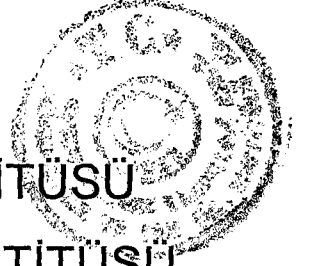


T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



PECTİNEX ULTRA SP-L'NİN
İMMOBİLİZASYONU VE PREBİYOTİK
ÜRETİMİNDE KULLANIMI

Yakup ASLAN
DOKTORA TEZİ

171056

KİMYA ANABİLİM DALI

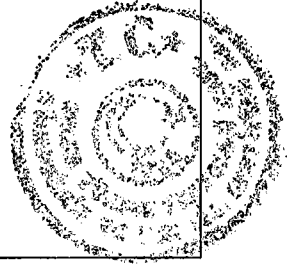
TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. Aziz TANRISEVEN

GEBZE
2005



**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ
ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU



Yakup ASLAN'ın tez çalışması, G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.06.2005 Tarih ve 2005/22 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN

ÜYE

: Prof. Dr. Bülent KESKİNER

ÜYE

: Prof. Dr. Dilek KAZAN

ÜYE

: Doç. Dr. Murat ÖZDEMİR

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Ali TÜRKAN

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
15.08.2005 Tarih ve 2005/27 sayılı kararı.

İMZA/MUHÜR



ÖZET

Bu çalışmada ticari bir enzim karışımı olan Pectinex Ultra SP-L, ticari immobilizasyon matrisleri olan Eupergit C ve kalsiyum alginat kapsülü ile immobilize edilerek fruktooligosakkarit, galaktooligosakkarit, laktozsuz süt ve glukoz üretiminde kullanıldı.

Aspergillus aculeatus'tan elde edilen Pectinex Ultra SP-L, endüstriyel olarak meyve sularındaki pektini parçalamak için yaygın olarak kullanılan ticari bir enzim karışımıdır. Karışımında, pektini parçalayan pektinazın yanında, poligalakturonaz, ksilanaz, fruktoziltransferaz ve β -galaktozidaz da vardır.

Çalışma üç bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde, Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferaz Eupergit C üzerine % 96 aktivite verimi ile immobilize edilerek, fruktooligosakkarit üretiminde kullanıldı. İmmobilizasyon, enzimin optimum pH ve sıcaklığını değiştirmedir. İmmobilize enzim +4 °C'de fosfat tampon çözeltide (25 mM, pH 5.5) saklandığında, 20 gün süresince aktivitesini korudu. Eupergit C üzerine immobilize enzim kullanılarak kesikli sistemde fruktooligosakkarit üretildiğinde serbest enzime göre ürün bileşimi değişmedi. İkinci olarak, Eupergit C üzerine immobilize edilen enzim sürekli sistemde kullanıldığında, seçici olarak 1-kestoz elde edildi. Üçüncü olarak, Eupergit C üzerine immobilize enzim kalsiyum alginat kapsüllerinde hapsedilerek fruktooligosakkarit üretiminde kullanıldığında, fruktofuranozil nistoz oluşmazken serbest enzimden daha fazla 1-kestoz ve nistoz elde edildi.

İkinci bölümde Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidaz Eupergit C üzerine % 124 aktivite verimi ile immobilize edilerek, galaktooligosakkarit ve laktozsuz süt üretiminde kullanıldı. İmmobilizasyon, enzimin optimum pH ve sıcaklığını

değiştirmedii. İmmobilize enzim +4 °C’de fosfat tampon çözeltilde (25 mM, pH 4.5) saklandığında, 20 gün süresince aktivitesini korudu. Laktozdan galaktooligosakkarit üretiminde, immobilize enzim kullanılarak serbest enzimden % 24 oranında daha fazla 6’-galaktozil laktoz elde edildi. İkinci olarak, immobilize enzim ile sürekli sistemde çiğ inek sütündeki laktozun % 98’i hidroliz edilerek laktozsuz süt üretildi.

Son bölümde, ilk olarak Pectinex Ultra SP-L karışımının glukoamilaz aktivitesinin de olduğu bulundu. Pectinex Ultra SP-L glukoamilaz, Eupergit C üzerine % 95 aktivite verimi ile immobilize edildi. İmmobilize enzim kullanılarak maltodekstrinden % 100 verimle glukoz elde edildi. İmmobilizasyon, enzimin optimum pH ve sıcaklığını değıştirmedii. İmmobilize enzim +4 °C’de fosfat tampon çözeltilde (25 mM, pH 5.0) saklandığında, 20 gün süresince aktivitesini korudu.

Sonuç olarak bu çalışmada, immobilize Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferaz, β-galaktozidaz ve glukoamilazın ticari önemi olan fruktooligosakkarit, galaktooligosakkarit, laktozsuz süt ve glukozun endüstriyel üretimlerinde kullanılabilme potansiyeline sahip oldukları bulundu.



SUMMARY

Pectinex Ultra SP-L, a commercial enzyme preparation, was covalently immobilized and used for production of fructooligosaccharides, galactooligosaccharides, lactose free milk and glucose. Pectinex Ultra SP-L, produced by *Aspergillus aculeatus*, has been used for hydrolysis of pectins in the food industry. In addition to pectinase, Pectinex Ultra SP-L has such enzymes as polygalacturonase, fructosyltransferase and β -galactosidase.

This work is composed of three chapters. In the first chapter, Pectinex Ultra SP-L fructosyltransferase was covalently immobilized onto Eupergit-C and used for production of fructooligosaccharides. Immobilization resulted in 96 % activity yield. Optimum pH and temperatures were not affected by immobilization. Immobilized enzyme retained its activity for 20 days without any decrease when stored at 4 °C. Product composition was not affected by immobilization using Eupergit C in the batch system, but 1-kestose was selectively produced in continuous system. When the Eupergit-C immobilized enzyme was encapsulated within calcium alginate capsules, 1-kestose and nystose but fructofuranosyl nystose were produced in the batch system.

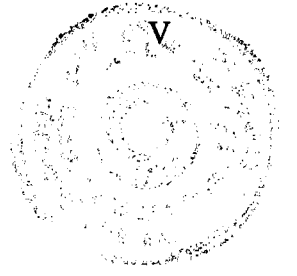
In the second chapter, Pectinex Ultra SP-L β -galactosidase was immobilized onto Eupergit-C and used for the production of galactooligosaccharides from lactose and lactose free milk. Immobilization resulted in 124 % activity yield. Optimum pH and temperatures were not affected by immobilization. Immobilized enzyme retained its activity for 20 days without any decrease when stored at 4 °C. Immobilized enzyme produced 24% more 6'-galactosyl lactose than soluble enzyme. In the continuous system, 98 % of milk lactose was hydrolyzed using immobilized enzyme.

In the last chapter, Pectinex Ultra SP-L glucoamylase was immobilized and used for production of glucose from maltodextrin. Immobilization resulted in 95 % activity yield. Optimum pH and temperatures were not affected by immobilization. Immobilized enzyme retained its activity for 20 days without any decrease when stored at 4 °C. Glucose was produced with 100 % yield from maltodextrins by using immobilized enzyme in the batch system.

It was found that the immobilized Pectinex Ultra SP-L has the potential to be used for the industrial production of fructooligosaccharides, galactooligosaccharides, glucose and lactose free milk.



TEŞEKKÜR

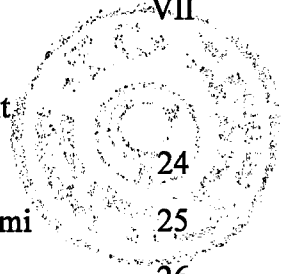


Başta, tez konusunun belirlenmesi ve deneylerin yürütülmesi sırasında yaptığı yönlendirmelerle tezin tamamlanmasında verdiği büyük desteklerden dolayı, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN'e; deneylerde kullanılan bazı maddeleri hediye eden Novo Nordisk (Pectinex Ultra SP-L), Degussa (Eupergit C) ve Meiji-Seika (FOS standartları) firmalarına; sağlanan proje desteği için Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu HÜBAK'a; yardımlarından dolayı, Sayın Prof. Dr. Bülent KESKİNLER, Sayın Prof. Dr. Füsun GÜMÜŞEL, Sayın Doç. Dr. Elif ERHAN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK'e; çalışmalarım süresince yaptıkları yardımlardan ve verdikleri moral destekten dolayı, çok değerli arkadaşlarım Arş. Grv. Oltan CANLI, Arş. Grv. Zehra ÖLÇER, Arş. Grv. Nadir DİZGE, Arş. Grv. Şeyda KORKUT, yüksek lisans öğrencisi Pınar AKKUŞ ve Nagihan AKBULUT'a; başta Sayın Ali ÖZALP olmak üzere, doktora çalışmalarım süresince maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli arkadaşlarıma; yaptıkları fedakarlıklarla çalışmamı kolaylaştıran sevgili eşim ve çocuklarıma; başta annem ve merhum babam olmak üzere, yaptıkları maddi ve manevi yardımlardan dolayı bütün aileme çok teşekkür eder, saygılar sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

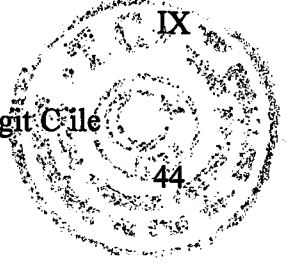


	<u>Sayfa</u>
ÖZET	I
SUMMARY	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGE VE KISALTMALARDIZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
TABLolar DİZİNİ	XVI
1. GİRİŞ	1
1.1. Sükroz	3
1.2. Fruktooligosakkaritler (FOS)	4
1.3. Laktoz	5
1.4. Galakktooligosakkaritler (GOS)	6
1.5. Maltodekstrinler (MD)	7
1.6. Glukoz	7
1.7. Fruktoziltransferazlar (FTS)	8
1.8. β -Galaktozidazlar	10
1.9. Glukoamilazlar	11
1.10. Pectinex Ultra SP-L	12
1.11. Enzim İmmobilizasyonu	13
1.13. Enzim İmmobilizasyon Metodları	15
1.13.1. Adsorpsiyon	16
1.13.2. Entrapment (Hapsetme)	17
1.13.2.1. Enzimlerin Kalsiyum Alginat ile İmmobilizasyonu	17
1.13.3. Çapraz Bağlama	19
1.13.4. Kovalent Bağlama	19
1.13.4.1. Eupergit [®] C ile Enzim İmmobilizasyonu	20
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	23
2.1. İmmobilize Fruktoziltransferaz Kullanarak Fruktooligosakkarit (FOS) Üretimi	23



2.2. İmmobilize β -Galaktozidaz Kullanarak Galaktooligosakkarit (GOS) Üretimi	24
2.3. İmmobilize β -Galaktozidaz Kullanarak Laktozsuz Süt Üretimi	25
2.4. İmmobilize Glukoamilaz Kullanarak Glukoz Üretimi	26
2.5. Pectinex Ultra SP-L Kullanarak Prebiyotik Üretimi	26
2.6. Epoksi (Oksiran) Grubu İçeren Matriksler Kullanarak Enzim İmmobilizasyonu	27
3. MATERYAL VE METOD	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Enzim	29
3.1.2. Kimyasal Maddeler	29
3.1.3. Araç-Gereçler	30
3.2. Metod	31
3.2.1. Kantitatif Protein Tayini	31
3.2.1.1. Bradford Boyasının Hazırlanması	31
3.2.1.2. Protein Standartlarının Hazırlanması	31
3.2.1.3. Standart Tayin Prosedürü	31
3.2.2. Proteinlerin SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez Analizi	32
3.2.2.1. Jel ve Çözeltilerin Hazırlanması	32
3.2.2.1.1. Ayırma Jeli	32
3.2.2.1.2. Derişim Jeli	32
3.2.2.1.3. Yürütme Tamponu (5x)	32
3.2.2.1.4. Cracking Tamponu	33
3.2.2.1.5. Boyama Çözeltisi	33
3.2.2.1.6. Arıtma Çözeltisi	33
3.2.2.1.7. Örneklerin Hazırlanması	33
3.2.2.1.8. Protein Standartları	33
3.2.2.2. SDS- Poliakrilamit Jel Elektroforez'in Uygulanması	34
3.2.2.2.1. Jellerin Dökülmesi	34
3.2.2.2.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi	34
3.2.3. Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferazın Aktivite Tayini	35
3.2.4. Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidazın Aktivite Tayini	35
3.2.5. Pectinex Ultra SP-L Glukoamilazın Aktivite Tayini	36

3.2.6. TLC Densitometre ile Kantitatif Karbonhidrat Tayini	36
3.2.7. İmmobilizasyon ve Aktivite Verimleri	37
3.2.8. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Kullanarak Fruktooligosakkarit Üretimi	37
3.2.8.1. Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltarnsferazın Eupergit C ile İmmobilizasyonu	38
3.2.8.1.1. Optimum Aktivite pH'sında Eupergit C Miktarının Aktivite Verimine Etkisi	38
3.2.8.1.2. Tampon Çözelti pH'sının Etkisi	39
3.2.8.1.3. Tampon Çözelti Derişiminin Etkisi	39
3.2.8.1.4. İmmobilizasyon Süresinin Etkisi	39
3.2.8.1.5. Optimum İmmobilizasyon pH'sında Eupergit C Miktarının Etkisi	39
3.2.8.2. Eupergit C Üzerine İmmobilize Edilen Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltarnsferazın Alginat Kapsülünde Hapsedilmesi	40
3.2.8.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferazın Karakterizasyonu	41
3.2.8.3.1. Optimum pH	41
3.2.8.3.2. Optimum Sıcaklık	41
3.2.8.3.3. pH Kararlılığı	41
3.2.8.3.4. Termal Kararlılık	42
3.2.8.3.5. Kinetik Parametreler	42
3.2.8.3.6. Kullanım Kararlılığı	42
3.2.8.3.7. Saklama Kararlılığı	43
3.2.8.4. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Kullanarak Kesikli Sistemde Fruktooligosakkarit Üretimi	43
3.2.8.5. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Kullanarak Sürekli Sistemde 1-Kestoz Üretimi	43
3.2.8.5.1. Debinin 1-Kestoz Verimine Etkisi	43
3.2.8.5.2. Sükroz Derişiminin 1-Kestoz Verimine Etkisi	44
3.2.8.5.3. Devir Sayısının 1-Kestoz Verimine Etkisi	44
3.2.9. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak Galaktooligosakkarit ve Laktozsuz Süt Üretimi	44



3.2.9.1. Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidazın Eupergit C ile İmmobilizasyonu	44
3.2.9.1.1. Tampon çözelti pH'sının İmmobilizasyon Verimine Etkisi	44
3.2.9.1.2. Tampon Çözelti Derişiminin Etkisi	45
3.2.9.1.3. Eupergit C Miktarının Etkisi	45
3.2.9.1.4. İmmobilizasyon Süresinin Etkisi	45
3.2.9.2. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidazın Karakterizasyonu	46
3.2.9.2.1. Optimum pH	46
3.2.9.2.2. Optimum Sıcaklık	46
3.2.9.2.3. pH Kararlılığı	46
3.2.9.2.4. Termal Kararlılık	47
3.2.9.2.5. Kinetik Parametreler	47
3.2.9.2.6. Kullanım Kararlılığı	47
3.2.9.2.7. Saklama Kararlılığı	48
3.2.9.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak Galaktooligosakkarit Üretimi	48
3.2.9.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak Laktozsuz Süt Üretimi	48
3.2.10. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilaz Kullanarak Glukoz Üretimi	49
3.2.10.1. Pectinex Ultra SP-L Glukoamilazın Eupergit C ile İmmobilizasyonu	49
3.2.10.2. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilazın Karakterizasyonu	49
3.2.10.2.1. Optimum pH	49
3.2.10.2.2. Optimum Sıcaklık	50
3.2.10.2.3. pH Kararlılığı	50
3.2.10.2.4. Termal Kararlılık	50
3.2.10.2.5. Kinetik Parametreler	51



3.2.10.2.6. Kullanım Kararlılığı

3.2.10.2.7. Saklama Kararlılığı

3.2.10.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilaz Kullanarak

Glukoz Üretimi 52

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 53

4.1. Kantitatif Protein Tayini 53

4.2. Proteinlerin SDS-Poliakrilamit Jel Elektrophorez Analizi 54

4.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferaz Kullanarak
Fruktooligosakkarit Üretimi 56

4.3.1. Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferazın Eupergit C ile
İmmobilizasyonu 56

4.3.2. Eupergit C Üzerine İmmobilize Edilen Pectinex Ultra SP-L
Fruktoziltransferazın Alginat Kapsülünde Hapsedilmesi 60

4.3.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferazın
Karakterizasyonu 61

4.3.4. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferaz Kullanarak
Kesikli Sistemde Fruktooligosakkarit Üretimi 67

4.3.5. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferaz Kullanarak
Sürekli Sistemde 1-kestoz Üretimi 68

4.4. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak
Galaktooligosakkarit ve Laktozsuz Süt Üretimi 71

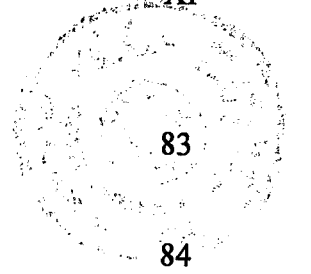
4.4.1. Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidazın Eupergit C ile
İmmobilizasyonu 71

4.4.2. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidazın
Karakterizasyonu 74

4.4.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak
Galaktooligosakkarit Üretimi 80

4.4.4. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak
Laktozsuz Süt Üretimi 81

4.5. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilaz Kullanarak
Glukoz Üretimi 83



4.5.1. Pectinex Ultra SP-L Glukoamilazın Eupergit C ile İmmobilizasyonu	83
4.5.2. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilazın Karakterizasyonu	84
4.5.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilaz Kullanarak Glukoz Üretimi	89
5.GENEL SONUÇ	90
KAYNAKLAR	92
YAYINLANAN MAKALE	
ÖZGEÇMİŞ	



SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ



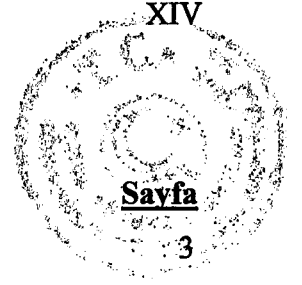
β G	beta-galaktozidaz
μ g	mikrogram
μ L	mikrolitre
R-	alkil
APS	amonyum per sülfat
BSA	bovine serum albumin
CaCl_2	kalsiyum klorür
CBB	commassie brilliant blue
CM	karboksi metil
COO^-	karboksil
DEAE	di-etil, amino-etil
DF	dilüsyon fakörü
E	enzim
FOS	fruktooligosakkarit
Fru	fruktoz
FTS	fruktoziltransferaz
g	gram
GA	glukoamilaz
Gal	galaktoz
Glc	glukoz
GOS	galaktooligosakkarit
IMO	izomaltooligosakkarit
IU	uluslararası enzim birimi
L	litre
Lac	laktoz
M	molarite
MD	maltodekstrin
mg	miligram
mL	mililitre
NaH_2PO_4	sodyum di hidrojen fosfat
NCO-	izosiyanat



°C	santigrat derece
PAGE	poli akril amid jel elektroforez
PGA	poli gluteral aldehit
pH	$-\log [H^+]$
PVA	poli vinil alkol
rpm	1 dakikadaki devir sayısı
SDS	sodyom dodesil sülfat
Suc	sukroz
TEMED	N, N, N', N'- tetra metil-etilendiamin
TLC	ince tabaka kromatografisi
UV	ultra viyole
v	hacim
w	kütle

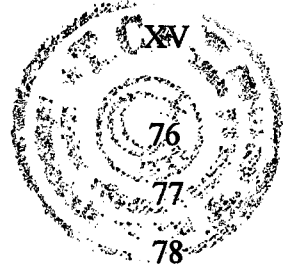


ŞEKİLLER DİZİNİ



Sekil

1.1. Sükrozun molekül yapısı	3
1.2. FOS'in molekül yapısı	4
1.3. Laktozun molekül yapısı	5
1.4. Galaktooligosakkaritlerin molekül yapısı	6
1.5. Maltodekstrinlerin molekül yapısı	7
1.6. Glukozun Molekül Yapısı	8
1.7. Fruktoziltransferaz kullanarak fruktooligosakkarit üretimi	9
1.8. Pectinex Ultra SP-L kullanarak 6'-galaktozil laktoz üretimi	11
1.9. Maltodekstrinden glukoz üretimi	12
1.10. Enzim immobilizasyon metotları	16
1.11. Alginat polimerinin molekül yapısı	19
1.12. Eupergit C ile enzim immobilizasyonu	22
3.1. TLC densitometre ile kantitatif karbonhidrat tayini	37
3.2. Pectinex Ultra SP-L'nin Eupergit C ile immobilizasyonu	38
3.3. Eupergit C üzerine immobilize edilen Pectinex Ultra SP-L'nin alginat kapsülünde hapsedilmesi	40
4.1. UV absorbansı-protein miktarı grafiği	53
4.2. Pectinex Ultra SP-L ve immobilizasyon süzüntülerindeki proteinlerin SDS-poliakrilamit jel elektroforez analizi.	55
4.3. Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferazın aktivitesine pH'nın etkisi	61
4.4. Pectinex Ultra SP- fruktoziltransferazın aktivitesine sıcaklığın etkisi	62
4.5. Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferazın pH kararlılığı	63
4.6. Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferazın termal kararlılığı	64
4.7. Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferazın Lineweaver-Burk grafiği	65
4.8. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferazın kullanım kararlılığı	66
4.9. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferazın saklama kararlılığı	66
4.10. Substrat akış hızının 1-kestoz verimine etkisi	68
4.11. Sukroz derişiminin 1-kestoz verimine etkisi	69
4.12. Devir sayısının 1-kestoz verimine etkisi	70
4.13. Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın aktivitesine pH'nın etkisi	74
4.14. Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın aktivitesine sıcaklığın etkisi	75



4.15. Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın pH kararlılığı	76
4.16. Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın termal kararlılığı	77
4.17. Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın Lineweaver-Burk grafiği	78
4.18. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın kullanım kararlılığı	79
4.19. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın saklama kararlılığı	79
4.20. Substrat akış hızının laktoz hidrolizine etkisi	81
4.21. Devir sayısının laktoz hidrolizine etkisi	82
4.22. Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın aktivitesine pH'nın etkisi	84
4.23. Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın aktivitesine sıcaklığın etkisi	85
4.24. Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın pH kararlılığı	86
4.25. Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın termal kararlılığı	86
4.26. Pectinex Ultra SP-L glukoamilazının Lineweaver-Burk grafiği	87
4.27. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın kullanım kararlılığı	88
4.28. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın saklama kararlılığı	88



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Adsorpsiyonla immobilizasyonda kullanılan adsorbentler	17
3.1. Deneylerde kullanılan araç ve gereçler	30
4.1. Pectinex Ultra SP-L ve immobilizasyon süzüntülerindeki protein miktarı	54
4.2. Eupergit C miktarının immobilize FTS'ın aktivite verimine etkisi	56
4.3. Tampon çözelti pH'sının immobilize FTS'ın aktivite verimine etkisi	57
4.4. Tampon çözelti derişiminin immobilize FTS'ın aktivite verimine etkisi	58
4.5. İmmobilizasyon süresinin immobilize FTS'ın aktivite verimine etkisi	59
4.6. Optimum immobilizasyon pH'sında (8) Eupergit C miktarının immobilize FTS'ın aktivite verimine etkisi	59
4.7. Kesikli sistem kullanılarak FOS üretiminde ürün bileşimi	67
4.8. Tampon çözelti pH'sının β -galaktozidazın aktivite verimine etkisi	71
4.9. Tampon çözelti derişiminin β -galaktozidazın aktivite verimine etkisi	72
4.10. Eupergit C miktarının β -galaktozidazın aktivite verimine etkisi	72
4.11. İmmobilizasyon süresinin β -galaktozidazın aktivite verimine etkisi	73
4.12. GOS üretiminde ürün bileşimi	80

1. GİRİŞ

Kompleks bir ekosistem olan insan kalın bağırsağında, alınan besinlerin yapısına, geçiş zamanına ve pH'ya bağlı olarak; 200 g feçeste, 500 farklı türe ait 10^{12} kadar bakteri hücresi bulunabilir [McCarty and Rastall, 2003]. Bunlardan bazıları (Örneğin *Clostridium difficile* ve *Escherchia coli* K88) patojendir [Daniel Allen Nadeau, 2000] ve enfeksiyon veya çeşitli fizyolojik hastalıklara neden olurlar. Bazı bakteriler ise (Örneğin *Bifidobakteri*'ler ve *Laktobasilus*'lar), insan sağlığına olumlu etkide bulunurlar [Gomes and Malcata, 1999], [Guarner and Malagelada., 2003]. Yapılan çok sayıda in vitro ve in vivo çalışma ile, *Bifidobakteri* ve *Laktobasilus*'ların insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri çok iyi tanımlanmıştır. Bu nedenle gelişmiş ülkelerde, sağlıklı insanlardan izole edilen *Bifidobakteri* ve *Laktobasilus*lar “probiyotik” olarak yoğurt ve diğer süt ürünlerine katılarak tüketilmektedir [Macfarlane and Cummings, 1999]. Probiyotikler, konak olan canlının sağlığını, onun bağırsak dengesini iyileştirerek, olumlu yönde etkileyen, canlı mikrobiyal gıda katkıları olarak tanımlanmaktadır [Tannock, 1999]. Probiyotik içeren yoğurt, son birkaç aydır ülkemizde de satılmaktadır.

Yaygın olarak kullanılan probiyotikler *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium cereus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei*' dir [Gismondo et al., 1999].

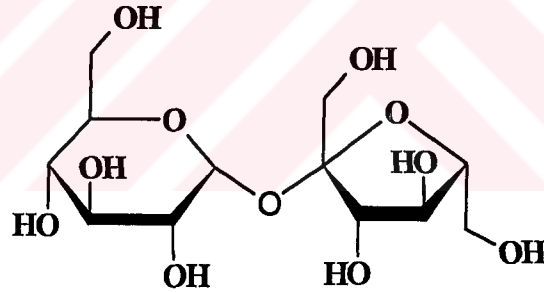
Kalınbağırsak mikroflorasını *Bifidobakteri* ve *Laktobasilus*'ların lehine değiştirmenin diğer bir yolu da, “probiyotik” olarak adlandırılan özel oligosakkaritleri tüketmektir. Probiyotikler ince bağırsakta sindirilemeyen, seçici olarak kalın bağırsakta yaşayan bazı *Bifidobakteri* ve *Laktobasilus* soylarını çoğaltarak konak'ın sağlığı üzerine olumlu etkiler yapan gıda katkıları olarak tanımlanmaktadır [Gibson and Roberfroid, 1995]. Probiyotik kavramı ilk olarak, insan sağlığına yararlı etkileri olan *Bifidobakteriler*'in çoğalmasını sağlayan inülin ve

fruktooligosakkaritler (FOS) için kullanılmıştır [Gibson and Roberfroid, 1995]. Prebiyotik olarak bilinen moleküller, 2-20 kadar sakkarit birimi içeren oligosakkaritlerdir [McCarty and Rastall, 2003]. Araştırmaların çoğu inülin ve fruktooligosakkaritler (FOS) üzerine yapılmış olmakla birlikte, galaktooligosakkaritler (GOS), izomaltooligosakkaritler (IMO) ve ksilo-oligosakkaritler gibi diğer bazı sindirilemeyen oligosakkaritlerin de prebiyotik özelliklere sahip oldukları tespit edilmiştir [Van Loo et. al., 1999].

FOS ve GOS'in karakteristik özellikleri şunlardır: Öncelikle, ağızda bulunan ve diş çürümesine sebep olan *Streptococcus mutans* tarafından substrat olarak kullanılmadıklarından diş çürütmezler. Sindirim sisteminde kalın bağırsağa kadar sindirilerek kana karışmadıkları için kalorisizdirler. *Bifidobakteriler* için iyi substrattırlar fakat, *Escherichia coli* ve *Clostridium perfringens* gibi zararlı bakteriler için substrat değildirler. Kısa zincirli yağ asitlerine dönüşerek kalın bağırsaktaki pH'yı düşürdükleri için patojen bakterilerin çoğalmasını inhibe ederler. Günde 3-6 g alındıklarında, kalın bağırsakta istenmeyen enzimlerin ve toksik metabolitlerin üretimini sırasıyla % 41 ve % 45 oranında azaltırlar. Zararlı bakterilerin azalmasını sağladıkları için patojenik ishali önlerler [Rivero-Urgel and Santamaria-Orleans, 2001]. Kalın bağırsak pH'sını düşürerek kalsiyum ve demir minerallerinin emilimini artırdıkları için, kemik erimesini ve demir eksikliğini önlerler [Chonan and Watanuki, 1995], [Van den Heuvel et al., 1999]. Kısa zincirli yağ asitlerin sentezlenmesi sonucu, bağırsakların peristaltik hareketleri ve ozmotik basınçla feçes'in nem oranı arttığından kabızlık önlenir [Mogenssen et al., 2000], [Deguchi, 1997]. FOS ve GOS alınmasıyla sayıları artan bazı *Lactobacillus acidophilus*'lar ortamda bulunan kolesterolü kendileri kullanarak [Gilliand and Walker, 1990] veya diğer bir kısmı da kolesterolün bağırsaktan emilimini inhibe ederek [Suzuki et al., 1990] serum kolesterol konsantrasyonunu düşürürler. *Bifidobakteriler*'in, prokarsinojen olan nitritleri ve nitrozaminleri uzaklaştırarak kolon kanserini önlemelerini sağlarlar [Gomes and Malcata, 1999]. FOS ve GOS ayrıca, B1, B2, B6, B12, nikotinik asit ve folik asiti sentezlerini uyarırlar [Rivero-Urgel and Santamaria-Orleans, 2001].

