

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Mucor miehei* RENNET-DEKSTRAN SÜLFAT
KONJUGATLARININ İNCELENMESİ**

Kimyager Mithat ÇELEBİ

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalından
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Huriye KUZU (YTÜ)

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖNSÖZ	x
ÖZET	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Proteazlar.....	3
2.2 Kimozin (Calf rennet) ve <i>Mucor miehei</i> Rennet	4
2.3 Süt Proteinleri.....	7
2.4 Sütte Pıhtı Oluşturulması	10
2.4.1.1 Proteazların Etkisi ile Pıhtılaştırma	10
2.4.1.2 Asid Etkisi ile Pıhtılaştırma.....	11
2.5 Diğer Pıhtılaştırıcılar.....	12
2.5.1 Bitkisel Rennet	12
2.6 Biyoteknolojide Biyopolimerler	12
2.6.1 Dekstran	12
2.6.2 Dekstran Sülfat	13
2.6.3 Dekstran Sülfatın Kimyasal Karakteristikleri	13
2.6.4 Stabilite ve Saklama Koşulları	14
2.7 Proteinlerin Stabilitesi Üzerine Etki	14
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	16
3.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	16
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	16
3.1.2 Kullanılan Malzemeler.....	17
3.1.3 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri.....	17
3.1.4 Kullanılan GPC (Viscotek) Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri.....	17
3.1.5 Kullanılan UV-Vis Spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri ...	19
3.1.6 Kullanılan Protein Ayrıştırma Cihazının Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	19
3.1.7 Kullanılan Fourier Transform Infrared Spektrometre Cihazının Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	19
3.2 Kullanılan Kimyasallar	20
3.3 <i>Mucor miehei</i> Rennetin Aktivite Tayini	21
3.3.1 Süt Çözeltilisinin Hazırlanması	21
3.3.2 Sütte Pıhtı Oluşumunun Tayin Edilmesi.....	22

3.4	<i>Mucor miehei</i> Rennet-Dekstran Sülfat Konjugatlarının Eldesi.....	23
3.4.1	Satın alınan <i>mucor miehei</i> Rennet’ in Jel Filtrasyon Yöntemi (G–50, Sephadeks) ile Saflaştırılması	23
3.4.2	Satın Alınan ve Saflaştırılan Enzimin pH 5.0’te ve Diğer pH’larda (pH 4.0, 6.0, 7.0 ve 8.0) Aktivitelerinin Tayin Edilmesi.....	23
3.4.3	Dekstran Sülfatın Aldehid Türevinin Eldesi	24
3.4.4	<i>Mucor miehei</i> Rennet -Dekstran Sülfat Konjugatlarının Elde Edilmesi.....	25
3.4.4.1	Aldehid Dekstran Sülfat Konsantrasyonlarının Hesaplanması	25
3.4.5	Konjugatların Jel Filtrasyon ile (G–100, Sephadeks) Saflaştırılması.....	27
3.5	<i>Mucor miehei</i> Rennet-Dekstran Sülfat Konjugatlarının İncelenmesi.....	28
3.5.1	Konjugatların FT-IR ile İncelenmesi.....	28
3.5.2	Konjugatların HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile İncelenmesi.....	28
3.5.3	Konjugatların Viscotek Marka GPC ile İncelenmesi	28
3.5.4	Konjugatların Aktivite Tayini	28
3.6	Satın Alınan ve Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet’ in İzoelektrik Noktasının Belirlenmesi.....	29
3.7	Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet ve Konjugatların Fiziksel Karışımlarının Pıhtılaşma Sürelerinin ve Aktivitelerinin Belirlenmesi	29
4.	DENEY SONUÇLARI	30
4.1	Dekstran Sülfatın Eldesi.....	30
4.2	Satın Alınan <i>Mucor miehei</i> Rennet’ in Saflaştırma Kromatogramları	30
4.3	Satın Alınan ve Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennetin Aktivite Sonuçları	35
4.3.1	Satın Alınan ve Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet’ in Farklı pH ve Sıcaklıklarda Pıhtılaşma süreleri ve Aktiviteleri	35
4.3.2	Satın Alınan ve Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet’ in pH 5,0’te Farklı Sıcaklıklarda, Farklı Bekleme Süreleri Sonrasında Pıhtılaşma Süreleri ve Aktiviteleri	39
4.3.3	Konjugatların Jel Filtrasyon Kromatografisi ile (G–100, Sephadeks) Saflaştırılması.....	49
4.3.4	Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet’ in ve Konjugatların pH 5,0’te Farklı Sıcaklıklarda, Farklı Bekleme Süreleri Sonrasında Aktiviteleri	53
4.4	(<i>Mucor miehei</i> Rennet)-(Dekstran Sülfat), Protein/Polimer: 1/1 ve 1/20 Olan Konjugatlarının FTIR Spektrumları	60
4.5	Sentezlenen Konjugatların HPLC Cihazının UV Dedektörü ile Alınan Kromatogramı.....	60
4.6	Sentezlenen Konjugatların GPC (Viskotek) Cihazının Farklı Dedektörleri ile Alınan Kromatogramları	61
4.7	Satın Alınan ve Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennetin İzoelektrik Noktası.....	66
4.8	<i>Mucor miehei</i> Rennet ve Dekstran Sülfatın Fiziksel Karışım ile Kovalent Bağlanmanın (Konjugasyonun) Aktiviteleri Yönünden Karşılaştırılması.....	67
5.	SONUÇLAR	73
	KAYNAKLAR.....	74
	ÖZGEÇMİŞ.....	78

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
mg	Miligram
L	Litre
ml	Mililitre
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
M	Molar
nm	Nanometre

KISALTMA LİSTESİ

NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat
DS	Dekstran sülfat
NaOH	Sodyum hidroksid
NaIO ₄	Sodyum periyodat
NaBH ₄	Sodyum borhidrür
MCA	Süt pıhtılaştırma aktivitesi
PA	Proteolitik aktivite
HCl	Hidroklorik asid
GPC	Moleküler eleme kromatografisi
HPLC	Yüksek basıçlı sıvı kromatografisi
FTIR	Fourier transform infrared spektrometre
IU	Uluslararası aktivite birimi
pI	İzoelektrik nokta

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Rennin' nin (bovine) 3-D yapısı	5
Şekil 2.2 Kazein miselleri	9
Şekil 2.3 Waugh tarafından tasarlanan kazein miselleri modeli	9
Şekil 2.4 Sütün proteazlar ile pıhtılaşması iki farklı adımda gerçekleşir: proteoliz and agregasyon	10
Şekil 2.5 Phe ₁₀₅ ile Met ₁₀₆ arasındaki peptid bağının kırılması	11
Şekil 2.6 Mozzarella Peyniri	12
Şekil 2.7 Dekstranın açık formülü	13
Şekil 2.8 Dekstran sülfat sodyum tuzunun açık formülü	13
Şekil 3.1 Dekstran sülfat'ın aldehidlenme reaksiyonu (Gladysheva vd, 2001)	24
Şekil 4.1 Dekstran sülfatın ve aldehid türevinin FTIR spektrumu.	30
Şekil 4.2 Satın alınan <i>mucor miehei</i> Rennetin +4 °C'deki jel filtrasyon kolonu ile Bio-Rad UV dedektör kullanılarak 280 nm'de alınan kromatogramı	31
Şekil 4.3 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> Rennetin HPLC cihazı ile alınan (Jel Filtrasyon Kolonu) kromatogramı	32
Şekil 4.4 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> Rennetin GPC (Viskotek) cihazının UV dedektörü ile alınan kromatogramı	32
Şekil 4.5 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> Rennetin GPC (Viskotek) cihazının kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogramı.....	33
Şekil 4.6 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> Rennetin GPC (Viskotek) cihazının ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogramı	33
Şekil 4.7 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> Rennetin GPC (Viskotek) cihazının viskozimetre dedektörü ile alınan kromatogramı.....	34
Şekil 4.8 Satın alınan <i>mucor miehei</i> rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda pıhtılaşma süreleri (sn)36	
Şekil 4.9 Satın alınan <i>mucor miehei</i> rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda aktiviteleri	37
Şekil 4.10 Saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda pıhtılaşma süreleri38	
Şekil 4.11 Saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda aktiviteleri.....	39
Şekil 4.12 Oda sıcaklığında bulunan satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklardaki süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri	43
Şekil 4.13 Oda sıcaklığında bulunan satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te ve farklı sıcaklıklardaki süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri	43
Şekil 4.14 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 0 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri	44
Şekil 4.15 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 0 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen aktivitesi	44
Şekil 4.16 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 5 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri	45
Şekil 4.17 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 5 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen aktiviteleri....	45
Şekil 4.18 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 15 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri	46
Şekil 4.19 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 15 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen aktivitesi	46
Şekil 4.20 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 30	

	dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri	47
Şekil 4.21	Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 30 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen aktivitesi	47
Şekil 4.22	Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 60 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri	48
Şekil 4.23	Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 60 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen aktivitesi..	48
Şekil 4.24	20/1 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram.....	50
Şekil 4.25	10/1 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram.....	50
Şekil 4.26	5/1 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram.....	51
Şekil 4.27	1/1 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram.....	51
Şekil 4.28	1/5 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram.....	52
Şekil 4.29	1/10 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram.....	52
Şekil 4.30	1/20 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram.....	53
Şekil 4.31	Oda sıcaklığındaki saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların, farklı sıcaklıklarda aktiviteleri	57
Şekil 4.32	Saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların farklı sıcaklıklarda 0 dakika bekleme sonrasındaki aktiviteleri.....	57
Şekil 4.33	Saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların farklı sıcaklıklarda 5 dakika bekleme sonrasındaki aktiviteleri.....	58
Şekil 4.34	Saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların farklı sıcaklıklarda 15 dakika	

bekleme sonrasındaki aktiviteleri.....	58
Şekil 4.35 Saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların farklı sıcaklıklarda 30 dakika bekleme sonundaki aktiviteleri	59
Şekil 4.36 Saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların farklı sıcaklıklarda 60 dakika bekleme sonundaki aktiviteleri	59
Şekil 4.37 dekstran sülfat aldehydin, saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennet ve $n_{\text{protein}}/n_{\text{polimer}}$: 1/1, 1/20 konjugatların FTIR spektrumları.....	60
Şekil 4.38 Dekstran sülfat aldehydin, saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin ve konjugatların HPLC cihazı ile alınan kromatogramları.....	61
Şekil 4.39 Dekstran sülfat aldehydin, saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin ve konjugatların GPC (Viskotek) cihazının UV dedektörü ile alınan kromatogramları	62
Şekil 4.40 Dekstran sülfat aldehydin, saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin ve konjugatların GPC (Viskotek) cihazının ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogramları	63
Şekil 4.41 Dekstran sülfat aldehydin, saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin ve konjugatların GPC (Viskotek) cihazının kırılma dedektörü ile alınan kromatogramları.....	64
Şekil 4.42 Dekstran sülfat aldehydin, saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin ve konjugatların GPC (Viskotek) cihazının viskozimetre dedektörü ile alınan kromatogramları.....	65
Şekil 4.43 Satın alınan ve saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin izoelektrik noktası.....	66
Şekil 4.44 Saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin ve protein/polimer: 1/10 olan fiziksel karışımının ve 1/10 kovalent konjugatın oda sıcaklığındaki bekleme sonunda farklı sıcaklıklardaki aktivitesi.....	70
Şekil 4.45 Saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin ve protein/polimer: 1/10 olan farklı sıcaklıklarda fiziksel karışımının ve 1/10 kovalent konjugatın farklı sıcaklıklarda 0 dakikada bekleme sonundaki aktiviteleri.....	71

