRAFİK DİZİNİ	xii
 1.GİRİŞ	 1
2.KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Enzimlerin İmmobilizasyonu	3
2.1.1. Adsorpsiyon	4
2.1.1.1. Fiziksel Adsorpsiyon	5
2.1.1.2. İyonik Bağlanma	5
2.1.2. Hapsetme	6
2.1.2.1. Kalsiyum-Alginat ile İmmobilizasyon	7
2.1.2.2. Poliakrilamid ile İmmobilizasyon	8
2.1.3. Bifonksiyonel Reaktiflerle Çapraz Bağlanma	8
2.1.4. Kovalent Bağlanma	9
2.1.5. Hücre İmmobilizasyonu	11
2.2. Matriks Aktivasyon Yöntemleri	12
2.2.1. Siynojen Bromide	12
2.2.2. Karbodiimid	12
2.2.3. Diazotizasyon	13
2.2.4. Alkilasyon ve Arilasyon	13
2.2.5. Aldehit Kondenzasyon	13
2.3. Glutaraldehit	13
2.3.1. Glutaraldehit'in Yapısı	13
2.3.2. Polyglutaraldehit	17

2.4. Glutaraldehit Ve Poliglutaraldehit İle İmmobilizasyon	19
2.5. Hidrofilik Poliüretan Prepolimer	21
2.6. <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> Ve İvertaz Enzimi	25
2.6.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve İvertaz ile Yapılan Çalışmalar	27
2.7. İvert Şeker	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Gereçler	33
3.1.1. Kullanılan Maddeler	33
3.2. Kullanılan Aletler	34
3.3. Yöntem	34
3.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi ile Fruktoz Tayini	34
3.3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> İvertazın İmmobilizasyonu	34
3.3.2.1. PGA Çözeltilisinin Hazırlanması	34
3.3.2.2. PÜ Köpüklere <i>Saccharomyces cerevisiae</i> İmmobilizasyonu	35
3.3.2.3. PÜ Köpüklere Kovalent Bağlanmamış Mayanın PGA ile Çapraz-Bağlanması	35
3.3.2.4. İvertaz Enziminin Aktivite Tayini	35
3.3.3. Sıcaklık-Aktivite Deneyleri	36
3.3.4. pH-Aktivite Deneyleri	36
3.3.5. K_m ve V_{max} Tayini	36
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	37
4.1. İmmobilizasyona Deterjan Etkisi	38
4.2. İmmobilizasyona Maya Miktarının Etkisi	39
4.3. Aktivite-Tekrar Kullanım ve Aktivite-Gün Deneyleri	39
4.4. pH-Aktivite Deneyleri	41
4.5. Sıcaklık-Aktivite Deneyleri	41
4.6. K_m ve V_{max} Tayini	42
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

GA	Glutaraldehit
PGA	Poliglutaraldehit
TLC	İnce tabaka kromatografi
μl	Mikrolitre
MA	Molekül ağırlığı
PEG	Poliäten glikol
PUF	Poliüretan köpük
pH	$-\log [\text{H}^+]$
MDI	Metilendifenil diizosiyanat
TDI	Tollil diizosiyanat
nm	nanometre
PCS	Poli(karbomilsülfonat)
DEAE-selüloz	Dietilaminoetil selüloz
CSTR	Sürekli karıştırmalı-tank reaktör
μg	mikrogram
PÜ	Poliüretan

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İmmobilizasyon Çeşitleri	4
2.2. Enzimlerin Alginat ile İmmobilizasyonu	7
2.3. Biyofonksiyonel Reaktiflerle Çapraz-Bağlanma	9
2.4. Eupergit-C ile enzim immobilizasyonu	10
2.5. Diizosiyanat Prepolimer	11
2.6. Diizosiyanat prepolimerin polimerleşme mekanizması	11
2.7. Sulu çözeltideki GA yapıları	14
2.8. Asidik ve nötral şartlarda GA'nın proteinlerle reaksiyonları	15
2.9. Kuaterner piridinyum bileşikleri ile GA'nın çapraz-bağlanması	16
2.10. Bazik şartlarda dimer yapıdaki halkasal GA'nın proteinlerle reaksiyonu	17
2.11. PGA'nın bazik şartlar altında proteinlerle reaksiyonu	18
2.12. Cannizaro reaksiyonu sonucunda oluşan polimerik GA yapıları	19
2.13. GA ile çapraz-bağlanma	20
2.14. Sukrozun enzimatik hidrolizi	26
2.15. İnvvertaz enziminin çalışma mekanizması	27

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Adsorpsiyonda kullanılan adsorbentler	6
3.1. Deneyde kullanılan kimyasal maddeler	33
3.2. Deneyde kullanılan cihazlar	34
4.1. Span 80 miktarının aktiviteye etkisi	39
4.2. Maya miktarını aktiviteye etkisi	39

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
4.1.İmmobilize invertaz için batch-aktivite grafiği	40
4.2. İmmobilize invertaz için gün-aktivite grafiği	40
4.3. Serbest ve immobilize invertaz için pH-aktivite grafiği	41
4.4. Serbest ve immobilize invertaz için sıcaklık aktivite grafiği	42
4.5. Serbest ve immobilize invertaz için Lineweaver-Burk grafiği	43

1.GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı şartlarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar. Yeterli şartların sağlanması durumunda etkinliklerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamların dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanı sağlamaktadır. Enzimler protein yapısındadırlar ve proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu oluştururlar. Bugün yaklaşık olarak bilinen 2000 enzim vardır. 1940'ların başında çok az sayıda enzim saflaştırılabilmişken, bu rakam 1980'lerde 200'ü kristallendirilmiş ve 1500'ü yüksek düzeyde saflaştırılmış enzime ulaşmıştır.

Endüstride kullanılan reaksiyonların bir çoğu kimyasal ve biyolojik katalizörlerin katalizlemesiyle gerçekleştirilmektedir. Enzimler biyolojik olmayan katalizörlerin çoğunda bulunmayan dikkate değer pek çok özelliğe sahiptir. Bu özelliklerini yüksek katalitik aktivite (bilinen kimyasal katalizörlere göre daha fazla etkinlik gösterebilmeleri), spesifik aktivite (substrat seçiciliği, stereoseçicilik, regiospesifiklik, geometri özgüllüğü vb) ve ılımlı şartlarda reaksiyon gerçekleştirebilme (oda sıcaklığı, normal basınç altında ve sulu çözelti ortamında) şeklinde sıralayabiliriz.

Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin substrat ve üründen ayrılarak tekrar kullanımı oldukça zordur. Bu sorunların çözümünü sağlayabilmek amacıyla son 30 yıldır enzimoloji alanında enzim immobilizasyon yöntemlerinin geliştirilmesine çalışılmıştır. Enzimlerin bir kez kullanımı yerine immobilize edilerek tekrarlanabilir kullanımlarının sağlanması ekonomik açıdan büyük önem taşır. İmmobilize enzimler kimyasal katalizörlere oranla substratlarına spesifik olmaları ve substratlarının saflığı çok yüksek bir ürün haline çevirme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle; tıpta, biyomedikal ve biyoteknoloji alanında ve endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda enzim immobilizasyonu yanında mikroorganizma immobilizasyonu da önem kazanmıştır. Substrat, mikroorganizmanın içerdiği enzimlerden biri için spesifik ise saf bir enzimin immobilizasyonu yerine bunu içeren

mikroorganizmanın immobilizasyonu enzimin saflaştırılmasını gerektirmeyeceğinden ekonomik açıdan büyük yarar sağlamaktadır.

Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmakta olan invert şeker (glukoz ve fruktoz karışımı) üretimi sukrozun asit hidroliziyle veya saf haldeki invertaz kullanımı veya invertaz aktivitesine sahip *Saccharomyces cerevisiae* ile enzimatik olarak gerçekleştirilmektedir. Enzimatik yöntemle gerçekleştirilen hidroliz elde edilen ürünün renksiz, kokusuz ve saf olması sebebiyle asit hidrolizine tercih edilmektedir. Ülkemizde gıda fabrikalarında kullanılmakta olan invert şeker ise asit hidrolizi veya ithalat yoluyla temin edilmekte olan çözünür invertaz kullanılarak elde edilmektedir. Soluble invertaz immobilizasyonu ile karşılaştırıldığında hücre içi invertaz aktivitesine sahip tüm hücrelerin immobilizasyonu ekonomik avantajlar sağlamasına rağmen yaygın olarak uygulanmamaktadır.

Bu çalışmada, ülkemizde üretilen ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae* (Pakmaya, İZMİT) poliüretan köpüklere immobilize edildi ve invert şeker üretiminde kullanıldı.

2.KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Enzimlerin İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon terimi enzimin suda çözülebilir hareketli fazdan, suda-çözünmeyen faza dönüştürülmesi olarak tanımlanmaktadır [Klibanov,1983]. Enzim immobilizasyonu enzimlerin tekrar kullanımına ve elde edilen ürünün ortamdan kolayca ayrılmasına imkan sağladığından, immobilizasyon için ucuz ve kullanıma uygun teknikler geliştirmek özellikle endüstriyel kullanımı olan enzimler açısından büyük önem taşımaktadır.

İmmobilize enzimler, biyokimya, biyoteknoloji, biyotıp ve gıda endüstrisi gibi alanlarda termal kararlılık, kullanım kararlılığı, ve saf ürün eldesi gibi üstünlükleri nedeniyle serbest enzimlere tercih edilmektedir.

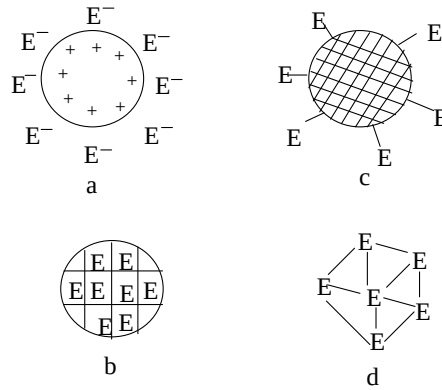
İmmobilize enzimin soluble enzime olan avantajlarını şöyle sıralayabiliriz:

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler (süzme, santrifüjleme, vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre şartlarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli proseslere uygulanabilirler.
- Serbest enzime kıyasla daha karardır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.

- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilirler.
- Enzimin kendi kendini parçalama (autolysis, self-digestion) olasılığı azalır.

Enzim immobilizasyonu 4 ana grupta incelenmektedir (Şekil 2.1):

- Adsorpsiyon
- Polimerik jelle hapsetme (entrapment)
- Kovalent bağlama
- Bifonksiyonel reaktiflerle çapraz-bağlama



E: Enzim

Şekil 2.1 İmmobilizasyon Çeşitleri

2.1.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon metodu kovalent bağlanma için fonksiyonel olmayan bir taşıyıcı matrikse enzimin zayıf kuvvetlerle bağlanması ile sağlanmaktadır. Destek materyaline uygun pH ve sıcaklıktaki enzim çözeltisi ilave edilir, sistem birkaç dakika karıştırılır ve daha sonra adsorbe olmayan enzim çözeltisi yıkamayla uzaklaştırılır. Enzim immobilizasyonu için genel olarak kullanılan metot olarak

adsorpsiyonun avantajı, herhangi bir reaktife ihtiyaç duymaması ve aktivasyon için gerekli olan basamakların minimum olmasıdır. Adsorpsiyon yöntemi fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlanma gibi iki farklı şekilde gerçekleştirilmektedir(Tablo 2.1.). İyonik bağlanma ile fiziksel adsorpsiyon arasındaki ana fark iyonik bağlanmada enzimle taşıyıcı arasındaki bağlanmanın daha kuvvetli olmasıdır.

2.1.1.1. Fiziksel Adsorpsiyon

Enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan bu yöntem suda-çözünmeyen taşıyıcının yüzeyine protein yapıdaki enzimin fiziksel adsorpsiyonu temeline dayanır. İmmobilizasyon, enzimin aktif merkezinde veya konformasyonunda değişime neden olmamaktadır.

Enzimle taşıyıcı arasında zayıf bağlanmalar olduğundan sıcaklık, pH ve iyonik şiddetin değişimiyle veya sadece substratın varlığında bile proteinin taşıyıcıdan ayrılabilir. Fiziksel adsorpsiyonun diğer bir dezavantajı ise spesifik olmamasıdır. Bir matrikse adsorbe edilen enzimin kararlılığı fiziksel adsorpsiyonu izleyen kimyasal bir reaksiyonla proteinin çapraz-bağlanmasıyla gerçekleştirilebilir.

2.1.1.2. İyonik Bağlanma

İyonik bağlanma metodu, iyon-değiştirici kalıntılar içeren suda-çözünmeyen taşıyıcıya protein yapıdaki enzimin iyonik bağlanmasına bağlıdır. İyon-değiştirici merkeze sahip polisakkarit ve sentetik polimerler genellikle taşıyıcı olarak kullanılırlar. Dietilaminoetil selüloz (DEAE-selüloz) veya Sephadex gibi anyon değiştiriciler ve karboksimetil selüloz gibi katyon değiştiriciler destek materyali olarak enzimlerin adsorpsiyonu için endüstriyel olarak kullanılmaktadırlar.

Taşıyıcıya enzimin bağlanması kovalent bağlanma metodu için gereken şartlardan daha ılımlı şartlarda ve daha kolay gerçekleştirilmektedir. İyonik bağlanma metodu enzimin aktif merkezinde ve konformasyonunda önemli değişiklikler oluşturmadiğundan enzim immobilizasyonu yüksek verimle gerçekleştirilebilmektedir.

Enzimlerin taşıyıcıdan kaçışları yüksek iyonik şiddete sahip substrat çözeltilerinde veya pH'nın değişimiyle meydana gelmektedir.