1.1. Sükroz

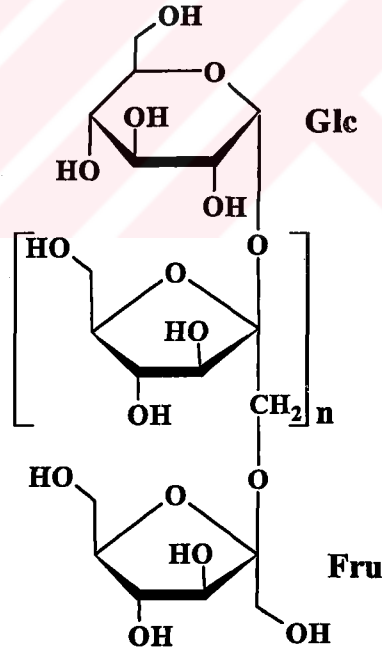
Sükroz, bir glukozun $\alpha(1\rightarrow2)$ glikozidik bağı ile bir fruktoza bağlanması sonucu oluşan bir disakkarittir (Şekil 1.1). Sükroz doğal ve ekonomik bir tatlandırıcı olup, çoğu sebze ve meyvelerde bulunur. Endüstriyel üretimi şeker kamışı ve şeker pancarından yapılmaktadır. Masa şekerı olarak kullanılmasının yanında, gıda üretiminde tatlandırıcı ve koruyucu olarak kullanılır. Bir maya enzimi olan invertaz tarafından ayrıştırılarak invert şekere (glukoz ve fruktoz karışımı) dönüştürülür. Ayrıca fruktoziltransferaz ile fruktooligosakkarit üretiminde substrat olarak kullanılmaktadır. Ağızda bulunan *Streptococcus mutans* bakterileri tarafından dextran polimerinin oluşumunda substrat olarak kullanıldığından diş çürütmesine neden olur. İnce bağırsakta bulunan sükraz enziminin etkisi ile glukoz ve fruktoza ayrılarak kana karışır ve vücutta metabolize olarak şişmanlığa neden olur.



Şekil 1.1: Sükrozun molekül yapısı

1.2. Fruktooligosakkaritler (FOS)

FOS prebiyotik özellik gösteren doğal şekerlerin en önemlileridir. Başta, Kudüs Enginarı, buğday, soğan ve sarımsak muz olmak üzere, çoğu sebze, meyva ve tahıllarda bulunur [Campbell et al., 1997]. Bazı mikroorganizmalar da FOS üretmektedirler. FOS, mikrobiyal fruktoziltransferazların sükroza etkisi ile veya uç kısmında bir glukoz bulunduran bir fruktoz polimeri olan inulinin hidrolizi ile üretilmektedir. FOS başlıca, sükroza (GF) β - (2 $\rightarrow$ 1) bağı ile bağlı fruktoz birimleri içeren 1-kestoz (GF₂), nistoz (GF₃) ve fruktofuranozil nistoz (GF₄)'den oluşmaktadır (Şekil 1.2). FOS'in tatlılık oranları sükrozdan daha azdır. 1-kestoz, nistoz ve fruktofuranozil nistoz'un sükroza göre bağıl tatlılıkları sırasıyla % 31, 22 ve 16'dır [Yun, 1996].

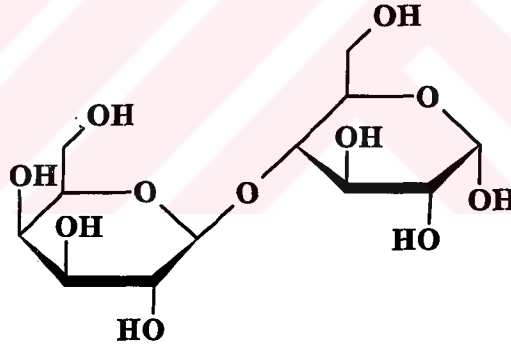


Şekil 1.2: FOS'in molekül yapısı. Glc: glukoz, Fru: fruktoz (n = 1-3).



1.3. Laktoz

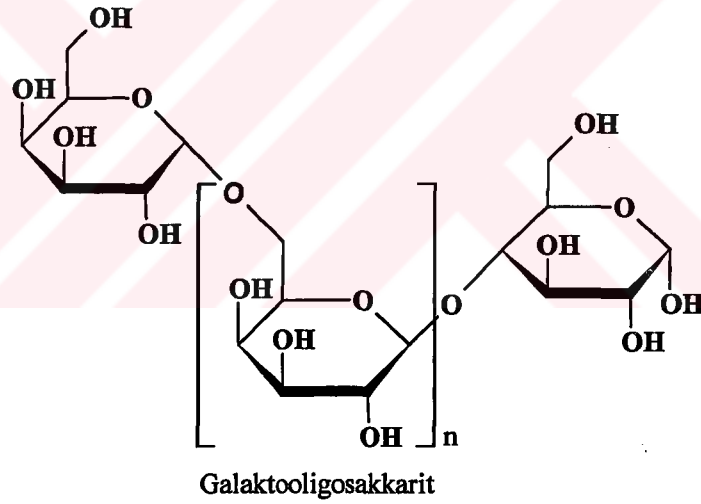
Laktoz sütte yaklaşık olarak % 5 (w/v) oranında bulunan doğal bir şekerdir [Mateo et al. 2004]. Galaktozun glukoza β (1→4) bağı ile bağlanması sonucu oluşmuştur (Şekil 1.3). İnce bağırsakta bulunan laktaz enziminin etkisiyle, galaktoz ve glukoza ayrılarak kana karışır ve metabolize olur. Bazı insanlarda laktazın olmaması laktoz intoleransını ortaya çıkarır. Laktoz ince bağırsakta sindirilmeden kalın bağırsağa geçerve burada fermentasyon sonucu çeşitli gazlara ve laktik aside dönüşerek ishal, şişkinlik ve karın ağrısı gibi rahatsızlıklara neden olur. Laktoz intoleransı, doğuştan gelen genetik bozukluk, sonradan gelişen genetik mutasyon veya ilerleyen yaşla birlikte laktaz aktivitesinin azalması gibi sebeplerden oluşabilir. Laktoz intoleransı Afrikalı ve Çinlilerde yaygındır [Petzelbauer et al, 2002].



Şekil 1.3: Laktozun molekül yapısı

1.4. Galaktooligosakkaritler (GOS)

GOS, laktoza galaktoz transferiyle elde edilen oligosakkaritlerdir (Şekil 1.4). Çok sayıda β -galaktozidaz izole edilerek saflaştırılmış ve GOS üretiminde kullanılmıştır [Mozaffar et al., 1984], [Onishi and Tanaka, 1995]. Genel olarak, GOS üretiminde verim düşüktür. En yüksek verim (% 38, w/w), termostabil enzimler kullanılarak 70-80 °C sıcaklıklarda elde edilmiştir [Del-Val and Otero, 2003]. Günümüzde, endüstriyel GOS üretimi kesikli sistemde yapılmaktadır. Gıda endüstrisindeki artan talep üzerine GOS üretiminde verimi artırmaya yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu nedenle, GOS'in sürekli üretimi için çok sayıda immobilizasyon çalışması yapılmaktadır [Shin et al., 1998], [Sheu DC et al., 1998].

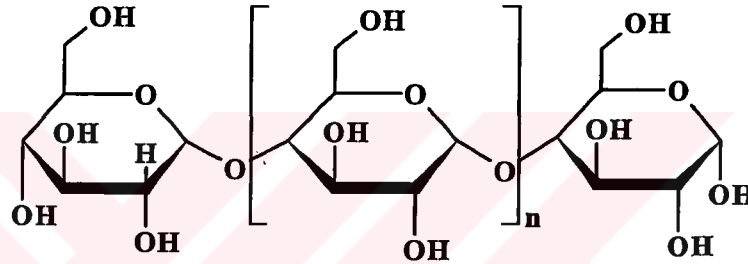


Şekil 1.4: Galaktooligosakkaritlerin molekül yapısı ($n = 1-4$).



1.5. Maltodekstrinler

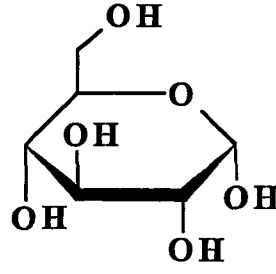
Maltodekstrinler, nişastadan elde edilen ve geniş bir kullanım alanına sahip oligosakkaritlerdir (Şekil 1.5). Maltodekstrinler taşıyıcı sistem, şekil verici, yağ substitute, film oluşturucu, bayatlamayı önleyici, sprej kurutmaya yardımcı, donmadan koruyucu, kristalleşmeyi önleyici ve besleyici özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde sıkça kullanılır. Maltodekstrinler kurutulmuş toz veya konsantre sıvı formlarında bulunur. Değişik molekül ağırlığında çok sayıda maltodekstrin karışımları ticari olarak üretilmektedir.



Şekil 1.5: Maltodekstrinlerin molekül yapısı ($n = 1-20$)

1.6. Glukoz

Glukoz, önemli karbonhidratlardan biridir (Şekil 1.6). Nişasta, glikojen, selüloz ve dekstran glukozdan meydana gelen doğal polisakkaritlerdir. İnsan diyetinin büyük bir bölümünü serbest veya polimerleşmiş glukoz oluşturur. Glukoz endüstriyel olarak nişastanın α -amilaz ve glucoamilaz kullanılarak hidroliz edilmesiyle üretilip gıda ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılır.



Şekil 1.6 : Glukozun molekül yapısı

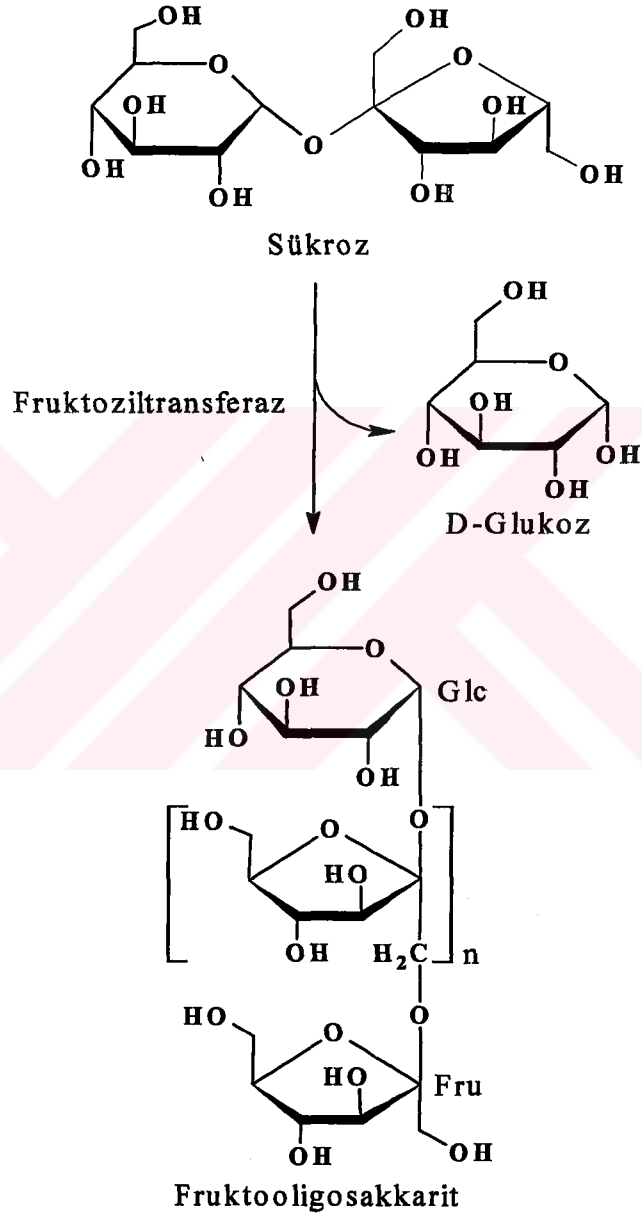
1.7. Fruktoziltransferazlar (FTS)

Fruktoziltransferazlar (EC.2.4.1.9), süktrozdaki fruktoza, 1-3 adet fruktoz transfer ederek, fruktooligosakkaritleri oluştururlar (Şekil 1.7). Fruktoziltransferazlar Kudüs Enginarı, soğan, buğday, kuşkonmaz, şeker pancarı, gibi bitkilerden ve *Aspergillus sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Fusarium sp.* gibi bakteri ve mantarlardan elde edilirler [Yun, 1996].

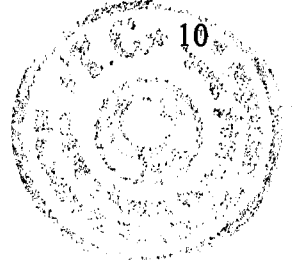
Fruktoziltransferazların spesifik aktivitesi, optimum şartları, kinetik parametreleri ve kararlılığı enzimin kaynağına göre değişmektedir. Genellikle bitkisel kaynaklı enzimlerin aktivitesi düşük olduğu için endüstriyel üretimi immobilize bakteri veya mantar hücreleri ile yapılmaktadır. Bu oligosakkaritler, ilk olarak 1984'te Japonya'da ve daha sonraki yıllarda Kore'de endüstriyel olarak üretilmeye başlanmıştır. Fruktooligosakkarit üretiminde, Japon şirketi Meiji Seika Kaisha, kalsiyum alginat beadlerinde immobilize edilen *A.niger* hücrelerini kullanırken, bir Kore şirketi olan Cheil Foods & Chemicals ise, kalsiyum alginat beadlerinde immobilize edilen *A.pullulans* hücrelerini kullanmaktadır [Yun, 1996].

Fruktooligosakkarit üretiminde karşılaşılan en önemli problem, yan ürün olarak oluşan glukozun enzimi inhibe etmesidir. Bunun bir sonucu olarak mevcut ticari fruktooligosakkarit ürünleri önemli ölçüde süktroz ve glukoz içermektedir. Bu

sebeple fruktooligosakkaritlerin olumlu özelliklerinden beklenen faydalar sınırlı kalmaktadır. Elde edilen maksimum FOS, toplam ürünün kütlece % 60'ını oluşturmaktadır. Araştırmacılar, daha yüksek konsantrasyonlu FOS üretimi için ekonomik bir metot araştırması üzerine yoğunlaşmışlardır [Yun, 1996].

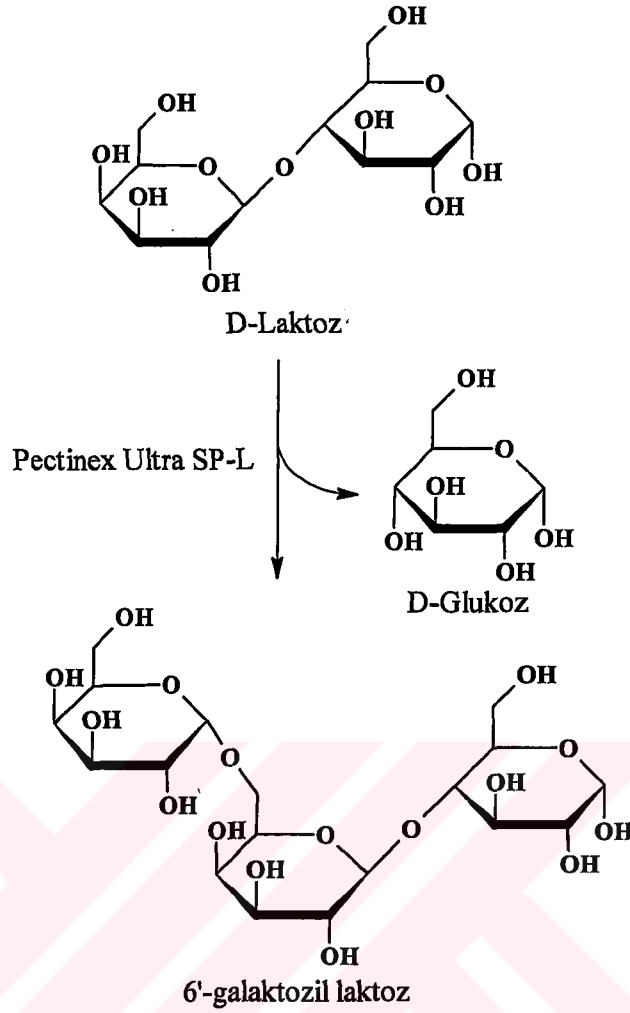


Şekil 1.7: Fruktoziltransferaz kullanarak fruktooligosakkarit üretimi ($n = 1-3$)



1.8. β -Galaktozidazlar

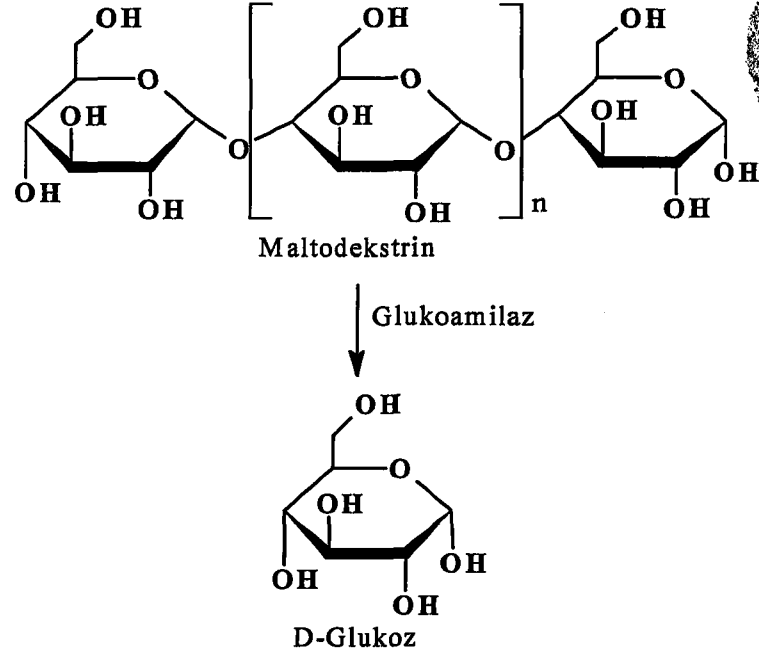
β -galaktozidazlar (EC.3.2.1.23), laktozun galaktoz ve glukozu hidrolizi ile birlikte bir veya daha fazla galaktoz birimini laktoza transfer ederek laktozdan GOS oluşumunu da katalizlerler [Mateo et al., 2004]. Transgalaktozilasyon reaksiyonunun çok geniş bakteri ve mantar türlerinin karakteristik bir özelliği olduğu gösterilmiştir [Moller et al., 2001]. *A. niger*, ve *A. oryzae* gibi mantar kaynaklı β -galaktozidazlar laktozun hidrolizi için sıklıkla kullanılmaktadır. *A. oryzae*, *Bullera singularis*, *Bacillus circulans*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Thermus aquaticus* [Shin et al., 1998], [Sheu et al., 1998], [Van Laere et al, 2000]. ve *Aspergillus aculeatus* [Del-Val MI et al.2001] kaynaklı β -galaktozidazlar ise GOS üretiminde kullanılmıştır. Şekil 1.8'de görüldüğü gibi, Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidaz kullanılarak laktozdan 6'-galaktozil laktoz elde edilmektedir



Şekil 1.8: Pectinex Ultra SP-L kullanarak 6'-galaktozil laktoz üretimi

1.9. Glukoamilazlar

Glukoamilazlar (EC.3.2.1.3), endüstriyel olarak nişastanın hidrolizinde kullanılan enzimlerden birisidir. Nişasta ve türevlerinin indirgen olmayan uçlarından α (1→4) ve α (1→6) glikozidik bağlarını hidroliz ederek D-glukoz oluştururlar. Şekil 1.9'da bir nişasta türevi olan maltodekstrinden glukoz üretimi görülmektedir. Glukoamilazlar bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilir, ancak endüstriyel üretimde tercih edilen glukoamilazlar bakteri veya mantar kaynaklıdır. *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus awamori*, glukoamilaz üreten mantarlar; *Clostridium thermoamylolyticum* ve *Clostridium thermohydrosulfaricum* ise



Şekil 1.9 : Maltodekstrinden glukoz üretimi (n = 1-18).

glukoamilaz üreten bakterilerden bazılarıdır. Endüstriyel glukoz üretiminde kullanılan glukoamilaz *Aspergillus niger*'den elde edilmektedir. *Aspergillus* grubundan elde edilen glukoamilazlar GA1 ve GA2 olmak üzere ik farklı formdan ibarettirler [Christensen, 2000], [Polakovic and Bryjak, 2002]. Glukoamilazların molekül ağırlığı, optimum şartları, kararlılıkları, kinetik parametreleri ve ürün bileşimi, elde edildikleri kaynağa göre değişmektedir. Örneğin, *Aspergillus niger*'den elde edilen GA1 ve GA2 izoenzimlerinin molekül ağırlıkları 74 ve 96 kd, optimum pH'ları 4.2 ve 4.5, optimum sıcaklıkları ise 60 ve 65 °C'dir [Amirul et al., 1996].

1.10. Pectinex Ultra SP-L

Pectinex Ultra SP-L, *Aspergillus aculeatus*'tan elde edilen ticari bir enzim karışımıdır ve endüstriyel olarak meyve sularındaki pektini parçalamak için yaygın olarak kullanılmaktadır [Hang and Woodams, Fructosyltransferase activity of commercial.... 1995]. Enzim karışımında, pektini parçalayan pektinaz, pektin

zincirindeki metoksil grubunu hidrolizleyen pektinesteraz ve poligalakturonik asit zincirini hidrolizleyen poligalakturonaz vardır. Karışımında bulunan enzimler selüloz, hemiselüloz, nişasta ve proteinleri de kısmen hidrolizleyebilmektedir [Sarıoğlu et al., 2001].

Meyve sularında polisakkaritler, özellikle yüksek derecede polimerleşmiş pektinler viskozite üzerinde önemli bir role sahiptirler [Demir et al., 2001]. Meyve veya sebze sularına Pectinex Ultra SP-L eklenmesi sonucu bu polimerler hidrolize olarak, daha az viskoz ve daha berrak meyva suyu elde edilir.

Pectinex Ultra SP-L'nin bu enzimlerden başka, fruktoziltransferaz [Hang and Woodams 1995, Fructosyltransferase Activity of...] ve β -galaktozidaz [Van Casteren., 2000] enzimlerini de içerdiği tespit edilerek, FOS üretiminde [Hang and Woodams 1996, Optimization of Enzymatic...], [Hang and Woodams 1995, Production of 1-Kestose...], [Tanrıseven ve Gökmen, 1999] ve GOS üretiminde [Del Val et al., 2001], [Del Val and Otero, 2003] kullanılmıştır. Literatürde Pectinex Ultra SP-L'nin glukoamilaz aktivitesi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, Pectinex Ultra SP-L'nin glukoamilaz aktivitesine de sahip olduğu tespit edildi.

Bu tezin amacı Pectinex Ultra SP-L'nin Eupergit C üzerine kovalent olarak immobilize edilerek FOS, GOS, laktosuz süt ve glukoz üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır.

1.12. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, yüzyıllardan beri gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Biyoteknolojideki gelişmeler sonucu olarak günümüzde ilaç ve kimya endüstrisinde de uygulama alanları bulmuşlardır.

Enzimler kimyasal katalizörlere göre, son derece yüksek katalitik aktiviteye sahiptir ve belirli şartlar altında bu aktiviteleri tek bir substrata veya substrat grubuna özgüdür. Bu nedenle, istenmeyen ürünlerin oluşma ihtimali çok azdır. Ancak, endüstride enzimlerin doğal formlarıyla kullanılmasının önemli dezavantajları vardır. Örneğin, aynı enzim örneği ya bir kere kullanılmakta ve ürünle birlikte tüketime sunulmakta veya tekrar kullanılması için, ancak pahalı teknikler kullanılarak üründen ayrılabilindiğinden, ürünün maliyeti yükselmektedir. Bir diğer dezavantajı ise, pH ve sıcaklıktaki değişmelere, kullanım şartlarına ve saklama şartlarına bağlı olarak, aktivitelerinde önemli kayıpların meydana gelmesidir.

Bu dezavantajların giderilmesi için ilk yaklaşım, suda çözünen stabilizatörler ilave etmek olmuştur. Metaller, surfaktanlar, polioller, polietilenglikoller, proteinler, aminoasitler ve bazı şekerler ilave edilerek enzimlerin aktiviteleri kararlı hale getirilmiştir. Bu kararlılık katkısı, enzim ve çözücü arasında non-kovalent etkileşimlerin bir sonucudur [Drevon, 2002 Ph.D Thesis, University of Pittsburg]. Ancak bu yöntem, aynı enzim örneğinin çok defa fazla kullanılması yönünde herhangi bir katkıda bulunmaz.

Diğer bir yaklaşım ise enzim immobilizasyonudur. Immobilizasyon, enzim aktivitesini uzun süre korumak için, suda çözünmeyen bir matrikse adsorpsiyon, kovalent bağlanma veya matriks içine hapsederek enzimin hareketinin sınırlanmasıdır. Enzim immobilizasyonunda organik ve inorganik yapıda çok sayıda doğal veya yapay matriks kullanılmaktadır. Eupergit C ve kalsiyum alginat, yaygın olarak kullanılan matrikslerdendir.

İmmobilize enzimler, kullanılan matriksin yapısına ve kullanılan immobilizasyon metoduna bağlı olarak, serbest enzimlere göre farklı özellikler gösterirler. İmmobilize enzimin optimum şartları, kinetik sabitleri ve ürün bileşimleri serbest enzime göre farklılık gösterebilir.

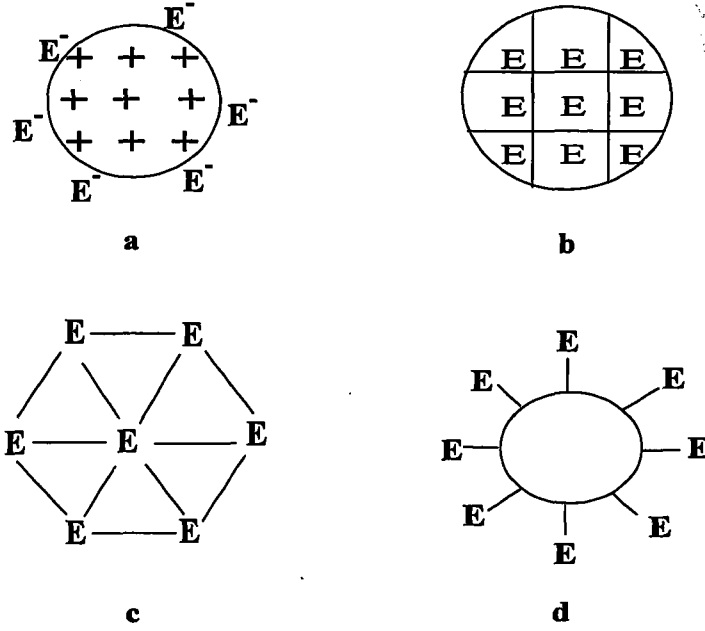
İmmobilize enzim kullanımının faydaları aşağıda gösterilmiştir:

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

İmmobilizasyon çalışmaları 1960'ların ilk yıllarında başlamış ve günümüze kadar konu ile ilgili olarak, 10.000'in üzerinde makale ve patent yayınlanmıştır. 1967'de Tosa ve arkadaşları tarafından Japonya'da İmmobilize *Aspergillus oryzae* aminoasit kolonlarının geliştirilmesi ve sentetik rasemik DL-aminoasitlerin aktif enantiyomerlere dönüştürülmesinde kullanılması, immobilize enzimlerle ilgili ilk endüstriyel uygulamadır.

1.13. Enzim İmmobilizasyon Metodları

İmmobilizasyon metodları genellikle, bağlanma reaksiyonunun tipine göre sınıflandırılır . Buna göre enzim immobilizasyon metodları başlıca dört ana grupta toplanır: Adsorpsiyon, entrapment (bir polimerik jel içine hapsetme), bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlama, kovalent bağlanma (Şekil 1.10).



Şekil 1.10: Enzim immobilizasyon Metotları. **a:** Adsorpsiyon, **b:** Entrapment, **c:** Çapraz bağlama, **e:** Kovalent bağlama.

1.13.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon metodu, enzimin zayıf çekim kuvvetleriyle inert bir matrixe bağlanmasıdır. Adsorpsiyon oldukça basit ve ekonomik bir immobilizasyon yöntemidir. İmmobilizasyon, enzim çözeltisinin uygun pH ve sıcaklıkta matrixle karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Enzimle matriks arasında zayıf bağlar (Van der waals ve hidrojen bağları) oluşur ve enzimler matriksten kolaylıkla ayrılırlar. İyon değiştiriciler kolaylıkla proteinleri adsorbe ederler ve enzim immobilizasyonu için endüstride yaygın olarak kullanılırlar. Tablo 1.1'de, adsorpsiyon için kullanılan adsorbentler yer almaktadır.

Tablo 1.1: Adsorpsiyonla immobilizasyonda kullanılan adsorbentler

Etkileşme	Adsorbentler
Fiziksel Adsorpsiyon	Doğal Matriksler Aktif karbon Silika jel Alumina Cam Nişasta Modifiye Matriksler: Concanavalin A Sephrose Tannin Amino hekzil selüloz Fenoksiasetil selüloz
İyonik Bağlanma	Kasyon Değiştiriciler: CM-selüloz Dowex 50 Amberlite CG-50 Anyon Değiştiriciler: DEAE-selüloz DEAE-sephadex Amberlite

1.13.2. Entrapment (Hapsetme)

Bir polimerin oluşumu sırasında, enzimin oluşan polimer içinde hapsedilmesine entrapment denir. Bu metot için en yaygın olarak kullanılan polimerlerden birisi aljinik asittir.