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Proteazlar ve özellikleri (Sumantha, Larroche, Pandey; 2006)	3
Çizelge 2.2 <i>Mucor miehei</i> rennet'in amino asit içeriği (Branner vd, Novo IndustriA/S)	6
Çizelge 2.3 Süt proteinleri.....	7
Çizelge 3.1 Saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin konsantre edildikten sonra ve liyofilizatörde kurutulduktan sonra elde edilen havuz 1 ve havuz 2 eluatlarının pıhtılaşma sürelerinin ölçülmesi, pH 5.0, 35°C	23
Çizelge 3.2 Satın alınan <i>mucor miehei</i> rennetin saflaştırılması sonucu elde edilen farklı fraksiyonların pıhtılaşma sürelerinin ölçülmesi, pH 5.0, 35 °C	23
Çizelge 3.3 Satın alınan enzimin saflaştırılması sonucu elde edilen Havuz 1 ve havuz 2 nin pıhtılaşma sürelerinin ölçülmesi, pH 5.0, 35 °C	24
Çizelge 3.4 C _{protein} : 2 mg/ml konsantrasyonu sabit alınarak hesaplanan C _{polimer} konsantrasyonları	26
Çizelge 3.5 <i>Mucor miehei</i> Rennet-dekstran sülfat konjugasyon süreci	27
Çizelge 4.1 Satın alınan <i>mucor miehei</i> rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda ölçülen pıhtılaşma süreleri (sn)	35
Çizelge 4.2 Satın alınan <i>mucor miehei</i> Rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerleri (IU/mg)	36
Çizelge 4.3 Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet'in farklı pH ve sıcaklıklarda ölçülen pıhtılaşma değerleri (sn)	37
Çizelge 4.4 Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet'in farklı pH ve sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerleri (IU/mg)	38
Çizelge 4.5 Satın alınan ve saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet'in farklı sıcaklıklarda belirli süreler beklemesinden sonra tayin edilen pıhtılaşma süreleri (sn)	39
Çizelge 4.6 Satın alınan ve saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> rennetin farklı sıcaklıklarda belirli süreler beklemesinden sonra tayin edilen aktivite değerleri (IU/mg)	41
Çizelge 4.7 Farklı oranlardaki n _{protein/polimer} konjugatlarının farklı sıcaklıklarda belirli süreler beklemesinden sonra tayin edilen pıhtılaşma süreleri (sn)	53
Çizelge 4.8 Farklı mol oranlı enzim/ polimer konjugatlarının farklı sıcaklıklarda belirli süreler beklemesinden sonra tayin edilen aktivite değerleri (IU/mg)	55
Çizelge 4.9 Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> rennet' in ve n _{protein/polimer} 1/10 oranlı fiziksel karışımının pıhtılaşma süreleri.....	67
Çizelge 4.10 Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet' in ve n _{protein/polimer} 1/10 oranlı fiziksel karışımının aktiviteleri	67
Çizelge 4.11 Saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennetin ve n _{protein/polimer} 1/10 oranlı fiziksel karışımının pıhtılaşma süreleri.....	68
Çizelge 4.12 Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> rennetin ve n _{protein/polimer} farklı oranlı fiziksel karışımların pıhtılaşma süreleri.....	68
Çizelge 4.13 Farklı pH' lardaki n _{protein/polimer} 1/1 ve 1/10 oranlı fiziksel karışımların liyofilizatörde kurutulmasından sonra elde edilen pıhtılaşma süreleri.....	69
Çizelge 4.14 Farklı pH' lardaki n _{protein/polimer} 1/1 ve 1/10 oranlı fiziksel karışımların liyofilizatörde kurutulmasından sonra elde edilen aktiviteleri	69

ÖNSÖZ

Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimimden bugüne kadar bilgi birikimi ve tecrübesiyle tez çalışmamda her türlü yardımı sağlayan ve önerileriyle beni yönlendiren değerli hocam Prof. Dr. Huriye KUZU' ya;

Biyomühendislik laboratuvarlarının imkânlarını bize açan Biyomühendislik A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Mustafa AKDESTE'ye;

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Y.T.Ü. Biyomühendislik Bölümü laboratuvarları çalışanlarından Araş. Gör. Özlem ÖZTOLON' a, Arş. Gör. Murat TOPUZOĞULLARI'na, Arş. Gör. Eray DALGAKIRAN' a, Arş. Gör. Namık AKKILIÇ'a, Arş. Gör. Yunus SARIÇAY' a ve Y.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı' ndan Araş. Gör. Melda ALTIKATOĞLU' na;

Eğitim ve öğretimimde hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme ve değerli arkadaşlarıma;

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Peynir üretiminde özellikle genç sığırların dördüncü midesinden (şirdeninden) elde edilen kimozi (Calf rennet) kullanılmakta ve üretilen peynirin kalitesi nedeniyle yıllardır tercih edilmekteydi. Oysa günümüzde, elde edilen kimozi dünya peynir üretiminin ihtiyacını karşılayamadığından fungal kaynaklı proteolitik enzimler önem kazanmıştır. Ancak bu enzimler genellikle yüksek sıcaklığa dirençli olmaları ve diğer özellikleri nedeniyle, peynir üretiminde kalite ve yan ürünlerin gıda endüstrisinde değerlendirilmesi yönünden bazı problemlere yol açmaktadır.

Bu çalışmada, peynir imalatında yaygın olarak kullanılan *mucor miehei* rennetin *mucor miehei* rennet-dekstran sülfat kovalent konjugatları sentezlendi ve konjugatların termal direncindeki azalma incelendi.

Bu çalışmada, ilk olarak satın alınan *mucor miehei* rennet Sefadeks G-50 kolonundan geçirilerek saflaştırıldı. Dekstran sülfat sodyum periyodat ile aldehyd türevine yükseltildi. Dekstran sülfat aldehyd türevinin oluştuğu FTIR spektroskopisi ile kontrol edildi. Farklı mol oranlarında *mucor miehei* rennet-dekstran sülfat konjugatları sentezlendi. Bu konjugatlar Sefadeks G-100 kolonundan geçirilerek saflaştırıldı. Satın alınan ve saflaştırılan enzimin farklı sıcaklık ve farklı pH değerlerinde, konjugatların ise peynir üretiminde sütün pıhtılaştırıldığı pH 5,0' te, farklı sıcaklık değerlerinde farklı bekleme sürelerinde aktiviteleri tayin edildi. Sentezlenen konjugatlar HPLC, Viskotek ve FTIR cihazları kullanılarak değerlendirildi.

Sonuç olarak, tayin edilen aktivite değerleri yüksek polimer oranlı konjugatlarda saflaştırılan enzime göre sıcaklığa karşı dirençte azalma olduğunu gösterdi. *Mucor miehei* rennet-dekstran sülfat fiziksel karışımlarının aktivite sonuçları ile saflaştırılan enzimin aktivite sonuçlarında birbirlerine yakın değerler elde edildi. Bu durum sıcaklığa karşı dirençte azalmanın *mucor miehei* rennet-dekstran sülfat konjugatlarının kovalent bağlanmasından ileri geldiğini gösterdi.

Anahtar kelimeler: *Mucor miehei* Rennet, Dekstran sülfat, Konjugat, Süt pıhtılaştırma aktivitesi (MCA), UV, GPC, FTIR, HPLC

ABSTRACT

Chymosin (calf rennet)– extracted from the fourth stomach (abomasum) of the young calves– has been used worldwide in cheese production for years and it has been preferred for its high quality. However, nowadays there has been a shortage of the chymosin in the world market for decades, so proteolytic enzymes from different sources gained more importance. But its high thermostability and their other properties causes problems and prevents the usage of byproducts in food industry.

In this study, covalent conjugates of *mucor miehei* rennet with dextran sulphate, *mucor miehei* rennet is commonly used in manufactured cheese, was synthesized and investigated for decrease its thermal resistance.

In this study, first purchased *mucor miehei* rennet was purified by column chromatography using Sephadex G–50 column. Then dextran sulphate was oxidized to aldehyde derivative with sodium periodate and the occurrence of derivative confirmed with FTIR spectroscopy. Conjugates of different mole ratios of *mucor miehei* rennet and dextran sulphate were synthesized and purified again using G–100 column. Activities of purchased and purified *mucor miehei* rennet at different pHs and temperatures were determined. The activities of conjugates at different temperatures were also measured at pH 5,0. The characteristics of synthesized conjugates were investigated with HPLC, GPC (Viscotek) and FTIR.

As a result, conjugates displayed decrease in the activities with the decrease of rennet: dextran molar ratios in all tested temperatures. Physically mixed (non covalent) *mucor miehei* rennet–dextran sulphate mixtures showed the same activity with purified enzyme. These results demonstrated that, covalent conjugation of *mucor miehei* rennet with aldehyde dextran sulphate caused the decrease of thermal resistance of this enzyme and decrease in thermostability is caused by covalent bonding of *mucor miehei* rennet–dextran sulphate conjugates.

Key words: *Mucor miehei* rennet, Dextran sulphate, Cojugate, Milk clotting activity, UV, GPC, FTIR, HPLC.

1. GİRİŞ

Peptid bağlarını hidrolizleyerek protein moleküllerini peptidlere ve amino asidlere parçalayan proteazlar endüstriyel açıdan önem taşımaktadırlar. Bu enzim grubu bütün canlı organizmalarda bulunmakta ve fizyolojik koşullarda farklı metabolik reaksiyonları katalizlemektedir. Hidrolizlenen bağı oluşturan amino asidlerin alifatik veya aromatik fonksiyonel gruplar taşıması veya sülfür içermesi gibi özellikler ile proteazın özgüllüğü bağlantılıdır. Substrat özgüllüğü, aktif merkez, katalitik mekanizma, optimum pH, optimum sıcaklık ve kararlılık profili yönünden farklılık gösteren proteazlar çok geniş ve kompleks bir enzim grubudur (Sandhya, Sumantha, Pandey, 2004).

Peynir üretiminde sütü pıhtılaştıran enzimler rennet olarak adlandırılmaktadır. Bu proteolitik enzimler sütün katı özellikte teleme ve peynir suyuna (whey) ayrılmasına neden olmaktadır. Binlerce yıl önce keşfedilen, özellikle genç sığırların 4. midesinde (şirdende) bulunan rennin veya kimozen olarak adlandırılan rennet (Calf Rennet; EC 3.4.23.4) peynir yapımında çok uzun zaman kullanılmıştır. Rennin diğer bazı geviş getiren hayvanlardan da elde edilebilmektedir. Bununla birlikte üretilen rennin miktarı belli bir düzeyi geçemediğinden, peynir üreticileri sütü pıhtılaştıran enzimleri bulunduran başka kaynaklara yönelmişlerdir. *Mucor* fungal esaslı proteolitik enzimler özellikle dikkat çekici olmuştur. Hücre dışı enzimler olan *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* ve *Mucor pusillus* yüksek süt pıhtılaştırma aktiviteleri (milk clotting activity “MCA”) ve düşük proteolitik aktiviteleri (PA) ile endüstriyel öneme sahip olmuşlardır (Seker, vd., 1998). Aslında proteolitik enzimlerin sütü pıhtılaştırma özellikleri genel bir kural olarak kabul edilmektedir (Tamer, 1993).

Mucor miehei Rennet yaklaşık olarak % 6 karbonhidrat içeriğine sahiptir. Yapıya bağlı karbonhidratın proteolitik aktiviteyi koruduğu, üç boyutlu yapısını stabilize ettiği ve böylece enzimin aktif kalma süresini arttırdığı düşünülmektedir. Molekülünün sekonder yapısı fazla miktarda β - sheet ve daha az oranda α -heliks içermektedir (Yada ve Nakai, 1986). *Mucor* kaynaklı enzimlerin termal direnci gelişmiş hayvanlardan elde edilen kimozena göre oldukça fazladır. *Mucor miehei* rennet peynir imalatında kullanılan enzimlerin sıcaklığa karşı en dirençli olanıdır. Ancak, süt pıhtılaştırma aktivitesi/proteolitik aktivite oranı daha düşüktür. Bu durum araştırmacıları fungal rennetleri modifiye etmeye yöneltmiştir. Peynir üretiminde yan ürünler de dikkate alındığında, sütü pıhtılaştırmak için kullanılan enzimlerin termal stabilitesinin azaltılması önemli olmaktadır (Yamashita vd., 1994).

Sütte bulunan proteinler başlıca kazeinler (α , β , κ), laktalbuminler ve laktoglobulinlerden oluşmaktadır. Bu proteinler globuler yapıdadır. Katlanmaya ve kompakt bir yapı oluşturmaya eğilimlidirler. Bir fosfoprotein olan kazein sütteki en temel proteindir. Kazein sütte kalsiyum kazeinat şeklinde bulunur. κ -kazein α ve β kazeinin misel oluşumu ile suda çözünmesini sağlamaktadır.

Süt rennin enzimine maruz kaldığında, kazein miselleri stabilitesini kaybeder ve çöker. κ -kazein molekülündeki 105 (fenilalanin)-106 (metiyonin) aminoasidleri arasındaki peptid bağı kırılır. Bunun sonucunda, molekülün karboksil ucunun bulunduğu kısım çözünerek serbest kalır. Bu gliko makropeptid 6.8 kD molekül ağırlığına sahiptir ve molekül serin fosfat ve karbohidrat grupları içerir. κ -kazeinin diğer kısmı para- κ -kazein olarak adlandırılır. Molekül ağırlığı 12.3 kD dır ve pH 6.7 de pozitif yüklüdür. Bu molekül hidrofobiktir ve suda çözünmez.