Tablo 2.1 Adsorpsiyonda kullanılan adsorbentler

ETKİLEŞİM	ADSORBENTLER
FİZİKSEL ADSORPSİYON	Aktif karbon, silika jel, alumina, cam Nişasta, kil MODİFİYE MATRİKSİLER: Concanavalin A-, Sepharose Tannin-, aminohekzil selüloz Fenoksiasetil selüloz
İYONİK BAĞLANMA	KATYON DEĞİŞTİRİCİLER: CM-selüloz Dowex 50 Amberlite CG-50 ANYON DEĞİŞTİRİCİLER: DEAE-selüloz DEAE-sephadex Amberlite

2.1.2. Hapsetme(Entrapment)

Hapsetme ile immobilizasyon membran ya da bir polimerin ağ yapısı içerisinde enzimin hapsedilmesi temeline dayanır. Substrat ve ürünün geçişine izin verilirken proteinin saklı kalmasını sağlayan bir yöntemdir.

İmmobilizasyon işleminde, jel oluşumundan önce enzim monomer çözeltisine ilave edilir. Daha sonra, jel oluşumu ya sıcaklığın değiştirilmesi ya da jel oluşumunu sağlayan bir kimyasalın ilavesiyle gerçekleştirilir.

Bu metot da kovalent bağlanma ve çapraz bağlanmadan farklı olarak enzimin kendisi jel matrikse ya da membrana bağlanmadığından geniş uygulama alanına

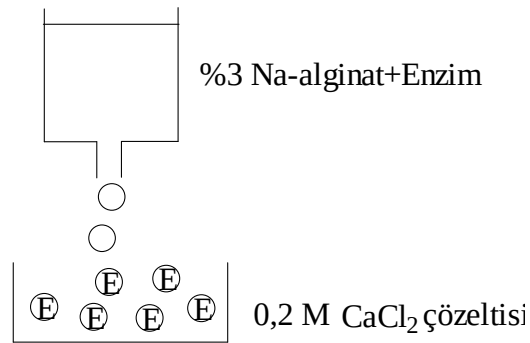
sahiptir. Polimerizasyon için gerekli olan kimyasallar, enzim veya mikroorganizmalar için zararlı olabileceğinden dikkatli kullanılmalıdır.

Enzimlerin immobilizasyonu için endüstriyel kullanıma sahip olan N-N' metilen bisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakril amid, kalsiyum alginat ve kappacaragenan gibi jeller kullanılmaktadır.

2.1.2.1. Kalsiyum Alginat İle İmmobilizasyon

Alginat, β -(1-4)-D mannuronik asit ve α -(1-4)-L-gluronik asit birimlerinin düzlemsel polimeridir. Alginat, immobilizasyon işleminin basit ve ılımlı şartlarda boyutları değişmeyen ve kontrol edilebilir bead oluşumuna izin verdiği için çok yaygın olarak kullanılan bir polimerdir [Uhm, et al. 1984].

İmmobilizasyon işleminde sodyum alginat çözeltisine enzim veya mikroorganizma ilave edilir ve daha sonra bu çözelti 0.2M CaCl_2 çözeltisine damlatılarak suda çözünmeyen kalsiyum alginat bead'leri oluşturulur. Sodyum alginat, CaCl_2 ile temas ettiğinde Na-Ca iyon değişimi nedeniyle Ca-Alginat bead'leri oluşur ve enzim molekülleri bu bead'lerin içinde bulunur (Şekil 2.2) .



Şekil 2.2 Enzimlerin Alginat ile immobilizasyonu

2.1.2.2. Poliakrilamid İle İmmobilizasyon

Poliakrilamid jel oluşturma işlemi, akrilamid monomerinin ve sık kullanılan çapraz-bağlayıcı reaktif olan N-N'-metilenbisakrilamid tampondaki çözeltisine enzimin karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Polimerizasyon ışık ortamında ribofalvin gibi fotokimyasal bir sistemle veya tetrametilen diamin ve potasyum persülfat gibi bir redoks sistem tarafından başlatılabilir. Polimerizasyon reaksiyonu ekzotermik olduğundan enzimin termal denatürasyonunu önlemek için düşük sıcaklıklar (0 dan 25°C'ye) tercih edilmelidir.

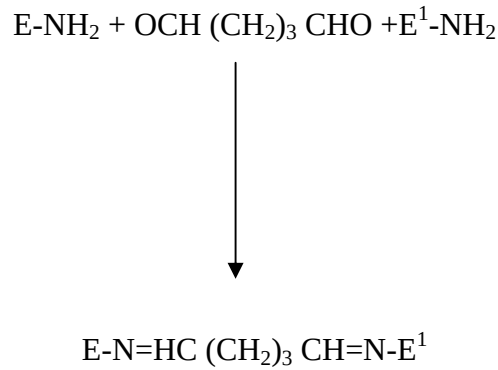
İmmobilizasyon verimi monomer konsantrasyonu ve monomer/çapraz-bağlayıcı oranından etkilenmektedir. 100 ml çözeltideki toplam monomer (akrilamid+metilen bisakrilamid) miktarı genellikle % 20-50 arasında değişirken, çapraz-bağlayıcı/monomer oranı % 1-10 sınırında olmalıdır. Monomer akrilamidin üreye benzer bir mekanizmayla enzim denatürasyona sebep olduğundan ortama substrat ilave edilerek denatürasyon önlenmelidir. Başlatıcı olarak kullanılan potasyum persülfat sülfidril gruplarını oksidasyona uğratarak enzim aktivitesini düşürmektedir. Bu etkinin oluşumunu önlemek için kullanılan persülfat konsantrasyonu % 0,625 iken % 0,125 konsantrasyonunda glutatyon, ditiyoeritrol ve sistein gibi indirgeyici reaktifler kullanılmalıdır.

2.1.3. Bifonksiyonel Reaktiflerle Çapraz Bağlanma

Enzimlerin immobilizasyonu proteinin moleküler içi, diğer protein molekülleriyle ya da suda çözünmeyen bir katı matriks üzerindeki fonksiyonel gruplarla çapraz-bağlanmasıyla gerçekleştirilmektedir. Bir enzimin kendisiyle çapraz-bağlanması hem pahalı hem de proteinlerin bir kısmı destek materyali olarak kullanılacağından etkisizdir ve bağıl olarak düşük aktiviteye sebep olmaktadır. Genellikle çapraz-bağlama diğer bir metodla beraber kullanıldığında çok elverişlidir. Adsorbe edilmiş enzimlerin karalı hale getirilmesi ve poliakril amid jellerden kaçıışı önlemek için kullanılmaktadır.

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 2.3). Çapraz-bağlanma reaksiyonları çeşitli şartlar altında gerçekleştirilmektedir. Bu zor şartlar enzimin aktif merkezinin konformasyonel değişimine neden olabilir ve bu sebeple enzimin aktivitesinde önemli kayıp meydana gelebilir. Çapraz bağlanma moleküller arası veya molekül içi oluşabilir ve çapraz-bağlanmış olan protein çöker. Çapraz bağlı protein santrifüj ile kolaylıkla ayrılabilir.



Şekil 2.3 Bifonksiyonel Reaktiflerle Çapraz Bağlanma

2.1.4. Kovalent Bağlanma

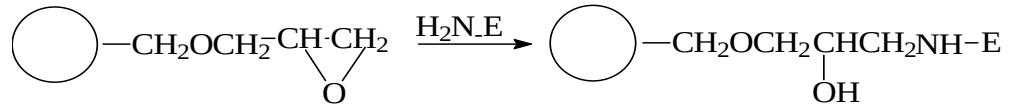
İmmobilizasyon teknikleri içerisinde en uygun olanıdır ve bu teknikte destek matriksi ve enzim arasında kovalent bağ oluşur. İmmobilize edilecek enzim ve reaksiyon tipinin seçimi iki karakteristikle belirlenir:

- Bağlanma reaksiyonu için gerekli olan reaksiyon şartlarında enzimatik aktivitedeki kaybı az olmalıdır.
- Kullanılan reaktifler enzimin aktif bölgesini etkilememelidir.

Kovalent bağlanma metodu, kovalent bağ ile enzim ve suda-çözünmeyen taşıyıcının bağlanması esasına dayanır. Bu bağlanma için kullanılan fonksiyonel gruplar şöyledir: amino, karboksil, sülfidril, hidroksil, imidazol, fenolik, tiyol, treonin ve indol grupları. İmmobilizasyonda ilk adım; matriksin aktivasyonu, daha sonrada enzimin aktive olan matrikse bağlanmasıdır.

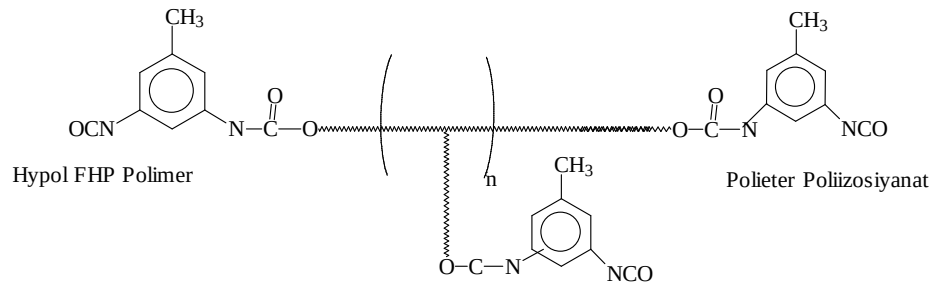
Kovalent bağlanma enzimin aktif merkezi ve konformasyonunda değişiklikler meydana getirebilmektedir ve bu da aktivite kaybına neden olabilmektedir. Taşıyıcı ve enzim arasındaki bağlanmanın gücü kuvvetli olduğundan yüksek iyonik şiddete sahip substrat çözeltilerinin varlığında bile enzim kaçıışı meydana gelmez.

Röhm Pharma (Almanya) firması tarafından hazırlanan oksiran akrilik kopolimeri olan Eupergit C bead'leri kovalent bağlanmada kullanılan matrikslerden biridir. Eupergit C ve Eupergit C 250 L enzim immobilizasyonunda geniş uygulama alanına sahiptir. Enzimin saflığına bağlı olarak bir gram Eupergit C beadler üzerine 100 mg'i aşan miktarlarda enzim immobilizasyonu mümkündür. pH 7-8 arasında oksiran grubu, enzimlerin serbest amino ve sülfidril gruplarıyla; asidik pH'larda ise; imidazol, tirozil ve triptofenil gruplarıyla kovalent olarak bağlanır (Şekil 2.4). Eupergit C bead'leri geniş bir pH aralığında oldukça kararlıdır.



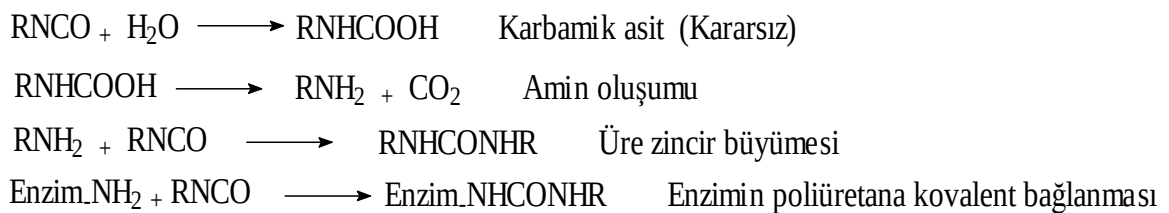
Şekil 2.4 Eupergit-C ile enzim immobilizasyonu

Bir diğer kovalent immobilizasyon polimeri de ürethan prepolimerleridir. Prepolimerler, diisocyanate türevlerinin çeşitli aktif hidrojen ihtiva eden bileşiklerle (glikol, poliglikol, poliol) reaksiyonlarıyla elde edilirler ve yapılarında izosiyanat'lar mevcuttur (Şekil 2.5). Diizosiyanat prepolimerleri su ile muamele edildiğinde süngerimsi yapıda polimer meydana gelir. Ortamda enzim bulunduğunda, enzimin aktif hidrojen bulunduran gruplarıyla, izosiyanat grupları kovalent bağlar oluştururlar (Şekil 2.6).



Şekil 2.5 Diizosiyanat Prepolimer

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



Şekil 2.6 Diisocyanate prepolimerlerinin polimerleşme mekanizması

2.1.5. Hücre İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu için kullanılmakta olan yöntemler canlı ve cansız hücrelerin immobilizasyonu için kullanılabilirler. Jellere hücrenin tamamı kullanılarak hücrenin hapsedilmesi enzim kullanıldığında ortaya çıkan matriksten kaçış gibi bir problem oluşturmadığından jel immobilizasyonu en verimli metoddur.

Endüstriyel uygulamalarda çok sayıda mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonu ile hazırlanmış proses bulunmaktadır. Örneğin; poliakril amid jelle immobilize edilen *Escherichia coli* (aspartaz aktivitesine sahip) L-aspartik asit üretimi ve *Beevibacterium ammoniagenes* (fumaraz aktivitesine sahip) L-malik asidin üretimi için kullanılmaktadır.

Biyoteknolojik olarak cansız hücre enzimlerle dolu bir çanta olarak düşünülebilir. Bu sebeple istenilen enzimatik aktivitenin sağlanabilmesi tek konudur. İstenilen enzimatik aktivite canlı hücre için önemli olan metabolik mekanizmayı bozulmamalı ve aynı zamanda tekrar üretimine engel olmamalıdır. Bu yüzden immobilize edilmiş canlı hücreler geleneksel fermantasyona alternatif olarak söylenebilir. Artan hücre yoğunluğu, devamlı proseslerde üstün performans ve reaktör kontrolünün daha kolay olması gibi avantajları da göz önüne alınmalıdır. Mikrobiyal, bitki ve hayvan canlı hücrelerinin immobilize (jele hapsedilmiş veya adsorbe edilmiş) sistemleri çeşitli biyotransformasyon işlemlerinde başarıyla kullanılmaktadır.