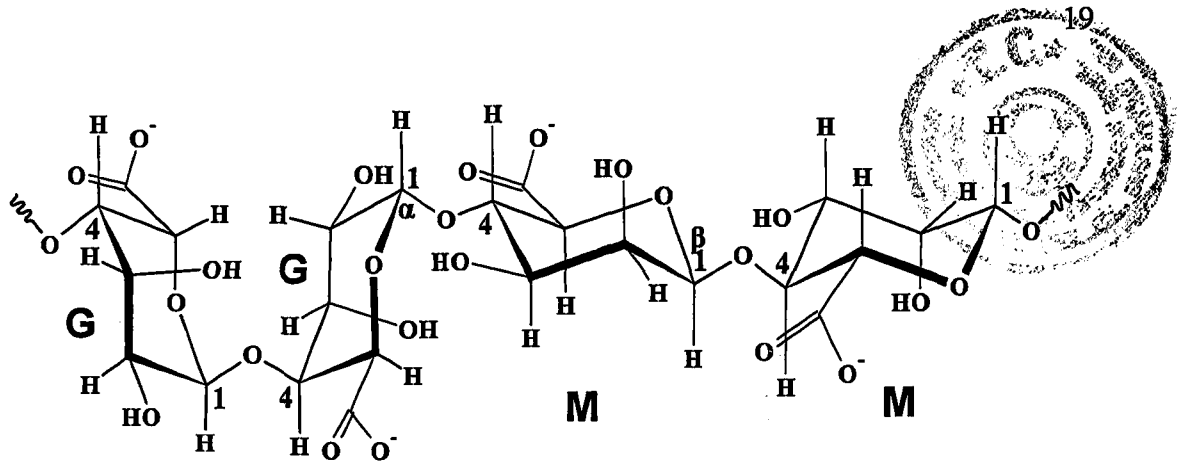
1.13.2.1. Enzimlerin Kalsiyum Alginat ile Enzim İmmobilizasyonu

Alginatlar, kahverengi deniz yosunlarından (*Phaeophyceae*, başlıca *Laminaria hyperborea*) elde edilen, α -(1→4)-L-gluronik asit (G) ve β -(1→4)-D-mannuronik asit (M) birimlerinden oluşmuş anyonik, lineer bir polisakkarittir [Smidsrod and

Skjak-Braek, 1990], [Blandino et al., 2001]. Alginat molekülünün kimyasal yapısı Şekil 1.2'de görülmektedir. Alginat molekülüllerinde bulunan G ve M monomerlerinin oranı ve dizilişi, alginatın elde edildiği kaynağa göre değişmektedir. Alginatlar sulu çözeltilerde, Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonlarla iyonik bağlanma yaparak jel oluştururlar. Jel oluşumu, farklı alginat zincirlerindeki G'lerin karboksil grupları ile Ca^{+2} iyonları arasındaki kooperatif bağlanma sonucu gerçekleşir.

Alginat kullanılarak enzimler değişik metodlarla immobilize edilebilir. Enzim, alginat çözeltisiyle karıştırılarak kalsiyum klorür çözeltisine damlatıldığında kalsiyum alginat beadleri oluşur. Enzim, kalsiyum klorür ile karıştırılarak alginat çözeltisine damlatıldığında ise kalsiyum alginat kapsülleri oluşur. Enzim-alginat-gliserol karışımı, kalsiyum klorür çözeltisine bir şırınga ile iplik şeklinde enjekte edildiğinde, kalsiyum alginat fiberleri oluşur. Oluşan bead, fiber veya kapsülün gözenek büyüklüğü, kullanılan alginat ve kalsiyum klorür çözeltisinin derişimine bağlıdır. Molekül ağırlığı 300 bin dalton olan enzimler bile alginat jellerinden kaçabilmektedir. Bu nedenle, kalsiyum alginat ile immobilizasyon genellikle hücrelerin immobilizasyonunda kullanılır. Alginat ve kalsiyum klorür derişimleri optimize edilerek, enzimler de alginat içerisinde bu üç yöntemden birisi ile immobilize edilmiştir [Blandino et al, 2000], [Hayashi et al., 1994].

Alginatlar, toksik olmayan doğal polimerlerdir ve ekonomik olarak elde edilebilmektedir. Alginat jellerinin (bead, kapsül, fiber) gözeneklerinin büyük olması, fosfat gibi bazı anyonlar içeren reaksiyon ortamlarında kararlılığının düşük olması, kullanılmalarını sınırlayan faktörlerdir.



Şekil 1.11. Alginat polimerinin molekül yapısı. **G** : Gluronik asit, **M** : Mannuronik asit

1.13.3. Çapraz Bağlama

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



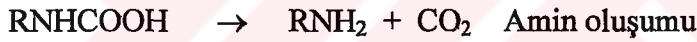
1.13.4. Kovalent Bağlama

Enzimler genellikle amino, karboksil, sülfidril, hidroksil veya imidazol gruplarıyla, doğal ve yapay çok sayıda katı matrikse kovalent bağlanmayla

immobilize olabilirler. Üzerinde aktif gruplar bulunduran matriksler, uygun tampon çözeltide enzimlerle muamele edilerek immobilizasyon gerçekleştirilir.

Üretan prepolimerleri kovalent immobilizasyonda yaygın olarak kullanılan matrikslerindendir. Prepolimerler, diizosiyanat türevlerinin, aktif hidrojen ihtiva eden çeşitli bileşiklerle (glikol, poliglikol, poliol) reaksiyonlarından elde edilirler ve yapılarında izosiyanat'lar bulunur. Prepolimerler su ile muamele edildiğinde süngerimsi yapıda polimer meydana gelir. Ortamda enzim bulunduğunda, enzimin aktif hidrojen bulunduran gruplarıyla, izosiyanat grupları kovalent bağlar oluştururlar.

Diizosiyanat prepolimerlerinin polimerleşme mekanizması:



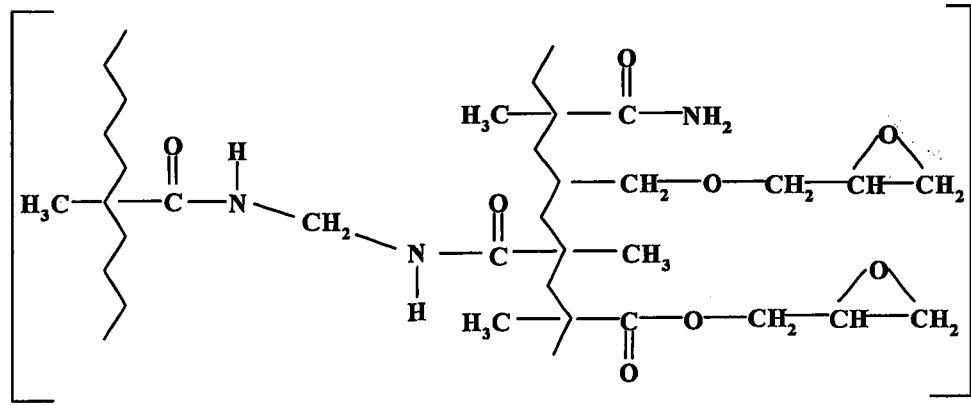
1.13.4.1. Eupergit[®] C ile Enzim İmmobilizasyonu

Eupergit C, üzerinde reaktif epoksi grupları bulunan ve biyomoleküllerin immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan bir matrikstir. Gözenekli beadlerden ibaret bir matriks olan Eupergit C, metakrilamid, allilglisidil eter, ve N,N'-metilen-bis-akrilamidin ko-polimerizasyonu ile oluşturulur. Eupergit C kimyasal ve mekanik olarak, 1-12 pH aralığında kararlıdır. Mikrobiyal bozunmalara karşı da oldukça dayanıklıdır. Tüm reaktörlerde kullanılabilir [Katzir and Kramer, 2000], [Roehm, 05/95].

Eupergit C'nin epoksi grupları (600 $\mu\text{mol/g}$ kuru Eupergit C), nötral ve bazik pH'larda enzimlerin amino, sülfidril ve karboksil grupları ile kovalent olarak bağlanabilmektedir. Eupergit C, asidik, nötral ve bazik pH'larda, enzimlerin sülfidril ve karboksil gruplarına da bağlanabilmektedir. Şekil 1.12'de, enzimlerin amino grupları ile Eupergit C'nin epoksi grupları arasındaki kovalent bağlanma görülmektedir. Eupergit C'ye bağlanan çok sayıda enzimin pH ve termal kararlılığı artmakta ve uzun süre aktivitesini korumaktadır. Eupergit C ile immobilizasyon sonucunda enzimlerin optimum pH ve sıcaklıkları ile kinetik sabitleri değişebilmektedir [Katzir and Kramer, 2000].

İmmobilizasyonda, matrikse bağlanan enzim miktarının başlangıçta kullanılan enzim miktarına oranı immobilizasyon verimi olarak tanımlanır. Aktivite verimi ise, immobilize enzimin aktivitesinin, başlangıçta kullanılan enzim aktivitesi ile immobilizasyon süzöntüsünde kalan enzimin aktivitesi arasındaki farka oranı olarak tanımlanır.

Eupergit C ve enzim miktarı, bağlanma tamponunun pH'sı, bağlanma tamponunun konsantrasyonu ve bağlanma süresi immobilizasyon ve aktivite verimini oldukça etkilemektedir. Yapılacak bir immobilizasyon çalışmasında bu şartların optimize edilmesi gerekmektedir. Endüstriyel potansiyele sahip çok sayıda enzim, genellikle % 80'in üzerinde bir verimle Eupergit C üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. [Roehm, 05/95].



Eupergit C

+

Enzim-NH₂



İmmobilize Enzim

Şekil 1.12 : Eupergit C ile enzim immobilizasyonu

2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. İmmobilize Fruktoziltransferaz Kullanarak Fruktooligosakkarit (FOS) Üretimi

Farklı kaynaklardan elde edilen fruktoziltransferazlar, çeşitli matriksler kullanılarak genellikle kovalent bağlanma veya entrapment metodu ile immobilize edilerek FOS üretiminde kullanılmıştır. Aşağıda, bu çalışmalardan bazıları kronolojik sıra ile özetlenmiştir.

Aerobasidium sp. ATCC 20524 fruktoziltransferaz, gluteraldehid ile aktifleştirilmiş gözenekli shirasu camı üzerine immobilize edilerek, 1-kestoz üretiminde kullanılmıştır. 168 saat süren reaksiyon sonunda elde edilen ürünlerdeki 1-kestoz derişimi 80-90 mg/ml'dir [Hayashi et al., 1991].

Aspergillus japonicus MU-2 fruktoziltransferaz, gluteraldehit ile aktive edilen silika üzerine % 64 verimle immobilize edilmiş ve fruktooligosakkarit üretiminde kullanılmıştır. İmmobilizasyon enzimin sıcaklığa, proteolizise ve metal iyonlarına karşı kararlılığı artmıştır [Hayashi et. al., 1993,].

Aerobasidium sp. ATCC 20524 fruktoziltransferaz, Ca-alginat beadlerinde % 98 verimle immobilize edilmiş ve fruktooligosakkarit üretiminde kullanılmıştır. İmmobilize enzimin yarı ömrü 275 gündür [Hayashi et. al. 1994, Long-term continuous...].

Yine, *Aerobasidium sp.* ATCC 20524 fruktoziltransferaz, DEAE-Selüloz üzerine % 95 verimle immobilize edilmiş ve fruktooligosakkarit üretiminde

kullanılmıştır. İmmobilize enzim, aktivitesini 360 saat boyunca korumuştur [Hayashi et al. 1994, Immobilization of....].

Aspergillus niger ATCC 20611 ve *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1 fruktoziltransferazları, metakrilamid bazlı epoksi grubu taşıyan polimerik matriks üzerine % 100 verimle kovalent olarak immobilize edilmiştir [Chiang et al., 1997].

Aspergillus niger ATCC 20611'den elde edilen fruktoziltransferaz, seramik membran iç yüzeyine kimyasal olarak % 76 verimle immobilize edilmiştir. İmmobilize enzim 35 gün sonunda, aktivitesinin % 50'sini korumuştur [Nishizawa et al., 2000].

2.2. İmmobilize β -Galaktozidaz Kullanarak Galaktooligosakkarit (GOS) Üretimi

Literatürde, immobilize β -galaktozidaz kullanılarak galaktooligosakkarit üretimi ile ilgili yapılmış birkaç çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalar aşağıda kronolojik olarak özetlenmiştir.

Bullera singularis ATCC 24193 β -galaktozidaz, chitosan beadlerine immobilize edilerek GOS üretiminde kullanılmıştır. İmmobilize enzim, aktivitesini 15 gün korumuştur [Shin et al., 1998].

Aspergillus oryzae ATCC 20423 β -galaktozidaz, gluteraldehitte muamele edilen chitosan beadleri üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. İmmobilize enzim, aktivitesini kaybetmeden 15 gün kullanılmıştır [Sheu et al., 1998].

Aspergillus oryzae β -galaktozidaz, % 90-95 verimle pamuklu kumaş üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş ve galaktooligosakkarit üretiminde kullanılmıştır. Immobilize enzimin yarı ömrü, 40 °C'de 1 yıl; 50 °C'de ise 21 gün olarak tespit edilmiştir. Ayrıca immobilize enzim, sürekli sistemde herhangi bir problem olmaksızın 3 gün kullanılmıştır [Albayrak and Yang, 2002].

2.3. Immobilize β -Galaktozidaz Kullanarak Laktozsuz Süt Üretimi

Aspergillus oryzae β -galaktozidaz, çapraz-bağlanmış poli vinil alkol (PVA) ve chitosan üzerine kovalent olarak immobilize edilerek kesilmiş süt suyundaki laktozun hidrolizinde kullanılmıştır. Immobilizasyon yaklaşık % 98 verimle gerçekleşmiştir. PVA ve Chitosan ile immobilize enzimlerin yarı ömürleri, sırasıyla 12 ve 20 gün olarak tespit edilmiştir [Rejikumar and Devi, 2001].

Kluyveromyce lactis β -galaktozidaz, yarım daire şeklindeki çelik elek üzerinde mangan alginat ile immobilize edilerek sütteki laktozun hidrolizinde kullanılmıştır. Immobilize enzim +4 °C'de süt içinde saklandığında, aktivitesini 50 gün sonunda bile kaybetmemiştir. Ancak, peş peşe 40 reaksiyonda kullanıldığında aktivitesinin % 50'sini kaybetmiştir [Genari et al., 2003].

Kluyveromyce lactis β -galaktozidaz, glioksil ve gluteraldehit kullanılarak aktifleştirilen agaroz üzerine immobilize edilerek sütteki laktozun hidrolizinde kullanılmıştır. Immobilizasyon verimi, gluteraldehit kullanıldığında % 75, glioksil grubu kullanıldığında ise % 60 civarında gerçekleşmiştir. [Mateo et al., 2004].

2.4. İmmobilize Glukoamilaz Kullanarak Glukoz Üretimi

İmmobilize glukoamilazla glukoz üretiminde, substrat olarak nişasta, dekstrinler ve maltodekstrinler kullanılmaktadır. Aşağıda, maltodekstrinden glukoz üretimi ile ilgili iki çalışma özetlenmiştir [Varavinit et al., 2001], [Oh and Kim, 2000], [Tanriseven et al., 2002].

Aspergillus niger glukoamilaz, önce gelatinleştirilen mısır nişastası üzerine adsorbe edilip, daha sonra kalsiyum alginat fiberleri içerisinde hapsedilerek % 22 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir. İmmobilize enzim, aktivitesini 21 gün korumuştur [Tanriseven et al., 2002].

Aspergillus niger glukoamilaz, poli gluteraldehit (PGA) ve gluteraldehit kullanılarak aktifleştirilmiş jelatin üzerine % 100 verimle immobilize edilmiş ve immobilize enzimin aktivite verimi % 85 olarak gerçekleşmiştir. İmmobilize enzim, peş peşe 30 reaksiyon sonunda bile aktivitesini korumuştur. Ayrıca, immobilize enzimin aktivitesi 30 güne kadar azalmadan korunmuş, 60. gün sonunda % 90'a ve 90 gün sonunda da % 60'a düşmüştür [Ölçer, 2004].

2.5. Pectinex Ultra SP-L Kullanarak Prebiyotik Üretimi

Yirmi iki ticari enzim preparasyonu içinde, en yüksek fruktoziltransferaz aktivitesine Pectinex Ultra SP-L'nin sahip olduğu ve fruktooliosakkaritlerin endüstriyel olarak üretiminde kullanılabileceği tespit edilmiştir [Hang and Woodams 1995, Fructosyltransferase Activity of...].

Aynı yıl yapılan bir diğer çalışmada, sıvı Pectinex Ultra SP-L kullanılarak fruktooligosakkarit üretiminin şartları optimize edilmiştir [Hang and Woodams 1995, Optimization of Enzymatic...].

Bir başka çalışmada ise, sıvı Pectinex Ultra SP-L, pancar melasındaki şükrozdan yüksek miktarda kestoz içeren karışım eldesinde kullanılmıştır [Hang and Woodams 1995, Production of 1-Kestose...].

Başka bir çalışmada Pectinex Ultra SP-L kalsiyum alginat fiberi içerisinde immobilize edilerek, FOS ve IMO içeren bir karışım üretiminde kullanılmıştır [Tanrıseven and Gökmen, 1999].

Sıvı Pectinex Ultra SP-L sulu ortamda [Del Val et al., 2001] ve su ile polietilenglikol'den oluşan iki fazlı ortamda [Del Val and Otero, 2003] 6'-galaktozil laktoz eldesinde de kullanılmıştır.

2.6. Epoksi (Oksiran) Grubu İçeren Matriksler Kullanarak Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu için çok uygun bir matriks olduğundan, Eupergit C ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Aşağıda, bu çalışmalardan bazıları kronolojik olarak özetlenmiştir.

Aspergillus niger lipaz Eupergit C ile % 100 verimle immobilize edilerek, 3-deasetil sefalosporinlerin hazırlanmasında kullanılmıştır. İmmobilize enzim, kesikli sistemde 12 kez tekrarlanan 5 saatlik reaksiyon sonunda bile aktivitesini korumuştur. Ayrıca, sürekli sistemde aktivitede önemli bir azalma olmadan 2 ay boyunca sürekli olarak kullanılmıştır [Carrea et al., 1996].

Rekombinant *Escherichia coli* N-asetilnöraminik asit aldolazı, Eupergit C üzerine % 30-40 verimle immobilize edilerek, N-asetilnöraminik asit üretiminde kullanılmıştır. İmmobilize enzim karıştırmalı tank reaktöründe, aktivitede önemli bir azalma olmadan her biri 5'er saatlik 9 reaksiyonda kullanılmıştır [Mahmodian et al., 1997].

Escherichia coli DH B4/pTre11 trehalaz, VA-epoksi polimeri üzerine % 60 verimle immobilize edilerek, trehaloz tayininde kullanılmıştır. İmmobilize enzim peş peşe 100 enjeksiyon ve 4 ay boyunca 2000 enjeksiyon sonunda bile aktivitesini korumuştur [Myer zu Dutingdorf et al., 1997].

Streptomyces lavendulae ATCC 13664 penisilin V açılaz, Eupergit C üzerine % 87 aktivite verimiyle immobilize edilerek, penisilin V'nin hidrolizinde kullanılmıştır. İmmobilizasyondan sonra reaksiyona girmeden kalan epoksi grupları bovine serum albumin (BSA) ile bloke edilerek, aktivite verimi % 144'e çıkarılmıştır. İmmobilize enzim, aktivitesini kaybetmeden 50 kez kullanılmıştır [Torres-Bacete et al., 2000].

Lentinula edodes lakkaz, Eupergit C üzerine % 56 aktivite verimiyle immobilize edilerek, atık sulardaki yağlar içerisinde bulunan fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. İmmobilizasyon, enziminin pH ve termal kararlılığını artırmıştır. İmmobilize enzim peş peşe 8 reaksiyonda kullanıldığında önemli bir aktivite kaybı olmamıştır. İmmobilize enzimin aktivitesi, iki ay sonunda % 85'e ve altı ay sonunda da % 38'e düşmüştür [D'Annibale et al., 2000].

Bacillus subtilis Maltogenaz, Eupergit C üzerine % 60 aktivite verimiyle immobilize edilerek, maltodekstrinden maltoz üretiminde kullanılmıştır. İmmobilizasyon, enzimin yüksek pH ve sıcaklıklara karşı kararlılığını artırmıştır. İmmobilize enzim, önemli bir aktivite kaybına uğramadan 30 gün kullanılmıştır [Canlı, 2003].



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Enzim

Pectinex Ultra SP-L Novo Nordisk (Bagsværd, Danimarka) tarafından hediye edildi.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

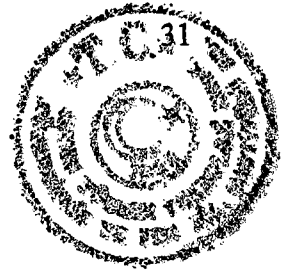
Sodyum di hidrojen fosfat, sodyum azid, hidroklorik asit, kalsiyum klorür di hidrat, gluteraldehid, asetonitril, etanol, metanol, sülfürik asit, Tris HCl, Commassie Brilliant Blue, fosforik asit ve α -naftol Merck'ten (Darmstadt, Almanya); Bovine Serum Albumin ve amonyum persülfat (APS) Bio-Rad'dan (Kaliforniya, ABD); Kalsiyum asetat, alginik asit, gliserol, izopropanol, akrilamid, Brilliant Blue R, Bromfenol Blue, glisin, protein standardı, sodyum lauril sülfat (SDS), N, N, N', N'-tetra metil-etilendiamin (TEMED), β -merkaptotanol, D-glukoz, D-maltoz, D-fruktoz ve D-laktoz Sigmadan (Taufkirchen, Almanya); Sodyum hidroksit ve tris Fluka'dan (Taufkirchen, Almanya); maltodekstrin Avebe'den (Veendam, Hollanda); asetik asit TLC-tabakaları Whatman'dan (New York, ABD) ve ısıl işlem görmemiş inek sütü marketten (Gebze, Türkiye) satın alındı. Eupergit C Röhm (Darmstadt, Almanya), fruktooligosakkarit standartları Meiji Seika Kaisha (Tokyo, Japonya) firmaları tarafından hediye edildi.



3.1.3. Araç-Gereçler

Tablo 3.1: Deneylerde kullanılan araç ve gereçler

Araç/Gereç	Marka	Model
TLC-Densitometre	Bio-Rad (Kaliforniya, ABD)	GS 670
UV-Spektrofotometre	GBC (Northbrook, ABD)	Cintra-20
pH-metre	İno-Lab (Kladno, Çek Cumhuriyeti)	pH Level 1
Mekanik karıştırıcı	Heidolph (Schwabach, Almanya)	Promax 2020
Magnetik karıştırıcı	Heidolph (Schwabach, Almanya)	MR 3003
Hassas Terazı	Sartorius (Goetingen Almanya)	BA 110 S
Protein Elektroferez Sistemi	Bio-Rad (Kaliforniya, ABD)	Miniprotean II
Termostatlı Su Banyosu	Gessellschaft Für Labortechnik (Burladingen, Almanya)	1086
TLC tabaka ısıtıcısı	Camag (Muttentz, İsviçre)	Ceran
Mikroşırınga	Hamilton (Bonaduz, İsviçre)	7105
Masa Üstü Santrifüj	Heraeus (Hanau, Almanya)	Labofuge 400R
Orbital Karıştırıcı	Biometra (Goetingen Almanya)	WT12
Otomatik Pipet (1000 µl)	Pluripete Kartell (Welshpool Avustralya)	P 1000
Otomatik Pipet (200 µl)	Pluripete Kartell (Welshpool Avustralya)	P 200
Otomatik Pipet (20 µl)	Gilson (Bedfordshire, İngiltere)	P 20
Peristaltik Pompa	Cole Parmer(Illinois, ABD)	7518-12
Güç Kaynağı	Bio-Lab (Ipswich, ABD)	Elite 300 Plus
Polipropilen (PP) Kolon	Özel olarak yaptırıldı (İstanbul, Türkiye)	(dış çap 60 mm, dış boy 72 mm)



3.2. Metod

3.2.1. Kantitatif Protein Tayini

Pectinex Ultra SP-L ve immobilizasyon süzüntülerindeki protein miktarı Bradford Metodu ile tayin edildi [Bradford, 1976].

3.2.1.1. Bradford Boyasının Hazırlanması

Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyası (100 mg), methanol içinde (50 mL) çözülerek üzerine H_3PO_4 (100 mL, % 85) ilave edildi ve saf su ile 200 mL'ye seyreltildi. Elde edilen çözelti, kullanılıncaya kadar koyu renkli bir şişe içerisinde buzdolabında (+4 °C) saklandı.

3.2.1.2. Protein Standartlarının Hazırlanması

Farklı derişimlerde (0-50 mg/L) Bovin Serum Albumin (BSA) standartları (1.5 ml), saf su kullanılarak taze hazırlandı.

3.2.1.3. Standart Tayin Prosedürü

Farklı derişimlerde BSA standartları (1.5 ml) ve Bradford Boyası (1,5 ml) kullanılarak Absorbans (594 nm)-Protein Derişimi (mg/L) grafiğı çizildi ve grafiğıe ait doğru denklemi kullanılarak, örneklerin (1.5 ml) absorbans değerlerine karşılık protein miktarları hesaplandı.



3.2.2. Proteinlerin SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez Analizi

Pectinex Ultra SP-L ve İmmobilizasyon süzüntülerindeki proteinler, SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez metodu kullanılarak ayrıldı [Gümüsel ve ark. 1997].

3.2.2.1. Jel ve Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.2.1.1. Ayırma Jeli

Saf su (750 μ L), Tris-HCl tamponu (75 mM, pH 8.8) hazırlanan % 0.2'lik SDS çözeltisi (3750 μ L), Akrilamit/bisakrilamit (3000 μ L), % 10'luk amonyum per sülfat çözeltisi (90 μ L) ve TEMED (6 μ L)'in karışımından oluşur.

3.2.2.1.2. Derişim Jeli

Saf su (1050 μ L), Tris-HCl tamponu (25 mM, pH 6.8) hazırlanan % 0.2'lik SDS çözeltisi (1500 μ L), akrilamit/bisakrilamit (390 μ L), % 10'luk amonyum per sülfat çözeltisi (60 μ L) ve TEMED (3 μ L)'in karışımından oluşur.

3.2.2.1.3. Yürütme Tamponu (5x)

Tris (15 g), glisin (72 g), SDS (5 g) saf suda çözülerek 1 litreye tamamlandı.



3.2.2.1.4. Cracking Tamponu

Tris (2.5 ml, 2 M, pH 6.8), SDS (1 g), EDTA (0.4 ml, 0.5 M), β ME (1 ml), gliserol (10 ml) ve BFB (20 mg) suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

3.2.2.1.5. Boyama Çözeltisi

% 10'luk asetik asit çözeltisi (100 ml) ve % 95'lik alkolde çözülerek hazırlanmış Brilliant Blue R (100 ml) karıştırılarak hazırlandı.

3.2.2.1.6. Arıtma Çözeltisi

Asetik asit (% 5'lik) ve etanolün (% 50'lik) 1/1 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı.

3.2.2.1.7. Örneklerin Hazırlanması

Sıvı Pectinex Ultra SP-L ve immobilizasyon tamponu çözeltisinin süzüntüleri, saf su ile 50 kat seyreltilti.

3.2.2.1.8. Protein Standartları

Karbonik anhidraz (29 kDa), ovalbümin (45 kDa), bovin serum albümin (66 kDa), fosforilaz B (97.4 kDa), β -galaktozidaz (116 kDa) ve myozin (205 kDa)'den oluşmaktadır.

3.2.2.2. SDS- Poliakrilamit Jel Elektroforez'in Uygulanması

3.2.2.2.1. Jellerin Dökülmesi

İki adet elektroforez camının arasına ayırıcılar konarak kasete monte edildi. Ayırma jeli, yukarıdaki miktarların yarısı kullanılarak hazırlandı ve pipet yardımıyla döküldükten sonra jelin üzeri izo-propanol ile kapatılarak oda ısısında polimerize olması beklenildi. Polimerleşme tamamlandıktan sonra jelin üzerindeki izopropanol dökülüp saf su ile yıkanıp, filtre kağıdı ile kurulandı. Daha sonra, yukarıdaki miktarların yarısı kullanılarak hazırlanan derişim jeli pipet yardımı ile döküldü ve tarak takılarak polimerize olması beklenildi.

3.2.2.2.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Marker (5 μ L) ve protein örnekleri (15 μ L) cracking çözeltisi (5 μ L) içinde çözülerek santrifüjde spin edildi. Daha sonra 5 dakika kaynatılıp tekrar spin edildi ve kuyulara yerleştirildi. Boş kuyulara cracking (15 μ L) yüklendikten sonra kuyuların üzeri yürütme tamponu ile tamamlandı. Kaset tanka takılıp hücreye yerleştirildikten sonra, güç kaynağına bağlanarak 100 V'de derişim jeli sonuna kadar yürütüldü. Daha sonra 200 V'de ayırma geli sonuna kadar (Bromofenol blue çıkıncaya kadar) yürütüldü. Güç kaynağı kapatıldıktan sonra, jelin üzerindeki cam alınarak, derişim jeli kesilip atıldı. Jelin sol üst köşesi kesilerek işaretlendi ve boyama çözeltisi içerisinde 3 saat bekletilerek boyandı. Son olarak, jel arıtma çözeltisine alınıp 1 saat bekletildikten sonra jel kurutuldu ve görüntülendi.

3.2.3. Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferazın Aktivite Tayini

Optimum şartlarda (pH 5.5, 60 °C, çalkalama hızı 255 rpm, süre 1 saat), sıvı Pectinex Ultra SP-L (200 µL) ve süktroz çözeltisi [% (w/v) 60'lık, 10 ml] ile reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda alınan 50 µL örnek, sodyum azid içeren [% (w/v) 0.02] saf su ile 2 ml'ye seyreltildi ve enzimi inaktive etmek için 10 dakika kaynatıldı. Oluşan glukoz miktarı, TLC densitometre ile kantitatif olarak tayin edildi. Aktivite, oluşan glukoz miktarları kullanılarak hesaplandı.

1 IU, optimum şartlarda (pH 5.5, sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 255 rpm ve süre 1 saat) süktroz çözeltisinden [% (w/v) 60'lık, 10 ml] 1 dakikada 1 µmol glukoz oluşturan sıvı Pectinex Ultra SP-L miktarı olarak tanımlandı.

Pectinex Ultra SP-L FTS aktivitesi, 269 IU / ml sıvı Pectinex Ultra SP-L olarak hesaplandı. Pectinex Ultra SP-L'deki protein miktarı 11.03 mg/ml olduğundan, spesifik aktivite 24.4 IU/mg olarak hesaplandı.

3.2.4. Pectinex Ultra SP-L β-Galaktozidazın Aktivite Tayini

Optimum şartlarda (pH 4.5, 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm, süre 1 saat), sıvı Pectinex Ultra SP-L (200 µL) ve laktoz çözeltisi [% (w/v) 5'lik, 10 ml] ile reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda alınan 200 µL örnek, sodyum azid içeren [% (w/v) 0.02] saf su ile 1 ml'ye seyreltildi ve enzimi inaktive etmek için 10 dakika kaynatıldı. Oluşan 6'-galaktozil laktoz miktarı, TLC Densitometre ile kantitatif olarak tayin edildi. Aktivite, oluşan 6'-galaktozil laktoz miktarı kullanılarak hesaplandı.