Peynirde eldesine proteoliz üç aşama olarak dikkate alınabilir. Bunlar peynir imalatına başlamadan önce sütte meydana gelen proteoliz, sütün enzimatik olarak koagülasyonu yani teleme oluşturmaları ve peynirin olgunlaşması sırasında gerçekleşen proteoliz şeklinde sıralanabilir (Fox, 1989). “Psychrotroph”lardan hücre dışı proteinazlar peynir verimini azalmasına ve tadın bozulmasına neden olmaktadır. “Leococytes”den proteinazlar da verimin azalmasına neden olabilir fakat bunlar bakteriyel proteinazlardan daha az aktiftirler. Kan plasma proteinlerini, özellikle de fibrinleri parçalayan plazmin önemli bir serin proteazdır (EC 3.4.21.7). Plasmin özellikle geçikmiş salgılanması β -kazeinin hidrolizine neden olur. Plasmin aktivitesi verimi düşürmektedir (Fox, 1989). Peynir üretiminde telemenin süzülüp elde edilen peynir kalıplarının uygun kaplara yerleştirilmiş halde soğukta bekletildiği olgunlaşma aşamasında birçok hidroliz reaksiyonu meydana gelmekte ve peynirde istenen yapı, tad ve koku oluşumu gerçekleşmektedir (Fox, 1989).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Proteazlar

Proteazlar, endüstriyel açıdan önemli enzimlerdendir (Garcia-Carend ve Hard, 1993). Bu enzimlerin proteolitik (digesting) biyokatalizler olarak gıda, ilaç, kozmetik gibi endüstri dallarında yaygın kullanım alanları bulunmaktadır. Aşağıda çizelge 2,1’de proteazlar ve özellikleri özet olarak verilmiştir.

Çizelge 2.1 Proteazlar ve özellikleri (Sumantha, Larroche, Pandey; 2006)

Özellikleri	EC No	Molar Kütle Aralığı (kD)	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	Metal iyon	Aktif aminoasit zincirleri	Başlıca inhibitörler
Aspartik veya karboksil proteazlar	3.4.23	30-45	3-5	40-45	Ca ²⁺	Aspartat veya sistein	Pepsitatin
Sistein veya tiyol proteazlar	3.4.22 3.4.24	34-35	2-3 5-7	40-55	-	Aspartat veya sistein	Indoasetamid, p-CMB
Metaloproteazlar	3.4.21	19-37	6-11	65-85	Zn ⁺² , Ca ⁺²	Fenilalanin ve lösün	EDTA, EGTA gibi celatlar
Serin proteazlar	3.4.23	18-35	3-5	50-70	Ca ⁺²	Serin, histidin ve aspartat	PMSF, DIFP, EDTA, soybean tripsin, inhibitör, fosfat tamponları, indol, fenol, triamino asetik asid

Asid proteazlar hayvan hücrelerinde, küflerde, mayalarda ve nadir olarak da bakterilerde bulunmaktadır. Endüstride kullanılan mikrobiyal rennet genellikle *Mucor miehei*, *M. Pusillus* ve *Endothia parasitica*'dan elde edilmektedir. *M. Hiemalis*, *M. Racemosus*, ve *M. bacilliformis* satın alınan değeri bulunan ve proteaz aktivitesi gösteren diğer mucor türleridir. Pepsin benzeri asid proteazlar ise *Aspergillus* spp. ve *Rhizopus* spp. den elde edilmektedir. Çok eski zamanlardan beri peynir üretiminde sütü pıhtılaştıran ve böylece teleme eldesini sağlayan, genellikle genç sığırların şirdeninden (4.mide) elde edilen rennin (Calf rennet) de bir asid proteazdır. Bu enzimlerin çoğu aktif merkezlerinde aspartat bulundurmaktadır ve proteinlerde kırıdıkları bağın içerdiği yan zincirlerin aromatik veya alifatik gruplar v.b. bulundurmasına göre aktif merkezlerinin amino asid içeriği değişmektedir. Asid proteazların karbonhidrat içeriği onların sıcaklığa karşı kararlılığını arttırmaktadır Termofilik *Penicillium* da asid proteazların üretiminde kullanılmaktadır (Sumantha, Larroche, Pandey; 2006).

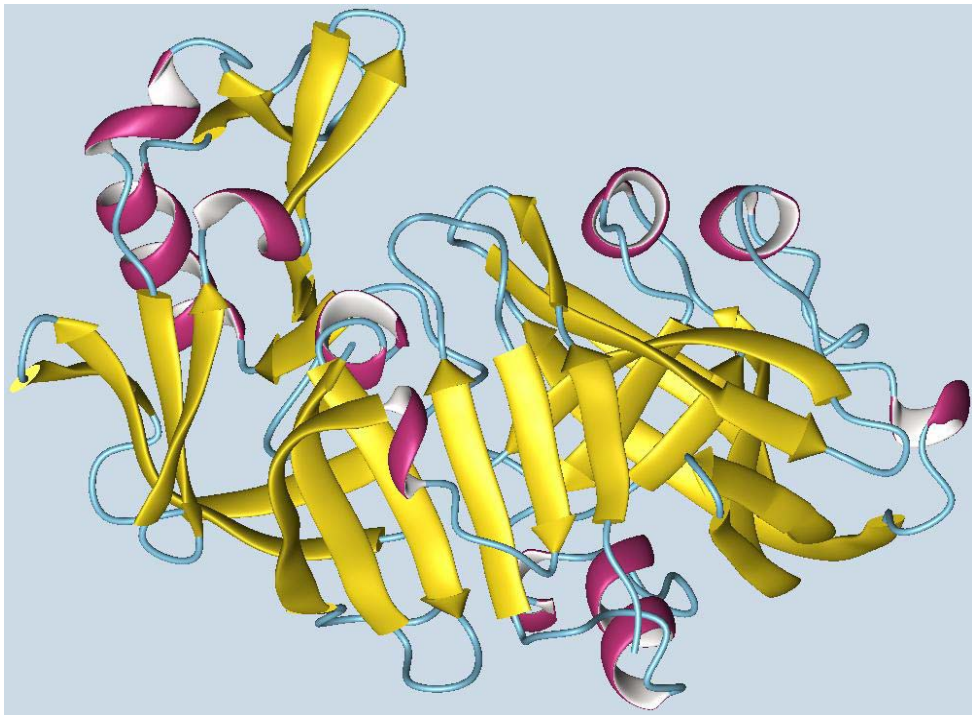
Bu enzimler gıda endüstrisinde başlıca Alcalase®, Neutrase®, Esperase®, Protamex™, ve Novozym® FM satın alınan adlarıyla yer almaktadır. Danimarka' da satın alınan Novozymes enzim üretiminde etkilidir. Neutrase® maya üretimi için alkol üretimek amacıyla kullanılan bir satın alınan bakteriyel proteazdır (Sumantha, Larroche, Pandey; 2006). Bisküvi, kraker ve pastalar için kullanılan unlarda parçalanmış proteinlerin oluşması da proteazlar ile sağlanmaktadır. Bakteriyel proteazlar ise proteinlerin fonksiyonel özelliklerinde, besin değerlerinde ve tatlarında iyileştirme gerçekleştirmek amacıyla kullanılmaktadırlar (Sumantha, Larroche, Pandey, 2006).

Dünya genelinde endüstriyel enzimlerden yılda 1 milyon \$ gelir elde edildiği tahmin edilmektedir ve bunun yaklaşık % 60 ı proteazlardan sağlanmaktadır. Bu enzimler mantarlar, bakteriler ve genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kullanılmasıyla birçok kaynaktan üretilmektedir. Bununla birlikte, yeni enzim kaynakları bulmak, daha iyi üretim teknikleri geliştirmek ve yeni alanlarda enzimlerin kullanılmasını getirmek amacıyla araştırma çalışmaları devam etmektedir (Sumantha, Larroche, Pandey; 2006).

2.2 Kimozin (Calf rennet) ve *Mucor miehei* Rennet

Dünya çapında çok eskiden beri peynir üretiminde kullanılmış olan rennin (Calf rennet) çoğunlukla genç sığırların şirdeninden (4 mide) elde edilmektedir (Garnot vd., 1972). Kimozin (veya rennin) (EC 3.4.23.4) rennette bulunan aspartik asit proteaz enzimidir. Calf rennet % 88–94 kimozin ve % 6–12 pepsin yanında lipaz da içermektedir. Bu enzim sütte pH değişmelerine karşı duyarlıdır (Şeker, vd., 1998). Rennin süt proteini kazeini spesifik olarak

kırmakta ve kaliteli peynir üretimini sağlamaktadır. Ancak renninin elde edilmesi zor ve zahmetli olduğu gibi üretildiği kaynaklar nedeniyle miktarı sınırlı kalmış ve peynir imalatçılarının talebini karşılanamamıştır. Rennin uzun süre muhafaza için de yeterince dayanıklı değildir. Bu sebeplerden dolayı fiyatının da yüksek olması birçok ülkede mikroorganizma kaynaklı enzim üretim araştırmalarını cesaretlendirmiştir (Hyslop, 1979; Areces, v.d., 1992). Ayrıca bitkiler (Lopez vd., 1998) ve balıklar (Shamsuzzana, Hard, 1983; Hard, 1992) yeni kaynak araştırmalarında yer almıştır (D'Ambrosio vd, 2003). Aşağıda Şekil 2,1'de renninin üç boyutlu yapısı verilmektedir.



Şekil 2.1 Rennin' nin (bovine) 3-D yapısı

Mucor miehei ve *Mucor pusillus* mantarlardan üretilen *mucor miehei* rennet kimozen ile kıyaslandığında nonspesifik proteolitik aktivite, daha yüksek termal stabilite ve sütte daha düşük hızda pıhtı oluşturma (MCA) özellikleri ile karakterize edilmektedir. Termal stabilitesinin yüksek olması yüzünden enzim aktivitesinin devamlılığı peynir üretiminde uzun süreli olgunlaşma aşamasında kötü tatlar oluşmasına neden olabilmektedir (Arima, vd., 1968; Yamashita vd., 1994). Bununla birlikte peynir endüstrisinin giderek artan rennet ihtiyacı ve mikroorganizma kaynaklı enzimlerin fazla miktarda ve daha ekonomik olarak üretilmesinin mümkün olması *mucor miehei* rennetin önemini arttırmıştır (Lopez vd., 1998).

Mucor miehei rennet yaklaşık olarak % 6 karbonhidrat içeriğine sahiptir. Yapıya bağlı karbonhidratın proteolitik aktiviteyi koruduğu, üç boyutlu yapıyı stabilize ettiği ve böylece enzimin aktif kalma süresini arttırdığı düşünülmektedir. Molekülünün sekonder yapısı fazla miktarda β -katlanmış yaprak ve daha az oranda α -heliks yapı içermektedir (Yada ve Nakai, 1986). Çizelge 2.2’de *Mucor miehei* rennet’in amino asid içeriği verilmektedir.

Çizelge 2.2 *Mucor miehei* rennet’in amino asid içeriği (Branner vd, Novo IndustriA/S)

Doğal <i>Mucor miehei</i> rennet		
Amino Asid	Literatür	Yada ve Arkadaşları
Met(O)		0
Asp	46-48	47
Thr	32	30
Ser	34-39	35-36
Glu	25-27	25
Pro	19	19
Gly	37-38	37
Ala	29	29
Cys	4	4
Val	26-28	28
Met	6.0-7.0	7
Met(O)		
Ile	20-23	21
Leu	21-22	22
Tyr	21-22	21
Phe	22-23	23
Lys	10	10
His	2	2
Trp	3	3
Arg	7	7

Mucor kaynaklı enzimlerin termal direncinin kimozone kıyasla oldukça yüksek olması peynir endüstrisinde olumsuz özellik olarak değerlendirilirken MCA/PA oranını düşük olması tercih edilmelerinde etkili olmaktadır. *Mucor miehei* rennet belirtilen enzimlerden termal direnci en fazla olanıdır. Bu durumun değerlendirilmesi araştırmacıları fungal rennetleri modifiye etmeye yöneltmiştir (Smith ve Yada, 1991). Peynir üretiminde kalite yanında yan ürünler de dikkate alındığında sütü pıhtılaştırarak teleme oluşmasında kullanılan enzimlerin termal stabilitesinin azaltılması konusu araştırmacılar için önem kazanmıştır (Yamashita vd., 1994; Branner-Jorgensen vd; 1981).

2.3 Süt Proteinleri

Süt su, yağ, proteinler, fosfat, laktoz, sitrik asid ve kalsiyum fosfat gibi inorganik fosfatları içermektedir. Sütün protein yapısı kazein fraksiyonu ve whey proteinleri olarak iki gruba ayrılabilir. Sütteki proteinler düzensiz yapıli kazeinler (özellikle α_{S1} -kazein ve β -kazein) ve globular whey proteinleri (özellikle β -laktoglobulin) şeklinde ifade edilebilir (Çizelge 2,3). Süt proteinleri emülsiyon oluşturma ve stabilite sağlama gibi özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Dickens, 1998).