2.2. Matriks Aktivasyon Yöntemleri

2.2.1. Siyonejen Bromid

CNBr metodu ilk olarak Axen ve grubu tarafından kullanılmıştır. Siyonojen bromide (CNBr) ile çeşitli polisakkaritlerin hidroksil grupları aktive edilerek, enzimlerin amino gruplarıyla kovalent bağ oluşturmaları sağlanır. CNBr ile polisakkarit taşıyıcı materyallerinin aktivasyonu reçinenin nükleofilliğini arttırmak için kuvvetli bazik ortamda gerçekleştirilir. Fakat kuvvetli bazik ortam CNBr hidrolizine ve taşıyıcı matrkise bağlanabilen reaktif siyanat esterlerin oluşumuna neden olur. bu da yüksek oranda toksik belirteç miktarını fazla olmasına ve düşük aktivasyon verimiyle sonuçlanmasına neden olur [Bernath, et al.].

2.2.2. Karbodiimid

Matrikslerin karboksil grupları karbodiimid'ler (RNCNR1) ile aktive edilerek enzimlerin immobilizasyonunda kullanılırlar. Bu reaktif kararlı amid bağı vermek için başlıca aminlerle kondanse olabilen çok reaktif O-açilizoüre oluşumu için asidik pH değerlerinde (pH=4,75-5) taşıyıcının karboksil gruplarıyla reaksiyona girer. Yaygın olarak kullanılan suda çözünebilen karbodiimid 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC)'dir [Bernath, et al.].

2.2.3. Diazotizasyon

Aromatik primer amin grubu taşıyan polimerik taşıyıcılar diazonyum tuzu oluşturarak protein moleküllerini fenolik, imidazol ve serbest NH₂ grupları üzerinden bağlayabilmektedir.

2.2.4. Alkilasyon ve Arilasyon

Matrikslerde bulunan fenolik, sülfidril veya serbest amino grupları alkillenerek matriksler aktif duruma getirilirler. Özellikle halojen substitüe aromatik halkalar enzim molekülünü serbest amino grupları üzerinden bağlarlar. Serbest hidroksil grubu taşıyan doğal veya sentetik polimerler s-triklortriazin ile aktive edilebilmektedirler. Arilleme ve alkilleme reaksiyonu açılmeden daha yavaştır ve protonlanmamış nükleofillere gereksinim duyar. Dolayısıyla pH'ya çok bağımlıdır.

2.2.5. Aldehit Kondenzasyon

Amino grupları içeren matriksler monomerik yada polimerik glutaraldehit ile aktive edilerek, enzimlerin matrikse 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.

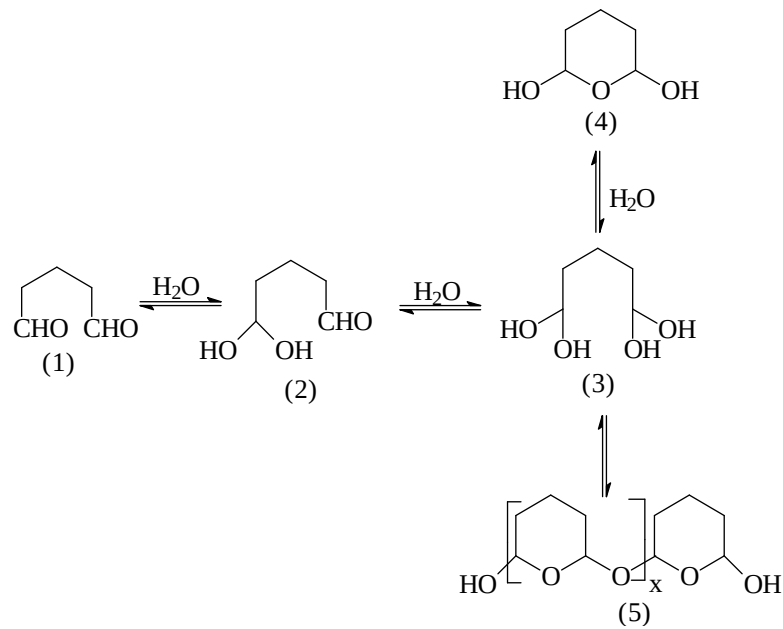
2.3. Glutaraldehit

2.3.1. Glutaraldehit'in Yapısı

Glutaraldehit (1,5- pentandial; OHC(CH₂)₃CHO) enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan çapraz-bağlayıcı bir reaktiftir.

Glutaraldehit çözelti şartlarına bağlı olarak çeşitli kimyasal yapılara sahiptir. Yapılan çalışmalar ticari GA çözeltilerinin (% 25 ya da % 70) çok bileşenli bir karışım olduğunu göstermiştir. Bu ticari çözeltilerdeki GA'nın pH sı bazı aldehit gruplarının kısmi olarak karboksilik aside yükseltgenmesinden dolayı 3,1'dir. Saf

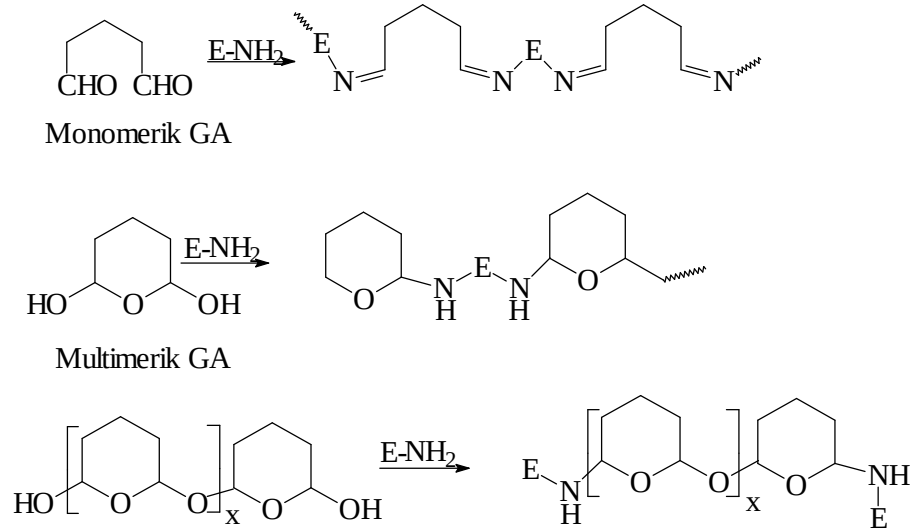
formunda 280 nm’de maksimum absorbans göstermesine rağmen polimerik safsızlıkların bulunduğu formları 235 nm’de ikinci bir maksimum absorbans göstermektedir. GA’in sulu çözeltisinin NMR analizleri sonucu beş farklı yapıya sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.7). Bu yapılar; serbest GA (1), düzlemsel mono- (2) ve dihidratlar (3), halkasal hemiasetal (4) ve oligomerdir(5) [Walt ve Agayn, 1994] .



Şekil 2.7 Sulu çözeltideki GA yapıları

Sıcaklık artırıldığında, halkasal hidratların harcanmasıyla serbest GA miktarı artmaktadır. % 25’den daha konsantre çözeltilerde ve asidik şartlar altında halkasal hemihidrat multimerler (5) oluşumu gerçekleşebilmektedir. Polimerik yapının distile su ile seyreltilmesi sonucu hidrasyon reaksiyonun tersine dönmesiyle monomerik GA oluşumu gözlenir. Bu sebeple monomerik GA’nın depolanması için seyreltik çözeltilerinin kullanımı önerilmektedir.

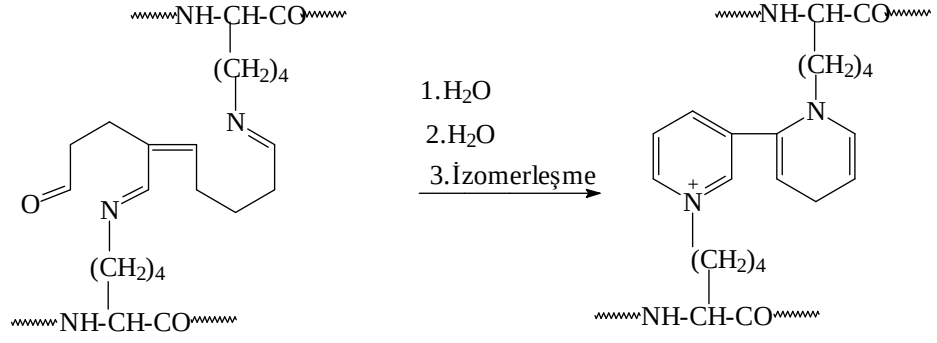
Çözelti ortamındaki her bir yapı çapraz-bağlanma reaksiyonlarına farklı katılır ve farklı ürünlerin oluşumu gözlenir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Asidik ve nötral şartlarda GA'nın proteinlerle reaksiyonları

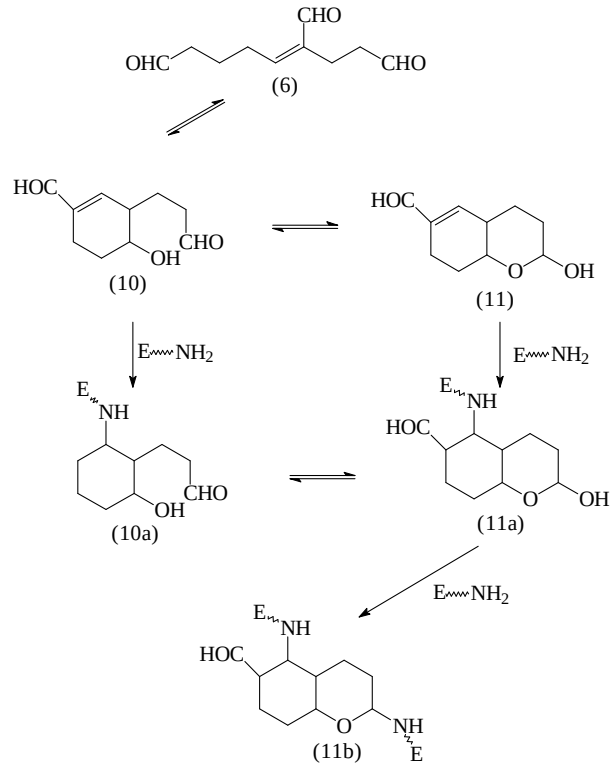
Aldehitler proteinlerdeki lizin gruplarıyla Schiff bazı oluşturur. Schiff bazı asidik şartlar altında kararsızdır ve aldehit ve amin oluşumu için bozunur. Bu nedenle, Schiff bazını kararlı ikincil amin yapısına dönüştürmek için NaBH₄ gibi indirgeyici bir reaktif kullanılır. Bu indirgenme reaksiyonu Schiff bazı oluşumuyla benzer bir reaksiyon vermeyen halkasal hemiasetal ve oligomerik yapıların ürünlerini kararlı hale getirmek için gerekli değildir.

GA'nın proteinlerle oluşturduğu bir diğer ürün ise kuaterner piridinyum bileşiğidir (Şekil 2.9). Yapılan bir çalışmada proteindeki lizin gruplarıyla GA arasında kuaterner piridinyum bileşiği oluşumu belirlemiş ve bu bileşiğin izolasyonunu yapmıştır. Bu bileşik basit bir Schiff bazı oluşumu için protein ile α,β -doymamış multimerik aldehitin reaksiyonunu halkalaşma, dehidratasyon ve molekül içi redoks reaksiyonlarını takip etmesi sonucu elde edilmektedir.



Şekil 2.9 Kuaterner piridinyum bileşikleriyle GA'nın çapraz-bağlanması

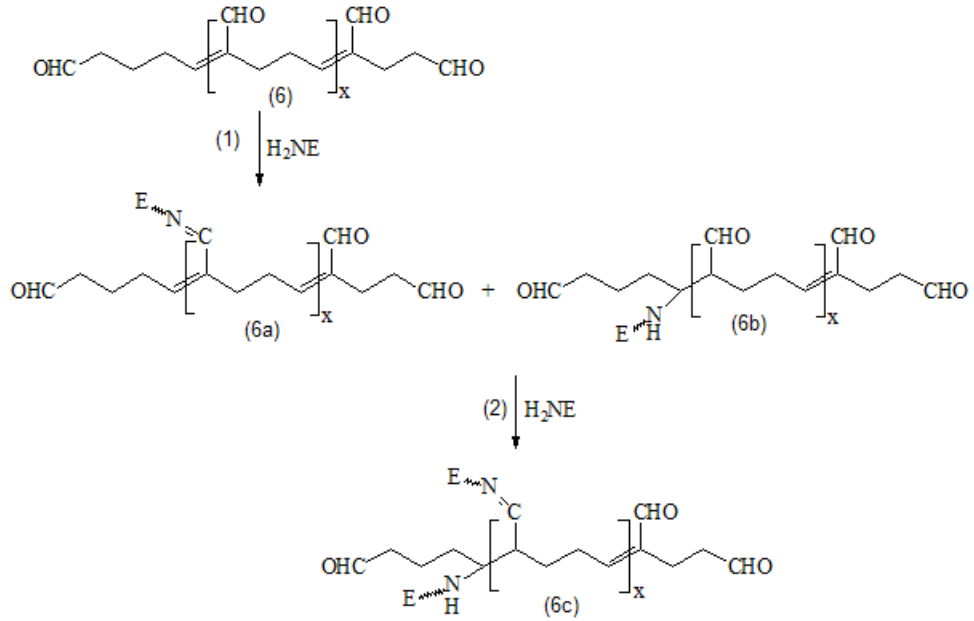
GA çözeltisinin aldol kondenzasyonu süresince, çapraz-bağlama kabiliyeti fazla olan oligomerlerin oluşumu da gözlenmektedir (Şekil 2.10). Oluşan muhtemel oligomer yapısı (6) şeklindedir. (10) ve (11) yapısının proteinlerle olan reaksiyonu (10a) ve (11a) oluşumuyla sonuçlanan çifte bağa Michael katılması şeklindedir. Bu reaksiyon meydana gelirse, katılma ürününün kararlı hale getirilmesi için NaBH₄ veya NaB(CN)H₃ ile indirgenmesi gerekmemektedir.