Bir IU, optimum şartlarda (pH 4.5, sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı = 200 rpm ve süre 1 saat) laktoz çözeltisinden [% (w/v) 5'lik, 10 ml] 1 dakikada 1 µmol 6'-galaktozil laktoz oluşturan sıvı Pectinex Ultra SP-L miktarı olarak tanımlandı.

Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz aktivitesi, 8.4 IU / ml sıvı Pectinex Ultra SP-L olarak hesaplandı. Pectinex Ultra SP-L'deki protein miktarı 11.03 mg/ml olduğundan, spesifik aktivite 0.76 IU/mg olarak hesaplandı.

3.2.5. Pectinex Ultra SP-L Glukoamilazın Aktivite Tayini

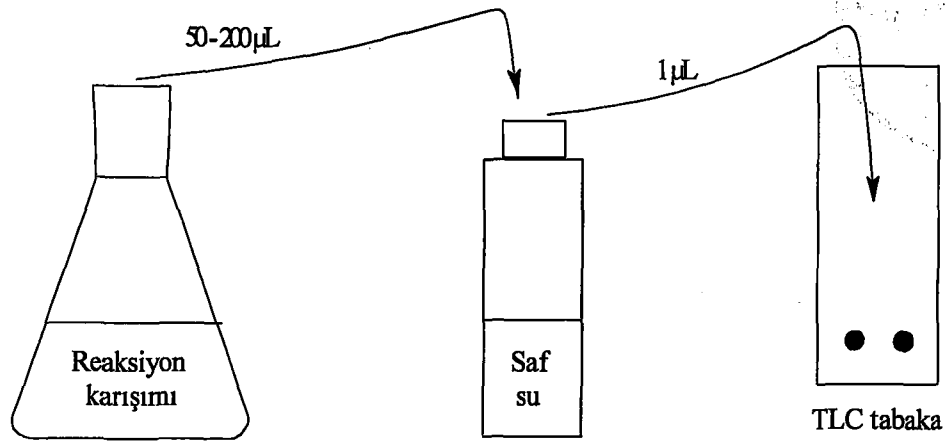
Optimum şartlarda (pH 5.0, 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm, süre 15 dakika), sıvı Pectinex Ultra SP-L (200 μ L) ve maltodekstrin çözeltisi [% (w/v) 5'lik, 20 ml] ile reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda alınan 200 μ L örnek, sodyum azid içeren [% (w/v) 0.02] saf su ile 1 ml'ye seyreltildi ve enzimi inaktive etmek için 10 dakika kaynatıldı. Oluşan glukoz miktarı, TLC Densitometre ile kantitatif olarak tayin edildi (Şekil 2.5). Aktivite, oluşan glukoz miktarları kullanılarak hesaplandı.

Bir IU, optimum şartlarda (pH 5.0, sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm ve süre 15 dakika) maltodekstrin çözeltisinden [% (w/v) 5'lik, 20 ml] 1 dakikada 1 μ mol glukoz oluşturan sıvı Pectinex Ultra SP-L miktarı olarak tanımlandı.

Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz aktivitesi, 156 IU / ml sıvı Pectinex Ultra SP-L olarak hesaplandı. Pectinex Ultra SP-L'deki protein miktarı 11.03 mg/ml olduğundan, spesifik aktivite 14.14 IU/mg olarak hesaplandı.

3.2.6. TLC Densitometre ile Kantitatif Karbonhidrat Tayini

Standart çözelti ve örneklerden, Hamilton şırınga ile 1'er μ L alınıp 10 cm boyundaki TLC tabaka üzerine damlatılıp kurutulduktan sonra, asetonitril-su (85:15, v/v) solvent sisteminde üç kere yürütüldükten sonra fön makinesi ile kurutuldu. Daha sonra TLC tabaka üzerinde ayrılan karbonhidratları görünür hale getirmek için tabaka, % 5 (w/v) sülfürik asit ve % 0.5 (w/v) α -naftol içeren etanol çözeltisine daldırılıp, hot plate üzerinde 110 °C'de 10 dakika yakıldı. TLC tabaka üzerinde görünür hale gelen karbonhidratlar Bio-Rad GS 670 model TLC imaging densitometre ile kantitatif olarak tayin edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: TLC densitometre ile kantitatif karbonhidrat tayini

3.2.7. İmmobilizasyon ve Aktivite Verimleri

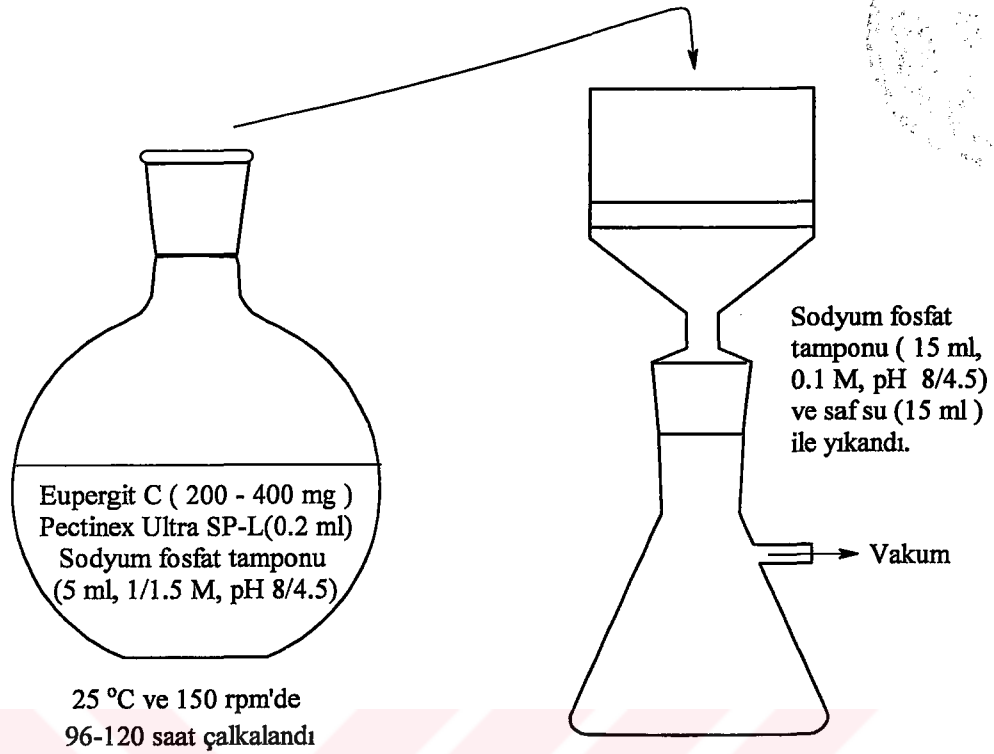
İmmobilizasyondan sonra süzüntüde aktivite tespit edilmediğinden immobilizasyon veriminin % 100 olduğu anlaşılmıştır. İmmobilize enzimin aktivite verimi ise aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{İmmobilizasyon Verimi (\%)} = \left[\frac{(\text{Sıvı enzimin aktivitesi} - \text{Süzüntüdeki aktivite})}{\text{Sıvı enzimin aktivitesi}} \right] \times 100$$

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

3.2.8. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Kullanarak Fruktooligosakkarit Üretimi

Bu çalışmada, Pectinex Ultra SP-L'nin fruktoziltransferaz, glukoamilaz ve β -galaktozidaz aktiviteleri çalışıldı. Pectinex Ultra SP-L optimum şartlarda immobilize edilerek (Şekil 3.2) fruktooligosakkarit, galaktooligosakkarit, laktozsuz süt ve glukoz üretimlerinde kullanıldı.



Şekil 3.2: Pectinex Ultra SP-L'nin Eupergit C ile immobilizasyonu.

3.2.8.1. Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferazın Eupergit C ile İmmobilizasyonu

Eupergit C miktarı, bağlanma tamponu (pH ve derişim) ve immobilizasyon süresi immobilizasyon verimini etkilediğinden, bu faktörlerden herbirinin etkisi ayrı ayrı incelenerek immobilizasyon şartları optimize edildi ve aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.8.1.1. Optimum Aktivite pH'sında Eupergit C Miktarının Aktivite Verimine Etkisi

Pectinex Ultra SP-L (200 µL) ve değişik miktarlarda (100-1000 mg) Eupergit C, fosfat tampon çözeltilerinde (5 ml, 1M, pH 6), oda sıcaklığında (25 °C) 24 saat süre ile muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilizasyon gerçekleştirildi ve aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.8.1.2. Tampon Çözelti pH'sının Etkisi

Pectinex Ultra SP-L (200 µL) ve Eupergit C (400 mg), değişik pH değerlerinde (5-9) olan fosfat tampon çözeltilerinde (1M), oda sıcaklığında (25 °C) 24 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilizasyon gerçekleştirildi ve aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.8.1.3. Tampon Çözelti Derişiminin Etkisi

Pectinex Ultra SP-L (200 µL) ve Eupergit C (400 mg), değişik derişimlerde (0.025-2.5 M) fosfat tampon çözeltilerinde (pH 8), oda sıcaklığında (25 °C) 24 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilizasyon gerçekleştirildi ve aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.8.1.4. İmmobilizasyon Süresinin Etkisi

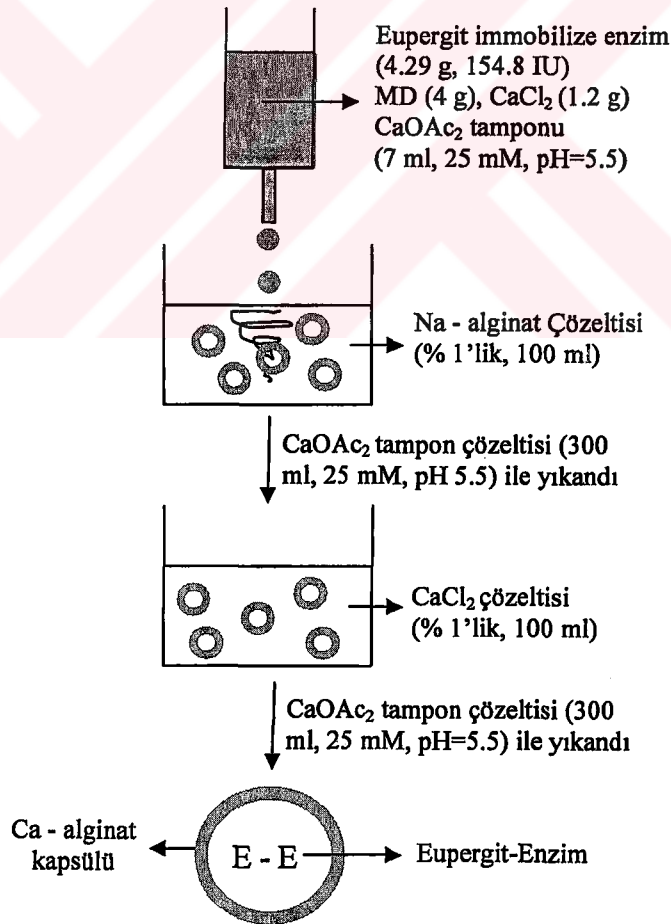
Pectinex Ultra SP-L (200 µL) ve Eupergit C (400 mg), fosfat tamponu çözeltilerinde (1 M ve pH 8), oda sıcaklığında (25 °C) farklı sürelerle (12-96 saat) muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızında) immobilizasyon gerçekleştirildi ve aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.8.1.5. Optimum İmmobilizasyon pH'sında Eupergit C Miktarının Etkisi

Pectinex Ultra SP-L (200 µL) ve değişik miktarlarda (100-1000 mg) Eupergit C, oda sıcaklığında (25 °C), fosfat tampon çözeltisinde (5 ml, 1 M, pH 8), 96 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilizasyon gerçekleştirildi ve aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.8.2. Eupergit C Üzerine İmmobilize Edilen Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferazın Alginat Kapsülünde Hapsedilmesi

Üzerine Pectinex Ultra SP-L (154.8 IU) immobilize edilen Eupergit C (4.29 g), maldodextrin (4 g), kalsiyum klorür (1.2 g) ve kalsiyum asetat tampon çözeltisi (5 ml pH 5.5 25 mM) ile iyice karıştırıldıktan sonra, 60 °C'de % (w/v) 0.5'lik gluterdialdehit ile 1 saat muamele edilmiş % (w/v) 1'lik sodyum alginat çözeltisine (600 rpm hızla karıştırılan), iç çapı 1.6 mm olan şırınga ile damlatıldıktan sonra aynı hızla (600 rpm) 1 saat karıştırıldı. Elde edilen 210 adet kapsül, nuçe erleni üzerinde kalsiyum asetat tampon çözeltisi (300 ml, pH 5.5 25 mM) ile yıkandı. Daha sonra kapsüller, 25 mM kalsiyum asetat tamponu (pH= 5.5) ile hazırlanan % 1'lik kalsiyum klorür çözeltisi içerisinde 1 saat bekletilerek sağlamlaştırıldı (Şekil 3.3)



Şekil 3.3: Eupergit C üzerine immobilize edilen Pectinex Ultra SP-L'nin alginat kapsülünde hapsedilmesi

3.2.8.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferazın Karakterizasyonu



3.2.8.3.1. Optimum pH

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (1.43 g) enzimler, % 60'lık (w/v) süktroz çözeltisi (10 ml) ile, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 255 rpm), farklı pH'larda (4.5-8.0) 1 saat reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi (pH 4.5-5.5 için kalsiyum asetat; 6.0-8.0 için imidazol tampon çözeltileri kullanıldı). Bağlı aktivite (%) -pH grafiğinden, optimum pH aralığı tespit edildi.

3.2.8.3.2. Optimum Sıcaklık

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (1.43 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ile hazırlanan % 60'lık (w/v) süktroz çözeltisi (10 ml) ile, su banyosunda (çalkalama hızı 255 rpm), farklı sıcaklıklarda (35-75 °C) 1 saat reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi. Bağlı aktivite (%) -sıcaklık grafiğinden, optimum sıcaklık aralığı tespit edildi.

3.2.8.3.3. pH Kararlılığı

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (1.43 g) enzimler, farklı pH değerlerinde (4.5-8.0) olan tampon çözeltilerde (2.5 ml, 25 mM) oda sıcaklığında (25 °C) 1 saat bekletildikten sonra buz banyosunda 10 dakika tutuldu (pH 4.5-5.5 için asetat; 6.0-8.0 için imidazol tampon çözeltileri kullanıldı). Daha sonra bu karışımların üzerine kalsiyum asetat tampon çözeltisi (250 mM, pH 5.5) ile hazırlanmış % 80'lik (w/v) süktroz çözeltisi ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 255 rpm) 1 saat reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi. Bağlı aktivite (%) -pH grafiğinden, Pectinex Ultra SP-L FTS'in en kararlı olduğu pH aralığı tespit edildi.



3.2.8.3.4. Termal Kararlılık

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (1.43 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltilerinde (2.5 ml, 25 mM, pH 5.5), farklı sıcaklıklarda (35-75 °C) 1 saat bekletildikten sonra buz banyosunda 10 dakika tutuldu. Daha sonra bu karışımların üzerine kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ile hazırlanmış % 80'lik (w/v) süktroz çözeltisi ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 255 rpm) 1 saat reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi. Bağlı aktivite (%)-sıcaklık grafiğinden, Pectinex Ultra SP-L FTS'in en kararlı olduğu sıcaklık aralığı tespit edildi.

3.2.8.3.5. Kinetik Parametreler

Sıvı (0.5 ml) ve immobilize (3.6 g) enzim, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ile hazırlanmış değişik derişimlerde (% 1-10; w/v) süktroz çözeltileri (10 ml, pH 5.5) kullanılarak, su banyosunda (60 °C ve 255 rpm) 1 dakika reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon hızının belirlenmesi için oluşan glukoz miktarı tayin edildi. Lineweaver-Burk grafiğı kullanılarak Vmax ve Km değerleri bulundu.

3.2.8.3.6. Kullanım Kararlılığı

İmmobilize enzim (1.43 g), herbiri 1 saat süren 20 reaksiyonda kullanılarak aktiviteler tayin edildi. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra 100 ml saf su ile yıkandı. Bağlı aktivite (%)-tekrar kullanım sayısı grafiğinden, aktivitedeki değışme tespit edildi.

3.2.8.3.7. Saklama Kararlılığı

20 gün boyunca iki günde bir, İmmobilize enzimin (1.43 gram) aktivitesi tayin edildi. Her kullanımdan sonra, immobilize enzim saf su (100 ml) ile yıkandı ve bir sonraki kullanıma kadar kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (20 ml, 25 mM, pH 5.5) saklandı. Bağlı aktivite (%)-zaman (gün) grafiğinden, aktivitedeki değişme tespit edildi.

3.2.8.4. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferaz Kullanarak Kesikli Sistemde Fruktooligosakkarit Üretimi

Sıvı (200 µL) ve immobilize (1.43 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ile hazırlanan % 60'lık (w/v) sükroz çözeltisi (10 ml) ile, su banyosunda (60 °C, çalkalama hızı 255 rpm), 24 saat reksiyona sokuldu ve 4'er saat aralıklarla örnekler alınarak, oluşan karbonhidratlar TLC densitometre ile kantitatif olarak tayin edilerek, yüzde bileşimler (w/w) hesaplandı.

3.2.8.5. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferaz Kullanarak Sürekli Sistemde 1-Kestoz Üretimi

3.2.8.5.1. Debinin 1-Kestoz Verimine Etkisi

Eupergit C üzerine immobilize edilen enzim (10 g), özel olarak yaptırılan poli propilen (PP) kolona (iç çapı 41 mm, iç boyu 2.8mm) dolduruldu. Su banyosuna (60 °C) yerleştirilen kolondan, sükroz çözeltileri [100 ml, 50 g/L, pH 5.5], değişik akış hızlarında (3-18 ml/dakika) birer defa geçirildi. Oluşan karbonhidratlar TLC densitometre ile kantitatif olarak tayin edildi. Hız ve hidroliz yüzdesinin debiye karşı grafiğinden, en yüksek 1-kestoz yüzdesi (w/w) elde edilen akış hızı belirlendi.

3.2.8.5.2. Sükroz Derişiminin 1-Kestoz Verimine Etkisi

Eupergit üzerine immobilize edilen enzim (10 g) PP kolona dolduruldu. Su banyosuna (60 °C) yerleştirilen kolondan, kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH 5.5) hazırlanan farklı derişimlerde (5-60 g/L) sükroz çözeltileri (100 ml) 3 ml/dakika hızla kolondan birer defa geçirildi. Oluşan karbonhidratlar TLC densitometre ile kantitatif olarak tayin edildi. Hız ve hidroliz yüzdesinin sükroz derişimine karşı grafiğinden, en yüksek 1-kestoz yüzdesi (w/w) elde edilen sükroz derişimi bulundu.

3.2.8.5.3. Devir Sayısının 1-Kestoz Verimine Etkisi

Eupergit üzerine immobilize edilen enzim (10 g) PP kolona dolduruldu. Su banyosuna (60 °C) yerleştirilen kolondan, kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH 5.5) hazırlanan sükroz çözeltisi (100 ml, 50 g/L), 3 ml/dakika hızla ard arda 6 kez geçirildi. Oluşan karbonhidratlar TLC densitometre ile kantitatif olarak tayin edildi. Hız ve hidroliz yüzdesinin devir sayısına karşı grafiğinden, en yüksek 1-kestoz yüzdesi (w/w) elde edilen devir sayısı tespit edildi.

3.2.9. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak Galaktooligosakkarit ve Laktozsuz Süt Üretimi

3.2.9.1. Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidazın Eupergit C ile İmmobilizasyonu

3.2.9.1.1. Tampon çözelti pH'sının İmmobilizasyon Verimine Etkisi

Pectinex Ultra SP-L (200 μ L) ve Eupergit C (200 mg) değişik pH değerlerinde (4.5-7.5) olan fosfat tampon çözeltilerinde (5 ml, 1M), oda sıcaklığında (25 °C) 24

saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızında) immobilizasyon gerçekleştirildi ve aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.9.1.2. Tampon Çözelti Derişiminin Etkisi

Pectinex Ultra SP-L (200 µL) ve Eupergit C (200 mg), değişik derişimlerde (0.025-2.5 M) olan fosfat tampon çözeltilerinde (pH 4.5) oda sıcaklığında (25 °C) 24 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızında) immobilizasyon gerçekleştirildi ve aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.9.1.3. Eupergit C Miktarının Etkisi

Pectinex Ultra SP-L (200 µL) ve değişik miktarlarda (100-1000 mg) Eupergit C, fosfat tampon çözeltilerinde (5 ml, 1.5 M, pH 4.5), oda sıcaklığında (25 °C) 24 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızında) immobilizasyon gerçekleştirildi ve aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.9.1.4. İmmobilizasyon Süresinin Etkisi

Pectinex Ultra SP-L (200 µL) ve Eupergit C (200 mg), fosfat tamponu çözeltilerinde (5 ml, 1.5M, pH 4.5) değişik sürelerle (12-120 saat) oda sıcaklığında (25 °C) muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızında) immobilizasyon gerçekleştirildi ve aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.9.2. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidazın Karakterizasyonu

3.2.9.2.1. Optimum pH

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzimler, % 5'lik (w/v) laktoz çözeltisi (10 ml) ile, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm), farklı pH'larda (3.0-7.0) 1 saat reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi (pH 3.0-5.5 için kalsiyum asetat; 6.0-7.0 için imidazol tampon çözeltileri kullanıldı). Bağlı aktivite (%)-pH grafiğinden, optimum pH aralığı tespit edildi.

3.2.9.2.2. Optimum Sıcaklık

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 4.5) ile hazırlanan % 5'lik (w/v) laktoz çözeltisi (10 ml) ile, su banyosunda (çalkalama hızı 200 rpm), farklı sıcaklıklarda (35-75 °C) 1 saat reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi. Bağlı aktivite (%)-sıcaklık grafiğinden, optimum sıcaklık aralığı tespit edildi.

3.2.9.2.3. pH Kararlılığı

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzimler, farklı pH değerlerinde (3.0-7.0) olan tampon çözeltilerde (5 ml, 25 mM) oda sıcaklığında (25 °C) 1 saat bekletildikten sonra buz banyosunda 10 dakika tutuldu (pH 3.0-5.5 için asetat; 6.0-7.0 için imidazol tampon çözeltileri kullanıldı). Daha sonra bu karışımların üzerine kalsiyum asetat tampon çözeltisi (250 mM, pH 4.5) ile hazırlanmış % 10'luk (w/v) laktoz çözeltisi (5 ml) ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm) 1 saat reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi Bağlı aktivite (%)-pH

grafiğinden, Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın en kararlı olduğu pH aralığı tespit edildi.

3.2.9.2.4. Termal Kararlılık

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzimler kullanılarak, kalsiyum asetat tampon çözeltilerinde (5 ml, 25 mM, pH 4.5), farklı sıcaklıklarda (35-75 °C) 1 saat bekletildikten sonra buz banyosunda 10 dakika tutuldu. Daha sonra bu karışımların üzerine, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ile hazırlanmış % 10'luk (w/v) laktoz çözeltisi ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm) 1 saat reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi. Bağlı aktivite (%)-sıcaklık grafiğinden, Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın en kararlı olduğu sıcaklık aralığı tespit edildi.

3.2.9.2.5. Kinetik Parametreler

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzim, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 4.5) ile hazırlanmış değişik derişimlerde (% 4-20; w/v) laktoz çözeltileri (10 ml) kullanılarak, su banyosunda (60 °C ve 200 rpm) 3 dakika reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon hızının belirlenmesi için, oluşan 6'-galaktozil laktoz miktarı tayin edildi. Lineweaver-Burk grafiğı kullanılarak V_{max} ve K_m değerleri bulundu.

3.2.9.2.6. Kullanım Kararlılığı

İmmobilize enzim (0,71 g), herbiri 1 saat süren 20 reaksiyonda kullanılarak aktiviteler tayin edildi. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra 100 ml saf su ile yıkandı. Bağlı aktivite (%)-tekrar kullanım sayısı grafiğinden, aktivitedeki değişme tespit edildi.

3.2.9.2.7. Saklama Kararlılığı

20 gün boyunca iki günde bir, İmmobilize enzimin (0,71 g) aktivitesi tayin edildi. Her kullanımdan sonra, immobilize enzim saf su (100 ml) ile yıkandı ve bir sonraki kullanıma kadar kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (20 ml, 25 mM, pH 4.5) saklandı. Bağlı aktivite (%)-zaman (gün) grafiğinden, aktivitedeki değişme tespit edildi.

3.2.9.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak Galaktooligosakkarit Üretimi

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 4.5) ile hazırlanan % 5'lik (w/v) laktoz çözeltisi (10 ml) ile, su banyosunda (60 °C, çalkalama hızı 200 rpm), 24 saat reksiyona sokuldu ve 4'er saat aralıklarla örnekler alınarak, oluşan karbonhidratlar TLC densitometre ile kantitatif olarak tayin edilerek, yüzde bileşimler (w/w) hesaplandı.

3.2.9.4. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak Laktozsuz Süt Üretimi

İmmobilize enzim (14,2 g) PP kolona dolduruldu ve akış hızının laktoz hidrolizine etkisini belirlemek için, süt (100 ml) kolondan (60 °C) değişik debilerde (3-18 ml/dakika) birer defa geçirildi. Devir sayısının etkisinin belirlenmesi için ise, aynı miktarda süt (100 ml) kolondan ardarda 8 kez geçirildi. Alınan numunelerdeki karbonhidratlar TLC densitometre ile kantitatif olarak tayin edildi. Hidroliz hızı ve hidroliz yüzdesinin (w/w) debiye karşı grafiğinden optimum debi bulundu. Hidroliz hızı ve hidroliz yüzdesinin (w/w) devir sayısına karşı grafiğinden de reaksiyon süresi tespit edildi.

3.2.10. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilaz Kullanarak Glukoz Üretimi

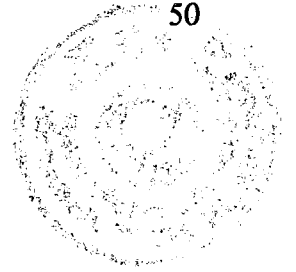
3.2.10.1. Pectinex Ultra SP-L Glukoamilazın Eupergit C ile İmmobilizasyonu

Yapılan ön deneylerde, sıvı Pectinex Ultra SP-L'nin glukoamilaz aktivitesine de sahip olduğu ve fruktooligosakkarit üretiminde kullanmak için elde edilen immobilize Pectinex Ultra SP-L'nin glukoamilaz aktivitesinin sıvı Pectinex Ultra SP-L'nin glukoamilaz aktivitesinin % 95'i olduğu tespit edildi. Elde edilen aktivite verimi yeterince yüksek olduğundan, immobilizasyon şartlarının yeniden optimize edilmesine gerek görülmedi ve Pectinex Ultra SP-L glukoamilaz, Pectinex Ultra SP-L FTS ile aynı şartlarda [Pectinex Ultra SP-L (200 µL) ve Eupergit C (400 mg), sodyum fosfat tamponunda (5 ml, 1 M, pH 8), oda sıcaklığında (25 °C), 96 saat muamele edilerek (çalkalama hızı 150 rpm)] immobilize edildi.

3.2.10.2. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilazın Karakterizasyonu

3.2.10.2.1. Optimum pH

Sıvı (200 µL) ve immobilize (1.43 g) enzimler, % 5'lik (w/v) maltodekstri çözeltisi (20 ml) ile, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm), farklı pH'larda (3.5-8.0) 15 dakika reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi (pH 3.5-5.5 için kalsiyum asetat; 6.0-8.0 için imidazol tampon çözeltileri kullanıldı). Bağlı aktivite (%)-pH grafiğinden, optimum pH aralığı tespit edildi.



3.2.10.2.2. Optimum Sıcaklık

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (1.43 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.0) ile hazırlanan % 5'lik (w/v) maltodekstrin çözeltisi (20 ml) ile, su banyosunda (çalkalama hızı 200 rpm), farklı sıcaklıklarda (35-80 °C) 15 dakika reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi. Bağlı aktivite (%)-sıcaklık grafiğinden, optimum sıcaklık aralığı tespit edildi.

3.2.10.2.3. pH Kararlılığı

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (1.43 g) enzimler, farklı pH değerlerinde (3.5-8.0) olan tampon çözelti (10 ml, 25 mM) oda sıcaklığında (25 °C) 15 dakika bekletildikten sonra, buz banyosunda 10 dakika tutuldu (pH 3.5-5.5 için asetat; 6.0-8.0 için imidazol tampon çözelti kullanıldı). Daha sonra bu karışımların üzerine kalsiyum asetat tampon çözeltisi (250 mM, pH 5.0) ile hazırlanmış % 10'luk (w/v) maltodekstrin çözeltisi (10 ml) ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm) 15 dakika reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi. Bağlı aktivite (%)-pH grafiğinden, Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın en kararlı olduğu pH aralığı tespit edildi.

3.2.10.2.4. Termal Kararlılık

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (1.43 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözelti (10 ml, 25 mM, pH 5.0), farklı sıcaklıklarda (35-80 °C) 15 dakika bekletildikten sonra, buz banyosunda 10 dakika tutuldu. Daha sonra bu karışımların üzerine kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ile % 10'luk (w/v) maltodekstrin çözeltisi (10 ml) ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm) 15 dakika reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi. Bağlı

aktivite (%)-sıcaklık grafiğinden, Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın en kararlı olduğu sıcaklık aralığı tespit edildi.



3.2.10.2.5. Kinetik Parametreler

Sıvı (200 μ L) ve immobilize (1.43 g) enzim, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.0) ile hazırlanmış değişik derişimlerde (% 2-10; w/v) maltodekstrin çözeltileri (20 ml) kullanılarak, su banyosunda (60 °C ve 200 rpm) 1 dakika reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon hızının belirlenmesi için, oluşan glukoz miktarı tayin edildi. Lineweaver-Burk grafiğı kullanılarak Vmax ve Km değerleri bulundu.

3.2.10.2.6. Kullanım Kararlılığı

İmmobilize enzim (1.43 g), herbiri 15 dakika süren 20 reaksiyonda kullanılarak aktiviterler tayin edildi. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra 100 ml saf su ile yıkandı. Bağlı aktivite (%)-tekrar kullanım sayısı grafiğinden, aktivitedeki değişme tespit edildi.