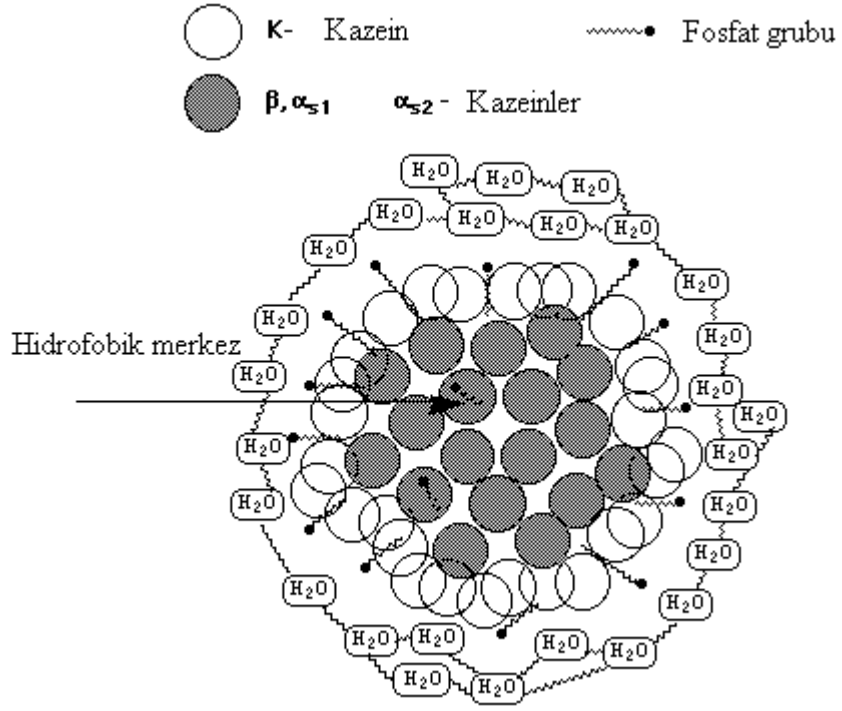
Çizelge 2.3 Süt proteinleri

Protein	(%) miktarı
Kazeinler:	
α_{S1} -kazein	32
α_{S2} -kazein	8
B-kazein	32
K-kazein	8
	80
Peynir altı suyu proteinleri (whey)	
B-laktoglobulin	12
B-laktalbumin	4
İmmunoglobulinler	3
Serum albumin	1
	20

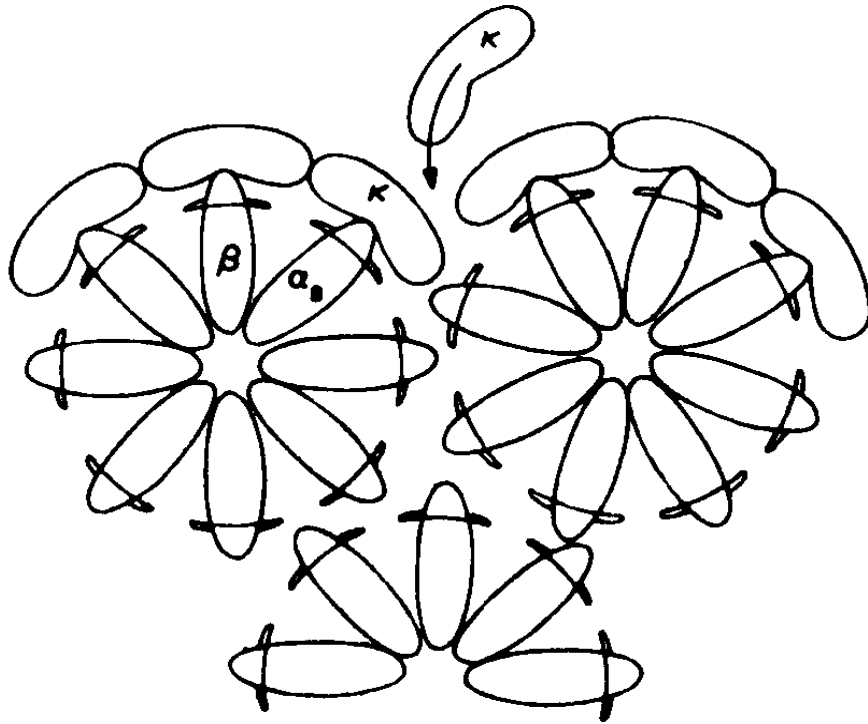
Kazeinler sütte miseller oluşturmaktadır. Peynir elde edilmesi sırasında kazeinler teleme meydana gelmesinde rol oynamaktadırlar. Kazeinler proteolize karşı hassastırlar, fosfoproteindirler ve sütteki kalsiyuma bağlanırlar (Rehm vd., 1987). Kazeinler sütte

polidispers protein partikülleri içinde agreste durumdadırlar. Whey proteinleri ise tümüyle suda çözünmüş durumdadır. Kazein miselleri kolloidal partiküllerdir (Şekil 2.2). Misellerin dış kabuğu κ -kazein glikoproteini tarafından sarılarak stabilize edilmiştir. Süt kazeininden kalsiyum tuzunun uzaklaştırılması ve/veya sodyum tuzları ile yer değiştirmesi yoluyla gıdalarda yaygın olarak kullanılan sodyum kazeinat üretilmektedir. Sodyum kazeinat kazein monomerlerinin ve küçük kazein agregatlarının (alt miseller) bir karışımı olarak nötral pH da sulu çözeltide oluşmaktadır. İki temel kazein olarak değerlendirilen α_{s1} -kazein ve β -kazein, toplam inek sütü kazeininin % 75 ini oluşturmaktadır. Globular β -laktoglobulin ise toplam whey proteinlerinin % 75 ini meydana getirmektedir (Dickens, 1998).

α_{s1} -kazein ve β -kazein, herikisi de yaygın olarak kullanılan kalsiyum duyarlı fosfoproteinlerdir. Yüksek oranda prolin içerirler, fakat 200 yan zincir polipeptid zinciri boyunca sistein içermez. Her bir kazein monomeri sütün pH sında (pH 6,7), negatif net yük taşımaktadır ve yine her biri amfifilik karakterdedir. Yan zincirlerinde hidrofob özellik yüksektir. Bu iki protein çözeltide kendiliğinden birleşmeye meyillidir ve hidrofilik ve hidrofobik yüzeylerde adsorblanmaktadır. Her ikisi de yağ su emülsiyonlarında etkili bir stabilizör olarak kullanılabilir. Diğer taraftan α_{s1} -kazein ve β -kazein yapıları arasında belirgin farklılıklar da vardır. Hidrofobik/hidrofilik segment dağılımı β -kazeinde α_{s1} -kazeine oranla daha seyrek. β -kazeindeki hidrofobik yan zincirlerin non-uniform dağılımı özelliği dikkat çekicidir. β -kazein α_{s1} -kazeinden daha iyi sterik stabilizördür. β -kazein kusursuz emülsiyon stabilizasyonu yeteneğine sahiptir (Dickens, 1998).



Şekil 2.2 Kazein miselleri



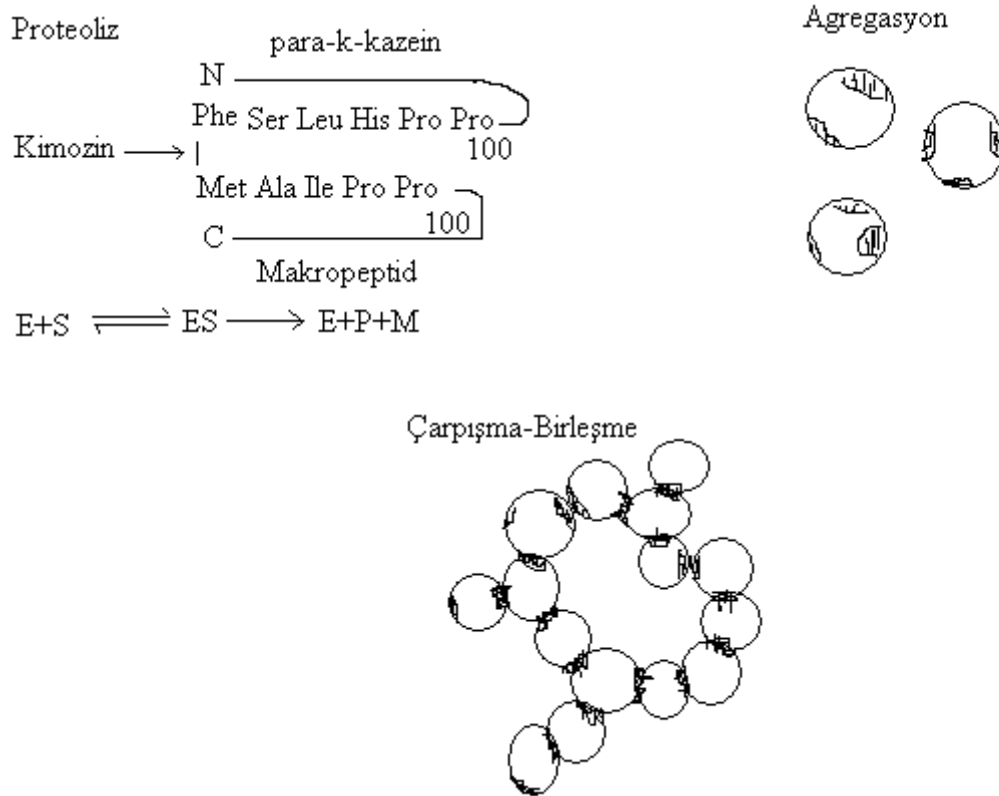
Şekil 2.3 Waugh tarafından tasarlanan kazein miselleri modeli

2.4 Sütte Pıhtı Oluşturulması

Sütte pıhtı oluşturma proteazlar etkisi ve asid etkisi ile olmak üzere iki yöntem ile gerçekleştirilmektedir.

2.4.1.1 Proteazların Etkisi ile Pıhtılaştırma

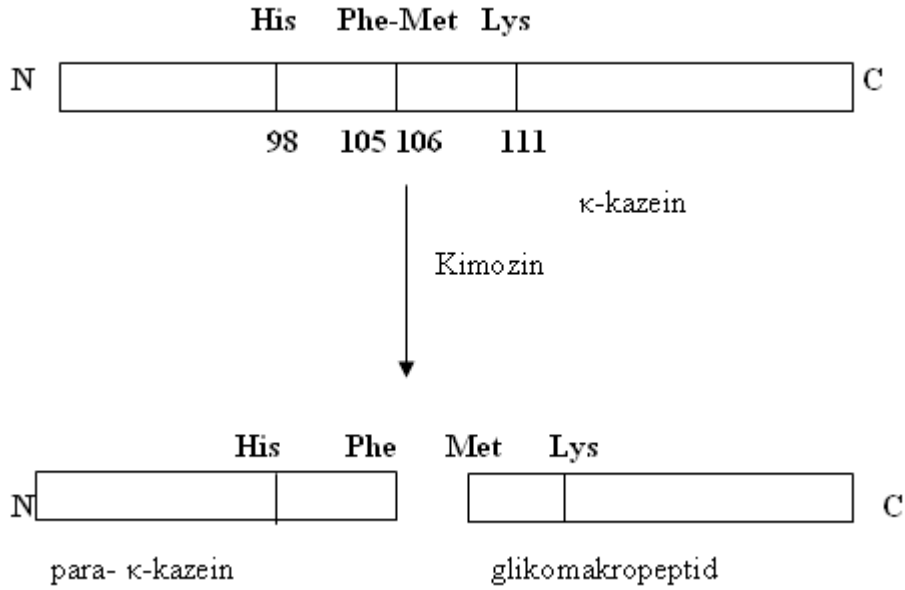
Sütün rennet ile koagülasyonu iki aşamalı bir süreçtir. İlk olarak koloidal süspansiyondaki kazein miselleri kazein misellerinin yüzeyindeki κ -kazeinin kimozin ile hidrolizi ile gerçekleşir. İkicisinde ise, kararlılığı bozulan kazein miselleri kendiliğinden çökerek agregat oluşturur (Pires vd., 2004). Sütün pıhtılaşmasındaki κ -kazeinin fenil alanin (105)-metiyonin (106) bağının rennet ile kırılması Şekil 2.4 ve Şekil 2.5 te ayrı ayrı gösterilmektedir. κ -kazeinin birincil, ikincil ve üçüncül yapısı yanında ortamın pH değeri, iyonik kuvveti, sıcaklığı ve diğer çevresel faktörler ve prosesin gerçekleşmesinde öneme sahiptir (Fox, 1989).