Şekil 2.10 Bazik şartlarda dimer yapıdaki halkasal GA'nın proteinlerle reaksiyonu

2.3.2. Poliglutaraldehit

Bazik şartlar altında GA hızlı bir şekilde molekül içi aldol kondenzasyonu verir ve α,β -doymamış oligomerik aldehitler meydana gelir (Şekil 2.11). Bu ürünlerin oluşumu saf GA'nın absorbands vermediği 235 nm'deki absorbandsın artışıyla gözlenebilmektedir. (6) yapısı başlangıçta saf GA çözeltisinin ana bir bileşeni olduğu düşünülmüş fakat daha sonra bu yapının bazik şartlarda GA'nın reaksiyonu sonucu oluştuğu kabul görmüştür. Polimerizasyon sıcaklık ve bazik pHlarda artar ve sarı renk oluşumu gözlenir. Fakat oda sıcaklığı ve nötral pH'da bu reaksiyon uzun sürede meydana gelmektedir. Asidik saklama şartlarında monomerik yapının korunumu sağlanabilmektedir.



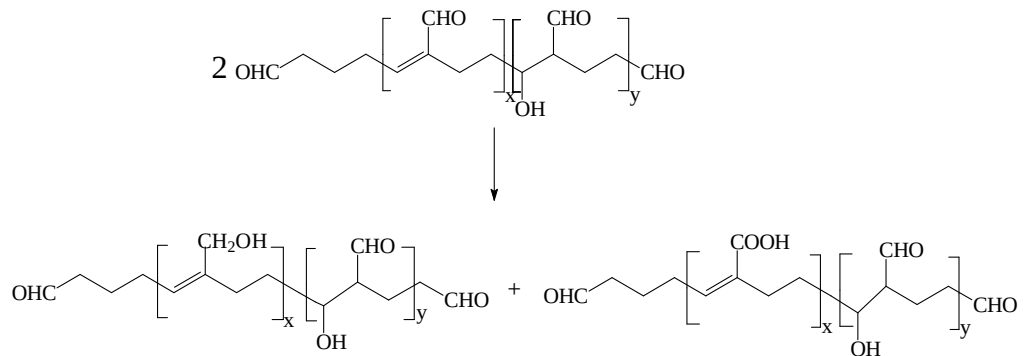
Şekil 2.11 PGA'nın bazik şartlar altında proteinlerle reaksiyonu

Polimerizasyon sonucu elde edilen (6) bileşiği PGA'nın proteinlerle reaksiyonunu sağlamaktadır. Bu şartlarda oluşan Schiff bazları ve C-C çifte bağları ile konjasyonda olan internal aldehit grupları (örneğin (6a) gibi) rezonansla büyük ölçüde kararlı hale gelebilmektedir. Bunun sonucunda oluşan yapı asidik kararlılığa sahiptir. $NaBH_4$ ile indirgenme ikincil aminlerin oluşumunu sağlar. Ortamda aşırı miktarda amin olması durumunda ikinci bir reaksiyon oluşumu gözlenmektedir ki bu reaksiyon çifte bağa Michael katılmasıdır. Katılma reaksiyonu rezonans kararlılığının bozulmasına ve asit hidrolizine karşı dirençsiz olan (6c) katılma ürününün oluşumunu sağlar. IR spektrumlarından elde edilen sonuçlara göre, proteinlerdeki amino grupları ile polimerin α,β -doymamış aldehit reaksiyonundan oluşan ürün Michael katılma ürünü değildir; fakat (6a) ile konjuge durumda olduğundan imini kararlı hale getirmektedir. Diğer bir kabul gören görüş ise polimerik doymamış aldehitlerin asit hidrolizine karşı dirençli olan (6b) gibi bir ürün oluşumu için Michael tarzı reaksiyona girmesidir.

Glutaraldehit ile proteinlerin çapraz-bağlanma reaksiyonları α,β - doymamış moleküllerin yoğun olarak bulunduğu yüksek alkali pH'larda gerçekleştirilir. Bu moleküllerin aldehit grupları primer aminlerle reaksiyona girerek asit hidrolizine dirençli ve rezonans yapıdaki iminleri oluştururlar. Poliglutaraldehitin zincir sonunda

olmasından dolayı konjuge olmayan terminal aldehit grupları asit hidrolizine karşı dirençli ürünler oluşturmazlar. Yine de konjuge olmayan imin bağları hidrofobik mikro çevrede kararlı olabilmektedirler. Protein konsantrasyonu çapraz-bağlayıcı reaktiften fazla olduğu zaman ikincil bir Michael reaksiyonu oluşabilir ve α,β -doymamış polimerin etilen bağına amin katılır. Michael katılma ürünü asit hidrolizine dirençli değildir [Marquie, 2001].

GA çözeltisinin pH 7,0-13,5 aralındaki reaksiyonu sonucunda elde edilen polimerik yapı çözünen ve çözünmeyen formlardadır. Bu polimer etilenik zincirlerle konjuge olabilen, hidratlı ve hidratsız aldehit gruplarından oluşmaktadır. Aldol ürünlerinin dehidratasyonu tamamlanmadığından ikincil hidroksil grupları oluşabilmektedir. Bu polimerdeki primer hidroksil ve karboksilik asit gruplarının oluşturduğu serbest aldehit gruplarıyla Cannizzaro reaksiyonları da meydana gelir (Şekil 2.12).

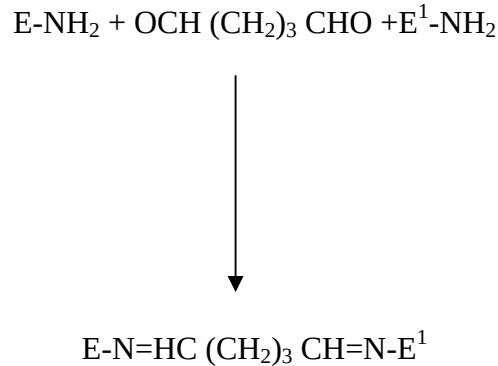


Şekil 2.12 Cannizzaro reaksiyonu sonucunda oluşan polimerik GA yapıları

2.4. Glutaraldehit ve Poliglutaraldehit İle İmmobilizasyon

Glutaraldehitin immobilizasyonda çeşitli kullanımları mevcuttur. Bunları şöyle sıralayabiliriz: taşıyıcı üzerindeki amino gruplarının ön aktivasyonu, adsorpsiyondan sonra taşıyıcı matrikse enzimlerin çapraz-bağlanması, suda çözünebilir polimerlerle çapraz-bağlanmış jel oluşturma ve suda çözünmeyen membran ya da suda çözünebilir oligomerlerin içerisinde enzimlerin çapraz-

bağlanması Ayrıca GA bifonksiyonel çapraz-bağlayıcı reaktifler arasında en yaygın kullanılan materyaldir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 GA ile Çapraz Bağlanma

Glutaraldehit konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve reaksiyon süresi arasında karmaşık bir ilişki mevcuttur. Çapraz-bağlanma genellikle nötral pH ve nötral pH'ya yakın bölgelerde gerçekleştirilir. Taşıyıcı ön aktivasyonu genellikle yüksek konsantrasyon (% 10 gibi) kullanımı ve onu izleyen yıkamalarla oda sıcaklığında sağlanır. Enzim bulunduğu şartlarda çok daha düşük konsantrasyonlar (% 0,01 ile 1) kullanılır ve çapraz-bağlayıcı reaktifine bağlı olarak 1 ile 60 dakikaya kadar değişen muamele süreleri uygulanmaktadır. Optimum şartlar her bir enzim-taşıyıcı çifti için deneysel olarak belirlenmelidir.

GA kullanılarak yapılan bir çalışmada, taşıyıcı matriksin GA ile aktivasyonundan sonra matrikse proteazın immobilizasyonu GA'nın serbest aldehit gruplarıyla enzimin amin grupları arasında meydana gelen kovalent bağlanmayla gerçekleştirilmiştir. GA taşıyıcı matriksin ara kolu olarak etki etmiştir. Yüksek verim elde edilebilmesi için immobilizasyon ve aktivasyon şartlarının optimizasyonu yapılmıştır. Immobilizasyon için kullanılan enzim miktarı arttırıldığında bağ yapmamış olan aldehit gruplarıyla enzimin inaktivasyonu sonucu enzim aktivitesinde bir düşme gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyona sahip enzim çözeltisi kullanımı ise enzim aktivitesine olumlu etki yapmıştır [Chae et al. 1998].

Enzim immobilizasyonunu etkili bir şekilde gerçekleştirebilmek için aldehit gruplarından kaynaklanan inaktivasyonu düşürmek gereklidir. Fazla olan aldehit grupları ve enzim arasındaki rasgele bağlanma enzim inaktivasyonuna neden olacağından, enzim kararlılığı enzimin amin grupları ve aldehit gruplarıyla aktive edilmiş taşıyıcı arasındaki spesifik olmayan bağlanmaların sınırlandırılmasıyla gerçekleştirilebilir. Çapraz-bağlama karışımına koruyucu reaktiflerin ilave edilmesiyle, enzim molekülleri aşırı olan aldehit gruplarından korunmuş olacağından enzimin kararlılığı artırılmış olacaktır. Proteaz immobilizasyonunda enzim kararlılığını arttırmak için soya peptidi ve PEG kullanılmıştır. Soya peptidi düşük moleküler ağırlığa sahip olduğundan (~ 300) protein gibi aldehit gruplarıyla reaksiyona girerek inaktivasyona sebep olan bağlanmamış aldehit gruplarının sayısını azalttığı için immobilizasyon verimini arttırmıştır [Chae et al. 2000].

Glutaraldehit ile immobilizasyonda enzim-taşıyıcı çifti taşıyıcı üzerinde kalan serbest aldehit gruplarının enzimi inaktive etmemesi için seyreltik glisin, lizin, Tris, etanol amin ve hidrazin çözeltileri ile muamele edilir.

İmmobilizasyondan sonra yapılması gerekli olan diğer bir işlem de kompleksin borohidrat ile muamele edilmesidir. Bu yöntem enzimin kovalent bağlanmasını kararlı hale getirmek için Schiff bazındaki çift bağın indirgenmesi amacıyla yapılmaktadır.

2.5. Hidrofilik Poliüretan Polimerler

Bilinen en yaygın poliüretan üretim yöntemi, aktif hidrojen ihtiva eden glükol, poliglükol, poliester poliol ve polieter poliol bileşiklerinin di-, tri- izosiyanat ile sonlandırılması şeklindedir. Bu reaksiyon izosiyanat ile sonlandırılmış poliüretan elde edilmesini sağlar [Wood et al. 1982].

Hypol Wood ve Frisch tarafından patentlenmiş çalışmanın Organic Chemical Division of W. R. Grace and Company tarafından geliştirilmesiyle üretilen köpük hale gelebilen poliüretan çeşidinin ticari ismidir. Materyal tek-bileşenli prepolimer reçine olarak satışa sunulmaktadır. Reçine çoklu kollara ayrılmış polietilen oksit

temeline dayanmaktadır. Hypol prepolimerleri hem alifatik hem de aromatik poliizosiyanatla sonlandırılmış polieterlerdir. Polimer zinciri metilendifenil diizosiyanat (MDI) veya tollil diizosiyanat (TDI) ile bütün haline getirilmiş hidroksil gruplarıyla sonlandırılmıştır [Havens et al. 1993].

Enzimleri kovalent bağlamak için bir destek materyali olarak Hypol'den üretilmiş köpükler geniş por aralığı, bükülebilir olma, çeşitli boyut ve büyüklüklerde olabilme gibi mekanik özellikleri, yüksek madde ilave edilebilme kapasitesi, çok miktarda su adsorplayabilme (ağırlığının 10-30 kat fazlası su tutabilme kapasitesi) ve mikrobiyal etkilere karşı enzime direnç sağlama gibi pek çok avantajlara sahiptir [Havens et al. 1993].

Köpük oluşum reaksiyonu, prepolimere deterjan madde ihtiva eden yaklaşık olarak eşit hacimdeki sulu enzim çözeltisinin ilave edilmesiyle gerçekleştirilmektedir.

Suda çözünmüş haldeki enzimle izosiyanat-sonlandırılmış poliüretan ilk olarak etkileşime girdiklerinde poliüretan kimyasal olarak çok aktif hale gelir [Wood et al. 1982]. Su molekülleri ve izosiyanat grupları arasındaki reaksiyon karbondioksit ve primer amine ayrılan kararsız karbamik asit oluşumuyla sonuçlanır. Bu parçalanma, poliüretan polimerin gözenekli olmasını sağlayan reaksiyon sisteminin her tarafında karbondioksit çıkışıyla köpük oluşumu başlar. Polimerizasyonun ilk basamağında oluşan primer amin çapraz-bağlanmış poliüretan matriksin oluşumunu başlatan izosiyanatla ilave reaksiyona girer. Bu reaksiyon su molekülleriyle yarışmalı haldedir. Protein teorik olarak enzim-polimer üretimini sağlayan lisin artıklarıyla köpük sentezine katılır [Drevon et al. 2001] [Bang et al. 2001].

Prepolimer ile enzim çözeltisi karıştırıldığında, substitüe üre ürününün izosiyanatı ile enzimin primer amin grupları bazı aminlerle yer değiştirir. İyi bir poliüretan köpük oluşumu için zincir büyüme reaksiyonu çok önemlidir. Bu zincir büyüme reaksiyonu sırasında enzimin reaksiyon ortamında hazır bulunması gereklidir. Büyüme ve köpük oluşum reaksiyonlarının tamamlanması süresince

enzim ortamda hazır değilse enzim köpük oluşumu tamamlanmış olan poliüretana bağlanmamış olacaktır [Wood et al. 1982].

Köpük oluşumunun ilk reaksiyon basamağında farklı aktif hidrojen bileşikleri ile izosiyanatların reaksiyon skalası aşağıdaki gibi rapor edilmiştir [Chakrabarti et al. 1988]:

Alifatik NH_2 > Aromatik NH_2 > Primer OH > Su > Sekonder OH > Tersiyer OH > Fenolik OH > COOH

Polimer reaksiyonu ekzotermik olduğundan reaksiyon karışımının sıcaklığı enzimin termal denatürasyonuna neden olan sıcaklıktan aşağıda tutulmalıdır. Bağlanma basamağında, uygun pH, iyonik şiddet, substrat veya gerekli katyonların kullanımıyla enzimin doğal konformasyonu korunmalıdır [Wood et al. 1982].