3.2.10.2.7. Saklama Kararlılığı

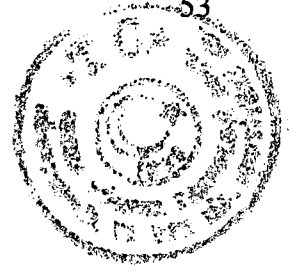
20 gün süresince iki günde bir, immobilize enzimin (1.43 gram) aktivitesi tayin edildi. Her kullanımdan sonra, immobilize enzim saf su (100 ml) ile yıkandı ve bir sonraki kullanıma kadar kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (20 ml, 25 mM, pH 5.0) saklandı. Bağlı aktivite (%)-zaman (gün) grafiğinden, aktivitedeki değişme tespit edildi.

3.2.10.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilaz Kullanarak Glukoz Üretimi



Sıvı (0.5 ml) ve immobilize (3.58 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.0) ile hazırlanan % 5'lik (w/v) maltodekstrin çözeltisi (20 ml) ile, su banyosunda (60 °C, çalkalama hızı 200 rpm), 3 saat reaksiyon gerçekleştirildi ve 30 dakika aralıklarla örnekler alınarak, elde edilen ürünlerdeki karbonhidratlar TLC densitometre ile kantitatif olarak tayin edilerek, yüzde bileşimler (w/w) hesaplandı.

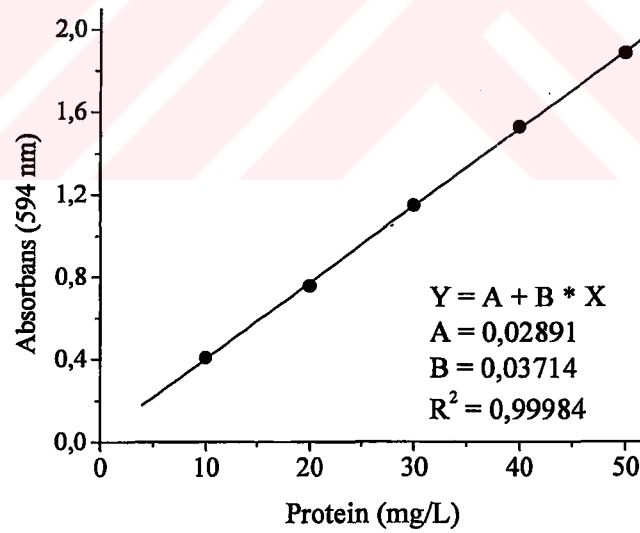




4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Kantitatif Protein Tayini

Sıvı Pectinex Ultra SP-L ve immobilizasyon süzüntülerindeki protein miktarları, Bradford Metoduna göre çizilen absorbans (594 nm)-protein miktarı (mg/L) grafiğine (Şekil 4.1) ait doğru denkleminde hesaplandı. Hesaplanan protein miktarları Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, immobilizasyonda kullanılan sıvı Pectinex Ultra SP-L’de (200 µL) bulunan protein miktarı 2.21 mg’dır. Enzim aktivitesi kullanıldığında % 100 olarak bulunan immobilizasyon verimini, süzüntüde aktivite kalmaması ve immobilizasyondan sonraki süzüntülerde kalan protein miktarının az olması da, doğrulamaktadır.



Şekil 4.1: UV absorbansı-protein miktarı grafiği. Farklı derişimlerde (10-50 mg/ml) Bovin Serum Albumin (BSA) standartları (1,5 ml) ve Bradford Boyası (1,5 ml) kullanılarak ultraviyole (UV) spektrofotometresinde, absorbanslar değerleri (594 nm) ölçüldü.

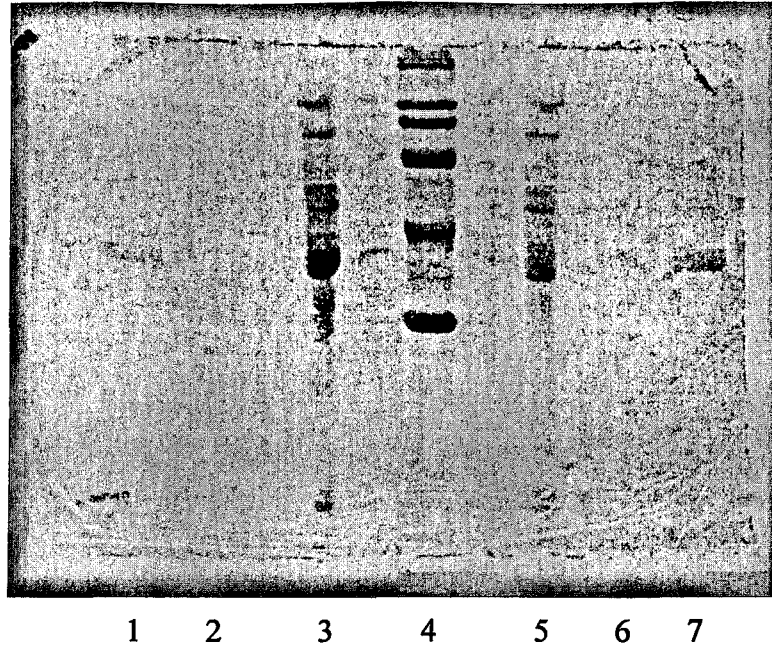
Tablo 4.1: Pectinex Ultra SP-L ve immobilizasyon süzöntülerindeki protein miktarı

Numune	Absorbans (594 nm)	Dilüsyon Faktörü	Protein (mg/ml)
Sıvı Pectinex Ultra SP-L	0,8480	500	11.027
Pectinex Ultra SP-L FTS'nin immobilizasyon Süzöntüsü	0,2290	4	0.022
Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın immobilizasyon Süzöntüsü	0,2290	4	0.022
Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın immobilizasyon Süzöntüsü	0,7235	4	0.075

Örnekler (1.5 ml) Bradford Boyası (1.5 ml) ile karıştırıldıktan sonra, absorbans değerleri ölçüldü ve bu absorbans değerlerine karşılık gelen protein miktarları (mg/ml), Bradford Metodu'na göre çizilen absorbans (594 nm)-protein miktarı (mg/L) grafiğine (Şekil 4.1) ait doğru denkleminde hesaplandı.

4.2. Proteinlerin SDS-Poliakrilamit Jel Elektrophorez Analizi

Şekil 4.2'de görüldüğü gibi, Pectinex Ultra SP-L'deki proteinler ayrılarak bant oluştururken, Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferaz ve glukoamilazın immobilizasyon süzöntülerinde hiç bant yoktur. Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın immobilizasyon süzöntüsünde ise tek bant vardır. Buna göre Pectinex Ultra SP-L proteinlerinin tamamına yakını Eupergit C üzerine bağlanarak immobilize olmuştur. Bu sonuç, enzim aktivitesi kullanıldığında % 100 olarak bulunan immobilizasyon verimi hesabını da doğrulamaktadır.



Şekil 4.2: Pectinex Ultra SP-L ve immobilizasyon süzöntülerindeki proteinlerin SDS-poliakrilamit jel elektroforez analizi. 1: β -galaktosidazın immobilizasyon süzöntüsü (DF 50), 2: fruktoziltransferazın immobilizasyon süzöntüsü (DF 50), 3: Pectinex Ultra SP-L (DF 50), 4: Protein Standartları, 5: Pectinex Ultra SP-L (DF 100), 6: fruktoziltransferazın immobilizasyon süzöntüsü (DF 100), 7: β -galaktosidazın immobilizasyon süzöntüsü (DF 100). Protein Standartları: Myozin (205 kDa), β -galaktosidaz (116 kDa), Fosforilaz b (97.4 kDa), Bovin Serum Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Karbonik Anhidraz (29 kDa).



4.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferaz Kullanarak Fruktooligosakkarit Üretimi

4.3.1. Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferazın Eupergit C ile İmmobilizasyonu

Eupergit C üzerine en yüksek aktivite verimiyle enzim immobilizasyonu için, kullanılan Eupergit C miktarının enzim miktarına oranı optimize edilmek zorundadır. Tablo 4.2’de görüldüğü gibi en yüksek aktivite verimi 400 mg Eupergit C kullanıldığında elde edildi. Daha düşük miktarlarda Eupergit C kullanıldığında, enzim moleküllerinin hepsi bağlanamadığı için aktivite verimi düşük olmaktadır. Daha yüksek miktarlarda Eupergit C kullanılması ise, enzimin aktif bölgesindeki grupların ve üçlü yapısından sorumlu grupların da reaksiyona girmesi sebebiyle düşük aktivite verimi ile sonuçlanmaktadır [Katzir and Kraemer, 2000], [Roehm, 05/95].

Eupergit C üzerinde bulunan epoksi grupları, geniş bir pH aralığında (0-12) enzimlerin çeşitli reaktif grupları (NH₂, SH ve OH) ile reaksiyona girerek onları kovalent olarak bağlayabilirler [Hermanson et al. 1992].

Tablo 4.2: Eupergit C miktarının immobilize FTS’in aktivite verimine etkisi

Eupergit C miktarı (mg)	Aktivite verimi (%)
100	43
200	67
300	74
400	78
600	77
800	75
1000	73

Pectinex Ultra SP-L (200 µL), sodyum fosfat tamponunda (5 ml, 1 M, pH 6) farklı miktarlarda (100-1000 mg) Eupergit C ile oda sıcaklığında(25 °C) 24 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilize edildi.

Eupergit C ile enzim immobilizasyonu için en uygun tampon çözelti pH'sının, genellikle çalışılan enzimin optimum aktivite gösterdikleri pH olması tavsiye edilmekle beraber, bazı enzimler optimum pH'larının dışındaki pH'larda da yüksek verimle immobilize edilmiştir [Katzir and Kraemer, 2000]. Örneğin, *B. circulans* β -galaktozidazın optimum pH'sı 5 iken en yüksek aktivite verimi pH 7.5'te elde edilmiştir [Hernaiz and Crout, 2000]. Pectinex Ultra SP-L FTS'in optimum pH aralığı 5.5-6.5 olduğu halde, en yüksek aktivite verimi pH 8'de elde edildi (Tablo 4.3). Enzimlerin Eupergit C ile immobilizasyonunda, 1 M'lık fosfat tampon çözelti tavsiye edilmekle beraber, molaritedeki değişme aktivite verimini oldukça etkileyebilmektedir [Roehm, 05/95]. Örneğin, *B. circulans* β -galaktozidazın Eupergit C ile immobilizasyonunda en yüksek aktivite verimi, tampon çözelti derişimi 1 M olduğunda elde edilmiştir [Hernaiz and Crout, 2000]. Tablo 4.4'te görüldüğü gibi deneylerde, fosfat tampon çözelti derişiminin 0.025 M'dan 1 M'a yükselmesiyle, Pectinex Ultra SP-L FTS'in immobilizasyonunda da aktivite verimi % 14'ten % 80'e yükselmiş, ancak derişim 2.5 M'a yükseldiğinde aktivite verimi % 19'a düşmüştür. Yüksek tampon çözelti derişimi ise, enzim ile matriks arasında oluşan non-kovalent bağları kopararak enzimin aktif haldeki konformasyonunu almasını sağlar. Çok yüksek tampon çözelti derişimi, enzimin üçlü yapısını sağlayan non-kovalent bağları (iyonik bağ ve hidrojen bağı) da kopardığı için aktivite azalır [Katzir and Kraemer, 2000].

Tablo 4.3: Tampon çözelti pH'sının immobilize FTS'in aktivite verimine etkisi

pH	Aktivite verimi (%)
5	74
6	75
7	78
8	80
9	70

Pectinex Ultra SP-L (200 μ L), pH'ları farklı (5-9) sodyum fosfat tamponunda (5 ml, 1 M), Eupergit C (400 mg) ile oda sıcaklığında (25 °C) 24 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilize edildi.

Tablo 4.4 : Tampon çözelti derişiminin immobilize FTS'in aktivite verimine etkisi

Derişim (M)	Aktivite verimi (%)
0.025	14
0.25	20
0.5	68
1.0	80
1.5	58
2.0	28
2.5	19

Pectinex Ultra SP-L (200 µL), molaritesi farklı (0.025- 2.5 M) sodyum fosfat tamponunda (5 ml, pH 8) Eupergit C (400 mg) ile oda sıcaklığında (25 °C), 24 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilize edildi.

Eupergit C ile enzim immobilizasyonunda, immobilizasyon verimi ve immobilize enzimin operasyonel kararlılığı, immobilizasyon süresine de bağlıdır. Optimum süre 24-100 saat arasındadır [Katzir and Kraemer, 2000]. Maksimum bağlanma ve aktivite verimi için, süre 72-96 saat arasında olmalıdır [Roehm, 05/95]. İmmobilizasyon süresinin 12 saatten 96 saate çıkarılması sonucu, Pectinex Ultra SP-L FTS'in aktivite verimi % 67'den % 96'ya yükselmiştir (Tablo 4.5).

En uygun Eupergit C miktarı başlangıçta tespit edilmişti. Ancak, optimizasyon sonucunda pH, molarite ve süre değiştiğinden, optimum Eupergit C miktarında bir değişme olup olmadığını tespit etmek için, optimum immobilizasyon şartlarında farklı miktarlarda Eupergit C kullanılarak yeniden immobilizasyon yapıldı. Tablo 4.6'ya göre, optimum şartlarda da en yüksek immobilizasyon verimi, 400 mg Eupergit C kullanılarak elde edildi. Sonuç olarak, immobilizasyon şartları optimize edilerek Pectinex Ultra SP-L FTS, % 100 immobilizasyon verimi ve % 96 aktivite verimi ile Eupergit C üzerine kovalent olarak immobilize edildi.

Tablo 4.5: İmmobilizasyon Süresinin aktivite verimine etkisi

Süre (saat)	Aktivite verimi (%)
12	67
24	80
48	89
72	93
96	96

Pectinex Ultra SP-L (200 µL), sodyum fosfat tamponunda (1 M, 5 ml, pH 8) Eupergit C (400 mg) ile oda sıcaklığında (25 °C), değişik sürelerle (12-96 saat) muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilize edildi.

Tablo 4.6: Optimum immobilizasyon pH'sında (8) Eupergit C miktarının immobilize FTS'in aktivite verimine etkisi

Eupergit C miktarı (mg)	Aktivite verimi (%)
100	68
200	88
300	92
400	96
600	90
800	83
1000	69

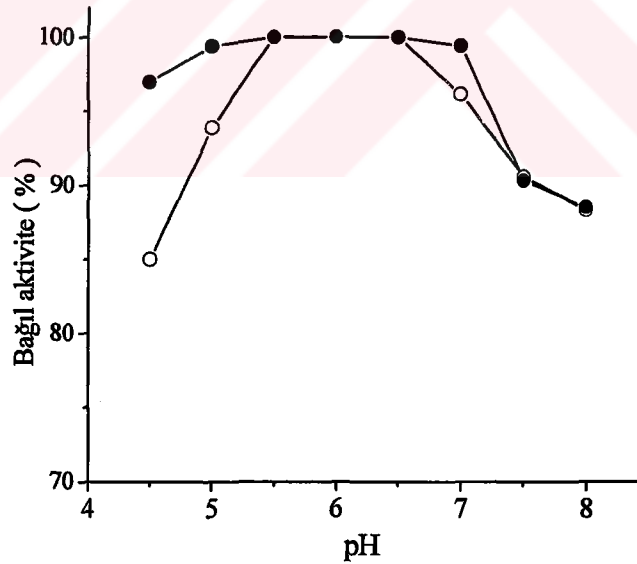
Pectinex Ultra SP-L (200 µL), sodyum fosfat tamponunda (5 ml, 1 M, pH 8) farklı miktarlarda (100-1000 mg) Eupergit C ile oda sıcaklığında (25 °C) 96 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilize edildi.

4.3.2. Eupergit C Üzerine İmmobilize Edilen Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferazın Alginat Kapsülünde Hapsedilmesi

Molekül ağırlığı 300 bin dalton olan enzimler bile, kalsiyum alginat kapsülleri içerisinde immobilize edildiklerinde, reaksiyon sırasında kapsülden kaçarak aktivitenin azalmasına yol açmaktadırlar [Tanrıseven ve Doğan, 2001]. Literatürde, Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferazın kalsiyum alginat kapsülleri içerisinde immobilizasyonu ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferaz kalsiyum alginat kapsülleri içerisinde immobilize edildiğinde, her biri 1 saat süren üç reaksiyon sonunda, aktivite % 20'ye düştü. Ancak, önce Eupergit C üzerine kovalent olarak immobilize edilen Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferaz, daha sonra kalsiyum alginat kapsülü içerisinde hapsedildiğinde, her biri 1 saat süren üç reaksiyon sonunda aktivitede hiç azalma olmadı.

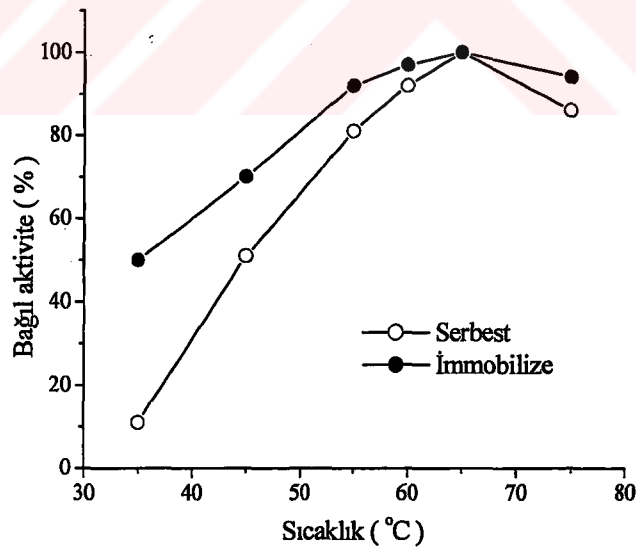
4.3.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferazın Karakterizasyonu

Pectinex Ultra SP-L FTS'nin optimum pH aralığı 5.5-6.5 olup, immobilizasyondan etkilenmemiştir (Şekil 4.3). Bu değerler diğer FTS'lar ile de uyumludur. Farklı mikroorganizmalardan elde edilen FTS'ların optimum pH aralığının 5.0-6.5 olduğu çok sayıda çalışmada rapor edilmiştir [Yun, 1996]. Şekil 4.3'e göre ayrıca, immobilize enzim 4.5-5.5 pH aralığında serbest enzimden daha yüksek aktiviteye sahiptir. immobilizasyon, optimum pH aralığını değiştirmemiştir. *A. niger* ve *A. japonicus* FTS'ların epoksi grupları taşıyan metakrilamid bazlı polimerik matriks üzerine immobilizasyonunda [Chiang and Lee, 1997] ve *Lentinula edodes* lakkaz'ın Eupergit C ile immobilizasyonunda da optimum pH değişmemiştir [D'annibale, 2000].

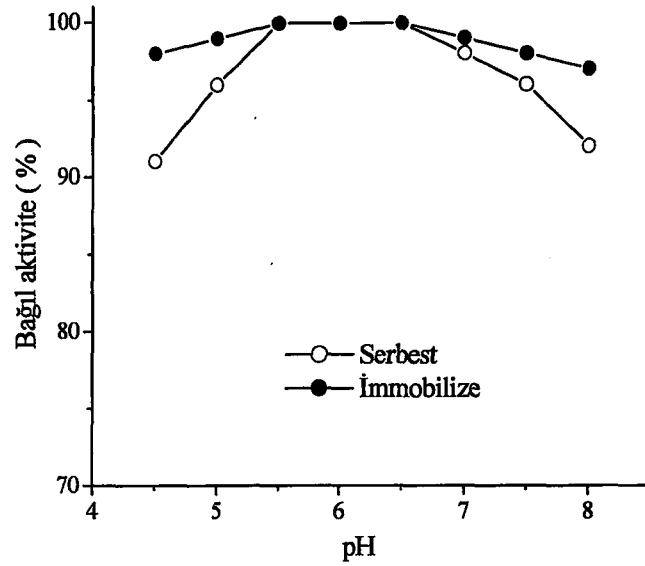


Şekil 4.3: Pectinex Ultra SP-L FTS'nin aktivitesine pH'nın etkisi. Sıvı (200 µL) ve immobilize (1.43 g) enzimler, % 60'luk (w/v) şükroz çözeltisi (10 ml) ile, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 255 rpm), farklı pH'larda (4.5-8.0) 1 saat reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi (pH 4.5-5.5 için kalsiyum asetat; 6.0-8.0 için imidazol tampon çözeltileri kullanıldı).

Pectinex Ultra SP-L FTS'in aktivitesine sıcaklığın etkisi, Şekil 4.4'te görülmektedir. Serbest ve immobilize enzimin her ikisi için de optimum sıcaklık 65 °C olup, immobilizasyondan etkilenmemiştir. Mikroorganizmalardan elde edilen FTS'ların optimum sıcaklık aralığı 50-60 °C arasındadır [Yun, 1996]. Buna göre Pectinex Ultra SPL FTS'in optimum sıcaklığı diğer FTS'lara göre 5 °C daha yüksektir. Şekil 4.4'te, immobilize enzimin 75 °C'de serbest enzimden daha kararlı olduğu görülmektedir. Pectinex Ultra SP-L FTS'in kararlılığına pH'nın etkisi, Şekil 4.5'te görülmektedir. Immobilizasyon, enzimin optimum pH kararlılığını değiştirmezken, daha düşük ve daha yüksek pH'lardaki kararlılığını artırmıştır. Eupergit C ile enzim immobilizasyonunda optimum şartların değişmediğine ve enzimin kararlılığının arttığına dair raporlara, literatürde sıklıkla rastlanmaktadır [Katzir and Kraemer, 2000], [Roehm, 05/95]. Örneğin, *A. niger* ve *A. japonicus* FTS'ların epoksi grupları taşıyan metakrilamid bazlı polimerik matris üzerine immobilizasyonunda [Chiang and Lee, 1997] ve *Lentinula edodes* Laccase'in Eupergit C ile immobilizasyonunda da optimum sıcaklık değişmemiştir [D'annibale, 2000].

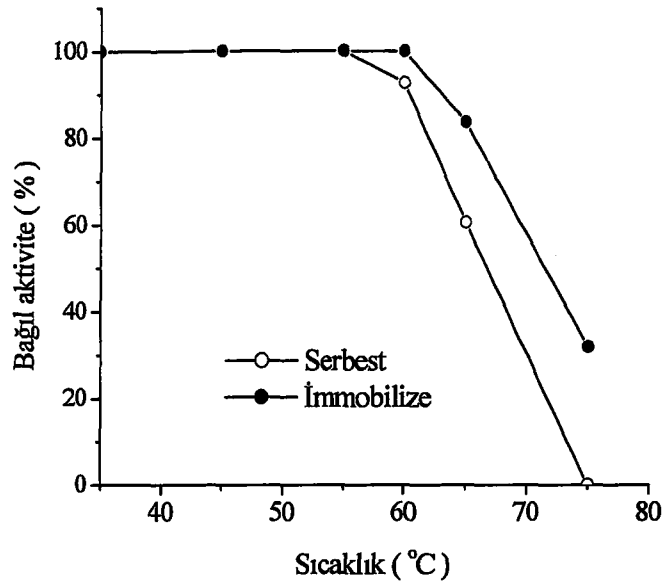


Şekil 4.4: Pectinex Ultra SP-L FTS'in aktivitesine sıcaklığın etkisi. Sıvı (200 µL) ve immobilize (1.43 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ile hazırlanan % 60'lık (w/v) süktroz çözeltisi (10 ml) ile, su banyosunda (çalkalama hızı 255 rpm), farklı sıcaklıklarda (35-75 °C) 1 saat reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi.



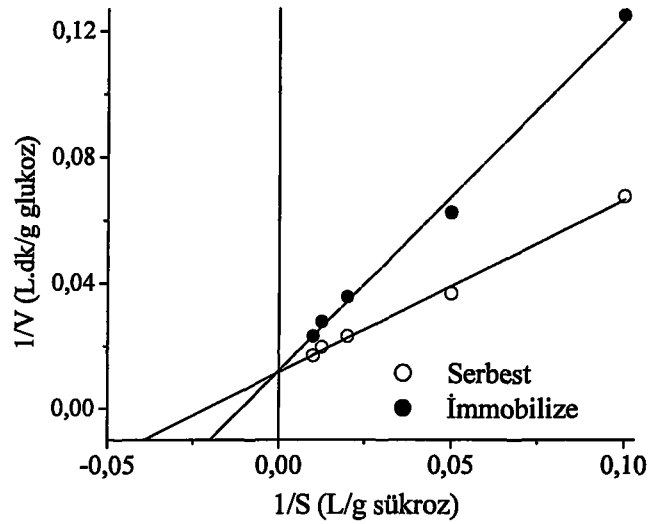
Şekil 4.5: Pectinex Ultra SP-L FTS'in pH kararlılığı. Sıvı (200 µL) ve immobilize (1.43 g) enzimler, farklı pH değerlerinde (4.5-8.0) olan tampon çözeltilerde (2.5 ml, 25 mM) oda sıcaklığında (25 °C) 1 saat bekletildikten sonra buz banyosunda 10 dakika tutuldu (pH 4.5-5.5 için asetat; 6.0-8.0 için imidazol tampon çözeltileri kullanıldı). Daha sonra bu karışımların üzerine kalsiyum asetat tampon çözeltisi (250 mM, pH 5.5) ile hazırlanmış % 80'lik (w/v) süktroz çözeltisi ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 255 rpm) 1 saat reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi

Pectinex Ultra SP-L FTS'in kararlılığına sıcaklığın etkisi, Şekil 4.6'da gösterilmiştir. 35-55 °C aralığında serbest ve immobilize enzimin kararlılıkları aynı iken, daha yüksek sıcaklıklarda immobilize enzim serbest enzimden daha kararlıdır. Serbest enzim 60 °C'de inaktif olmaya başlarken, immobilize enzim aktivitesinin tamamını korumaktadır. Serbest enzim 75 °C'de aktivitesini tamamen kaybederken, aynı sıcaklıkta immobilize enzim aktivitesinin % 30'unu korumuştur.



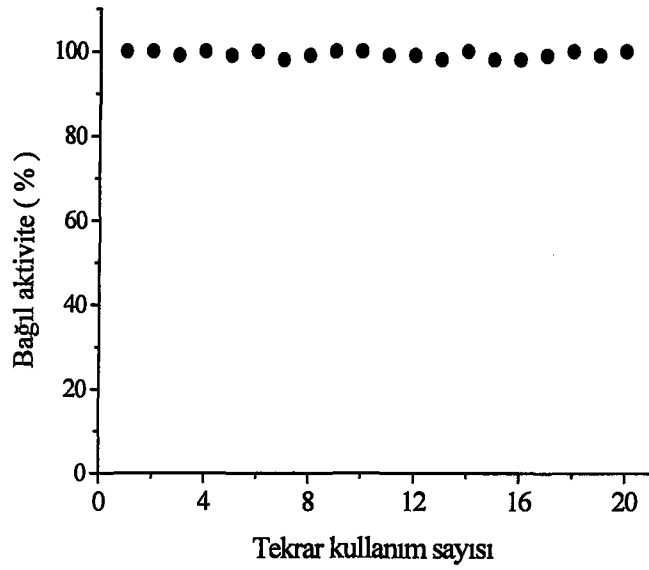
Şekil 4.6: Pectinex Ultra SP-L FTS'in termal kararlılığı. Sıvı (200 µL) ve immobilize (1.43 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltilerinde (2.5 ml, 25 mM, pH 5.5), farklı sıcaklıklarda (35-75 °C) 1 saat bekletildikten sonra buz banyosunda 10 dakika tutuldu. Daha sonra bu karışımların üzerine kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ile hazırlanmış % 80'lik (w/v) süktroz çözeltisi ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 255 rpm) 1 saat reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi.

Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri, Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 4.7) kullanılarak bulundu. İmmobilizasyon, enzimin Michaelis-Menten Sabitini 47 g/L'den 91 g/L'ye yükseltirken, maksimum hızı 86 g glukoz/L.dk.'dan 82 g glukoz/L.dk.'ya düşürmüştür. Bu tür sonuçlara literatürde sıklıkla rastlanmaktadır. Örneğin, *A. niger* fruktoziltransferazın epoksi grupları taşıyan metakrilamid bazlı polimerik matriks üzerine immobilizasyonunda, Michaelis-Menten sabiti 20 g/L'den 30 g/L'ye yükselmiştir [Chiang and Lee, 1997].

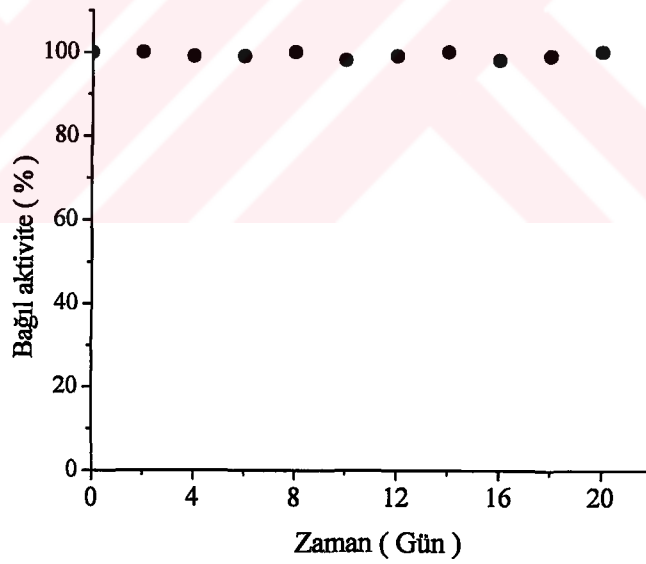


Şekil 4.7: Pectinex Ultra SP-L FTS'in Lineweaver-Burk grafiği. Sıvı (0.5 ml) ve immobilize (3.6 g) enzim, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ile hazırlanmış değişik derişimlerde (% 1-10; w/v) sükkroz çözeltileri (10 ml, pH 5.5) kullanılarak, su banyosunda (60 °C ve 255 rpm) 1 dakika reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon hızının belirlenmesi için oluşan glukoz miktarı tayin edildi.