Şekil 2.4 Sütün proteazlar ile pıhtılaşması iki farklı adımda gerçekleşir: proteoliz and agregasyon

Renninin kimozin içeriği kazein miselleri yapısında yer alan kapa-kazeinin hızlı ve spesifik kırılmasına neden olmaktadır (Şekil 2.5). Kapa-kazein miselleri stabilize etme görevi

üstlenmiştir. Katalizden sonra, kazein proteinleri kalsiyum iyonları etkisiyle çöker. Kimozin özgül olarak, His₉₈---Lys₁₁₁ kapa-kazein zincirindeki; Phe₁₀₅ ile Met₁₀₆ arasındaki peptid bağını kırmaktadır (Lawrence vd., 1998). Bu kırma işleminden sonra kapa kazeinin çözünebilen parçası (106–169 dizisi) peynir altı suyuna (whey) geçerken ikinci parçası (1–105 dizisi) sulu ortamda çözünmez. Bu ikinci parça kalsiyum iyonları varlığında teleme oluşturmak üzere kazein misellerinin çökmesine sebep olmaktadır (Shammet vd., 1992).



Şekil 2.5 Phe₁₀₅ ile Met₁₀₆ arasındaki peptid bağının kırılması

2.4.1.2 Asid Etkisi ile Pıhtılaştırma

Süt sitrik asit gibi bazı asidlerin ilavesiyle de pıhtılaştırılabilmektedir. Pıhtılaştırmanın bu formu ucuz Mozzarella peyniri üretiminde (Şekil 2.6) kullanılmaktadır. Paaner (Kuzey Hindistan ve Pakistan peyniri) de bu yöntem ile üretilmektedir. Sütü asitleştirme işlemi bakteriler tarafından da gerçekleştirilebilir.



Şekil 2.6 Mozzarella Peyniri

2.5 Diğer Pıhtılaştırıcılar

Hayvan kaynaklı rennet ürünlerine benzeyen, kazeinin kırılması sonucunda benzer tat ve yapı oluşturan enzimlerin bulunması çalışmaları yapılmaktadır.

2.5.1 Bitkisel Rennet

Birçok bitki, sütü pıhtılaştırma özelliğine sahiptir. İncir ağacı, ısırgan otu, ebegümeçi, sarmaşık ve devedikeni bunlara örnek verilebilir. Devedikeni veya “cynara” Akdeniz civarında yaşayan insanlar tarafından geleneksel peynir üretiminde kullanılmaktadır. Bu gerçek bitkisel rennetler vejeteryanlar içinde uygundur. Satın alınan bitkisel rennetler genellikle *mucor miehei* rennet içermektedir. Bitkisel rennetler kosher peynirlerinin üretiminde kullanılabilir. Fakat dünya genelinde bitkisel rennetin endüstriyel üretimi bulunmamaktadır.

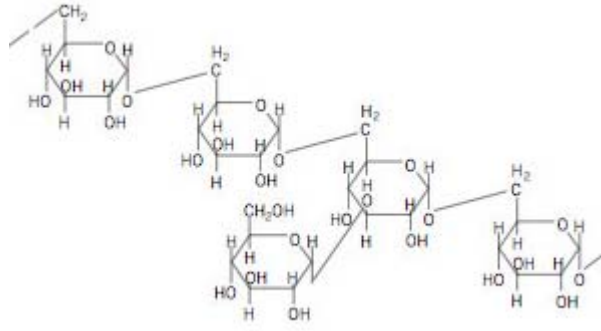
2.6 Biyoteknolojide Biyopolimerler

Biyoteknolojinin araştırma alanlarından biri olan enzimlerin modifikasyonuna olan ilgi gün geçtikçe daha da önem kazanmaktadır. Doğal polimerler proteinlere çeşitli yollarla bağlanarak proteinlerin fonksiyonel özelliklerini arttırmaktadırlar. Enzimlerin doğal polimerler kullanılarak yapılarının değiştirilmesiyle gıda, ilaç ve tekstil endüstrilerinde ve biyoteknolojide kullanım alanlarının daha da yaygınlaşması sağlanmıştır (Betancor vd., 2004).

2.6.1 Dekstran

Dekstran mikrobiyolojik sentez ile elde edilen polisakkaridlerin yaygın kullanılan bir adıdır. Anhidro-D-glukoz ünitelerinin α -1,6-glikozid bağı ile bağlanarak dekstran ana zinciri oluşur

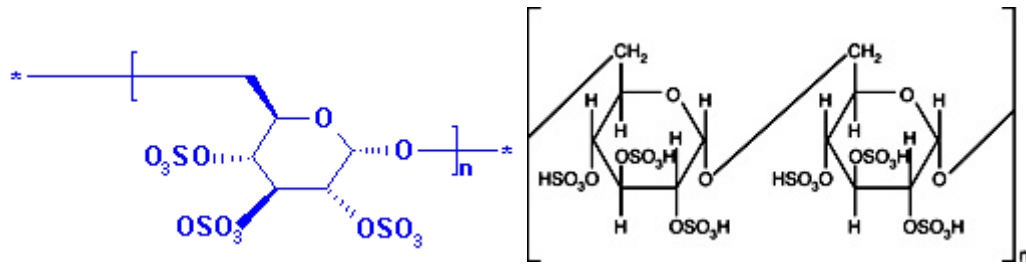
(Gladysheva vd, 2001). Dekstran biyopolimerinin ana zincire 1–3 glikozid bağı yan zincirleri ile dekstran alfa-D-glukoz bağı bir glukandır. Dekstran biyopolimerinde yaklaşık % 5 dallanma vardır. Dallanmalar çoğu kez 1–2 glukoz uzunluğundadır (Şekil 2.7). Dekstran sukrozlu ortamda *Leuconostoc mesenteroides* B512F in fermentasyonundan üretilir. Aldehid dekstran birçok ihtiyaca cevap verebilen esnek bir polimerdir. Ayrıca, multimerik enzimlerin çapraz bağlanmasında kullanılmaktadır (Betancor vd., 2004).



Şekil 2.7 Dekstranın açık formülü

2.6.2 Dekstran Sülfat

Dekstran sülfat dekstranın polianyonik bir türevidir (Şekil 2.8). Suda kolayca çözünerek kararlı bir çözelti oluşturmaktadır. İlaç sanayi, biyoteknoloji ve kozmatik endüstrisi gibi alanlarda kullanılmaktadır.



Şekil 2.8 Dekstran sülfat sodyum tuzunun açık formülü

2.6.3 Dekstran Sülfatın Kimyasal Karakteristikleri

Dekstran sülfat dekstranın sülfatlanması ile hazırlanmaktadır. Dekstran zincirindeki her glukoz ünitesi yaklaşık olarak iki sülfat grubu bulundurmaktadır. Sülfat grupları glukoz

üntelerinin 2. ve 4. karbonlarına bağlanmıştır.

2.6.4 Stabilite ve Saklama Koşulları

Dekstran sülfat pH 6 ve 7 arasında optimum stabilite göstermektedir. Toz halde iken az miktar fosfat ilavasi ile stabilize edilir, ve “air-tight” konteynerlerinde saklandığı zaman oda sıcaklığında uzun bir süre stabilitesini korumaktadır. Araştırmalar dekstan sülfatın toz halde bu koşullarda saklandığında 6 yıl süreyle stabilite gösterdiğini kanıtlamıştır.

Dekstan Sülfatın Uygulama Alanları

- Anti-koagulant olarak,
- Enzimler, hücreler ve virüsler üzerinde etkisi yönünden,
- Hibridasyon hızını artırmada,
- Proteinlerin stabilizasyonunda,
- Lipoproteinler ile etkileşiminden yararlanarak,
- Kalp hastalarında pıhtılaşmayı engelleyici ilaç olarak kullanılmaktadır.

Dekstran sülfat yüksek molekül ağırlıklı lipoprotein ile çözünmez kompleks oluşturur, böylece lipoproteinlerin plasmadan uzaklaşması ve ayrılması için yarar sağlar (pk chemicals A/S).

2.7 Proteinlerin Stabilitesi Üzerine Etki

Enzimlerin stabilitelerinin değiştirilmesi üzerine yapılan çalışmaların biyoteknolojideki önemi zamanla artmaktadır. Enzim içeren ürünlerde, enzimlerin yarı ömrü ve enzimlerin uygulama sırasındaki kararlılığının azalması bu ürünlerin kullanılmasını güçleştirmektedir. Bu yüzden, enzimlerin stabilize edilmesi çalışmaları önem kazanmıştır (O' Fagain, 2003).

Endüstriyel enzimlerin uygulama sırasında kararlılığını kaybetmesi biyoteknolojide kritik bir sorundur. Enzimlerin kararlılığının sağlanması için protein stabilizasyonundan, protein mühendisliğinden, immobilizasyon tekniklerinden veya kimyasal modifikasyondan yararlanılmaktadır (Dickens, 1998).

Endüstriyel uygulamalar sırasında enzimler çeşitli faktörlerden dolayı aktivitelerini

kaybederler. İki fazlı sistemlerde çözünebilen enzim ve organik çözücü damlalarının arayüzeyleri veya karışmış sistemlerdeki çözünebilen enzim ve gaz kabarcıkları arasındaki etkileşimler enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olabilir. Bu arayüzeyler, proteinin elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağları etkileşimlerini destabilize ederek enzimin geri dönüşümsüz denatürasyonuna neden olurlar (Dickens, 1998).

Proteinlerin polisakarlidlere kovalent bağlanması polisakkaridlerin kimyasal olarak aktif hale getirilmesinden sonra gerçekleşebilmektedir (Shmanai ve Litoshko, 2001). İyonik polisakkaridler ile enzimlerin kovalent olarak bağlanması enzimleri stabilize etmek için en çok kullanılan yöntemlerdendir (Darias ve Villalonga, 2001). Enzimlerin endüstriyel kullanımı arttıkça, fonksiyonel özellikleri geliştirilen gıda proteinleri rağbet görmektedir. . Polisakkaritlerin stabilize edici ve proteinlerin emülsifiye edici özellikleri birleştiğinde proteinlere polisakkaridlerin kovalent bağlanması sonucunda konjugatın stabilitesini ve çözünürlüğünü artırır (Dickinson ve Galazka, 1991).

Ayrıca, enzimlerin polianyonlar ile kompleksleri yapıldığında enzimlerin katalitik aktiflikleri yok olur (Mustafaev, 1996). Dekstran sülfat polimeri bir polianyondur. Dekstran sülfat polimeri bir protein ile kovalent olarak bağlandığında proteinin globular yapısının denatüre olmasına ve enzimin aktivitesinin düşmesine neden olabilir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Kaba terazi	: Precise BJ 6100D
Hassas terazi	: Precise XB 220A
Manyetik karıştırıcı	: Heidolph MR 3001
Vorteks	: Heidolph Type REAX top
Su banyosu	: GFL 1086
Soğutmalı santrifüj	: ThermoIEC (Micromax RF) Model 230
Liyofilizatör	: Telstar Cryodos
Saflaştırılan su cihazı	: Millipore F4SN77678
pH metre cihazı	: Inolab
HPLC sistemi	: Shimadzu Program Class VP.
GPC sistemi	: Viscotek 4 detektörlü SEC-HPLC-GPC
Protein ayrıştırma cihazı	: Model 2110 fraction collector
UV Visible Spektrofotometre	: Model V-530 JASCO Program
Ultrafiltrasyon Sistemi	: Millipore Stirred Ultrafiltration Cell
FTIR	: Perkin Elmer

3.1.2 Kullanılan Malzemeler

- Otomatik pipet : Finnpiette 0-50 µl, 100-1000 µl, 10 mL
- Beher : 50ml, 100 ml, 500 ml, 1 L, 2 L, 4 L
- Erlen
- Penisilin şişeleri
- Ebandorf tüpleri

3.1.3 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Çok ufak tanecikli sabit fazın üzerinden yüksek basınçta hareketli fazın yürütülmesi ile gerçekleştirilen bir kromatografi türüdür. Kullanılan kolonda yine ayrılma jel filtrasyon esasına göre eluatlar elde edilir.