Polimerizasyon süresince deterjan ilavesi reaksiyona giren polimer ile yüzey arasındaki gerilimi değiştirerek karbondioksit çıkışını artırır ve böylece ıslanma oranı, yüzey alanı, gözenek yapısı ve yoğunluk gibi köpük matriksin fiziksel özellikleri etkilenmektedir [Drevon et al. 2000].

Köpüğün yoğunluğu, hücre yapısı, ıslanma oranı ve su tutabilme kapasitesi gibi özellikleri sulu faza ilave edilen deterjanın tipi, miktarı, köpük oluşum sıcaklığı ve pH'sı ve prepolimer-su oranı ile ayarlanabilmektedir. Çok gözenekli ve yumuşak köpükten, çok kalın açık gözenekli köpüğe kadar geniş aralıktaki özelliklere sahip köpük elde edilebilir. Son ürün olarak sünger elde edilmesi için ortama aşındırıcılar, polimerleşme zamanını serbest hale getirmek için kimyasallar ve farmasotikler gibi ağır katkı maddeleri ilave edilmelidir. Köpük oluşumu sırasında ortama çapraz-bağlayıcı reaktifler (poliaminler, politiyoller ve poliasitler), antioksidanlar veya dolgu katkı maddeleri de ilave edilebilir [Wood et al. 1982]. Poliüretan köpüklerin fiziksel özellikleri başlatıcı, deterjan ve kaynama reaktifi gibi katkı maddeleriyle değiştirilebilmektedir [Bakker et al. 2000].

Çapraz-bağlayıcı reaktifler PUF köpüklere enzimlerin yükleme kapasitesini arttırdığı için kullanılmaktadır. Poliüretan polimer hidrofobik substratlar ve biyokatalizörler arasında etkileşimde hidrofobik etkiler sağladığından ilgi çeken bir destek materyalidir [Drevon et al. 2001].

Poliüretan köpüklerin fiziksel yapısı ve üretan prepolimerlerin reaktifliği kovalent bağlanma, hapsetme veya adsorpsiyon ile enzim immobilizasyonunu mümkün kılmaktadır.

Fermantasyon brothları, saf ekstraktlar, saflaştırılmış ve liyofilize edilmiş örnekler gibi çok sayıda kaynaktan elde edilmiş enzimler poliüretan köpüklere immobilize edilmiştir. Araştırmacılar bağlanamayan herhangi bir enzim bulamamışlardır ve bağlı enzimlerin tamamı aktivitesinin bir kısmını korumuşlardır [Havens et al. 1993].

Jele hapsetmeyle immobilizasyon sistemlerinin mekanik ve kimyasal kararlılığının yetersiz oluşu uygulamalarda ve immobilize biyokatalizörün kullanım zamanında sınırlamalara sebep olur. Jellere alternatif olarak , hem önceden oluşturulmuş hem de su ile karışabilen üretan prepolimerle yerinde oluşturulan porlu poliüretan köpükler (PUF) farklı biyokatalizörler için taşıyıcı veya matriks immobilizasyonu olarak başarıyla kullanılmaktadır. Poliüretan köpüğün partikül boyutu dikkate alınmaksızın bir difüzyon probleminin olmadığı bulunmuştur [Hu et al. 1993].

Kimyasal olarak inert, mekanik olarak kararlı, oksijen transferi için gerekli kapasite ve gözenekli yapıda olmasından dolayı poliüretan köpükler mikroorganizmaların immobilizasyonu için de kullanılmaktadırlar. Poliüretan köpüklere immobilizasyonun en önemli avantajı reaktör içerisinde gerekli olan mikroorganizma sayısını kararlı şekilde tutabilmesidir. Diğer bir avantajı ise por büyüklüğü kontrolünün kolay olması, büyük ölçekli kullanımlarda maliyetin düşük olmasıdır [Na et al. 2000]. Ayrıca PUF köpükler çeşitli mikroorganizma ve bitki hücresi kültürlerinin hazırlanmasında başarıyla kullanılmaktadır [Donimgo et

al.1997] [Nakamura et al. 1999] [Yamaguchi et al. 1999] [Lindsey et al. 1983] [Liu et al. 2000] [Liu et al. 1998].

Diğer immobilizasyon metotları ile karşılaştırıldığında in-situ (yerinde) kopolimerizasyon immobilizasyon işleminin basit olması, prepolimerin enzimi denatüre edebilecek monomer içermemesi, prepolimerdeki izosiyanat gruplarının enzimle kovalent bağ oluşturmaması, PUF matrisin ağ yapısının köpük oluşum şartlarını değiştirmekle veya farklı zincir uzunluğundaki prepolimer kullanımıyla kontrol edilebilmesi gibi avantajları vardır.

Enzim immobilize edilmiş poliüretan köpükler batch operasyonlarında veya kolonda sürekli sistem olarak kullanılabilirler.

2.6. *Saccharomyces cerevisiae* ve İnvertaz Enzimi

Saccharomyces ilk defa 1838'de Meyen tarafından bulunmuştur. *Saccharomyces cerevisiae*'nin sitoplazmik membranının yaklaşık % 49'u protein, % 45'i yağdır. Bu yağın % 84'ünü de lesitin ve cephalinler oluşturur. Maya üzerinde bulunan gözeneklerin büyüklüğü ise 0,42 nm'dir.

Saccharomyces cerevisiae'nin invertaz aktivitesini sağlayan iki enzim bulunmaktadır. Bu enzimlerden biri hücre duvarına lokalize olmuş olan external invertaz enzimi diğeri ise sitoplazmik membranda bulunan ve external enzime göre daha küçük yapıda olan internal invertaz enzimidir. External invertaz glikoprotein yapıda olup % 3 glukozamin ve % 50 mannoz ihtiva eder [Gascon et al.1968].

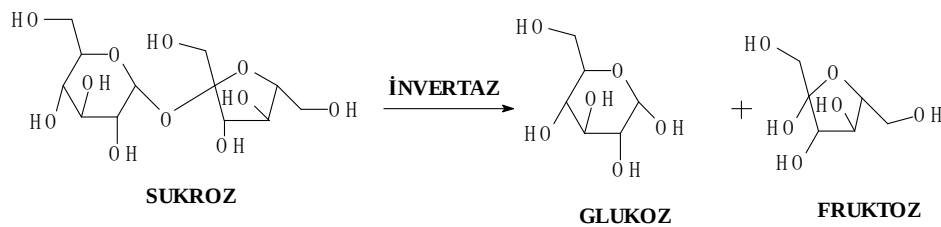
Besiyer olarak sukrozun kullanımıyla çok sayıda mikroorganizma invertaz üretebilmektedir. Ticari olarak invertaz başlıca *Saccharomyces cerevisiae* veya *Saccharomyces carlsbergensis* maya türlerinden biyosentezlenmektedir. Maltoz ve sukroz bulunan ortamda *Saccharomyces cerevisiae* invertaz sentezleyebilmektedir. % 1'den düşük şeker konsantrasyonlarında glukozun ortamda bulunması durumunda da enzim sentezi gerçekleştirilebilmektedir [Elorza et al. 1977]. Aynı maya kültürü içinde bile, bir veya daha fazla invertaz bulunmaktadır. Örneğin; hücre içi salınan

invertaz 135000 dalton molekül ağırlığına sahipken, hücre dışı salınan invertaz 270000 dalton molekül ağırlığına sahiptir.

Bu iki enzimin amino asit kompozisyonları birbirinden farklıdır. Küçük olan form dimer yapıda olduğu bilinmesine rağmen, ortam şartlarına bağlı olarak (pH, iyonik şiddet, oligosakkaritler, vb.) daha büyük oligomerlerin oluşumuna (dimerden oktamere) kesin bir eğilimi olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [Torres et al.2002]. External enzim sistin ya da sistein içerirken, internal enzimde bu yapılar bulunmamaktadır. İnternal enzim az ya da hiç karbohidrat içermemektedir. Her iki invertaz da sukroz ve raffinöz için aynı K_m değerine sahiptirler.

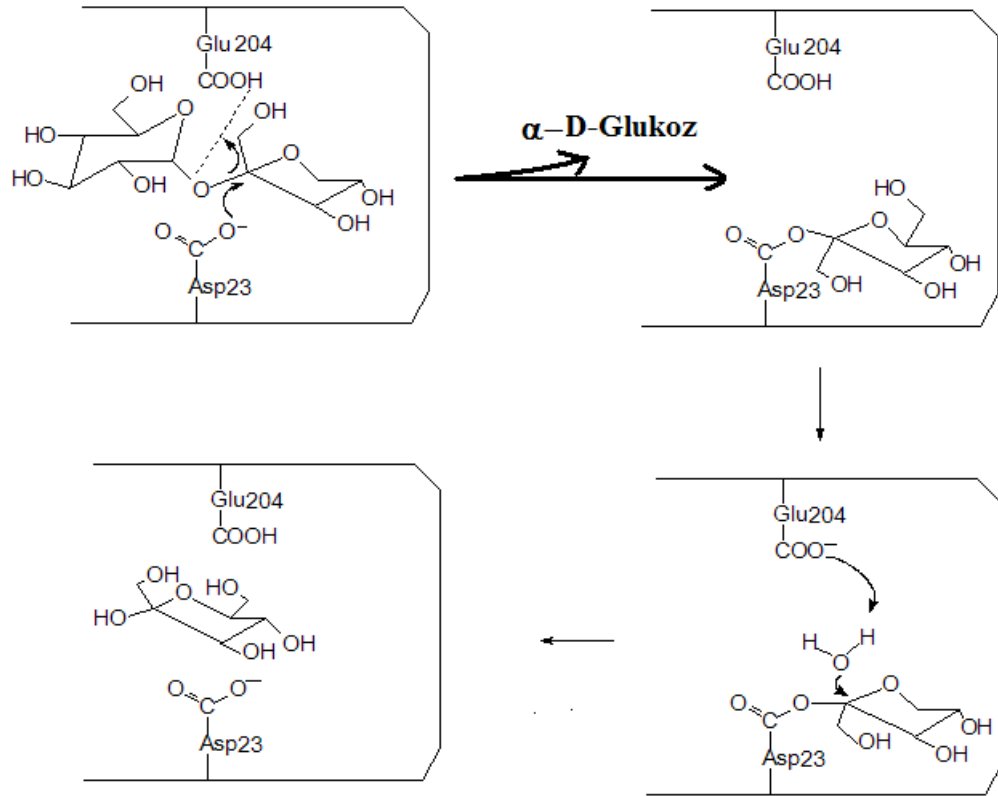
Yüksek konsantrasyona sahip sukroz çözeltilerinin invertaz ile hidrolizinde D-fruktoz kompetitiv (yarışmalı) inhibitör, D-glukoz ise kısmi nonkompetitiv (yarışmasız) inhibitör olarak etki göstermektedir. Yapılan bir çalışmada $>0,3M$ sukroz konsantrasyonlarında invertaz aktivitesi çok hızlı olarak azalmıştır [Combes et al. 1981]. Aktivitedeki azalma substratın yapısındaki molekül içi ve molekül arası hidrojen bağlarının değişimine bağlıdır [Combes et al. 1983]. $<0,3M$ sukroz konsantrasyonlarında $V_{max}=140\mu\text{mol/dak}$ ve $K_m=42mM$ olarak belirlenmiştir [Combes et al. 1981].

İnvertaz başlıca kolaylıkla kristallenmeyen ve sukrozdan daha tatlı olan fruktozun tercih edildiği gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Tat ve sağlık sebeplerinden gıda sanayide kullanılacak invertazın çok saf olması gereklidir.



Şekil 2.14 Sukrozun Enzimatik Hidrolizi

İnvertazın aktif bölgesinde sukroz hidrolizinde kullanılan amino asit kalıntıları Asp-23 ve Glu-204'dür. Asp-23, nükleofilik bir reaksiyonla sukrozun fruktoz kısmıyla kovalent bir ara ürün oluşturur. Sukrozun glukoz kısmı ise Glu-204'ten bir proton alarak, glukozdan ayrılır. Daha sonra, su molekülünün nükleofilik reaksiyonuyla fruktoz invertazdan ayrılır ve sukroz fruktoz ve glukoz monomerlerine ayrılmış olur.



Şekil 2.15 İnvertaz Enziminin Çalışma Mekanizması

2.6.1. *Saccharomyces cerevisiae* ve İnvertaz İle İlgili Yapılan Çalışmalar

İnvertaz (β -D-fruktofuranosidaz, β -D-fruktofuranosit fruktohidrolaz, EC 3.2.1.26) çeşitli endüstriyel uygulamalar için dikkat çekici enzimlerden biridir.

İnvertaz aktivitesine sahip immobilize bir biyokatalizörün endüstriyel ölçekte sukroz hidrolizinde kullanılabilmesi için aşağıdaki şartları sağlaması gerekmektedir:

- Yüksek konsantrasyonlu (yaklaşık olarak % 70) sukroz çözeltilerini hidroliz edebilme kabiliyeti
- Uzun-süreli operasyonel enzim aktivite kararlılığı (60-75°C ve 10²-10³ saat)
- Biyokatalizör partiküllerinin uzun-süreli fizikomekanik kararlılığı
- İmmobilizasyon şartlarının minimum maliyette olması

Literatürde invertaz aktivitesine sahip mikrobiyal hücrelerin veya soluble invertaz için çok sayıda immobilizasyon metodu tanımlanmıştır.