İmmobilize Pectinex Ultra SP-L FTS'in kullanım kararlılığı Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi immobilize enzim, aktivitesini 20 kullanımdan sonra bile korumaktadır. Ayrıca, İmmobilize Pectinex Ultra SP-L FTS, aktivitesini yirmi gün süresince korumaktadır (Şekil 4.9). Eupergit C ile immobilize enzimler aktivitelerini aylarca bile koruyabilmektedir. Örneğin, Eupergit C immobilize *B. circulans* β -galaktozidaz ve *A. oryzae* α -galaktozidaz 4 ay sonunda aktivitelerinin % 96'dan daha fazlası korunmuştur [Hernaiz and Crout, 2000]. Eupergit C immobilize 5'-fosfodiesteraz ise sürekli kullanımda 500 gün boyunca aktivitesini kaybetmemiştir [Keller et al., 1987].



Şekil 4.8: İmmobilize Pectinex Ultra SP-L FTS'in kullanım kararlılığı. İmmobilize enzim (1.43 g), herbiri 1 saat süren ard arda 20 reaksiyonda kullanılarak aktiviteler tayin edildi. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra 100 ml saf su ile yıkandı.



Şekil 4.9: İmmobilize Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferazın saklama kararlılığı. 20 gün boyunca iki günde bir, İmmobilize enzimin (1.43 gram) aktivitesi tayin edildi. Her kullanımdan sonra, immobilize enzim saf su (100 ml) ile yıkandı ve bir sonraki kullanıma kadar kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (20 ml, 25 mM, pH 5.5) saklandı.

4.3.4. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferaz Kullanarak Kesikli Sistemde Fruktooligosakkarit Üretimi

Reaksiyon sonunda elde edilen ürünün yüzde (w/w) karbonhidrat bileşimi Tablo 4.7’de yer almaktadır. Serbest ve Eupergit C üzerine immobilize edilen Pctinax Ultra SP-L FTS için ürün bileşimi yaklaşık olarak aynı olup, sükroz % 12, glukoz % 28, fruktoz % 2.5, 1-kestoz (GF₂) % 24.5, nistoz (GF₃) %27, fruktofuranozil nistoz (GF₄) % 6.5 ve toplam FOS % 58’dir. Bu sonuçlar diğer FTS’ların ürün bileşimleri ile karşılaştırıldığında, benzerlik göstermektedir [Nishizawa K et al, 2000], [Cruz R. et al., 1998]. Kapsülde immobilize enzimin ürün bileşimi sükroz , glukoz, fruktoz ve toplam FOS bakımından değişmezken, 1-kestoz (GF₂) % 40.38, nistoz (GF₃) % 16.47 ve fruktofuranozil nistoz (GF₄) % 1.14 olarak elde edildi. Buna göre, immobilizasyon enzimin 1-kestoz seçiciliğini artırmaktadır. Kapsülde immobilizasyon bu bakımdan bilime bir yenilik getirmektedir. Ürünleri tekrar substrat olarak kullanılabilen diğer enzimler de alginat kapsülünde immobilize edilerek ürün bileşimi değiştirilebilir.

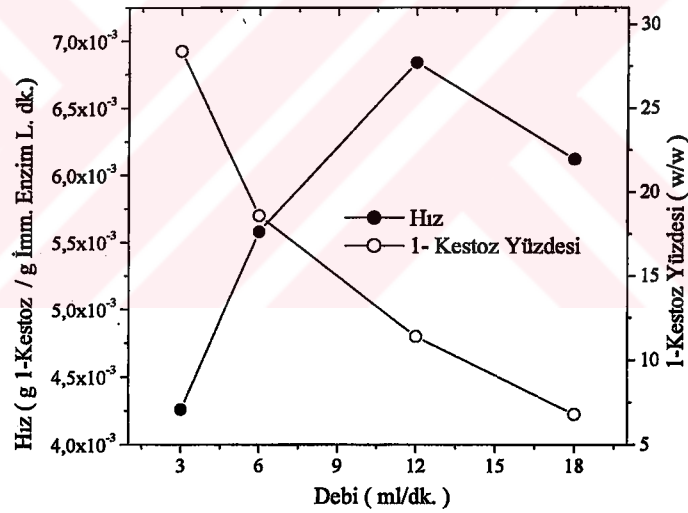
Tablo 4.7: Kesikli sistem kullanılarak FOS üretiminde ürün bileşimi.

Enzim	Karbonhidrat yüzdesi (w/w)						
	Suc	Glc	Fru	GF ₂	GF ₃	GF ₄	ΣFOS
Serbest	11.72	27.92	2.31	24.43	27.22	6.40	58.05
Eupergit-immobilize	12.24	26.81	2.93	24.29	27.19	6.54	58.02
Kapsülde immobilize	12.48	26.32	3.21	40.38	16.47	1.14	57.99

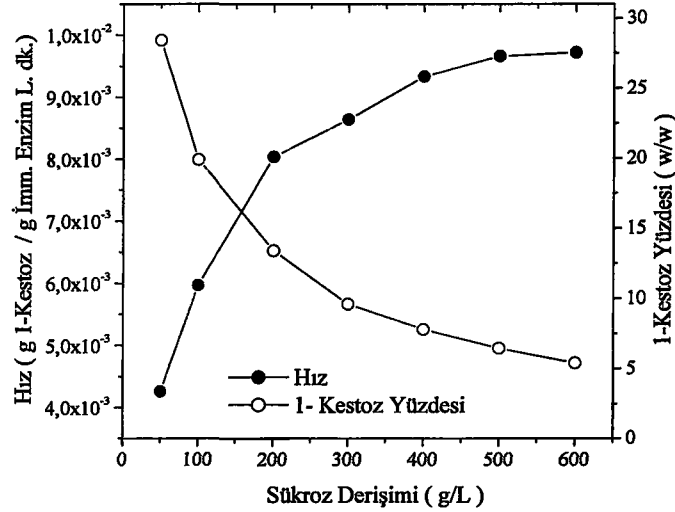
Sıvı (200 µL, 53.8 IU) ve immobilize (1.43 g, 51.6 IU) enzim kullanılarak, standart metoda göre 24 saat reaksiyon gerçekleştirildi ve 4'er saat aralıklarla alınan örneklerdeki karbonhidrat yüzdeleri (w/w), TLC densitometresi kullanılarak tayin edildi

4.3.5. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Fruktoziltransferaz Kullanarak Sürekli Sistemde 1-Kestoz Üretimi

Debinin 1-kestoz verimine etkisi Şekil 4.10'da görülmektedir. Grafikte görüldüğü gibi, en yüksek 1-kestoz oluşum hızına 12 ml/dk'da ulaşılırken, 1-kestoz yüzdesi debi ile ters orantılı olarak azalmaktadır. En yüksek verimle 1-kestoz elde etmek için optimum debi 3 ml/dakikadır. Sükroz derişiminin 1-kestoz verimine etkisi ise Şekil 4.11'de verilmiştir. Grafiğe göre, sükroz derişimi arttırıldığında hız artmakta, ancak 1-kestoz yüzdesi azalmaktadır. Buna göre, en yüksek 1-kestoz yüzdesini elde etmek için optimum sükroz derişiminin 50 g/L olduğu anlaşılmaktadır.

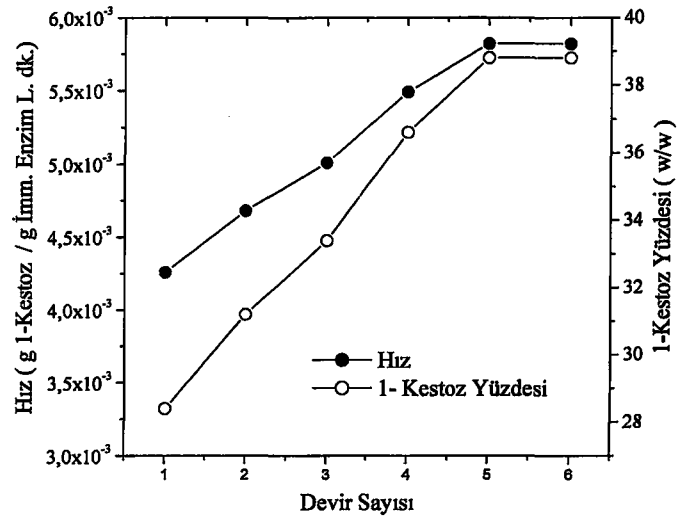
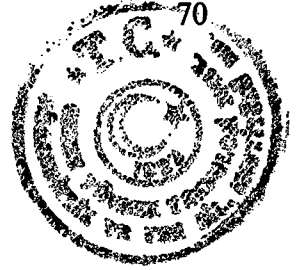


Şekil 4.10: Eupergit C üzerine immobilize edilen enzim (10 g), özel olarak yaptırılan polipropilen (PP) kolona dolduruldu. Su banyosuna (60 °C) yerleştirilen kolondan, kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH 5.5) hazırlanan sükroz çözeltileri (100 ml, 50 g/L), değişik debilerde (3-18 ml/dakika) birer defa geçirildi.



Şekil 4.11: Sükroz derişiminin 1-kestoz verimine etkisi. Eupergit üzerine immobilize edilen enzim (10 g), PP kolona dolduruldu. Su banyosuna (60 °C) yerleştirilen kolondan, kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH 5.5) hazırlanan farklı derişimlerde (50-600 g/L) sükroz çözeltileri (100 ml) 3 ml/dakika hızla kolondan birer defa geçirildi.

Devir sayısının 1-kestoz verimine etkisi de Şekil 4.12’de görölmektedir. Grafiğe göre, hız ve 1-kestoz yüzdesi zamanla artarak beşinci devir sonunda maksimum düzeye ulaşarak sabit kalmıştır. Ürün karışımında, % 47.4 sükroz, % 38.8 1-kestoz ve % 13.8 glukoz vardır. Yan ürün olarak oluşan glukoz, FOS oluşumunu yarışmalı olarak inhibe ettiğinden, sükrozun tamamı reaksiyona girmemektedir [Yun, 1996]. Yaklaşık olarak 2.5 saat süren reaksiyon sonunda, optimum şartlarda (pH 5.5, sıcaklık 60 °C) 100 ml sükroz çözeltisinden (50 g/L), 1.94 g 1-kestoz elde edildi.



Şekil 4.12: Devir sayısının 1-kestoz verimine etkisi. Eupergit C üzerine immobilize edilen enzim (10 g), PP kolona dolduruldu. Su banyosuna (60 °C) yerleştirilen kolondan, kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH 5.5) hazırlanan süktroz çözeltisi (100 ml, 50 g/L), 3 ml/dakika hızla ard arda 6 kez geçirildi.

4.4. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak Galaktooligosakkarit ve Laktozsuz Süt Üretimi

4.4.1. Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidazın Eupergit C ile İmmobilizasyonu

Pectinex Ultra SP-L, β -galaktozidaz aktivitesine de sahip olduğundan, FOS üretimi için elde edilen Eupergit C-İmmobilize Pectinex Ultra SP-L'nin β -galaktozidazın aktivitesi tayin edildi. Aktivite verimi çok düşük ($\sim$ % 10) olduğu için, immobilizasyon şartları β -galaktozidaz için yeniden optimize edildi.

Tampon çözelti pH'sının Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın aktivite verimine etkisi Tablo 4.8'de görülmektedir. Optimum aktivite verimi Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın optimum aktivite gösterdiği pH'da (4.5) elde edildi. Tampon çözelti molaritesinin 0.025'ten 1.5'e yükselmesiyle, aktivite verimi % 63'ten % 109'a çıkmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.10'da görüldüğü gibi, en yüksek verim 200 mg Eupergit C ile elde edilmiştir. Pectinex Ultra SP-L FTS'da olduğu gibi, daha yüksek miktarlarda Eupergit C kullanıldığında aktivite veriminde azalma görülmektedir.

Tablo 4.8: Tampon çözelti pH'sının β -galaktozidazın aktivite verimine etkisi

pH	Aktivite verimi (%)
4.5	107
5.5	98
6.5	94
7.5	90

Pectinex Ultra SP-L (200 μ L), pH'ları farklı (4.5-7.5) sodyum fosfat tamponunda (5 ml, 1 M), Eupergit C (200 mg) ile oda sıcaklığında (25 °C) 24 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilize edildi.

Tablo 4.9: Tampon çözelti derişiminin β -galaktozidazın aktivite verimine etkisi

Tampon derişimi (M)	Aktivite verimi (%)
0.025	63
0.25	73
0.5	84
1.0	107
1.5	109
2.0	99
2.5	89

Pectinex Ultra SP-L (200 μ L), molaritesi farklı (0.025- 2.5 M) sodyum fosfat tamponunda (5 ml, pH 4.5) Eupergit C (200 mg) ile oda sıcaklığında (25 $^{\circ}$ C), 24 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilize edildi.

Tablo 4.10: Eupergit C miktarının β -galaktozidazın aktivite verimine etkisi

Eupergit C (mg)	Aktivite verimi (%)
100	94
200	109
300	103
400	99
600	91
800	81
1000	68

Pectinex Ultra SP-L (200 μ L), sodyum fosfat tamponunda (5 ml, 1.5 M, pH 4.5) farklı miktarlarda (100-1000 mg) Eupergit C ile oda sıcaklığında (25 $^{\circ}$ C) 24 saat muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilize edildi.

Tablo 4.11’de görüleceğı gibi, aktivite verimi 24 saat immobilizasyon sonunda % 109 iken, 120 saat sonunda % 124’e yükselmiştir. İmmobilizasyondan sonra süzüntülerdeki aktivite tayini yapıldığında, 120 saatlik immobilizasyon sonunda süzüntüde aktivite olmadığı görüldüğünden, immobilizasyonun % 100 olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 4.11: İmmobilizasyon süresinin β -galaktozidazın aktivite verimine etkisi

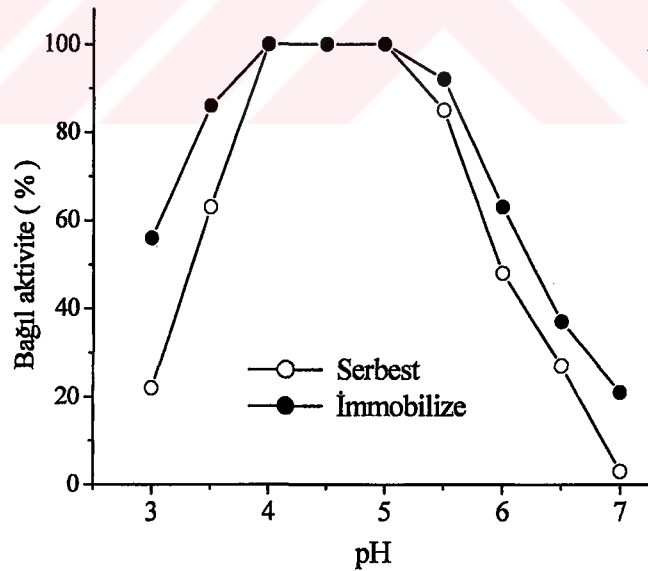
İmmobilizasyon süresi (saat)	Aktivite verimi (%)
24	109
48	116
72	120
96	123
120	124

Pectinex Ultra SP-L (200 μ L), sodyum fosfat tamponunda (1 M, 5 ml, pH 4.5) Eupergit C (200 mg) ile oda sıcaklığında (25 °C), değişik sürelerle (24-120 saat) muamele edilerek (150 rpm çalkalama hızıyla) immobilize edildi.

Aktivite veriminin % 100'ün üzerinde olması şaşırtıcıdır, ancak literatürde benzer sonuçların görüldüğü çalışmalar vardır. Örneğin, *S. levendulae* penisilin açılazın Eupergit C ile immobilizasyonunda % 144'lük aktivite verimi elde edilmiştir [Torres-Bacete et al, 2000]. Elde edilen bu İmmobilizasyon verimi, diğer kaynaklardan elde edilen β -galaktozidaz'lar ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Örneğin, *Aspergillus oryzae* β -galaktozidaz'ın pamuklu kumaş üzerine immobilizasyonunda elde edilen aktivite verimi % 95'tir [Albayrak ve Yang, 2002].

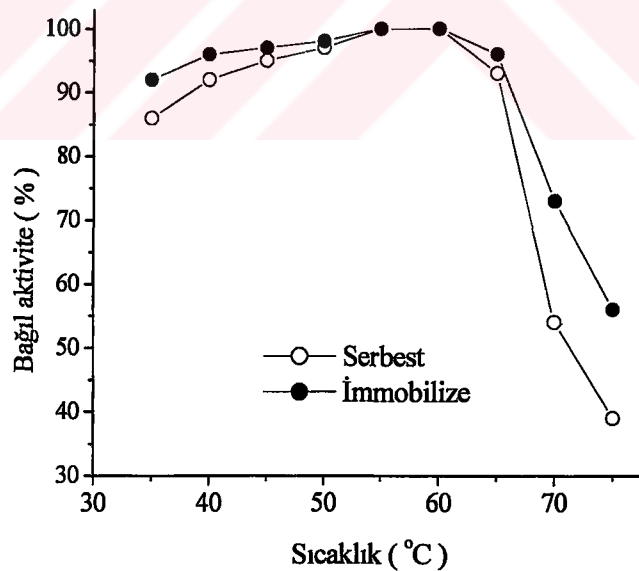
4.4.2. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidazın Karakterizasyonu

Şekil 4.13 incelendiğinde, immobilizasyon sonunda optimum pH aralığının değiştiği görülmektedir. Serbest ve İmmobilize Pectinex Ultra SP-L ile galaktooligosakkarit üretimi için optimum pH aralığının 4,0-5,0 olduğu görülmektedir. Galaktooligosakkarit üretiminde, *A. oryzae*, *B.circulans*, *T.aquaticus*, *K. Lactis* ve *B.singularis*'ten elde edilen β -galaktozidazların optimum pH'ları sırasıyla 4.5, 6.0, 4.6, 7.0 ve 3.7-4.8'dir [Shin et al., 1998], [Sheu et al., 1998], [Albayrak ve Yang, 2002]. Fruktoziltransferaz aktivitesinde olduğu gibi, immobilizasyon Pectinex Ultra SP-L'nin β -galaktozidaz aktivitesinde de optimum pH aralığını değiştirmemiş, buna karşılık düşük ve yüksek pH'lara karşı kararlılığı artırmıştır (Şekil 4.13 ve Şekil 4.15). Polietilenimin kullanarak pamuklu kumaş üzerine immobilizasyonunda da *A. oryzae*'den elde edilen β -galaktozidazın optimum pH'sı immobilizasyondan etkilenmemiştir [Albayrak ve Yang, 2002].



Şekil 4.13: Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın aktivitesine pH'nın etkisi. Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzimler, % 5'lik (w/v) laktoz çözeltisi (10 ml) ile, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm), farklı pH'larda (3.0-7.0) 1 saat reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi (pH 3.0-5.5 için kalsiyum asetat; 6.0-7.0 için imidazol tampon çözeltileri kullanıldı).

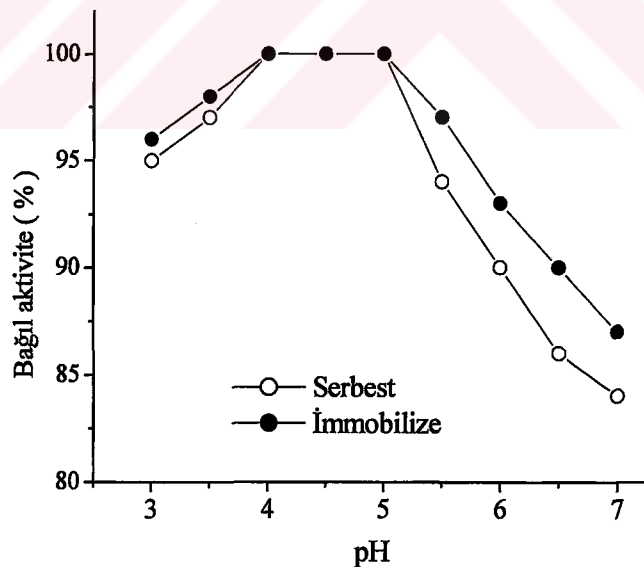
Şekil 4.14'e göre, serbest ve immobilize Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın optimum sıcaklık aralığının 55-60 °C olduğu görülmektedir. *A. oryzae*, ve *B. circulans* β -galaktozidazların optimum sıcaklıkları 40 °C, *B. singularis* ve *K.* β -galaktozidazların optimum sıcaklıkları 45 °C ve *T. aquaticus* β -galaktozidazın optimum sıcaklığı ise 70 °C'dir [Shin et al., 1998], [Sheu et al., 1998], [Albayrak ve Yang, 2002]. Bu sonuçlara göre Pectinex Ultra SP-L'de bulunan β -galaktozidaz diğerlerinden farklıdır. Optimum pH aralığının değişmemesine benzer şekilde, Pectinex Ultra SP-L FTS'da olduğu gibi, immobilizasyon sonunda Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın da optimum sıcaklık aralığı değişmemiş, buna karşılık yüksek sıcaklığa karşı kararlılığı artmıştır (Şekil 4.14 ve Şekil 4.16). *A. Oryzae* β -galaktozidazın polietilenimin kullanarak pamuklu kumaş üzerine immobilizasyonunda ve *B. singularis* β -galaktozidazın chitosan beadleri içerisinde immobilizasyonunda da optimum sıcaklık değişmemiştir [Albayrak ve Yang, 2002], [Shin et al., 1998].



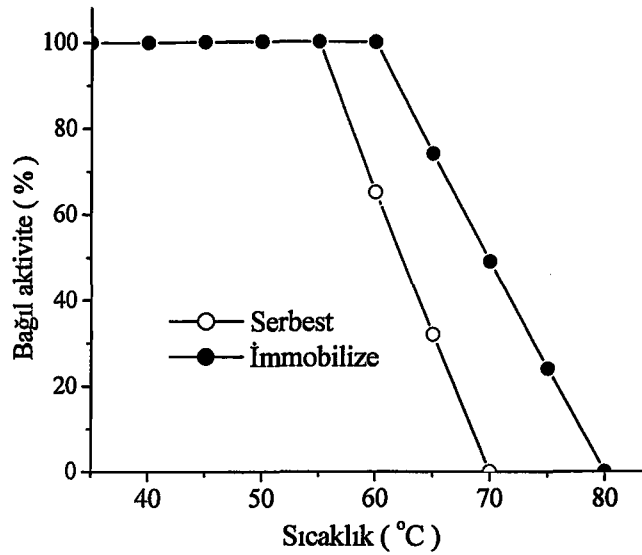
Şekil 4.14: Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın aktivitesine sıcaklığın etkisi. Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 4.5) ile hazırlanan % 5'lik (w/v) laktoz çözeltisi (10 ml) ile, su banyosunda (çalkalama hızı 200 rpm), farklı sıcaklıklarda (35-75 °C) 1 saat reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi.

Şekil 4.15'e göre 4.0-5.5 pH aralığında serbest ve immobilize Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın kararlılığı en yüksektir. Eupergit C üzerine immobilize edilen çok sayıda enzimde olduğu gibi [Katzir and Kraemer, 2000], [Roehm, 05/95], immobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz da, düşük ve yüksek pH'larda, serbest enzimden daha kararlıdır (Şekil 4.13 ve Şekil 4.15).

Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın kararlılığına sıcaklığın etkisi Şekil 4.16'da gösterilmiştir. 60 °C'de serbest enzimin aktivitesinin yaklaşık % 40'ı kaybolurken, aynı sıcaklıkta immobilize enzimin aktivitesinin tamamını korunmuştur. Serbest enzim, 70 °C'de aktivitesinin tamamını kaybederken, immobilize enzim 80 °C'de tamamen inaktif olmaktadır. Bu sonuçlara göre immobilizasyon, enzimin termal kararlılığını artırmıştır. *A. oryzae* β -galaktozidaz'ın pamuklu kumaş üzerine kovalent immobilizasyonunda da enzimin termal kararlılığında artış olmuştur [Albayrak and Yang, 2002]. Eupergit C ile immobilizasyonda enzimlerin termal kararlılıklarının artması bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [Katzir and Kraemer, 2000], [Roehm, 05/95].

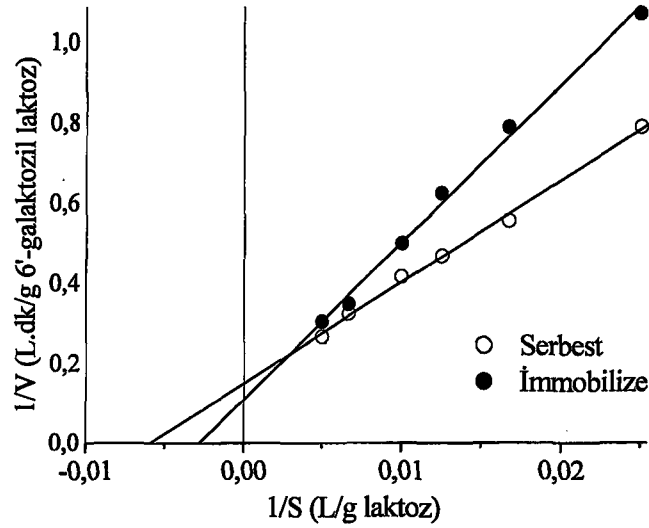


Şekil 4.15: Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın pH kararlılığı. Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzimler, farklı pH değerlerinde (3.0-7.0) olan tampon çözeltilerde (5 ml, 25 mM) oda sıcaklığında (25 °C) 1 saat beklendikten sonra buz banyosunda 10 dakika tutuldu (pH 3.0-5.5 için asetat; 6.0-7.0 için imidazol tampon çözeltileri kullanıldı). Daha sonra bu karışımların üzerine kalsiyum asetat tampon çözeltisi (250 mM, pH 4.5) ile hazırlanmış % 10'luk (w/v) laktoz çözeltisi (5 ml) ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm) 1 saat reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi



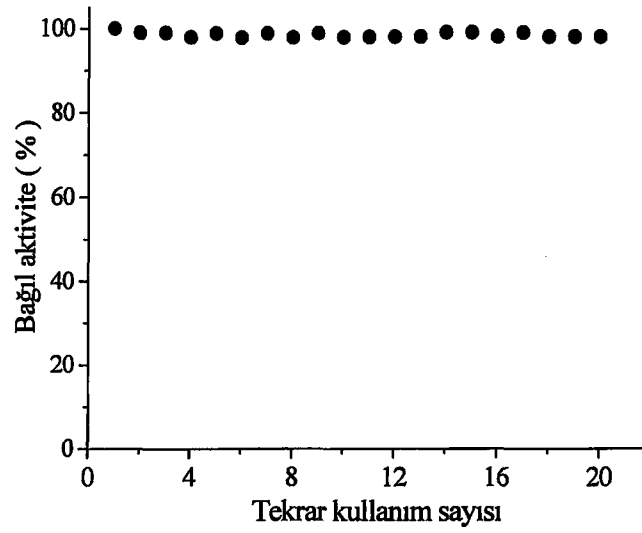
Şekil 4.16: Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın termal kararlılığı. Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzimler kullanılarak, kalsiyum asetat tampon çözeltilerinde (5 ml, 25 mM, pH 4.5), farklı sıcaklıklarda (35-75 $^{\circ}$ C) 1 saat bekletildikten sonra buz banyosunda 10 dakika tutuldu. Daha sonra bu karışımların üzerine, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ile hazırlanmış % 10'luk (w/v) laktoz çözeltisi ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 $^{\circ}$ C, çalkalama hızı 200 rpm) 1 saat reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi.

Kinetik parametreler, oluşan 6'-galaktozillaktoz ve Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 4.17) kullanılarak tespit edildi. immobilizasyon, Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın Michaelis-Menten sabitini (K_m) 161 g/L'den 313 g/L'ye yükseltirken, maksimum hızını (V_{max}) 6.2 g 6'-galaktozillaktoz/L.dk'dan 7.7 g 6'-galaktozillaktoz/L.dk'ya yükseltmiştir. Maksimum hızdaki bu artış serbest enzime göre % 24'e karşılık gelmektedir. Enzimlerin Eupergit C ile immobilizasyonunda genellikle K_m yükselirken V_{max} düşmektedir. Ancak bazı enzimlerde, immobilizasyon maksimum hızı artırmıştır. Örneğin, *S. levendulae* penisilin açılazın Eupergit C ile immobilizasyonunda da K_m sabiti 3 mM'dan 7.6 mM'a yükselirken maksimum hız serbert enzime göre % 44 artmıştır [Torres-Bacete et al, 2000].

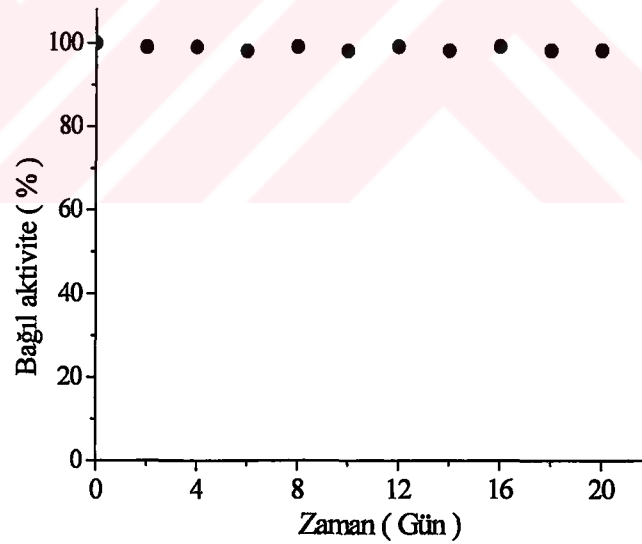


Şekil 4.17: Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın lineweaver-burk grafiği. Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzim, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 4.5) ile hazırlanmış değişik derişimlerde (% 4-20; w/v) laktoz çözeltileri (10 ml) kullanılarak, su banyosunda (60 °C ve 200 rpm) 3 dakika reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon hızının belirlenmesi için, oluşan 6'-galaktozil laktoz miktarı tayin edildi.

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi immobilize enzim, herbiri 1 saat süren reaksiyonlarda ard arda 20 kez kullanıldığında, aktivitesinin % 98'ini korumaktadır. Ayrıca Şekil 4.19'da görüldüğü gibi, immobilize enzim 20 gün sonra bile aktivitesinin % 98'ini korumaktadır. Aktivitedeki % 2'lik bu azalma, her bir kullanımdan sonra immobilize enzimin tekrar kullanım için süzülmesi sırasında bir miktar enzimin süzgeç üzerinde kalmasından ve reaksiyon sonunda alınan örnek içinde de bir miktar immobilize enzim bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, gerçekte yirmi kullanım sonunda bile immobilize enzimi aktivitesi korunmaktadır.