Kolon	: Silika jel kolon (LC column Shim Pack Diol-300)
Boyut	: 7,9mm x 50cm
Akış hızı	: 1 ml/dak
Dedektör	: UV-VIS dedektör (SPD-10AV)
Mobil faz	: PBS; pH= 7,0; %0,05 NaN ₃
Akış hızı	: 1ml / dakika
Kolon sıcaklığı	: 25 °C
Dalga boyu	: 280 nm

3.1.4 Kullanılan GPC (Viscotek) Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Viscotek cihazı dolgulu kolon kullanan bir kolon sıvı kromatografisidir. Viscotek cihazında sıvı hareketli faz yüksek basınçta ufak tanecikli hareketli faz üzerinde hareket ettirilmektedir. Bu tekniğe yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilmektedir. Dört dedektörlü bir sistemdir.

Viscotek cihazı üç bölümden oluşur:

1. Numune hazırlama ve pompa bölümü

Viscotek GPCmax VE2001 GPC SOLVENT / SAMPLE MODULE

2. Kolon ve dedektör kısmı

Viscotek TDA 302 Triple Detector Array

3. Bilgisayar kısmı

Yazılım adı: Omnisec 3.1 programı.

Viscotek cihazında poröz tipli kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Poröz kolonlar içindeki dolgu maddesinin taneciklerinin çapı 3-10 µm arasında değişmektedir.

Kolon 1 : TOSOH G 5000 PWXL

Polimer dolgulu kolon

Akış hızı : 0,8ml/dak

Boyut : 7,8mm x 30 cm

Kolon 2 : Shim-Pack Diol 300

Silika dolgulu kolon

Akış hızı : 1ml/dak

Boyut : 7,9mm x 50 cm

Kolon 3 : TOSOH G 3000 SWXL

Silikon dolgulu kolon

Akış hızı : 0,8ml/dak

Boyut : 7,8mm x 30cm

Mobil faz : PBS; pH= 7,0; %0,05 NaN₃

Kolon sıcaklığı : 25°C

Dalga boyu : 280 nm

3.1.5 Kullanılan UV-Vis Spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Optical System	: Single monochromator
Detektör	: Silikon fotodiod (S1337)
Işık kaynağı	: Deuterium lamp : 190 to 350 nm
	Halogen lamp : 390 to 1100 nm

3.1.6 Kullanılan Protein Ayırıştırma Cihazının Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

U.V. monitör	: Biorad Econo (model EM-1)
Fraksiyon toplayıcı	: Biorad model 2110 fraction collector
Kayıt edici	: Biorad chart recorder model 1327
Pompa	: Biorad Econo pump (model EP-1)

3.1.7 Kullanılan Fourier Transform Infrared Spektrometre Cihazının Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

FT-IR	: Perkin Elmer
Universal ATR Sampling Accessory	: Perkin Elmer

3.2 Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Maddeler	Üretici Firma	Lot No.
<i>Mucor miehei</i> Rennet	Sigma	R5876
Dekstran sülfat Mw=100.000	Fluka	66786
Sefadeks G-50	Fluka	84946
Sefadeks G-100	Fluka	84951
Süt tozu	Pınar A.Ş.	
Dializ Selüloz mebranı	Sigma	D9777-BULK
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Riedel-de Haen	4269
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Fluka	71647
NaCl	Riedel-de Haen	13423
Asetik asit	Fluka	45754
NaOH	Riedel-de Haen	6203
NaIO ₄	Fluka	71862
HCl	Merck	1.00314.2500
NaBH ₄	Merck	S3912873 403
CaCl ₂	Riedel-de Haen	12095

3.3 *Mucor miehei* Rennetin Aktivite Tayini

Mucor miehei rennetin süt pıhtılaştırma aktivitesi uluslararası ünite birimi (IU) olarak hesaplandı. Bir IU (=400 Soxhlet rennet units) 1g yağsız süt tozu ve 0,0173 g CaCl_2 (0,016 N) içeren 10 mL süt çözeltisini 35 °C de ve bir dakikada pıhtılaştıran enzim miktarıdır (Payens., 1984; McMahon, Brown, vd., 1984).

3.3.1 Süt Çözeltisinin Hazırlanması

pH 3.0, 4.0, 5.0'te süt çözeltisi hazırlanırken asetat tamponu kullanılmıştır.

Asetat tamponlarının hazırlanması (pH 3.0, 4.0 ve 5.0)



CaCl_2 in asetat tamponuna eklenmesi (bir süre karıştırılır)



Süt tozunun karıştırılarak CaCl_2 lı çözeltiliye eklenmesi (bir süre karıştırılır)



Hazırlanan süt çözeltisi 30 dakika karanlıkta bekletildi.



Süt çözeltisi aktivite tayini için kullanıma hazır hale geldi.

Yukarıdaki proseste 10 mL süt çözeltisi içinde 1g yağsız süt tozu ve 0,0173g CaCl_2 (0,016 N) bulunduracak şekilde hazırlandı (Payens., 1984; McMahon, Brown, vd., 1984).

pH 6.0, 7.0, 8.0'de ise süt çözeltisi hazırlanırken fosfat tamponu kullanılmıştır.

Fosfat tamponlarının hazırlanması (pH 6.0, 7.0 ve 8.0)



CaCl₂ in fosfat tamponuna eklenmesi (bir süre karıştırılır)



Süt tozunun karıştırılarak CaCl₂ lı çözeltiliye eklenmesi (bir süre karıştırılır)



Hazırlanan süt çözeltisi 30 dakika karanlıkta bekletildi.



Süt çözeltisi aktivite tayini için kullanıma hazır hale geldi.

Yukarıdaki proseste 10 mL süt çözeltisi içinde 1g yağsız süt tozu ve 0,0173g CaCl₂ (0,016 N) bulunduracak şekilde hazırlandı (Payens., 1984; McMahon, Brown, vd., 1984).

3.3.2 Sütte Pıhtı Oluşumunun Tayin Edilmesi

Aktivitesi ölçülecek numunelerin, protein konsantrasyonu 0,04 mg/mL olacak şekilde stok enzim çözeltileri hazırlandı. Daha önce hazırlanan süt çözeltisinden 10 mL şer süt mezür yardımıyla 25 mL lik 3 adet behere ilave edilerek, pıhtılaşmanın gözleneceği sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda bekletilir. Termometre ile beherin sıcaklığı kontrol edilir. Süt çözeltisi aktivite yapılacak sıcaklığa geldiğinde stok enzim çözeltisinden 1 mL enzim otomatik pipet ile çekilerek süt çözeltisine bırakılır ve aynı anda kronometre başlatılır. Termometrenin ucu ile beherdeki süt çözeltisi karıştırılır. Termometrenin ucunda teleme oluşumu gözleendiği anda kronometre durdurulur ve kronometredeki değer saniye olarak kaydedilir. Kaydedilen pıhtılaşma sürelerinden aktivite değerleri; süt pıhtılaştırma aktivitesi enzim miktarı/zaman olarak IU/mg cinsinden hesaplandı (Berridge, 1945; Thakur vd, 1990; Şeker, 1998).

3.4 *Mucor miehei* Rennet-Dekstran Sülfat Konjugatlarının Eldesi

3.4.1 Satın alınan *mucor miehei* Rennet' in Jel Filtrasyon Yöntemi (G-50, Sephadexs) ile Saflaştırılması

Satın alınan *mucor miehei* rennet enzimine (Fluka, protein içeriği: % 9,8) jel filtrasyon işlemi uygulandı. 2000 mg satın alınan *mucor miehei* rennet 10 mL 0,01M, pH 7.0 tuzsuz fosfat tamponunda çözüldü. *mucor miehei* Rennet 2.5×40 cm (Sephadexs G-50) jel filtrasyon kolonundan geçirilerek saflaştırıldı. Bio-Rad marka protein saflaştırma sisteminin 280 nm de UV monitörü kullanılarak fraksiyonlara ayrıldı. Saflaştırma işlemi sonucunda iki eluat elde edildi (Şekil 4.2).

3.4.2 Satın Alınan ve Saflaştırılan Enzimin pH 5.0'te ve Diğer pH'larda (pH 4.0, 6.0, 7.0 ve 8.0) Aktivitelerinin Tayin Edilmesi

Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennet pH 5.0'te ve diğer pH'larda (pH 4.0, 6.0, 7.0 ve 8.0) süt pıhtılaştırma aktiviteleri ölçüldü. pH 3.0, 4.0 ve 5.0 için asetat tamponu kullanıldı. pH 3.0 da süt çözeltisi hazırlandıktan sonra asit etkisi ile süt proteinleri enzim ilavesinden önce pıhtı oluşturdularından pH 3.0' te enzimin süt pıhtılaştırma aktivitesi kontrol edilemedi.

Çizelge 3.1 Saflaştırılan *mucor miehei* rennetin konsantre edildikten sonra ve liyofilizatörde kurutulduktan sonra elde edilen havuz 1 ve havuz 2 eluatlarının pıhtılaşma sürelerinin ölçülmesi, pH 5.0, 35°C

Yöntem	Havuz	Pıhtılaşma Süresi (sn)			Ortalama
					Pıhtılaşma Süresi (sn)
Liyofilizatör	Havuz 1	34	37	39	37
	Havuz 2	1245	1275	1270	1263
Konsantre	Havuz 1	30	31	30	30
	Havuz 2	767	735	760	754

Çizelge 3.2 Satın alınan *mucor miehei* rennetin saflaştırılması sonucu elde edilen farklı fraksiyonların pıhtılaşma sürelerinin ölçülmesi, pH 5.0, 35 °C

Fraksiyon No	Pıhtılaşma Süresi (sn)			Ortalama
				Pıhtılaşma Süresi (sn)
5	64	63	65	64
14	33	29	32	31
35	541	564	552	552
51	1824	1810	1817	1817

Çizelge 3.3 Satın alınan enzimin saflaştırılması sonucu elde edilen Havuz 1 ve havuz 2 nin pıhtılaşma sürelerinin ölçülmesi, pH 5.0, 35 °C

Havuz	Pıhtılaşma Süresi (sn)			Ortalama
				Pıhtılaşma Süresi (sn)
Havuz 1	29	32	31	31
Havuz 2	960	1020	930	970

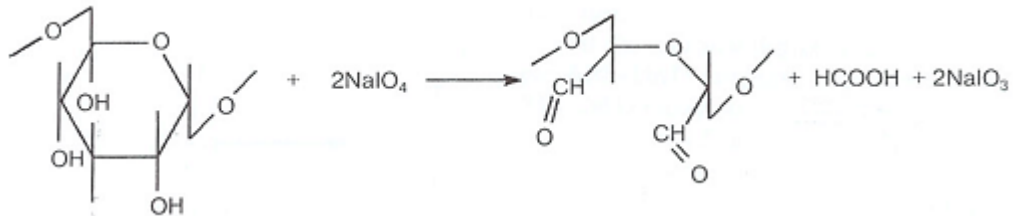
3.4.3 Dekstran Sülfatın Aldehid Türevinin Eldesi

Kullanılan Çözeltiler

- 1) 3,33g Dekstran Sülfat 30ml destile suda çözüldü.
- 2) 8,00g NaIO₄ 70ml destile suda çözüldü.

Deneyin Yapılışı

- 1) Dekstran sülfat çözeltisinin üzerine NaIO₄ yavaş yavaş karıştırılarak eklendi.
- 2) Bu çözelti karanlıkta, oda sıcaklığında 24 saat süreyle karıştırıldı.
- 3) Elde edilen yükseltgenmiş dekstran sülfat ile birlikte ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için ürün 24 saat karanlık ortamda, oda sıcaklığında destile suya karşı diyalize bırakıldı.
- 4) Soğutarak kurutma ile (liyofilizatörde) aldehid grupları bulunduran dekstran sülfat elde edildi (Sacco, 1988, Betancor, 2004, Dobrenchenko, 1993).