İnvertaz aktivitesine sahip hücrelerin immobilizasyonu, soluble saflaştırılmış invertaz immobilizasyonuna göre önemli ekonomik avantajlar sağlamasına rağmen, hücre immobilizasyonları kısıtlı uygulama alanı bulmuştur. İnvertaz aktivitesine sahip *Saccharomyces cerevisiae* hücreler başlıca sentetik partiküllere veya doğal hidrofilik jellere basitçe hapsedilerek immobilize edilmiştir. Ayrıca poliakril amid, polihidroksietilmetakrilat, alginat ve jelatin gibi suda çözünmeyen taşıyıcılara (sünger taşı parçaları ve sünger taşı granülleri) adhezyon veya kovalent bağlanmayla immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir [Hasal et al.1992].

İnvertaz aktivitesine sahip maya hücrelerinin immobilizasyonu glutaraldehit kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Maya hücreleri glutaraldehit ile maya hücrelerinin veya yünün veya her ikisinde muamele edilmesiyle hazırlanmıştır. İmmobilize hücreler pH 3,5-7,5 ve 0,1 M tampon veya 1M KCl ile yıkama sonucu desorbe olmamışlardır. Hazırlanan immobilize sistem tubular fix-bed reaktörde tam ölçekli sukroz hidrolizinde kullanılmış ve sistem 70° C sıcaklık ve 2M sukroz konsantrasyonunda çok yüksek verim göstermiştir. Reaktörün uzun süreli kullanımda ilk 30 gün boyunca verimliliği sabit kalırken 60 günden sonra % 50'den az olacak şekilde azalma gözlenmiştir [Krastanov, 1997].

Sukroz hidrolizi için polialbumin jel ve poli-2-hidroksietilmetakrilat hidrojelere β -D-fruktofuranosidaz ve *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri immobilize edilmiştir. İnvvertaz aktivitesi ve termal kararlılık için 60°C’de çalışılmıştır. İmmobilize hücreler immobilize enzimden daha yüksek aktivite göstermiştir. Maya hücrelerinin termal kararlılığı enzimden daha yüksektir [Cantarella et al. 1989].

İnvvertaz aktivitesine sahip tanecikli bir biyokatalizör her hangi bir taşıyıcı kullanmaksızın glutaraldehit ve polietilen iminle *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin kovalent olarak bağlanmasıyla hazırlanmıştır. Biyokatalizörün spesifik aktivitesi 300-1500 U/g olarak bulunmuştur. İmmobilize ve serbest invertaz için optimum pH 4,6’dır. 60-75°C’deki invertaz aktivitesi için yarı ömür 500-1000 saat olarak bulunmuştur. Partikül büyüklüğüne bağlı olarak enzim reaksiyonu 1-1,5 mol/l’den yukarı olan substrat konsantrasyonlarında inhibisyon gözlenmiştir [Hasal et al. 1992].

Jel matrikse hapsetme ile gerçekleştirilen bir immobilizasyon yönteminde maya hücreleri jelatin çözeltisinde süspanse edilmiş ve etanol/formaldehit çözeltisi ilave edilerek silindir kapta katılaşarak jel oluşumu sağlanmıştır. Bu yöntem diğer jel immobilizasyon yöntemleri olan alginat ve kappa-carrageenan ile karşılaştırılmıştır. Jelatinle yapılan immobilizasyon % 77 verimle en yüksek verimi göstermiştir. Jelatin kullanılarak yapılmış olan diğer bir çalışmada ise, süspanse edilmiş maya hücreleri jelatin çözeltisine ilave edilmiş, liyofilize edildikten sonra ezilerek sertleşmesi için etanol/formaldehit çözeltisiyle muamele edilerek katılaşması sağlanmış ve kurutulmuştur. Yeni geliştirilen jelatine hapsetme yönteminde liyofilize işlemi ortadan kaldırıldığı için immobilizasyon prosedürü daha hızlı gerçekleştirilebildiğinden bir üstünlük sağlanmıştır [Dhulster et al. 1983].

Maya hücresinin silika hidrojel kullanılarak gerçekleştirilen bir immobilizasyon yönteminde biyolojik aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Silika hidrojelere immobilize edilmiş hücrelerin mekanik özellikleri kolona doldurularak kullanımına izin vermemesine rağmen matriks hücre tabakasının desteğe yapışmasını sağlar. Maya hücrelerinin hücre duvarı ve destek materyali

arsında kimyasal bağ oluşumu için herhangi bir reaktif kullanılmaksızın cam üzerine direkt adhezyonu sağlanmıştır. Adhezyon sağlanmış hücrelerin yüksek santrifüjleme hızlarına karşı dirençli olduğu gözlenmiştir [Rouxhet et al.1981].

Poliüretan hidrojel beadlere *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri hapsedilmiştir. Bisülfite ile sonlandırılmış canlı hücreler için daha düşük toksite sağlamaktadır. Poli(karbomilsülfonat) (PCS) hidrojeller elastik yapıda olduklarından akışkan-yatak reaktörlerde olduğu kadar karıştırmalı reaktörlerde biyokatalizör matriksi olarak kullanılmaktadır. PCS hidrojellere hapsedilmiş *Saccharomyces cerevisiae* etanol fermentasyonunda kullanılmıştır. PCS beadlere *Saccharomyces cerevisiae* hapsedilmesinden sonra kalsiyum-alginat benzer bir invertaz aktivitesi gösterirken poliüretan küpler herhangi bir aktivite göstermemişlerdir [Vorlop et al. 1992].

İnvertaz aktivitesine sahip *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri kalsiyum alginat ve selüloz diasetat jel beadlerine immobilize edilmiştir. Alginat beadlere immobilize edilen maya hücreleri mekanik kararlılığın artırılması için % 2,5 GA çözeltisi ile muamele edildiğinde aktivite de önemli bir değişim gözlenmemiştir. GA ile muamele edilmiş biyokatalizör sukroz hidrolizi başlangıçta % 96,5 iken 80 gün sonunda bu değer yaklaşık olarak % 75'e düşmüştür. % 50 sukroz çözeltisinin katyon değiştirici reçine ve alginat beadlerle hidrolizi karşılaştırıldığında alginat beadlerle oluşan ürünün daha renksiz olduğu gözlenmiştir. % 10'luk sukroz çözeltisinde ise % 100 yakın bir hidroliz gözlenmiştir [Linko et al.1980].

Aktif invertaz ihtiva eden *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri jelatin matrikse immobilize edilmiş ve sürekli karıştırmalı-tank reaktörde (CSTR) yüksek operasyonel kararlılık göstermiştir. İmmobilize sistem batch usulü kullanımında jelatin partiküllerin reaktörden süzme ile uzaklaşması sonucunda aktivitesinde düşme gözlenmiştir. İmmobilize sisteme tampon etkisi incelenmiş ve sistemin tamponsuzda kullanılabileceği bulunmuştur. Ayrıca tamponun kullanılmaması oluşan üründen tampon iyonlarını uzaklaştırma işlemini de ortadan kaldırmış olacaktır [Parascandola et al. 1982].

Maya hücresi suda çözünmeyen jelatine hem fiziksel adsorpsiyon hem de formaldehitte kovalent bağlanmayla immobilize edilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri jelatine immobilize edildiğinde maya hücreleri invertaz aktivitesini korumuştur. Jelatine immobilize edilmiş hücreler daha sonra formaldehitte muamele edildiğinde invertaz aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Fakat immobilize maya % 18 gibi düşük bir aktivite göstermiştir. Bu düşük aktivitenin sebebinin maya üretici firmanın sulu çözelti ve 37 °C’de mayanın kendi kendini parçaladığını (autolysis) belirtmesiyle açıklanabilmiştir [Alteriis et al. 1988].

İnvertaz aktivitesine sahip rekombinant *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri alginat kapsüle immobilize edilmiş ve yüksek yoğunlukta kültür edilmiştir. Immobilize maya serbest mayaya göre termal olarak kararlılığını arttırmıştır. Na-asetat tamponunda bir ay süreyle 4°C ve 10°C’lerdeki depolama sonucunda aktivitede sırasıyla % 7 ve % 8 düşme gözlenmiştir. 30°C’de 7 gün süreyle 25 kullanımda sukroz hidrolizi boyunca kararlılığını korumuştur. 7 gün süreyle 0,3M sukroz hidrolizi paket yatak reaktörle % 90 çevrimle gerçekleştirilmiştir. Sürekli karıştırmalı tank reaktörde 1,0M sukroz çözeltisi kullanılarak % 59,1 ve 0,5M sukroz çözeltisinde ise % 95 çevrim gerçekleştirilmiştir [Chang et al. 1996].

Soluble enzim çeşitli suda çözünmeyen taşıyıcı yüzeylerine iyonik bağlanmayla oluşturulan fiziksel tutunma ile immobilize edilmiştir. Kullanılan suda çözünmeyen taşıyıcılar arasında iyon-değiştirici reçineler, sentetik polimerler, mikro gözenekli cam, diğer inorganik materyaller ve DEAE-selüloz vardır. İkinci grup immobilizasyon tekniği ise katı taşıyıcıya invertazı farklı kovalent bağlanma metotlarıyla gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem için kullanılan taşıyıcılar sentetik polimer partikülleri, selüloz türevleri, hayvansal mangal kömürü, mısır çubuğu ve manyetik partiküllerdir. İlave olarak, invertaz tavuk yumurtası akı proteinine glutaraldehitte çapraz bağlanarak, formaldehitte suda çözünmeyen jelatin partiküllerine ve triasetat-selüloz fiberlere entrapment ile immobilize edilmiştir [Hasal et al. 1992].

İnvertaz poliüretan köpük kullanılarak immobilize edilmiştir. Hidrofilik üretan prepolimere gerçekleştirilen invertaz immobilizasyonunda prepolimerdeki NCO grup sayısı artışında % aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Kullanılan poliol molekül ağırlığı arttıkça relative aktivitede artma gözlenmiştir. İmmobilize invertaz serbest enzime göre daha yüksek optimum pH (5,5) göstermiştir. Ayrıca immobilize enzim termal olarak daha kararlıdır [Fukushima et al. 1978].

2.7. İnvrt Şeker

İnvrt şeker 1:1 oranındaki glukoz ve fruktoz karışımıdır. İnvrt şeker sukrozun hem asitle hem de soluble invertaz veya invertaz aktivitesine sahip *Saccharomyces cerevisiae* gibi hücrelerle hidrolizi sonucu elde edilmektedir. Soluble enzimle invert şeker üretimi pahalı olmamasına rağmen, sürekli olarak invert şurubu üretimi için immobilize enzim kullanılmaktadır [Uhm et al. 1984].

Şeker endüstrisinin yan ürünlerinden yüksek-verimlilikte invert şeker üretimi için enzimatik hidroliz tercih edilmektedir. Biyolojik çevrimde asit hidroliziyle elde edilen ürünlerden daha iyi renk, tat ve saflık sağlanmaktadır [Cantarella, 1989].

İnternal invertaz aktivitesine sahip hücrelerin immobilizasyonu soluble invertaz immobilizasyonu ile karşılaştırıldığında ekonomik avantajlar sağlamasına rağmen, hücre immobilizasyonu daha az kullanımdadır [Krastanov, 1997].

İnvrt şeker yüksek su afinitesine sahip olduğundan ürünlerin nemini kontrol altında tutmak ve raf ömrünü arttırmak için kullanılmaktadır. Aynı zamanda invert şeker ilaç ve gıda endüstrisinde gerekli olan fonksiyonel özelliklere sahip değerli bir tatlandırıcıdır. Orta dereceli invert şeker (% 50 sukroz ve % 50 invert şeker) saf invert şeker ve saf sukroz ile karşılaştırıldığında tatlılığı % 20 daha arttırmaktadır. Bu ekstra tatlılıkta meyveli içeceklerin tatlandırılmasında kullanımına imkan sağlar. İnvrt şekerin kullanımı cazip hale getiren diğer bir özelliği ise kullanıldığı ürünlerdeki kristalizasyonu geciktirmesidir. Ayrıca invert şeker yağın olarak arıcılıkta kullanılan bir maddedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Maddeler

Tablo 3.1 Deneyde kullanılan kimyasal maddeler

ADI	ÜRETİCİ FİRMA	KATALOG NO
Ekmek mayası	Pakmaya	
Hypol 2002	Dow	2078
Glutaraldehit	Merck	8.2063.1000
Kalsiyum Asetat	Merck	1.09325.0500
Sodyum Asetat	Merck	1.06265
K ₂ HPO ₄	Fluka	60353
KH ₂ PO ₄	Fluka	60218
Asetik Asit	Merck	1.00056
HCl	Merck	100.317.2500
NaOH	Fluka	71692
Sodyum Azid	Merck	1.06688.0250
D-(+) Fruktoz	Sigma	F-0127
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

3.2. 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

3.3. Yöntem

3.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi ile Fruktoz Tayini

Reaksiyon sonunda alınan ve seyreltilen örneklerden 1µL Hamilton şırınga kullanılarak Whatman K5 TLC plakalarına damlatıldı. Hareketli faz olarak 90:10 (v/v) oranındaki asetonitril:su çözelti sistemi kullanıldı. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, saç kurutma makinesi ile plaka kurutuldu. 3 ascent olarak TLC plaka yürütüldü. TLC plakaları renklendirme çözeltisine daldırılıp, 110 °C’ de termoplate üzerinde 10 dakika ısıtıldı. Renklendirme çözeltisi plaka üzerindeki karbohidratları görünür hale getirmek için kullanılmaktadır. Renklendirme çözeltisi etil alkole sülfürik asit (% 5 v/v) ve α-naftol (% 0,5 w/v) ilave edilerek hazırlanmaktadır.

3.3.2. *Saccharomyces cerevisiae* İnvertazın İmmobilizasyonu

3.3.2.1. PGA Çözeltisinin Hazırlanması

PGA sentezi için 5 ml % 5’lik (w/v) glutaraldehit 50 µl 1 M NaOH çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında polimerleşmenin gerçekleşmesi için yarım saat 600 rpm’de karıştırıldı. Çözelti, 50 µl 1 M HCl ilave edilerek nötralleştirildi.