Şekil 4.18: İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın kullanım kararlılığı. İmmobilize enzim (0,71 g), herbiri 1 saat süren 20 reaksiyonda kullanılarak aktiviteler tayin edildi. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra 100 ml saf su ile yıkandı.



Şekil 4.19: İmmobilize Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferazın saklama kararlılığı. İmmobilize enzim (0,71 g), herbiri 1 saat süren 20 reaksiyonda kullanılarak aktiviteler tayin edildi. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra 100 ml saf su ile yıkandı.

4.4.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak Galaktooligosakkarit Üretimi

Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidazın ürün bileşimi, diğer β -galaktozidazlardan farklıdır. Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidaz laktozdan sadece bir trisakkarit olan 6'-galaktozil laktozu oluşturmaktadır [Del-Val et al., 2001], [Del-Val and Otero C., 2003]. Tablo 4.12'de görüldüğü gibi, 16 saatlik reaksiyon sonunda elde edilen ürün içerisindeki 6'-galaktozil laktoz derişimi, sıvı ve immobilize enzim için sırasıyla % 12.8 (w/w) ve % 15.8 (w/w)'dir. Buna göre immobilizasyon, 6'-galaktozil laktoz veriminde % 24'lük bir artışla sonuçlanmıştır. İmmobilizasyon sonunda ayrıca, laktozun kullanım oranını da % 31.8'den % 38.6'ya yükselmiştir. Laktoz kullanımı ve oluşan GOS verimi, kullanılan enzime ve immobilizasyon metoduna göre değişmektedir. Örneğin, chitosan beadleri üzerine immobilize edilen *Bullera singularis* β -Galaktozidaz ile, laktozun % 73'ü kullanılarak % 55 (w/w) oranında GOS elde edilmiştir [shin et al., 1998]. Pamuklu kumaş üzerine immobilize *Aspergillus oryzae* β -Galaktozidaz ile, laktozun % 50'si kullanılarak % 25-26 (w/w) oranında GOS elde edilmiştir [Albayrak ve Yang, 2002]. Chitosan beadleri üzerine immobilize *Aspergillus oryzae* β -Galaktozidaz ile, laktozun % 70'i kullanılarak % 15 (w/w) oranında GOS elde edilmiştir [Sheu et al., 1998].

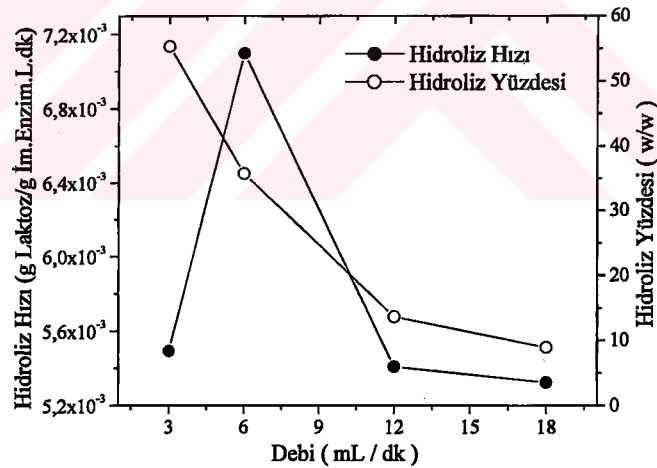
Tablo 4.12: GOS üretiminde ürün bileşimi

Enzim	Karbonhidrat yüzdesi (w/w)			
	Laktoz	GOS	Glukoz	Galaktoz
Serbest	68.2	12.8	11.8	7.2
İmmobilize	61.4	15.8	14.2	8.6

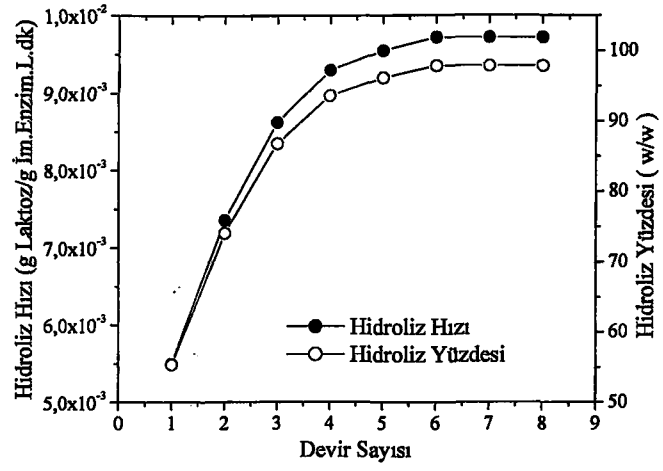
Sıvı (200 μ L) ve immobilize (0.71 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 4.5) ile hazırlanan % 5'lik (w/v) laktoz çözeltisi (10 ml) ile, su banyosunda (60 °C, çalkalama hızı 200 rpm), 16 saat reaksiyona sokuldu.

4.4.4. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L β -Galaktozidaz Kullanarak Laktozsuz Süt Üretimi

Şekil 4.20’de görüldüğü gibi, en yüksek laktoz hidroliz hızı 6 ml/dk’da elde edilirken, hidroliz yüzdesi debi ile ters orantılı olarak azalmaktadır. Debi 3ml/dakika olduğunda laktozun % 55’i hidroliz olurken, debi 18 ml/dakika’ya çıkarıldığında hidroliz oranı % 10’a düşmektedir. Benzer sonuçlar literatürde de yer almaktadır. Örneğin, çelik elek üzerinde mangan alginat jeli içerisinde immobilize edilen *Kluyveromyces lactis* hücreleri kullanılarak laktozsuz süt üretiminde de, sütteki laktozun hidroliz yüzdesi debinin artması ile azalmaktadır [Genari et al., 2003]. Şekil 4.21’e göre, laktozun hidroliz oranı, geçen devir sayısı ile orantılı olarak artmaktadır. Laktozun % 55’i birinci devirde hidroliz olmaktadır. Hidroliz oranı devir sayısına bağlı olarak artmakta ve altıncı döngüden sonra, % 98’de sabit kalmaktadır.



Şekil 4.20: Debinin laktoz hidrolizine etkisi. İmmobilize enzim (14,2 g) PP kolona dolduruldu ve akış hızının laktoz hidrolizine etkisini belirlemek için, süt (100 ml) kolondan (60 °C) değişik debilerde (3-18 ml/dakika) birer defa geçirildi.



Şekil 4.21: Devir sayısının laktoz hidrolizine etkisi. İmmobilize enzim (14,2 g) PP kolona dolduruldu ve devir sayısının etkisinin belirlenmesi için, süt (100 ml) kolondan ard arda 8 kez geçirildi.

4.5. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilaz Kullanarak Glukoz Üretimi

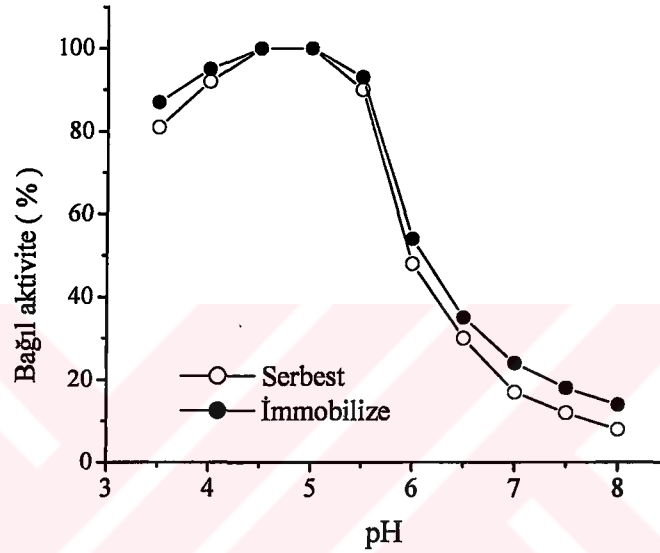
4.5.1. Pectinex Ultra SP-L Glukoamilazın Eupergit C ile İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon, Eupergit C (400 mg) ve Pectinex Ultra SP-L'nin (200 μ L), fosfat tamponu çözeltisi içinde (1 M, pH 8) 96 saat reaksiyonuyla (150 rpm hızıyla çalkalayarak) gerçekleştirildi. Süzüntüde aktivite bulunmadığından immobilizasyon verimi % 100 olarak kabul edildi. Aktivite verimi ise % 95 olarak hesaplandı.

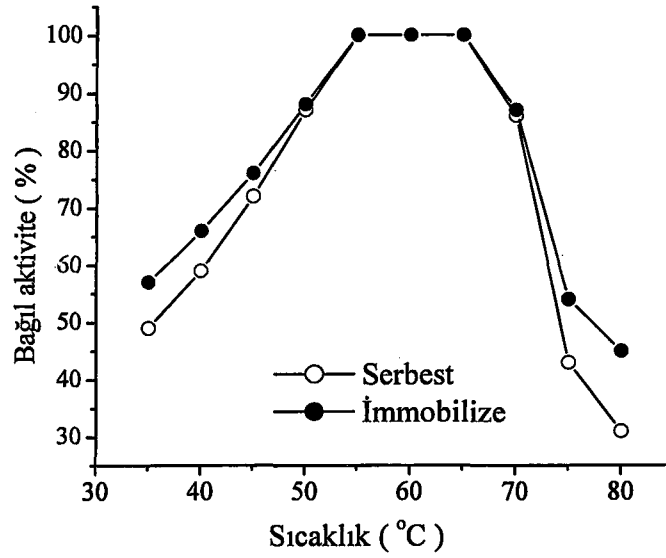


4.5.2. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilazın Karakterizasyonu

İmmobilizasyon immobilize Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın optimum pH ve optimum sıcaklık aralığını değiştirmemiştir. Optimum pH aralığı 4.5-5.0 (Şekil 4.22) ve optimum sıcaklık aralığı 55-65 °C'dir (Şekil 4.23).

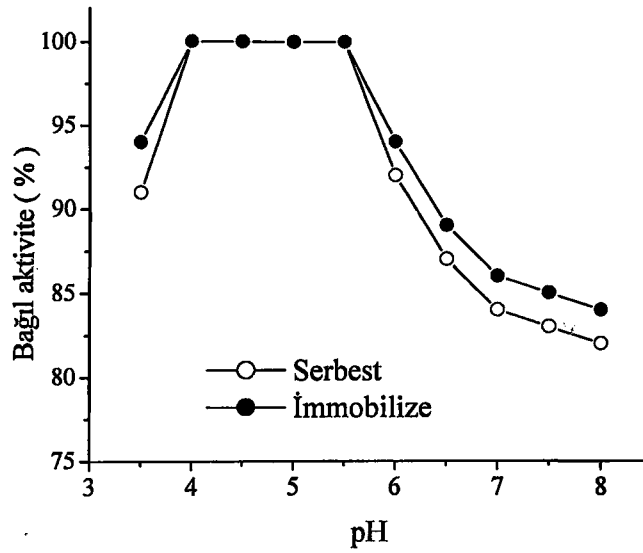


Şekil 4.22: Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın aktivitesine pH'nın etkisi. Sıvı (200 µL) ve immobilize (1.43 g) enzimler, % 5'lik (w/v) maltodekstrin çözeltisi (20 ml) ile, su banyosunda (sıcaklık 60 °C, çalkalama hızı 200 rpm), farklı pH'larda (3.5-8.0) 15 dakika reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi (pH 3.5-5.5 için kalsiyum asetat; 6.0-8.0 için imidazol tampon çözeltileri kullanıldı).

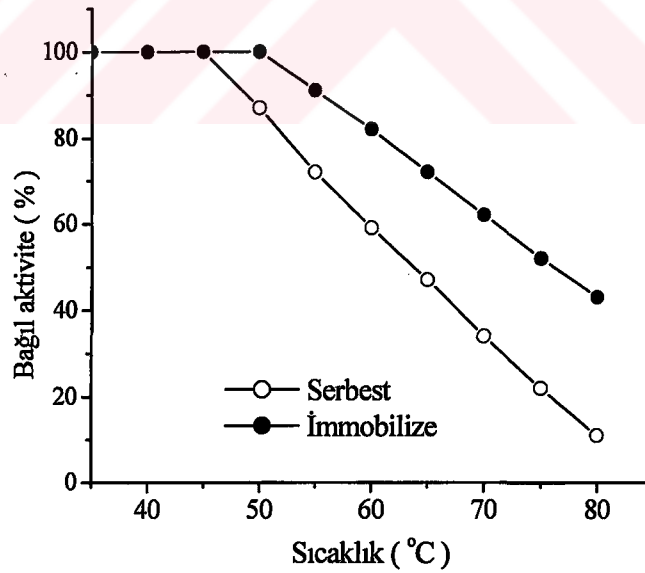


Şekil 4.23: Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın aktivitesine sıcaklığın etkisi. Sıvı (200 µL) ve immobilize (1.43 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.0) ile hazırlanan % 5'lik (w/v) maltodekstrin çözeltisi (20 ml) ile, su banyosunda (çalkalama hızı 200 rpm), farklı sıcaklıklarda (35-80 °C) 15 dakika reaksiyona sokularak aktiviteler tayin edildi.

Eupergit C ile immobilizasyon, Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferaz ve β -galaktozidaz da olduğu gibi glukoamilazın da pH ve termal kararlılığını kararlılığını artırmıştır. Serbest ve immobilize enzim 4.0-5.5 pH aralığında kararlıdır. Düşük ve yüksek pH'larda ise immobilize enzim daha kararlıdır (Şekil 4.24). Serbest enzim 50 °C'de aktivitesinin yaklaşık % 15'ini kaybederken, immobilize enzim aynı sıcaklıkta aktivitesinin tamamını korumaktadır. Serbest enzim, 80 °C'de aktivitesinin % 90'ını kaybederken, aynı sıcaklıkta immobilize enzim aktivitesinin yaklaşık % 40'ını korumuştur (Şekil 4.25).

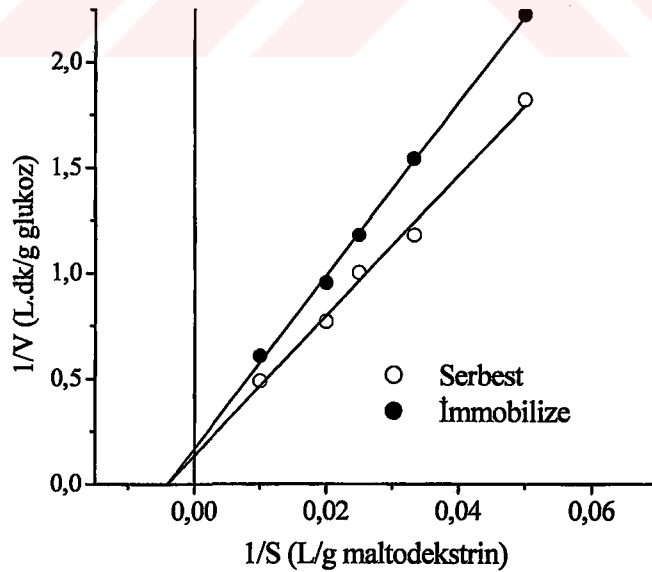


Şekil 4.24: Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın pH kararlılığı. Sıvı (200 μ L) ve immobilize (1.43 g) enzimler, farklı pH değerlerinde (3.5-8.0) olan tampon çözeltilerde (10 ml, 25 mM) oda sıcaklığında (25 $^{\circ}$ C) 15 dakika bekletildikten sonra, buz banyosunda 10 dakika tutuldu (pH 3.5-5.5 için asetat; 6.0-8.0 için imidazol tampon çözeltileri kullanıldı). Daha sonra bu karışımların üzerine kalsiyum asetat tampon çözeltisi (250 mM, pH 5.0) ile hazırlanmış % 10'luk (w/v) maltodekstrin çözeltisi (10 ml) ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 $^{\circ}$ C, çalkalama hızı 200 rpm) 15 dakika reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi.

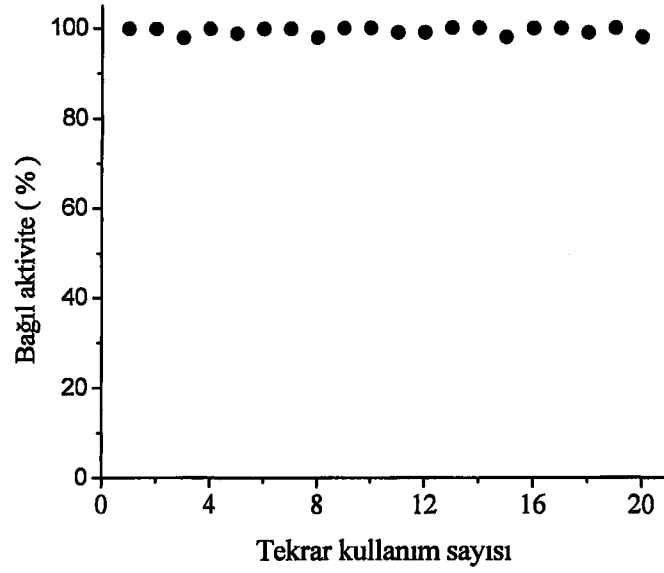


Şekil 4.25: Pectinex Ultra SP-L glukoamilazın termal kararlılığı. Sıvı (200 μ L) ve immobilize (1.43 g) enzimler, kalsiyum asetat tampon çözeltilerinde (10 ml, 25 mM, pH 5.0), farklı sıcaklıklarda (35-80 $^{\circ}$ C) 15 dakika bekletildikten sonra, buz banyosunda 10 dakika tutuldu. Daha sonra bu karışımların üzerine kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.5) ile % 10'luk (w/v) maltodekstrin çözeltisi (10 ml) ilave edilip, su banyosunda (sıcaklık 60 $^{\circ}$ C, çalkalama hızı 200 rpm) 15 dakika reaksiyon gerçekleştirilerek aktiviteler tayin edildi.

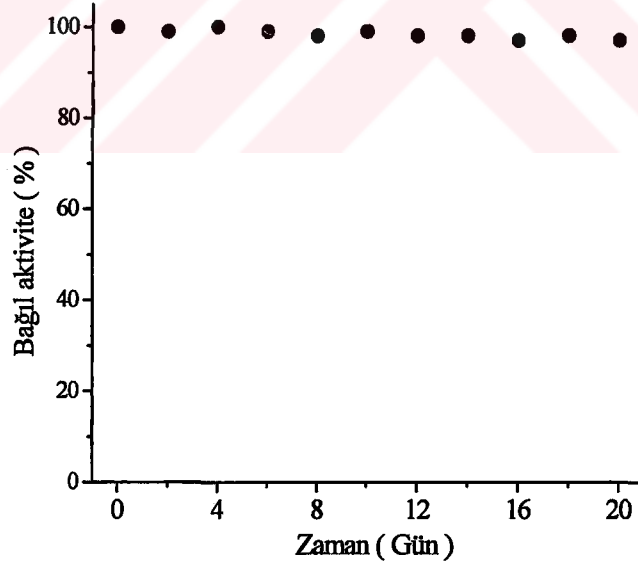
Kinetik parametreler, Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak tespit edildi (Şekil 4.26). İmmobilizasyon, enzimin Michaelis-Menten sabitinin (K_m) değerini 170 g/L'den 200 g/L'ye yükseltirken maksimum hızı (V_{max}) 5.43 g glukoz/L.dk.'dan 5.12 g glukoz/L.dk.'ya düşürmüştür. Her biri 15 dakika süren peş peşe 20 reaksiyon sonunda, immobilize enzim aktivitesinin % 98'ini korumaktadır (Şekil 4.27). Ayrıca, immobilize enzim 20 gün sonra bile, aktivitesinin % 97'sini korumaktadır (Şekil 4.28). Bu durum farklı glukoamilazların immobilizasyonunda da görülmektedir. Örneğin, *Aspergillus niger* glukoamilazın baggase dialdehit selüloz üzerine kovalent immobilizasyonu % 36 verimle sonuçlanmış ve nişastadan glukoz üretiminde peşpeşe 30 defa kullanıldığında, 15. kullanım sonunda aktivite başlangıçtaki değerinin % 65'ine düştükten sonra 30. kullanıma kadar sabit kalmıştır [Varavinit et al., 2001]. *Aspergillus niger* glukoamilaz'ın jelatin ile kovalent immobilizasyonunda % 85 aktivite verimi elde edilmiş, immobilize enzim 30 kullanım sonunda bile aktivitesini korumuştur. Ayrıca, aktivite 30 güne kadar korunmuş, ancak 60 gün sonra % 90'a, 90 gün sonra da % 70'e düşmüştür [Ölçer, 2004].



Şekil 4.26: Pectinex Ultra SP-L glukoamilazının Lineweaver-Burk grafiği. Sıvı (200 μ L) ve immobilize (1.43 g) enzim, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.0) ile hazırlanmış değişik derişimlerde (% 2-10; w/v) maltodekstrin çözeltileri (20 ml) kullanılarak, su banyosunda (60 °C ve 200 rpm) 1 dakika reaksiyon gerçekleştirildi.



Şekil 4.27: İmmobilize Pectinex Ultra SP-L glucoamilazın kullanım kararlılığı. İmmobilize enzim (1.43 g), herbiri 15 dakika süren 20 reaksiyonda kullanılarak aktiviteler tayin edildi. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra 100 ml saf su ile yıkandı.



Şekil 4.28: İmmobilize Pectinex Ultra SP-L glucoamilazın saklama kararlılığı. 20 gün boyunca iki günde bir, immobilize enzimin (1.43 gram) aktivitesi tayin edildi. Her kullanımdan sonra, immobilize enzim saf su (100 ml) ile yıkandı ve bir sonraki kullanıma kadar kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (20 ml, 25 mM, pH 5.0) saklandı.

4.5.3. İmmobilize Pectinex Ultra SP-L Glukoamilaz Kullanarak Glukoz Üretimi

Optimum şartlarda (sıcaklık 60 °C, pH 5.0), sıvı ve immobilize enzim ile % 5'lik (w/v) maltodekstrin çözeltisinin (20 ml) 2 saat süren reksiyonu sonunda, % 100 verimle glukoz elde edildi.

İmmobilize Pectinex Ultra SP-L glukoamilaz, aktivitesini 20 gün süresince kararlılığını korumaktadır ve optimum pH (5.0) ile optimum sıcaklığı (60 °C), endüstriyel olarak nişastadan glukoz üretiminde kullanılan *A. niger* α -amilaz ile aynıdır. Endüstriyel olarak nişastadan glukoz üretiminde *A. niger* α -amilaz ile birlikte, *A. niger* glukoamilaz kullanılmaktadır, ancak optimum pH'sı 4.5 ve optimum sıcaklığı 50 °C olduğundan, üretim sırasında pH ve sıcaklığın değiştirilmesi zorunluluğu vardır. Bu nedenle, immobilize Pectinex Ultra SP-L endüstriyel olarak, nişastadan glukoz üretiminde *A. niger* α -amilaz ile birlikte kullanılabilir.



5. GENEL SONUÇ

Ticari bir enzim karışımı olan Pectinex Ultra SP-L içinde bulunan enzimlerden fruktoziltransferaz, β -galaktozidaz ve glukoamilaz, Eupergit C üzerine başarılı bir şekilde immobilize edilerek, ticari önemi olan fruktooligosakkarit, galaktooligosakkarit, laktozsuz süt ve glukoz üretiminde kullanıldı. Pectinex Ultra SP-L, *Aspergillus aculeatus* 'tan elde edilir ve endüstriyel olarak meyve sularındaki pektini parçalamak için yaygın olarak kullanılır. Karışımda pektini parçalayan pektinazın yanında, poligalakturonaz, ksilinaz, fruktoziltransferaz ve β -galaktozidaz da vardır. Ancak, literatürde Pectinex Ultra SP-L'nin glukoamilaz aktivitesi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışma üç bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde, Pectinex Ultra SP-L fruktoziltransferaz % 100 bağlanma ve % 95 aktivite verimi ile immobilize edilerek, fruktooligosakkarit üretiminde kullanıldı. İmmobilizasyon, enzimin optimum pH ve sıcaklığını değiştirmedir. Buna karşılık, immobilizasyon enzimin pH ve sıcaklığa karşı kararlılığını attırdı. İmmobilize enzim, 20 gün süresince aktivitesini korudu. Eupergit C üzerine immobilize edilen enzim, kesikli sistemde serbest enzimle aynı bileşimde ürün verirken, kalsiyum alginat içerisinde hapsedildiğinde serbest enzimden daha fazla 1-kestoz ve nistoz elde edildi. Fruktofuranozil nistoz ise oluşmadı. Eupergit C üzerine immobilize edilen enzim sürekli sistemde kullanıldığında, seçici olarak 1-kestoz elde edildi.

İkinci bölümde Pectinex Ultra SP-L β -galaktozidaz % 100 bağlanma ve % 124 aktivite verimi ile immobilize edildi. İmmobilizasyon, enzimin optimum pH ve sıcaklığını değiştirmedir. Buna karşılık, immobilizasyon enzimin pH ve sıcaklığa karşı kararlılığını attırdı. İmmobilize enzim, 20 gün süresince aktivitesini korudu. İmmobilize enzim kullanılarak, serbest enzimden % 24 (w/w) oranında daha fazla 6'-galaktozil laktoz elde edildi. Ayrıca immobilize enzim kullanılarak, sütteki laktozun % 98'i hidroliz edildi.

Üçüncü bölümde, Pectinex Ultra SP-L'inin glukoamilaz aktivitesinin de olduğu bulundu. Pectinex Ultra SP-L'inin glukoamilaz, % 100 bağlanma ve % 95 aktivite verimi ile immobilize edildi. İmmobilizasyon, enzimin optimum pH ve sıcaklığını değiştirmedir. Buna karşılık, immobilizzasyon enzimin pH ve sıcaklığa karşı kararlılığını attırdı. İmmobilize enzim, 20 gün süresince aktivitesini korudu. İmmobilize enzim kullanılarak maltodekstrinden % 100 verimle glukoz elde edildi.

Sonuç olarak immobilize Pectinex Ultra SP-L'nin, ticari önemi olan fruktooligosakkarit, galaktooligosakkarit, laktozsuz süt ve glukozun endüstriyel üretimlerinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu bulundu.

KAYNAKLAR



1. Albayrak N, Yang ST. Immobilization of β -galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galactooligosaccharides from lactose. *Biotechnol. Prog* 2002;18:240-51.
2. Amirul AA, Khoo SL, Nazalan MN, Razip MS, Azizan MN. Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol (Praha)* 1996;41(2):165-74.
3. Blandino A, Macias M, Cantero D. Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules. *Enzyme and Microbial Technology* 2000;27:319-24
4. Blandino A, Macias M, Cantero D. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. *Proc Biochem* 2001;36: 601-6.
5. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding *Anal. Biochem.* 1976;72:248-54.
6. Campbell JM, Bauer LL, Fahey GC, Jr., Hogarth AJCL, Wolf BW, Hunter DE. Selected fructooligosaccharide (1-kestose, Nystose, and 1^F- β -fructofuranosylnystose) composition of foods and feeds. *J. Agric. Food Chem* 1997;45:3076-82.



7. Canlı O. Yeni bir metotla maltogenaz enziminin immobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü 2003.
8. Carrea G, Corcelli A, Palmisano G, Riva S. Preparation of 3-deacetyl cephalosporins by *Aspergillus niger* lipase. Biotechnology and Bioengineering 1996;52:648-52.
9. Chiang CJ, Lee WC, Sheu DC, Duan KJ. Immobilization of β -fructofuranosidase from aspergillus on metacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides. Biotechnol. Prog. 1997;13:577-82.
10. Chonan O, Matsumoto K, Watanuki M. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone lose in ovariectomized rats. Biosci Biotechnol Biochem 1995;59:236-9.
11. Christensen U. pH-dependence of the fast step of maltose hydrolysis catalysed by glucoamylase G1 from *Aspergillus niger*. Biochem. J. 2000;349:623-8.
12. Chui WK, Wan LSC. Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres. J. Microencapsulation 1997;14(1):51-61
13. Cruz R, Cruz VD, Belini MZ, Belote JG, Vieria CR. Production of fructooligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. Biosource Technol 1998;65:139-43.

14. D'annibale A, Stazi SR, Vinciguerra V, Sermanni GG. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* 2000;77:265-73.
15. Daniel Allen Nadeau MD. Intestinal Warfare: the role of short-chain fructooligosaccharides in health and disease. *Nutrition in Clinical Care* 2000;3:266-73.
16. Deguchi Y, Effects of beta 1-4-galactooligosaccharides administration on defecation of healthy volunteers with tendency to constipation. *Jpn J Nutr* 1997;55:13-22.
17. Del-Val MI, Hill CG, Jimenez-Barbero J, Otero C. Selective enzymatic synthesis of 6'-galactosyllactose by pectinex ultra sp in water, *Biotechnology Letters* 2001;23:1921-4.
18. Del-Val MI, Otero C, Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. *Enzyme and Microbial Technology* 2003;33:118-26.
19. Demir N, Acar J, Sarioglu K, Mutlu M. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment *Journal of Food Engineering* 2001;47(4):275-80.
20. Drevon GF. Enzyme immobilization into polymers and coatings. Ph.D Thesis. University of Pittsburgh 2002



21. Genari AN, Passos FV, Passos FML. Configuration of a bioreactor for milk lactose hydrolysis. J. Dairy Sci. 2003;86:2783-9
22. Gibson GR, Reinfeld MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr 1995;125:1401-12
23. Gilliland SE, Walker DK. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in human. J Dairy Sci 1990;73:905-11
24. Gismondo MR, Drago L, Lombardini A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. International Journal of Antimicrobial Agents 1999;12:287-92.
25. Gomes AMP, and Malcata FX. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food science & Technology 1999;10:139-57.
26. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. Lancet 2003;361:512-9.
27. Gümüşel F, İşsever S, Kabaloğlu S. Prokaryotik sistemlerde gen klonlanması ve ekspresyonu, Lisansüstü Eğitim Kursu Kitapçık'ı. TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gebze, 1997.