Şekil 3.1 Dekstran sülfat'ın aldehidlenme reaksiyonu (Gladysheva vd, 2001)

3.4.4 *Mucor miehei* Rennet -Dekstran Sülfat Konjugatlarının Elde Edilmesi

Konjugasyon için saflaştırılan *Mucor miehei* Rennet'ten elde edilen birinci eluat kullanıldı. 5 mL reaksiyon hacminde konjugasyon reaksiyonu yapıldı. Reaksiyonda pH 7.0 da 0.1M sodyum fosfat tamponu kullanıldı. Saflaştırılan enzim konsantrasyonunun konjugasyon reaksiyonunda kullanılacak kadar yüksek olmaması nedeniyle saflaştırılan enzim ultrafiltrasyon cihazı ile konsantre edildi. Daha sonra reaksiyon hacmindeki son protein konsantrasyonu $C_{\text{protein}} = 2 \text{ mg/ml}$ olacak şekilde konsantre enzimden $2 \text{ mg/ml} \times 5 \text{ mL} = 10 \text{ mg}$ proteine karşılık gelen hacimde alındı. Dekstran sülfat konsantrasyonu ise protein konsantrasyonu sabit alınarak farklı oranlı konjugatlar için hesaplandı (Çizelge 3.4). Şilifli 50 mL'lik erlende 5 mL'lik reaksiyon 25°C 'deki su banyosunda 16 saat bekletildi. Daha sonra, $+4^\circ\text{C}$ deki 100mM, pH: 8,5 olan sodyum bikarbonat çözeltisinden pH yükseltmek için 7,0 mL eklendi. Sonra, 12 mg (1 mg/mL) sodyum borhidrür (NaBH_4) aldehid gruplarını ve amino aldehid bağlarını indirgemek için ilave edildi (Betancor, vd. 2004). Bu çözelti 15 dk. $+4^\circ\text{C}$ karıştırıldıktan sonra tekrar aynı miktarda sodyum borhidrür (NaBH_4) eklendi. Tekrar 15 dk. $+4^\circ\text{C}$ karıştırıldı ve pH 7,0'a ayarlandı (Betancor vd. 2004). Daha sonra reaksiyon selülozik membran kullanılarak ultrafiltrasyon cihazı ile konsantre edilerek iki kez destile su ve iki kez de fosfat tamponu ile yıkandı. Elde edilen 2 mL (c: 1,5 mg/mL) konjugat Sephadex G-100 (1x50 cm) kolonundan geçirilerek saflaştırıldı.

3.4.4.1 Aldehid Dekstran Sülfat Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Protein konsantrasyonu (2 mg/mL) sabit tutularak farklı protein/polimer oranları için aldehid dekstran sülfatın konsantrasyonları hesaplanır.

$$\frac{n_{\text{protein}}}{n_{\text{polimer}}} = \frac{C_{\text{prot}} \times M_{\text{A pol}}}{C_{\text{pol}} \times M_{\text{A prot}}}$$

$$n_{\text{polimer}} = \frac{C_{\text{pol}} \times M_{\text{A prot}}}{C_{\text{prot}} \times M_{\text{A pol}}}$$

$$C_{\text{protein}} = 2 \text{ mg/ml}$$

$$M_{\text{A pol}} = 100.000$$

$$M_{\text{A prot}} = 40.000$$

$$C_{\text{polimer}} \text{ hesaplanır.}$$

Oran 1/20 için,

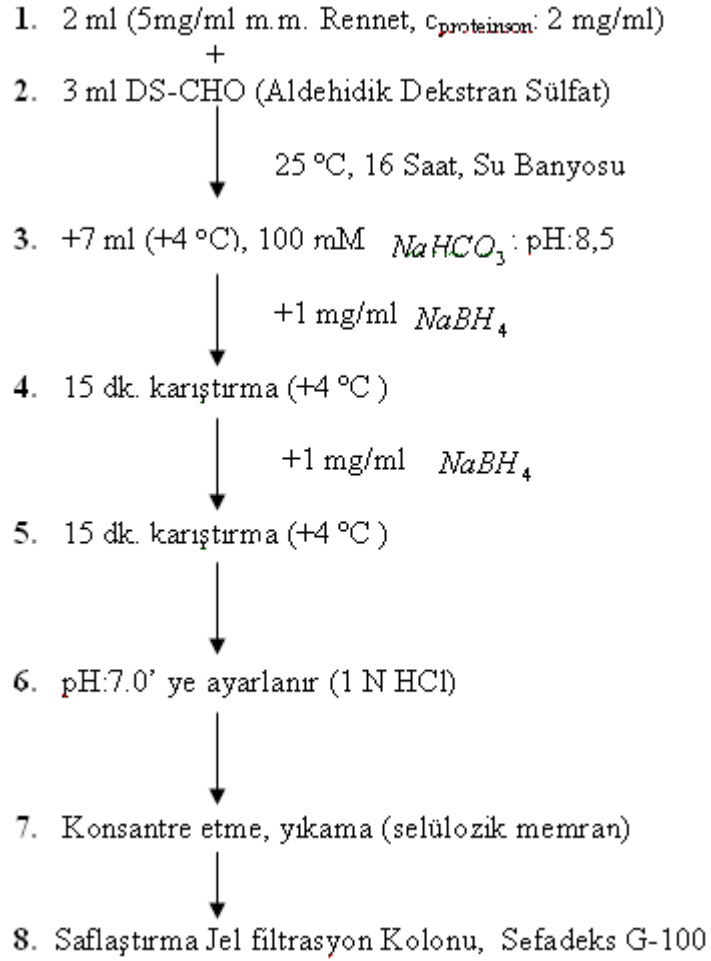
$$\frac{n_{\text{protein}}}{\text{_____}} = \frac{2 \times 100.000}{\text{_____}} = 1/20$$

$$n_{\text{polimer}} \quad C_{\text{pol}} \times 40.000$$

$$C_{\text{polimer}} = 100 \text{ mg/ml}$$

Çizelge 3.4 C_{protein} : 2 mg/ml konsantrasyonu sabit alınarak hesaplanan C_{polimer} konsantrasyonları

$n_{\text{mucor miehei RENNET}}/n_{\text{DSCHO}}$	$C_{\text{polimer (DSCHO)}} \text{ (mg/ml)}$
1/20	100
1/10	50
1/5	25
1/1	5.0
5/1	1.0
10/1	0.5
20/1	0.25

Çizelge 3.5 *Mucor miehei* Rennet-dekstran sülfat konjugasyon süreci

3.4.5 Konjugatların Jel Filtrasyon ile (G–100, Sephadeks) Saflaştırılması

Konjugatlar, reaksiyon ortamında bulunabilecek safsızlıkları yada agregatları uzaklaştırmak için jel filtrasyon kromatografisi ile Sephadeks G–100 dolgu maddesi kullanılarak 1.0x50 cm Bio-Rad kolonunda saflaştırıldı. Saflaştırılan konjugatlar protein saflaştırma cihazının fraksiyon toplama aparatı ile tüplere toplandı. Protein saflaştırma cihazının 280 nm de UV dedektörü yardımıyla konjugatların saflaştırma kromatogramları elde edildi ve aynı zamanda, toplanan fraksiyonların UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 280 nm deki absorbans değerleri okundu (Şekil 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.30).

3.5 *Mucor miehei* Rennet-Dekstran Sülfat Konjugatlarının İncelenmesi

3.5.1 Konjugatların FT-IR ile İncelenmesi

Dekstran sülfatın, aldehidik dekstran sülfatın, *Mucor miehei* rennet' in ve protein/polimer: 1/1 ve 1/20 konjugatlarının katı toz halinde ATR başlığı altında FT-IR spektrumları alındı (Şekil 4.37).

3.5.2 Konjugatların HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile İncelenmesi

Farklı protein/polimer oranlarındaki konjugatların jel filtrasyon yöntemi (Sephadeks G-100, 1x40cm) ile saflaştırılmasında elde edilen konjugatlar eşit konsantrasyonlarda (c= 0,1 mg/mL) HPLC cihazına verilerek incelendi (Şekil 4.38).

3.5.3 Konjugatların Viscotek Marka GPC ile İncelenmesi

Saflaştırılan konjugatlar GPC (VISCOTEK) cihazına verildi ve alınan kromatogramları incelendi (Şekil 4.39, 4.40, 4.41, 4.42). Dört dedektörde (UV, ışık saçılması, kırılma indisi ve viskozimetre) alınan sinyaller ve alıkonma süreleri saf enzim için alınanlar ile karşılaştırıldı.

3.5.4 Konjugatların Aktivite Tayini

Sentezlenen konjugatlarının Sephadex G-100 dolgu maddesi bulunan kolonundan saflaştırıldıktan sonra konjugatların aktiviteleri tayin edilmiştir. Konjugatların aktiviteleri pH 5.0 asetat tamponun kullanılmasıyla hazırlanan süt çözeltisine eşit protein miktarlarda (0.04 mg/mL) protein içeren konjugatların ilavesiyle belirlenmiştir. pH 5.0'de hazırlanan süt çözeltisine 1 mL konjugatların sütte pıhtı oluşturma süreleri ölçülmüştür (Çizelge 3.12).

3.6 Satın Alınan ve Saflaştırılan *Mucor miehei* Rennet' in İzoelektrik Noktasının Belirlenmesi

0,5 mg/mL protein konsantrasyonunda 5 mL Satın alınan *mucor miehei* rennet çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu 5 mL çözeltiye 0,1 N NaOH çözeltisi ilave edildi. Her NaOH ilavesinde çözeltinin pH'sı ölçüldü ve kayıt edildi. NaOH sarfiyatı ile ölçülen pH değerleri arasında çizilen grafikten *mucor miehei* rennet' in izoelektrik noktası hesaplandı. Saflaştırılan *mucor miehei* rennet' ten elde edilen birinci eluattan (Havuz 1) 0,5 mg/ mL protein yoğunluğunda 5 mL saflaştırılan *mucor miehei* rennet çözeltisi hazırlandı. Ve aynı süreç izlenerek sarf edilen NaOH hacmine karşı pH değerleri ölçüldü ve çizilen grafikten saflaştırılan rennetin de izoelektrik noktası 4.1 olarak hesaplandı (Şekil 4.43).

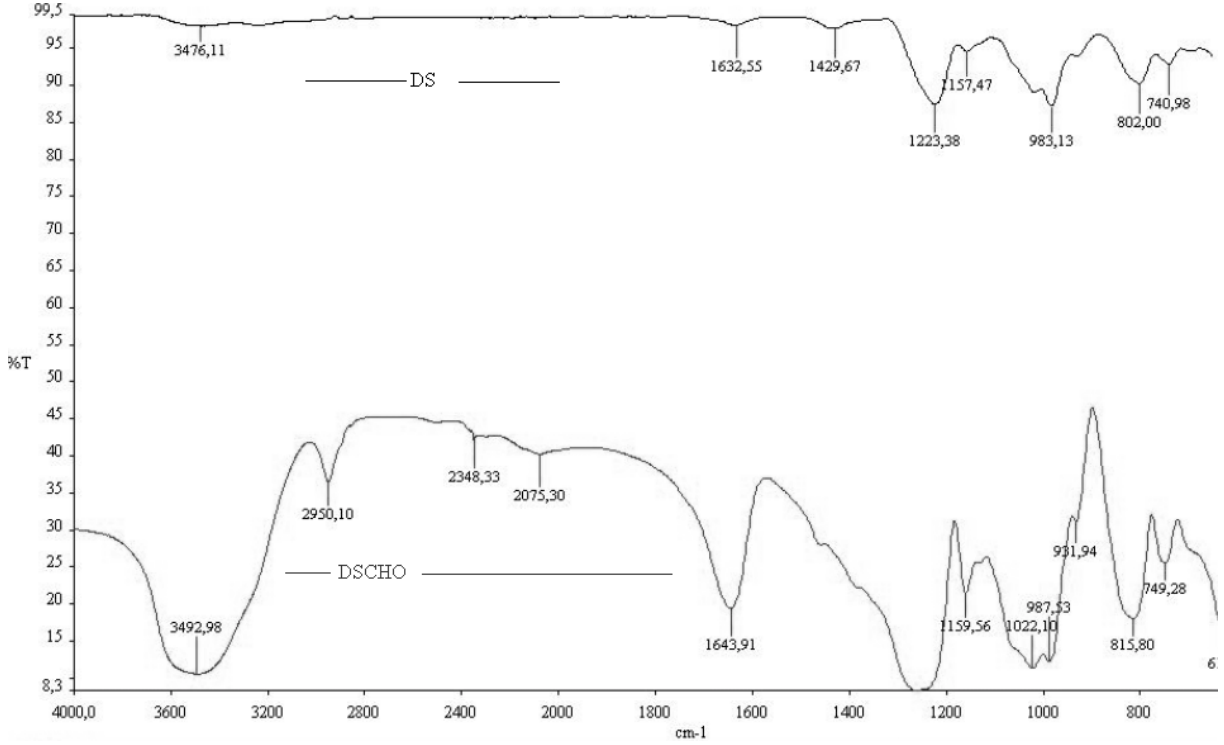
3.7 Saflaştırılan *Mucor miehei* Rennet ve Konjugatların Fiziksel Karışımlarının Pıhtılaşma Sürelerinin ve Aktivitelerinin Belirlenmesi

Elde edilen farklı oranlardaki konjugatların süt pıhtılaştırma aktivitesindeki düşüşlerin özellikle saf *mucor miehei* rennet ile aldehid dekstran sülfat arasındaki kovalent bağlanmadan kaynaklandığını desteklemek için; saf *mucor miehei* rennet ile dekstran sülfat fiziksel olarak karıştırılmış ve süt pıhtılaştırma aktivitesi ölçülmüştür. Saflaştırılan *Mucor miehei* rennetin ve protein/polimer 1/10 fiziksel karışımının oda sıcaklığındaki ve farklı sıcaklıklarda 0 dakika bekleme süreleri sonundaki sıcaklık ile aktivite değerleri arasında çizilen grafikler Şekil 4.44 ve 4.45'te gösterilmektedir.