3.3.2.2. PÜ köpüklere *Saccharomyces cerevisiae* immobilizasyonu

Maya (100 mg) distile su (1,5 ml) ile süspanse edildi. Karışıma surfactant olarak Span 80 (0,6 g) ilave edilerek plastik bir kapda bulunan Hypol 2002'ye (2 g) ilave edildi. Karışımı homojen hale getirmek için cam bir bagetle 5 dakika karıştırıldı. Karıştırma işlemi karışımın viskozitesinin artmasıyla durduruldu ve 30 dakika kuruması için bekletildi. Hazırlanan maya immobilize edilmiş köpükler, makasla 1cmx1cm ebatlarında küçük parçalara ayrıldı. 3 g maya immobilize edilmiş köpük elde edildi.

3.3.2.3. PÜ köpüklere kovalent bağlanmamış mayanın PGA ile çapraz-bağlanması

Küçük parçalara ayrılmış köpükler 50 ml % 10'luk sukroz % 3 PEG ve 1M KH_2PO_4 (pH 7,4) tamponla hazırlanmış çözeltiye ilave edildi. 540 rpm'de karışmakta olan karışıma çapraz-bağlanma reaktifi olarak ortama PGA azar azar ve 1 saat sonunda konsantrasyonu % 0,05 olacak şekilde % 5'lik PGA çözeltisinden ilave edildi. Bir saat sonunda köpükler süzülerek çözelti ortamından uzaklaştırıldı. 50 ml distile su ile 4-5 kez 5'er dakika 540 rpm'de karıştırılarak yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen maya immobilize edilmiş köpükler invert şeker üretiminde kullanıldı. Köpükler hemen kullanılmayacak ise % 0,01 NaN_3 içeren distile suda +4°C'de muhafaza edildi.

3.3.2.4. İnvvertaz Enziminin Aktivite Tayini

1- Serbest Mayadaki İnvvertazın Aktivite Tayini

100 mg ekmek mayası 50 ml distile su ile hazırlanmış % 10'luk sukroz çözeltisinde oda sıcaklığında muamele edildi. 20. dakikada 100 µl numune 900 µl distile su bulunan numune şişesine alınarak 100°C'deki su banyosunda 10 dakika tutularak invvertaz inaktive edildi. Oluşan fruktoz miktarı TLC kullanılarak tayin edildi.

2- İmmobilize Mayadaki İnvertaz Enziminin Aktivite Tayini

Poliüretan köpüklere immobilize edilmiş ekmek mayası (3 g) 50 ml % 10'luk distile su ile hazırlanmış sukroz çözeltisi ile 20 dakika muamele edildi. 20. dakika sonunda alınan 100 µl numune 1 ml'ye distile su ile tamamlanarak 100 °C'deki su banyosunda 10 dakika enzimin denatüre olması için bekletildi. Oluşan fruktoz miktarı fruktoz standartları kullanılarak TLC-densitometre metodu kullanılarak belirlendi.

3.3.3. Sıcaklık-Aktivite deneyleri

İmmobilize (3 g) veya serbest maya (100 mg) distile su ile hazırlanan sukroz çözeltisiyle (% 10 w/v, 50 ml) 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 75 °C sıcaklıklarda 20 dakika süreyle reaksiyona sokuldu ve aktivite tayin edildi.

3.3.4. pH-Aktivite Deneyleri

İmmobilize (3 g) ve serbest maya (100 mg) değişik pHlardaki (3,5-8,0) sukroz çözeltisiyle (% 10 w/v, 50 ml) 55 °C'de 15 dakika süreyle reaksiyon gerçekleştirildi ve aktivite tayin edildi. pH 3 ve 6 arasındaki çözeltiler 25 mM kalsiyum asetat tampon çözeltisi, pH 6 ve 8 arasındaki çözeltiler ise potasyum fosfat tampon çözeltisiyle hazırlandı.

3.3.5. K_m ve V_{max} Tayini

İmmobilize (3 g) ve serbest maya (100 mg) distile su ile hazırlanmış değişik konsantrasyonlardaki (25, 50, 100, 150, 200 mM) 50 ml sukroz çözeltileriyle oda sıcaklığında iki dakika süreyle reaksiyona sokuldu ve aktivite belirlendi.

4.SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* kovalent bağlanmayla poliüretan köpüklere immobilize edilmiştir. Poliüretan köpüklere polimerizasyon oluşumunda adsorbe olan mayanın çözeltiye geçişini önlemek amacıyla ikinci olarak PGA kullanımıyla Hypol'e kovalent olarak bağlanması sağlandı. Çapraz-bağlama yapılmadan önceki immobilizasyon verimi % 65 olarak belirlenmişti. Fakat 30 tekrar kullanım sonunda bu aktivitenin % 40'lara düştüğü belirlendi. Çapraz-bağlanmayla kararlı hale getirilmiş immobilizasyon verimi % 75 olarak belirlendi. İmmobilizasyon verimi TLC-densitometre ile belirlenen immobilize maya aktivitesinin serbest maya aktivitesine oranının 100 ile çarpılmasıyla elde edilmiştir.

GA ile çapraz-bağlamada enzim ve bağlanmadan kalan aldehit grupları arasında meydana gelen rasgele bağlanmalardan dolayı enzim inaktive olmaktadır. Enzimin kararlılığı enzimdeki amin grupları ile aldehit gruplarıyla aktive edilmiş taşıyıcı arasındaki spesifik olmayan bağlanmanın sınırlandırılmasıyla artırılabilir. Bağlanma karışımına koruyucu reaktiflerin ilave edilmesiyle enzim molekülü fazla olan aldehit gruplarından korunacağından enzim kararlılığı artırılmış olur.

Bu çalışmada poliüretan köpüklere adsorbe olmuş mayanın çapraz-bağlanmasında poliglutaraldehit kullanılırken PGA'nın maya invertazını inaktive etmesini önlemek için çapraz-bağlama reaksiyonu PEG ve sukroz ortamında gerçekleştirilmiştir. *Bacillus coagulans* glukoz izomeraz GA ve yüksek tuz konsantrasyonları kullanılarak selüloz fiberlere immobilize edilmiştir [Amotz et al.1987]. 1M'dan yüksek potasyum fosfat konsantrasyonları immobilizasyonu olumlu şekilde etkilemiştir. Bu çalışmadan yararlanarak bizde gerçekleştirdiğimiz çapraz-bağlama reaksiyonunu yüksek tampon konsantrasyonlarında gerçekleştirdik. 25 mM ile 1 M fosfat tamponlarının karşılaştırılması sonucunda 1 M fosfat tamponu çapraz-bağlanma verimini olumlu şekilde arttırdığı gözlenmiştir.

Şeker ve polietilen glikol (PEG) gibi bazı katkı maddeleri çözelti halindeki proteinleri kararlı hale getirebilirler. PEG aldehit gruplarıyla kovalent bağ

oluşturmaz. Ortama ilave edilen PEG miktarı enzim kararlılığı üzerinde etkilidir. PEG miktarı arttırıldıkça kararlılık artmaktadır.

Normal şartlar altında enzimin doğal ve aktif 3- boyutlu yapısı çok sayıdaki amino asit rezidüsünden oluşmaktadır ve van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimler, hidrofobik etkileşim ve hidrojen bağı gibi farklı kovalent olmayan kuvvetlerin bir dengesi sonucu oluşmaktadır.

Enzimin kararlı hale gelebilmesine PEG'in katkısı farklı şekillerde olmuş olabilir. PEG hidrofobik yapıda olduğundan enzimin hidrofobik kalıntıları olan amino asitlerin yüzeyine bağlanarak etkileşime girmiştir. Enzim çözeltisine PEG ilavesi sonucunda enzim molekülünden su molekülleri dışlandığından hidrofobik karakteri arttırılmış ve enzim molekülü kararlı bir yapıya dönüşmüştür [Chae et al. 2000].

Çapraz-bağlama işleminde GA yerine PGA'in tercih edilmesinin sebebi adsorbe olan enzimi geri dönüşümsüz bağlarla bağlaması sebebiyledir. GA, 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 hale gelir.

4.1. İmmobilizasyona Deterjan Etkisi

Hazırlanan poliüretan köpüklerin fiziksel özelliklerini iyileştirmek için su/prepolimer oranı ve deterjan ilavesi denendi. Bu denemeler sonucunda 0,6 g Span 80 (sorbitan monooleat) ile hazırlanmış köpüğün gözenek yapısının diğer denemelerdekinden daha iyi sonuç verdiği ve daha yüksek aktivite verdiği gözlenmiştir(Tablo 4.1). Kullanılan deterjanın noniyonik lipofilik yüzey-aktif reaktif olarak kullanımı mevcuttur. Değişen Span80 miktarları kullanılarak yapılan immobilizasyon işlemlerinde maya (100 mg), destile su (1,5 ml) ve Hypol 2002 (2 g) kullanılmış ve çapraz-bağlama işlemi yapılmamıştır.

Tablo 4.1 Span 80 Miktarının Aktiviteye Etkisi

Span 80 (g)	Aktivite (%)
0,3	67
0,6	75
1	62

4.2. İmmobilizasyona Maya Miktarının Etkisi

İmmobilizasyona değişen maya miktarlarının etkisi incelenmiş ve Tablo.4.2’de de görüldüğü gibi 100 mg maya kullanımı en iyi aktiviteyi vermiştir.

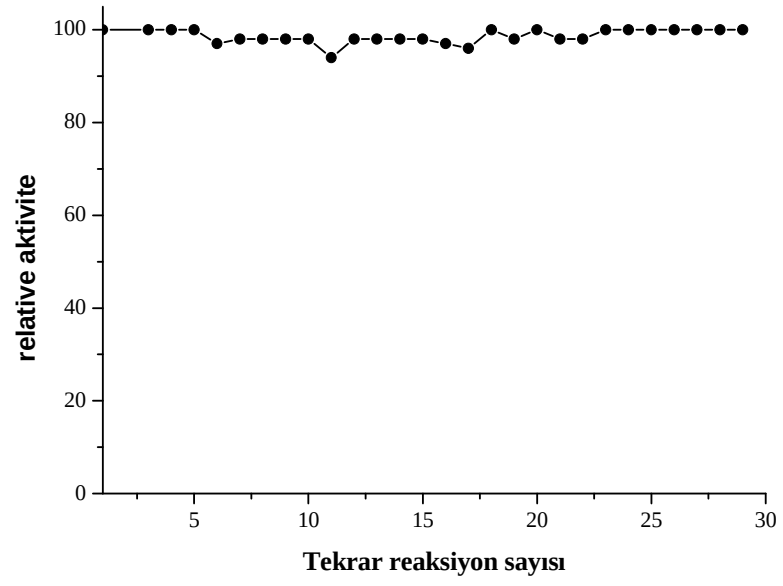
Tablo 4.2 Maya Miktarının Aktiviteye Etkisi

Maya miktarı (mg)	Relative Aktivite (%)
100	67
75	63
50	53
25	38

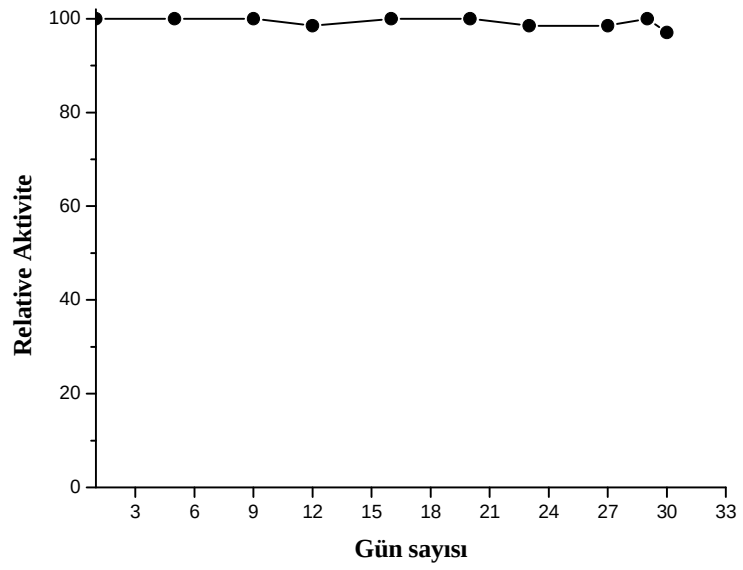
Batch usulü gerçekleştirilen aktivite deneylerinde difüzyon problemini ortadan kaldırmak için farklı karıştırma hızları denenmiş ve optimum karıştırma hızının 540 rpm olduğu bulunmuştur.

4.3. Aktivite-Tekrar Kullanım ve Aktivite-Gün Deneyleri

Bu çalışmada, elde edilen immobilize maya invertazı Grafik 4.1 ve 4.2’ de görüldüğü gibi, 30 tekrarlanan reaksiyon ve 30 gün boyunca aktivitesini korumuştur. Grafikler için gerekli olan deneyler 50 ml % 10’luk sukroz çözeltisiyle aktivite deneylerindeki gibi gerçekleştirilmiştir.