28. Hang YD, Woodams EE. Fructosyltransferase activity of commercial enzyme preparation used in fruit processing. *Biotechnology Letters* 1995;17(7):741-4.
29. Hang YD, Woodams EE. Optimization of enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. *Lebensm-Wiss. U-Technol* 1996;29:578-80.
30. Hang YD, Woodams EE. Production of 1-kestose from molasses with commercial juice processing enzyme preparation containing fructosyltransferase. *Biotechnology Letters* 1995;17(11):1167-8.
31. Hayashi S, Kinoshita J, Nogouchi M, Takasaki Y, Imada K. Continuous production of 1-kestose by β -fructofuranosidase immobilized on shirasu porous glass. *Biotechnology Letters* 1991;13(6):395-8
32. Hayashi S, Matsuzaki K, Inomata Y, Takasaki Y, Imada K. Properties of *Aspergillus japonicus* β -fructofuranosidase immobilized on porous silica. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1993;9:216-20.
33. Hayashi S, Sasao S, Takasaki Y, Mada K. Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium* on DEAE-cellulose. *Journal of Industrial Microbiology* 1994;13:103-5.
34. Hayashi S, Tubouchi M, Takasaki Y, Mada K. Long-term continuous reaction of immobilized β -fructofuranosidase. *Biotechnology Letters* 1994;16:227-8.

35. Hayashi S, Tubouchi M, Takasaki Y, Imada K. Long-term continuous of immobilized β -fructofuranosidase. *Biotechnology Letters* 1994;16(3):227-8.
36. Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK. Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press. California. 1992
37. Hernaiz MJ, Crout DHG. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. Circulans* and α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 2000;27:26-32.
38. Katchalski-Katzir E, Kraemer DM. Eupergit® C a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2000;10:157-76.
39. Keller R, Schlingman M, Woernle R. Production of 5'-ribonucleotides using immobilized 5'-phospho-diesterase. *Methods Enzymol* 1987;136:517-22.
40. Klibanov Alexander M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science* 1983;219:722-7
41. Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health. *BJM* 1999;318:999-03.
42. Mahmodian M, Noble D, Drake CS, Middleton RF, Montgomery DS, Piercey JE, Ramlakhan D, Todd M, Dawson MJ. An efficient process for production of N-acetylneuraminic acid using N-acetylneuraminic acid aldolase. *Enzyme and Microbial Technology* 1997;20:393-400.

43. Mateo C, Monti R, Pesella BCC, et al. Immobilization of lactase from *kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Fully hydrolysis of lactose in milk. *Biotechnol. Prog* 2004;20:1259-62
44. McCarthy KC, Rastall RA. Sticking your'ose in it: prebiotics. *Biologist* 2003;50(6):259-62.
45. Mogensen G, Rowland I, Midtvedt T, Fonden R. Functional aspect of pro-and prebiotics. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2000;2:40-4.
46. Moller PL, Jorgensen F, Hansen OC, Madsen SM, Stougaard P. Intra- and extracellular β -galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B . infantis*: molecular cloning, heterologous expression and comperative charecterization. *Applied and Environmental Microbiology* 2001;67(5):2276-83.
47. Mozaffar Z, Nakanishi K, Matsuno R, Kamikubo T. Purification and properties of β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Agricultural Biology and Chemistry* 1984;48:3053-61.
48. Myer zu Düttingdorf HD, Bachmann B, Buchholz M, Leuchtenberger W. Determination of trehalose by flow injection analysis using immobilized trehalase. *Analytical Biochemistry* 1997;253:8-12.
49. Nishizawa K, Nakajima M, Nabetani H. A forced-flow membrane reacto for transfructosylation using ceramic membrane. *Biotechnology and Bioengineering* 2000;68:92-7.

50. Oh J-T, Kim J-H. Preparation and properties of immobilized amyloglucosidase on nonporous ps/pnass microspheres. *Enzyme and Microbial Technology* 2000;27:356-61

51. Onishi N, Tanaka T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Applied and Environmental Microbiology* 1995;61:4026-30.

52. Ölçer Z. İmmobilize Glukoamilaz kullanarak maltodekstrinden glukoz üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek teknoloji Enstitüsü 2004.

53. Petzelbauer I, Kuhn B, Splechtna B, Kulbe KD. Development of an ultrahigh-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. Immobilization of two thermostable β -galactosidases and optimization of a packed-bed reactor for lactose conversion. *Biotechnol. and Bioeng* 2002;77(6):619-31

54. Polakovic M, Bryjak J. Modelling of the kinetics of thermal inactivation of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2002;19-20:443-50.

55. Rejikumar S, Devi S. Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing β -galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly(vinyl alcohol). *International Journal of Food Science and Technology* 2001;36:91-8.

56. Rivero-Urgell M and Santamaria-Orleans A., Oligosaccharides: application in infant food. *Early Human Development* 2001;65:S43-52.

57. Roehm, immobilization of enzymes on Eupergit[®]C and Eupergit[®] C 250 L. 05/95.
58. Sarıoğlu K, Demir N, Acar J, Mutlu M. The use of commercial pectinase in the fruit juice industry. Part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase Journal of Food Engineering 2001;47(4): 271-4.
59. Sheu DC, Li SY, Duan KJ, Chen CW. Production of galactooligosaccharides from lactose by β -galactosidase immobilized on glutaraldehyde-treated chitosan beads. Biotechnology Techniques 1998;12(4):273-6
60. Shin HJ, Park JM, Yang JW, Continuous production of galactooligosaccharides from lactose by *bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. Process Biochemistry 1998;33(8):787-92.
61. Smidsrod O, Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. Tibtech 1990;8:71-7.
62. Suzuki Y, Kaizu H, Yamaguchi Y. Effect of cultured milk on serum cholesterol concentrations in rats fed high-cholesterol diets. Anim Sci Technol 1990;62(6):565-71.
63. Tannock GW. Probiotics: what we know and need to know. Biotechnology Advances 1999;17:691-3

64. Tanrıseven A, Dogan Ş. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry* 2001;36:1081-3
65. Tanrıseven A, Gökmen F. Novel method for the production of a mixture of fructooligosaccharides and isomaltoligosaccharides. *Biotechnology Techniques* 1999;13:207-210.
66. Tanrıseven A, Uludağ YB, Doğan Ş. A novel method for the immobilization of glucoamylase to produce glucose from maltodekstrin. *Enzyme and Microbial Technology* 2002;30 (3): 406-9.
67. Torres-Bacete J, Arroyo M, Torres-Guzman R, De la Mata I, Castillon PM, Acebal C. Covalent immobilization of penicillin acylase from *Streptomyces lavendulae*. *Biotechnology Letters* 2000;22:1011-4.
68. Van Casteren WH, Eimermann M, van den Broek LA, Vincken JP, Schols HA, Voragen AG. Purification and characterisation of a beta-galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39 and B891. *Carbohydr Research* 2000;329(1):75-85.
69. Van den Heuvel EGHM, Muys T, Van Dokkum W, Schaafsma G. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am J Clin Nutr* 1999;69:544-8.
70. Van Laere KMJ, Abee T, Schols HA, Beldman G, Voragen GJ. Charecterization of a novel β -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* 2000;66(4):1379-84.

71. Van Loo J, Cummings J, Delzenne N. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project(DGXII ATRII-CT94-1095). British Journal of Nutrition 1999;81:121-32.
72. Varavinit S, Chaokasem N, Shobsngob S. Covalent immobilization of a glucoamylase to bagasse dialdehyde cellulose. Worl Journal of Microbiology & Biotechnology 2001;17:721-5
73. Yun JW. Fructooligosaccharides-occurance, preparation and application. Enzyme and Microbial Technology 1996;19:107-17.





Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides

Aziz Tanriseven*, Yakup Aslan

Department of Biochemistry, Gebze Institute of Technology, Gebze, 41420 Kocaeli, Turkey

Received 2 November 2004; accepted 1 December 2004

Abstract

Pectinex Ultra SP-L, a commercial enzyme preparation containing fructosyltransferase activity, was immobilized covalently onto Eupergit C and was used for the production of fructooligosaccharides. Immobilization resulted in 96% relative activity. The immobilized enzyme showed no decrease in activity for 20 batch reactions. Optimum conditions were not affected by immobilization, and the optimum pH and temperature for free and immobilized enzyme were 5.5–6.5 and 65 °C, respectively. Immobilized enzyme was more stable at high pH and temperatures. The amount of fructooligosaccharides produced from 60% (w/v) sucrose solution using the free and immobilized enzyme was determined to be approximately 57% of the total sugar in the reaction mixtures. The kinetic parameters for free and immobilized enzyme were also determined. The immobilized Pectinex Ultra SP-L could be used for the production of fructooligosaccharides since the immobilization efficiency is quite high (96%) and immobilized enzyme retains its activity for 20 days without any decrease.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Eupergit C; Immobilization; Fructosyltransferase; Fructooligosaccharides; Pectinex Ultra SP-L

1. Introduction

Fructooligosaccharides, found naturally in such foods as onions, bananas, artichokes, and tomatoes, have biofunctions. They increase the number of *Bifidobacteria*, occur in the human large intestine, contributing many healthful benefits such as immune system activation, resistance to some infections, synthesis of B-complex vitamins, and calcium absorption [1]. Fructooligosaccharides are added in pig and chicken food to improve growth [2]. In humans, they could be used to treat breast cancer, diarrhea, and constipation [3]. In addition, incidence of otitis media could be reduced by daily intake of fructooligosaccharides [4]. These oligosaccharides are calorie free and noncarcinogenic. The reaction leading to the formation of fructooligosaccharides from sucrose could be catalyzed by either immobilized fungal cells having fructosyltransferase activity or immobilized enzymes for the industrial production. Cells of *Aspergillus niger* and *Aureobasidium pullulans* were entrapped in alginate and used for fructooligosaccharide production [5,6]. Porous glass, alginate, ion-exchange

resin, ceramic membrane, and methacrylamide-based reactive polymeric beads containing oxirane groups have been used for immobilization of fructosyltransferases [5,7–9]. Commercial enzyme preparation called Pectinex Ultra SP-L derived from *Aspergillus aculeatus* has several enzymes including pectinase, cellulase, β -galactosidase, and fructosyltransferase [10]. This enzyme preparation has generally been used in fruit juice production [11]. The enzyme preparation has also been used for the production of fructooligosaccharides from sucrose [11,12]. In this work, Pectinex Ultra SP-L was immobilized with high yield onto Eupergit C, and used for the production of fructooligosaccharides. Eupergit C, epoxy-activated acrylic beads, is quite stable and has good mechanical and chemical properties. Enzymes are coupled to Eupergit C covalently via their amino, mercapto, or hydroxyl groups [13,14].

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pectinex Ultra SP-L, a commercial enzyme preparation, was kindly provided by Novo Nordisk. It had 269 IU/mL

* Corresponding author. Tel.: +90 262 754 2360; fax: +90 262 754 2385.
E-mail address: tanriseven@gyte.edu.tr (A. Tanriseven).

fructosyltransferase activity. One IU is defined as the amount of enzyme forming 1 μ mol glucose per min from sucrose (60% w/v) at pH 5.5 at 60 °C. Eupergit C was a gift from Röhm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Germany. Glucose, fructose, and α -naphthol were from Sigma. Calcium acetate and sodium dihydrogen phosphate were purchased from Carlo Erba. Calcium chloride, sulphuric acid, sucrose, sodium azide and imidazole were obtained from Merck. Fructooligosaccharide standards were kindly provided by Meiji Seika Kaisha, Ltd., Japan.

2.2. Methods

2.2.1. Immobilization procedure

Immobilization of fructosyltransferase was carried out by reaction of Eupergit C (400 mg) with Pectinex Ultra SP-L (0.2 mL) in phosphate buffer (5 mL, 1 M, pH 8) at 25 °C with gentle shaking (150 rpm) for 96 h. After immobilization the beads were filtered and washed with distilled water (15 mL) and phosphate buffer (15 mL, 0.1 M, pH 5.5) on a sintered glass filter by suction under vacuum. The wet weight of beads obtained was 1.43 g.

2.2.2. Optimization of immobilization procedure

Optimum conditions for immobilization were determined by changing individually the conditions (pH from 5 to 9; buffer concentration from 0.025 to 2.5 M; duration of immobilization from 12 to 96 h; and amount of Eupergit C from 100 to 1000 mg).

2.2.3. Determination of activity

Sucrose solution (10 mL, 60% w/v) in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.5) was reacted with agitation at 255 rpm with immobilized (1.43 g) or free enzyme (0.2 mL) at 60 °C for 60 min in a water bath. Reaction mixture (50 μ L) was added to distilled water (1950 μ L) and boiled for 10 min to inactivate the enzyme. The amount of glucose formed was determined by a TLC-imaging densitometer technique using a Bio-rad GS 670 densitometer [15].

2.2.4. Analysis of reaction mixture

Thin layer chromatography (TLC) was used for quantitative analysis of carbohydrates. TLC was carried out using three ascents of solvent system of acetonitrile/water (85:15 v/v) on Whatman K5 silica plates. Carbohydrates on TLC plates were visualized by dipping the plates into 5% (v/v) sulphuric acid in ethanol containing 0.5% (w/v) α -naphthol, followed by heating on a hot plate at 110 °C for 10 min. TLC densitometer was used for quantitative determination of carbohydrates.

2.2.5. Determination of optimum temperature, pH, and kinetic parameters

Km, Vm, optimum temperature and pH were determined by changing individually the conditions of activity assay (pH from 4.5 to 8.0; temperature from 35 to 75 °C; and sucrose

concentrations from 1 to 10% (w/v). Buffer solutions of calcium acetate (pH 4.5–5.5) and imidazole (pH 6–8) were used. Initial velocities for kinetic parameters were determined by carrying out the reactions for 1 min. Km and Vm were calculated from Lineweaver–Burk plots.

2.2.6. pH stability

Free (0.2 mL) or immobilized enzyme (1.43 g) was incubated in various buffers (4.5–8.0) at room temperature for 1 h and the remaining activity was determined under standart assay conditions.

2.2.7. Thermal stability

Free (0.2 mL) or immobilized enzyme (1.43 g) was incubated in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.5) at temperatures from 35 to 75 °C for 1 h and then the remaining activity was determined using the standart assay method.

2.2.8. Operational stability of the immobilized Pectinex Ultra SP-L

The operational stability was tested by repeated batch experiments using the method for activity determination.

2.2.9. Production of fructooligosaccharides

Free (0.2 mL) or immobilized enzyme (1.43 g) was reacted with 10 mL of 60% (w/v) sucrose in 25 mM calcium acetate buffer (pH = 5.5) at 60 °C for 24 h and the remaining sucrose concentration was determined with 4-h intervals. The product compositions for free and immobilized enzyme catalyzed reactions were determined in 24-h reaction.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the immobilization procedure

Eupergit C having active epoxy group, is an excellent matrix for immobilization of enzymes [13,14]. Many enzymes have been immobilized onto Eupergit C. Epoxy groups on the matrix react with amino, sulfhydryl and hydroxyl groups of biomolecules depending on pH of the buffer used. Immobilization procedure is quite simple and involves the reaction of Eupergit C beads with aqueous enzyme solution at room temperature or 4 °C for 12–72 h [14]. Immobilization of enzymes onto Eupergit C is affected by amount of Eupergit, duration of immobilization, pH and concentration of buffer used [16,17].

3.2. Effect of the amount of Eupergit C on the immobilization efficiency

Different amounts of support (100–1000 mg) for Pectinex Ultra SP L (200 μ L) were tested. Table 1 shows that the immobilization efficiency, defined as the ratio of activity of immobilized enzyme to the activity of soluble enzyme used in immobilization, was very high (96%) for 400 mg Eupergit C

Table 1
Effect of Eupergit C amount on immobilization efficiency

Eupergit C (mg)	Immobilization efficiency (%)
100	68
200	88
300	92
400	96
600	90
800	83
1000	69

Conditions for immobilization: Pectinex Ultra SP-L (0.2 mL) was reacted with various amounts of Eupergit C in phosphate buffer (5 mL, 1 M, pH 8) with gentle shaking (150 rpm) at 25 °C for 96 h.

at optimum conditions. There was no activity in the filtrate indicating that all the soluble enzyme used for immobilization was bound to the Eupergit. Usage of higher amounts of Eupergit C yielded low immobilization efficiency possibly due to multiple attachments and reaction with groups associated with active site and those responsible for the tertiary structure of the enzyme. High immobilization yield (100%) was also obtained by Chiang and Lee [5] for the immobilization of fructosyltransferase from *A. niger* onto methacrylamide-based polymeric beads carrying epoxy groups.

3.3. Effect of pH of the immobilization buffer

The epoxy groups on Eupergit C can react with various reactive groups of enzymes in a wide pH range (0–12) [13]. Table 2 shows the influence of pH on immobilization. Although optimum pH for both soluble and immobilized enzyme was 5.5–6.5, the highest immobilization efficiency was obtained at pH 8.

3.4. Effect of molarity of the immobilization buffer

Buffer concentration and salts such as sodium sulphate also influence the immobilization efficiency considerably in immobilization using Eupergit C: in our experiments, the immobilization efficiency changed from 14 to 80% in phosphate buffers of 25 mM and 1 M, respectively (Table 3).

3.5. Effect of immobilization time

The duration of immobilization is of importance: the immobilization efficiency increased from 80 to 96% in 24 and 96 h, respectively (Table 4).

Table 2
Influence of pH on immobilization efficiency

pH	Immobilization efficiency (%)
5	74
6	75
7	78
8	80
9	70

Conditions for immobilization: Pectinex Ultra SP-L (0.2 mL) was reacted with Eupergit C (0.4 g) in phosphate buffer (5 mL, 1 M) at different pH with gentle shaking (150 rpm) at 25 °C for 24 h.

Table 3
Effect of buffer concentration on immobilization efficiency

Buffer concentration (M)	Immobilization efficiency (%)
0.025	14
0.25	20
0.5	68
1.0	80
1.5	58
2.0	28
2.5	19

Conditions for immobilization: Pectinex Ultra SP-L (0.2 mL) was reacted with Eupergit C (0.4 g) in phosphate buffer (5 mL, pH 8) at different concentrations with gentle shaking (150 rpm) at 25 °C for 24 h.

Table 4
Effect of duration of coupling on immobilization efficiency

Time (h)	Immobilization efficiency (%)
12	67
24	80
48	89
72	93
96	96

Conditions for immobilization: Pectinex Ultra SP-L (0.2 mL) was reacted with Eupergit C (0.4 g) in phosphate buffer (5 mL, 1 M, pH 8) with gentle shaking (150 rpm) at 25 °C for various amount of time.

3.6. Characterization of immobilized enzyme

The highest immobilization efficiency (96%) was obtained by reacting Pectinex Ultra SP-L (0.2 mL) with Eupergit C (400 mg) stirring at 150 rpm at room temperature for 96 h in phosphate buffer (1 M, pH 8). Under these conditions, there was no activity in the filtrate indicating that all the soluble enzyme used for the immobilization was attached to the matrix. High immobilization efficiency (96%) indicates that almost all the enzyme covalently attached to matrix was active. The immobilized enzyme was characterized: as Fig. 1 shows, immobilization has not changed the optimum pH for activity (5.5–6.5) but immobilized enzyme was more stable at pH in range of 4.5–5.5. pH-stability experiments showed that immobilized enzyme was more stable in pH ranges of 4.5–5.5

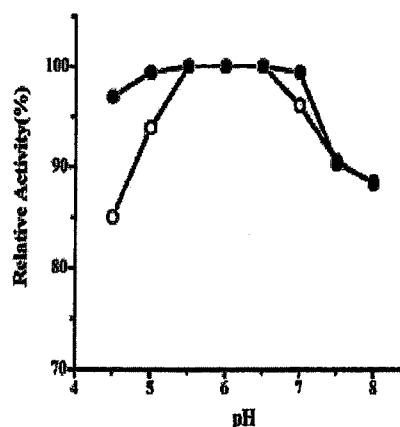


Fig. 1. Effect of pH on the activity of free (○) and immobilized (●) Pectinex Ultra SP-L.

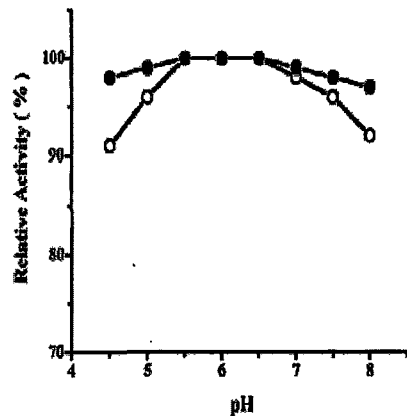


Fig. 2. Effect of pH on stability of free (○) and immobilized (●) Pectinex Ultra SP-L.

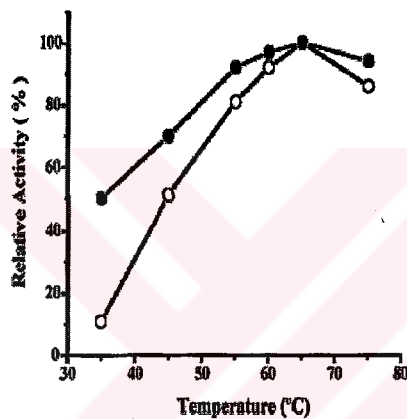


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of free (○) and immobilized (●) Pectinex Ultra SP-L.

and 6.5–8 (Fig. 2). Optimum temperature for both soluble and immobilized enzyme was 65 °C but immobilization enhanced the thermal stability of the enzyme (Figs. 3 and 4). Free enzyme was fully inactivated at 75 °C, whereas immobilized enzyme retained approximately 30% of its activity (Fig. 4). Kinetic parameters were also studied using Lineweaver–Burk plot (Fig. 5). The K_m values for sucrose of free and im-

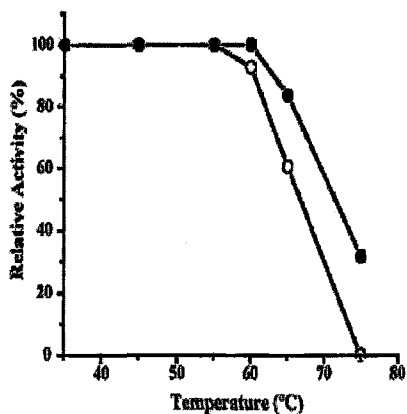


Fig. 4. Thermal stability of free (○) and immobilized (●) Pectinex Ultra SP-L.

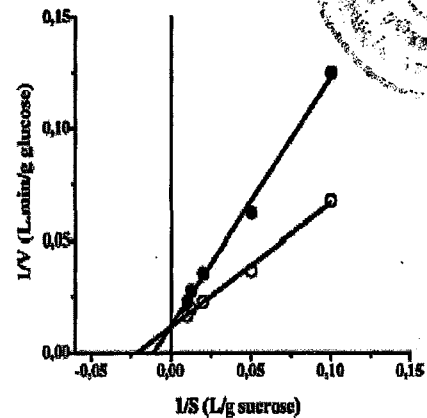


Fig. 5. Lineweaver–Burk plots of free (○) and immobilized (●) Pectinex Ultra SP-L.

bilized enzyme are 47 and 91 g sucrose/L, respectively. V_m for free and immobilized enzyme are found to be 86 and 82 (g glucose/L)/min, respectively. Both free and immobilized enzymes were used for the production of fructooligosaccharides and found that the product compositions were almost the same. The product contained sucrose (11.9%), fructose (2.1%), glucose (28.8%), 1-kestose (23.5%), nystose (27.2%), and fructofuranosyl nystose (6.5%). The amounts of fructooligosaccharides produced by free and immobilized enzyme are 57% of the total carbohydrates in the reaction mixture. This result is comparable to those obtained by immobilized fructosyltransferases from different sources [9,18]. Sucrose consumption during the fructooligosaccharides production by free and immobilized enzyme was similar (Fig. 6). In both cases, most of the sucrose was consumed within 4 h, but all the substrate was not converted to products even in 24 h reaction due to the formation of by-product glucose, which competes with sucrose for the substrate binding site [19,20]. We have used the immobilized enzyme in 20 batch reactions, each lasting for 1 h at 60 °C, and observed that there was no decrease in activity. It was also found that the immobilized enzyme retained its activity for 20 days of operation, determined by activity assays carried out each day. Since the

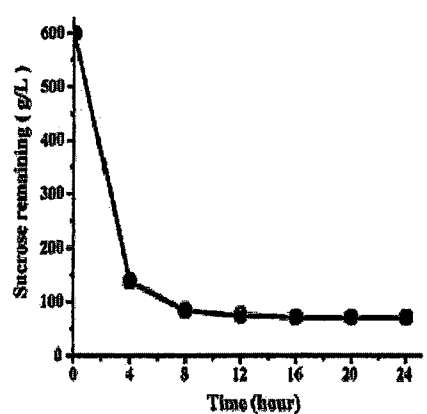
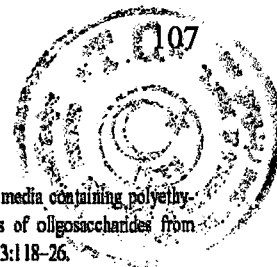


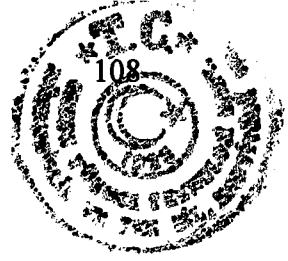
Fig. 6. Sucrose consumption during the fructooligosaccharides production by free (○) and immobilized (●) Pectinex Ultra SP-L.



immobilization efficiency is quite high (96%), and the immobilized enzyme has retained its activity without decrease for 20 days, the Eupergit C immobilized Pectinex Ultra-SP could be used for the industrial production of fructooligosaccharides from sucrose.

References

- [1] Hidaka H, Hirayama M, Yamada K. Fructooligosaccharides, enzymatic preparation and biofunctions. *J Carbohydr Chem* 1991;10:509–22.
- [2] Hashimoto K, Nakazawa T, Hidaka H, Eida T. Feeds for domestic animals and method for breeding them. US Patent 4734402, 1988.
- [3] Roberfroid M, Delzenne N, Coussemont P, Loo JV. Prevention of mammary carcinogenesis and breast cancer treatment. US Patent 5721345, 1998.
- [4] Dohnalek MH, Ostrom KM, Hilty MD. Use of indigestible oligosaccharides to reduce the incidence of otitis media in humans. US Patent 5849324, 1998.
- [5] Chiang CJ, Lee WC. Immobilization of β -fructofuranosidases from *Aspergillus* on metacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides. *Biotechnol Prog* 1997;13:577–82.
- [6] Yun JW, Jung HW, Jeon YJ, Lee JH. Continuous production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. *J Microbiol Biotechnol* 1992;2:98–101.
- [7] Hayashi S, Tobouchi M, Takasaki Y, Imada K. Long-term continuous reaction of immobilized β -fructofuranosidase. *Biotechnol Lett* 1994;16:227–8.
- [8] Hayashi S, Kinoshita J, Nonoguchi M, Takasaki Y, Imada K. Continuous production of l-kestose by β -fructofuranosidase immobilized on shirasu porous glass. *Biotechnol Lett* 1991;13:395–8.
- [9] Nishizawa K, Nakajima M, Nabetani H. A forced-flow membrane reactor for transfructosylation using ceramic membrane. *Biotechnol Bioeng* 2000;68:92–7.
- [10] Del-Val MI, Otero C. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. *Enzyme Microb Technol* 2003;33:118–26.
- [11] Hang YD, Woodams EE. Fructosyltransferase activity of commercial enzyme preparations used in fruit juice processing. *Biotechnol Lett* 1995;17:741–4.
- [12] Hang YD, Woodams EE. Optimization of enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. *Lebensm -Wiss u -Technol* 1996;29:578–80.
- [13] Katchalski-Katzir E, Kraemer DM, Eupergit C. A carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J Mol Catal* 2000;10:157–76.
- [14] Boller T, Meier C, Menzler S. Eupergit oxirane acrylic beads: how to make enzymes fit for biocatalysis. *Org Process Res Develop* 2002;6:509–19.
- [15] Pukl M, Prosek M. Rapid quantitative TLC analysis of sugars using an improved commonly used solvent system. *J Planar Chromatogr* 1990;3:173–6.
- [16] Hernaiz MJ, Crout DHG. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb Technol* 2000;27:26–32.
- [17] Martin MT, Plou FJ, Alcalde M, Ballesteros A. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *J Mol Catal* 2003;21:299–308.
- [18] Cruz R, Cruz VD, Belini MZ, Belote JG, Viera CR. Production of fructooligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. *Biosource Technol* 1998;65:139–43.
- [19] Jung KH, Kim JH, Jeon YJ, Lee JH. Production of high fructo-oligosaccharide syrup with two enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. *Biotechnol Lett* 1993;15:65–70.
- [20] Sheu DC, Duan KJ, Cheng CY, Bi JL, Chen JY. Continuous production of high content fructooligosaccharides by a complex cell system. *Biotechnol Prog* 2002;18:1282–6.



ÖZGEÇMİŞ

1966 yılında Kilis'te doğan Yakup ASLAN, ilk ve orta öğrenimini Gaziantep'in İslâhiye ilçesinde tamamladı.

1988'de Marmara Üniversitesi, Atatürk Eğitim Fakültesi, Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Kimya Eğitimi Ana Bilim Dalı'nda lisans eğitimini tamamlayarak mezun oldu. 1988'de Milli Eğitim Bakanlığı tarafından kimya öğretmenliği görevine atanarak, Trabzon ve Adıyaman'da kimya öğretmenliği yaptı. 1994 yılında, Milli Eğitim Bakanlığı'nın muvafakati ile, Harran Üniversitesi Rektörlüğü tarafından, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne öğretim görevlisi olarak atandı. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans eğitimini 1997'de tamamlayarak mezun oldu. Aynı yıl, Gebze Yüksek teknoloji Enstitüsü Rektörlüğü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından, Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda açılan doktora sınavını kazandı. 1999 yılında Harran Üniversitesi Rektörlüğü tarafından, Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde araştırma görevliliğine atanarak, Yüksek öğretim Kanunu'nun 35. maddesi gereğince, araştırma görevlisi olarak Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Rektörlüğü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü emrine görevlendirildi. Askerlik görevini 2000-2001 yıllarında, İzmir Maltepe Askeri Lisesi'nde Asteğmen Kimya Öğretmeni olarak yaptı.

Halen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Rektörlüğü, Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak görev yapmakta olan Yakup ASLAN, evli ve üç çocuk babası olup, İngilizce bilmektedir.