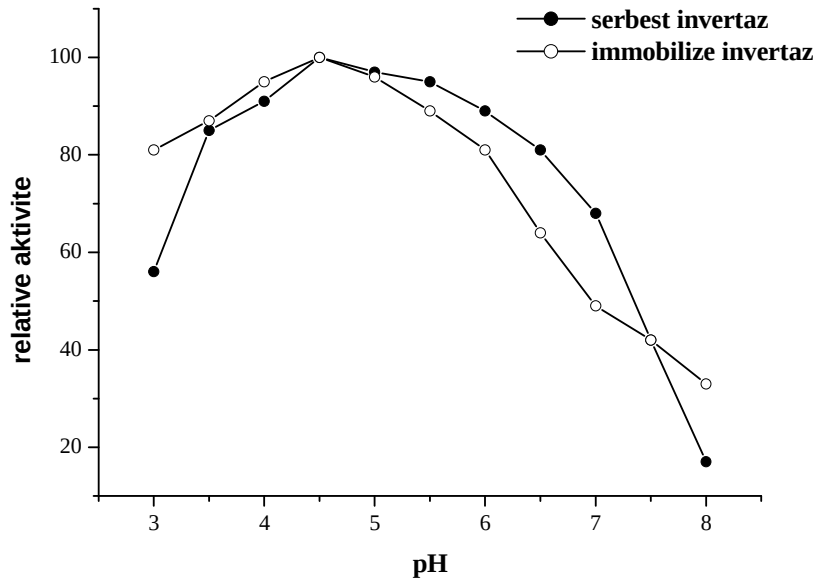
Grafik 4.1 İmmobilize invertaz için Tekrarlanan reaksiyon sayısı (Batch) – Aktivite Grafiği



Grafik 4.2 İmmobilize invertaz için Gün-Aktivite grafiği

4.4. pH-Aktivite Deneyleri

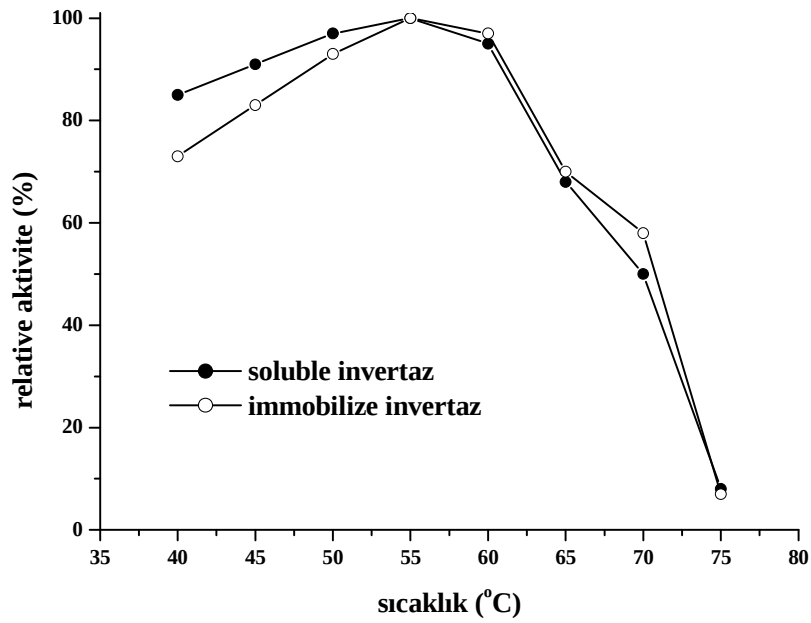
İmmobilize ve serbest invertazı üzerine pH etkisi Grafik 4.3'te gösterilmiştir. İmmobilize ve serbest maya invertaz enzimlerinin optimum pH'sı 4,5 olarak bulunmuştur. İmmobilize enzim asidik pH'larda soluble enzime göre daha yüksek aktivite göstermiştir.



Grafik 4.3 Serbest ve immobilize invertaz için pH-Aktivite grafiği

4.5. Sıcaklık-Aktivite Deneyleri

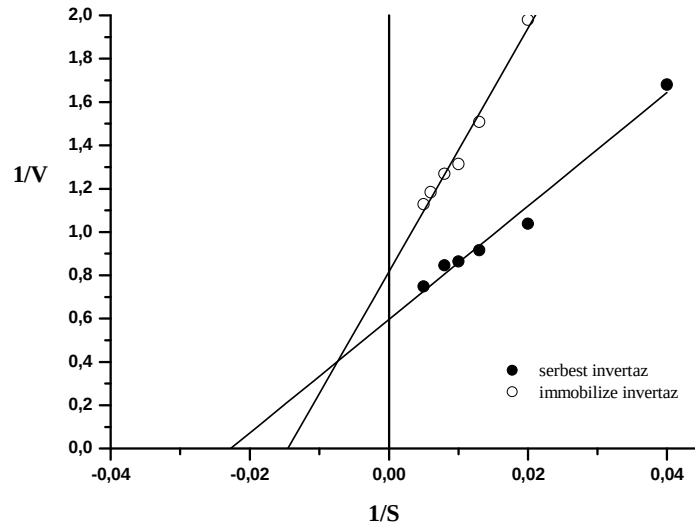
Grafik 4.4.'te serbest ve immobilize invertaz üzerine sıcaklığın etkisi gösterilmiştir. Serbest ve immobilize maya için optimum sıcaklık 55° C olarak bulunmuştur.



Grafik 4.4 Serbest ve immobilize invertaz için Sıcaklık-Aktivite grafiği

4.6. K_m ve V_{max} Tayini

Grafik 4.5' te serbest ve immobilize invertaz için Lineweaver-Burk grafiği görülmektedir. Serbest maya invertazının kinetik parametreleri $K_m=43,9$ mM ve $V_{max}=9.3$ mmol Fru/dak.mg maya iken immobilize enzim için $K_m=68,8$ mM ve $V_{max}=6.8$ mmol Fru/dak.mg maya olarak bulunmuştur. Immobilize enzimin K_m değeri serbest enzime göre yaklaşık olarak 1,5 kat artmıştır. Enzimin substratına olan ilgisindeki bu değişim, enzimin aktif bölgesinin immobilizasyondan etkilenmesinden kaynaklanmaktadır [Arıca et al. 2000].



Grafik 4.5 Serbest ve immobilize invertaz için Lineweaver-Burk grafiği

Bu tez çalışmasında poliüretan köpüklere immobilizasyon metodu kullanılarak maya yüksek bir verimle (% 75) immobilize edilmiştir. Immobilize enzim uzun süreli olarak ve tekrarlı kullanımlarda aktivitesini korumaktadır. Bu çalışmada elde edilen immobilize enzimle invert şeker üretiminde tampon çözelti yerine distile su kullanıldı. Bu uygulama üretimi daha ekonomik olarak gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Elde edilen immobilize enzim endüstriyel olarak invert şeker üretiminde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Klibanov, A.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" Journal Korean Agricultural Chemical Society, Vol.27, No.2, 112-118

Bernath, F.R. and Venkatasubramanian, K., "Methods of Enzyme Immobilization" Chapter 19

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

Marquie, C., (2001) "Chemical Reactions in Cottonseed Protein Cross-Linking by Fomaldehyde, Glutaraldehyde and Glyoxal for the Formation of Protein Films with Enhanced Mechanical Properties" Journal Agricultural Food Chemistry, Vol.49, 4676-4681

Chae, H.J., In, M.J. and Kim, E.Y., (1998) "Optimization of Protease Immobilization by Covalnet Binding Using Glutaraldehyde" Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol.73, 195-205

Chae, H.J., Kim, E.Y. and M.J., (2000) "Improved Immobilization Yields by Addition of Protecting Agents in Glutaraldehyde-Induced Immobilization Protease" Vol.89, No.4, 377-379

Wood, L.L., Hartdegen, F.J. and Hahn, A.P., (1982) "Enzymes Bound to Polyurethane" U.S. Patent, 4342834

Havens, P.L. and Rase, H.F., (1993) "Reusable Immobilized Enzyme/Polyurethane Sponge for Removal and Detoxification of Localized Organophosphate Pesticide Spills" *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol.32, 2254-2258

Drevon, G.F., Hartleib, J., Scharff, E., Rüterjans, H. and Russell, A.J., (2001) "Thermoinactivation of Diisopropylfluorophosphatase-Containing Polyurethane Polymers" *Biomacromolecules*, Vol.2, 664-671

Bang, S.S., Galinat, J.K., Ramakrishnan, V., (2001) "Calcite Precipitation Induced by Polyurethane-Immobilized *Bacillus pasteurii*" *Enzyme and Microbial Technology* Vol.28, 404-409

Chakrabarti, A.C. and Storey K.B., (1988) "Immobilization of Cellulase Using Polyurethane Foam" *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol.19, 189-203

Drevon, G.F. and Russell A.J., (2000) "Irreversible Immobilization of Diisopropylfluorophosphatase in Polyurethane Polymers" *Biomacromolecules*, Vol.1, 571-576

Bakker, M., Velde F., Rantwijk, F. and Sheldon, R.A., (2000) "Highly Efficient Immobilization of Glycosylated Enzymes into Polyurethane Foams" *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.70, No.3, 342-348

Hu, Z., Korus, R.A. and Stormo, K.E., (1993) "Characterization of Immobilized Enzymes in Polyurethane Foams in a Dynamic Bed Reactor" *Appl. Microbiol. Biotechnology*, Vol.39, 289-295

Na, K., Lee, Y., Lee, W., Huh, Y., Lee, J., Lee, J., Kubo, M. and Chung S., (2000) "Characterization of PCB-Degrading Bacteria Immobilized in Polyurethane Foam" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.90, No.4, 368-373

Domingo, J.W.S., Radway, J.C., Hermann, P., Wilde E.W. and Hazen, T.C., (1997) "Immobilization of *Burkholderia cepacia* in Polyurethane-Based Foams: Embedding

Efficiency and Effect on Bacterial Activity” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol.18, 389-395

Nakamura, Y., Sungusia, M.G., Sawada, T. and Kuwahara M., (1999) “Lignin-Degrading Enzyme Production by *Bjerkanda adusta* Immobilized on Polyurethane Foam” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.88, No.1, 41-47

Yamaguchi, T., Ishida, M. and Suzuki, T., (1999) “An Immobilized Cell System in Polyurethane Foam for the Lipophilic Micro-Alga *Prototheca zopfii*” *Process Biochemistry*, Vol.34, 167-171

Lindsey, K., Yeoman, M.M., Black, G.M. and Mavituna, F., (1983) “A Novel Method for Immobilization and Culture of Plant Cell” *FEBS Letters*, Vol.155, No. 1, 143-149

Liu, C., Moon, K. Honda, H. and Kobayashi, T., (2000) “Immobilization of Rice (*Oryza sativa* L) Callus in Polyurethane Foam Using a Turbine Blade Reactor” *Biochemical Engineering Journal*, Vol.4, 169-175

Liu, Y., Seki, M., Tanaka, H., Furusaki, S., (1998) “Characteristic of Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as a Carrier for Plant Cell Immobilization” *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol.85, No.4, 416-421

Gascon, S. And Lampen, J.O., (1968) “Purification of the Internal Invertase of Yeast” *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.243, No.7, 1567-1572

Elorza, M.V., Villanueva, J.R. and Sentandreu, R., (1977) “The Mechanism of Catabolite Inhibition of Invertase by Glucose in *Saccharomyces cerevisiae*” *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.475, 103-112

Combes, D. and Monsan, P., (1983) “Sucrose Hydrolysis by Invertase Characterization of Products and Substrate Inhibition” *Carbohydrate Research*, Vol.117, 215-228

Combes, D. and Monsan, P., (1981) "Enzymic Hydrolysis of Sucrose" Carbohydrate Research, Vol.93, 312-316

Krastanov, A., (1997) "Continuous Sucrose Hydrolysis by Yeast Cells Immobilized to Wool" Applied Microbiology Biotechnology, Vol.47, 476-481

Cantarella, M., Cantarella, L., Cirielli, G., Gallifuoco, A. and Alfani, F., (1989) "Sucrose bioconversion in membrane reactors" Journal of Membrane Science, Vol.41, 225-236

Hasal, P., Vojtisek, V., Cejkova, A., Kleczek, P. And Kofronova, O., (1992) "An Immobilized Whole Yeast Cell Biocatalyst for Enzymatic Sucrose Hydrolysis" Enzyme Microb. Technology, Vol.14, 221-229

Dhulster, P., Parascandola, P. and Scardi, V., (1983) "Improved Method for Immobilizing Invertase-Active Whole Cells of *Saccharomyces cerevisiae* in Gelatin" Enzyme Microb. Technology, Vol.5, 65-69

Rouxhet, P.G., Haecht, J.L.V., Didelez, J., Gerard, P. and Briquet, M., (1981) "Immobilization of Yeast Cells by Entrapment and Adhesion Using Siliceous Materials" Enzyme Microb. Technology, Vol.3, 49-54

Vorlop, K., Muscat, A. and Beyersdorf, J., (1992) "Entrapment of Microbial Cells within Polyurethane Hydrogel Beads with the Advantage of Low Toxicity" Biotechnology Techniques, Vol.6, No.6, 483-488

Linko, Y., Weckström, L. and Linko, P., (1980) "Sucrose Inversion by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells" Food Process Engineering, Vol.2, 81-91

Parascandola, P. and Scardi, V., (1982) "Sucrose Inversion by Gelatin-Entrapped Cells of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)" Biotechnology Letters, Vol.4, No.11, 753-758

Alteriis, E., Parascandola, P., Pecorella, A. and Scardi, V., (1988) "Effect of Gelatin-Immobilization on Catalytic Activity of Enzymes and Microbial Cells" *Biotechnology Techniques*, Vol.2, No.3, 205-210

Chang, H.N., Seong, G.H., Yoo, I., Park, J.K. and Seo, J., (1996) "Microencapsulation of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Cells with Invertase Activity in Liquid-Core Alginate Capsules" *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.51, No.2, Abstract

Fukushima, S., Nagai, T. and Fujita, K., (1978) "Hydrophilic Urethane Prepolymers: Convenient Materials for Enzyme Entrapment" *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.20, 1465-1469

Arıca, M.Y., Şenel, S., Alaeddioğlu, N.G., Patır, S. ve Denizli, A., (2000) "Invertase Immobilized on Spacer-Arm Attached Poly(Hydroxyethyl methacrylate) Membrane: Preparation and Properties" *Journal of Applied Polymer Science*, Vol.75, 1685-1692

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: AİŞE AKPINAR

DOĞUM YERİ: İSTANBUL

DOĞUM TARİHİ: 23.02.1980

LİSANS: ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ KİMYA BÖLÜMÜ (2001)

YÜKSEK LİSANS: Eylül 2001 – Haziran 2002 Yabancı Dil Hazırlık

Eylül 2002 –Haziran 2003 Ders Dönemi

Eylül 2003- Haziran 2004 Tez Dönemi