4. DENEY SONUÇLARI

4.1 Dekstran Sülfatın Eldesi

Aldehid dekstran sülfatın dekstran sülfat FTIR spektrumundan farklı olarak 1643.9 da, 2950 ve 3492, 98 de yarılmalar ortaya çıkmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Dekstran sülfatın ve aldehid türevinin FTIR spektrumu.

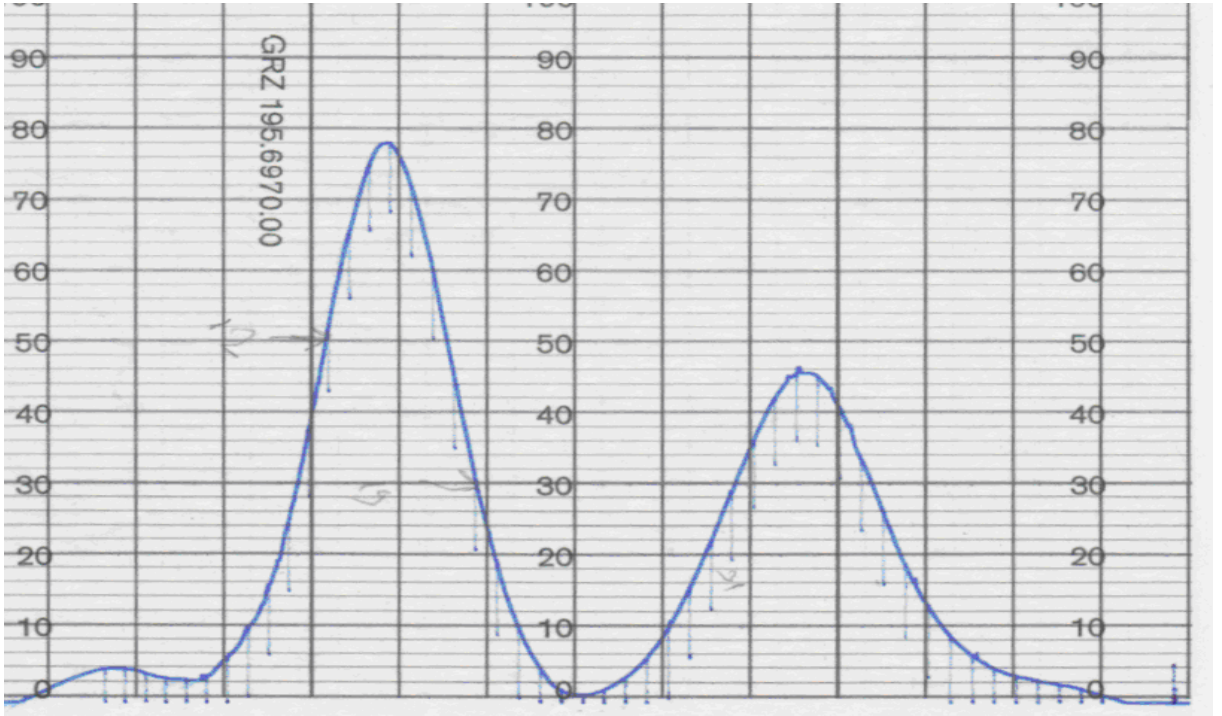
4.2 Satın Alınan *Mucor miehei* Rennet' in Saflaştırma Kromatogramları

Bio-Rad jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-50 dolgu maddesi kullanılarak satın alınan *Mucor miehei* rennet saflaştırılmıştır. Satın alınan *mucor miehei* rennetten elde edilen fraksiyonlar iki havuzda toplanmıştır. İlk büyük pik Havuz 1, ikincisi ise Havuz iki olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.2).

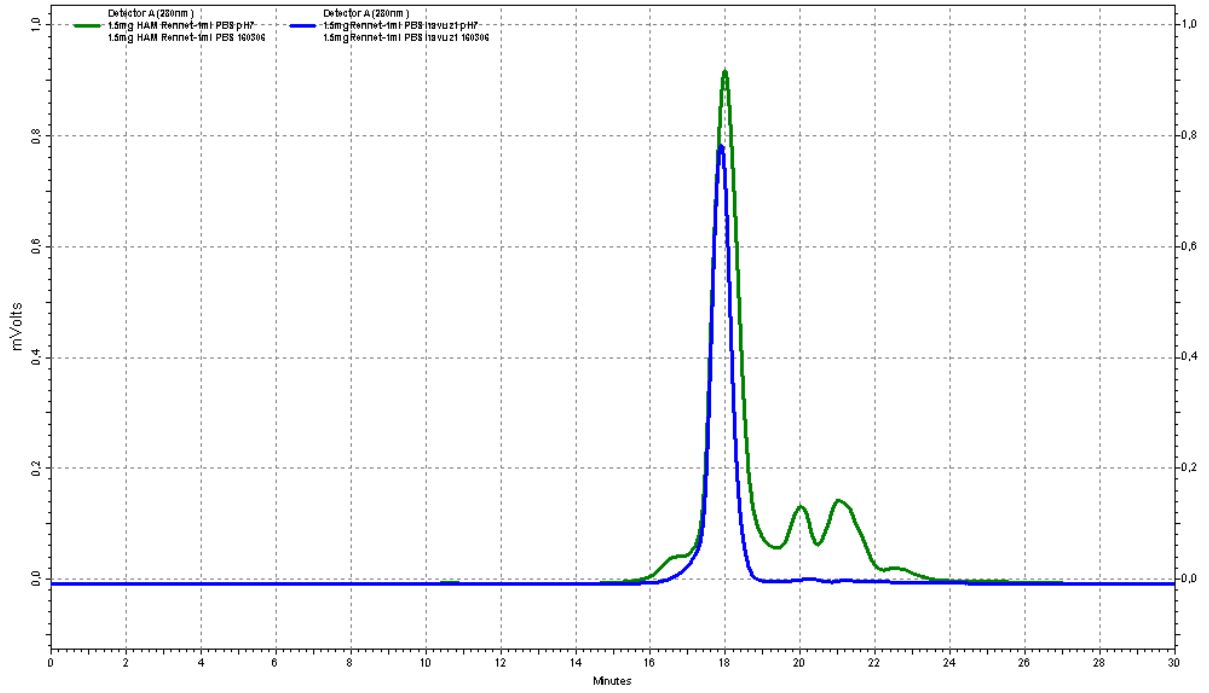
Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennet Bio-Rad kolonu saflaştırmanın kalitesini kontrol etmek için HPLC cihazına verilmiştir. Şekil 4.3'te satın alınan enzimdeki

safsızlıkların giderildiği görülmektedir.

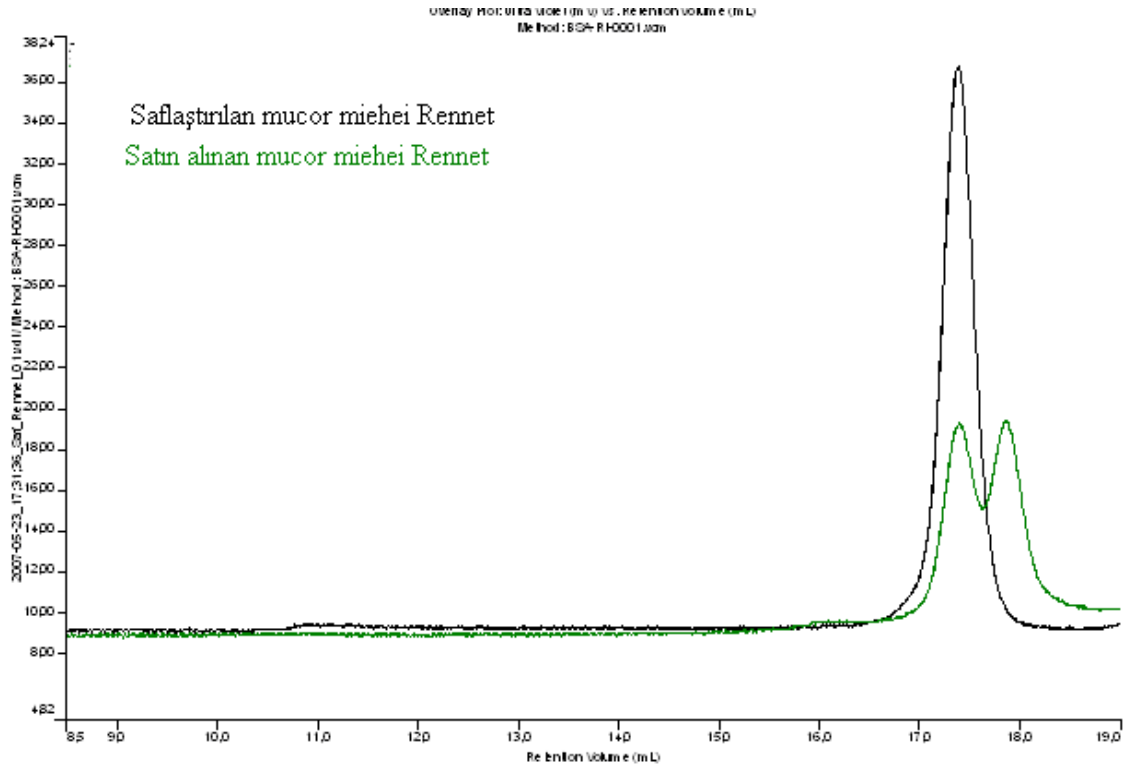
Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin 4 dedektörlü GPC (Viskotech) cihazı ile kromatogramları alınmıştır. Satın alınan enzimin satın alınan enzimin kromatogramında görülen 11., 17.5 ve 18.5, dakika alıkonma sürelerinde dedektör cevapları alınmıştır. Saf enzimin kromatogramında ise yalnızca alıkonma süresi 17.5 dakikaya ait dedektör cevabı görülmektedir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7).



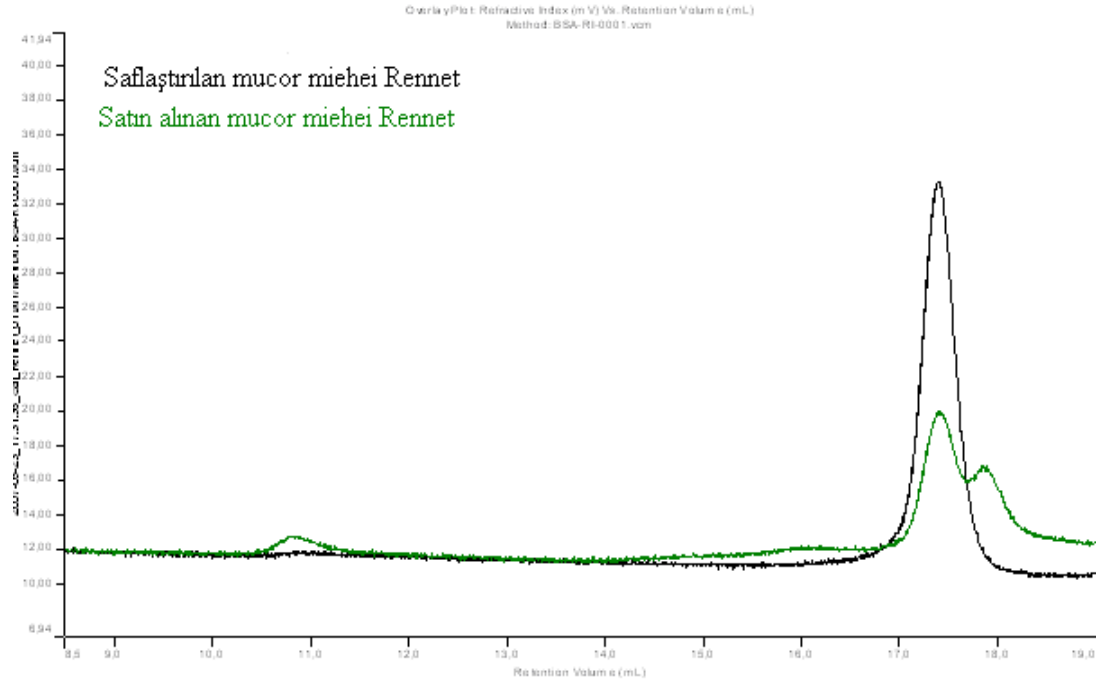
Şekil 4.2 Satın alınan *mucor miehei* Rennetin +4 °C'deki jel filtrasyon kolonu ile Bio-Rad UV dedektör kullanılarak 280 nm'de alınan kromatogramı



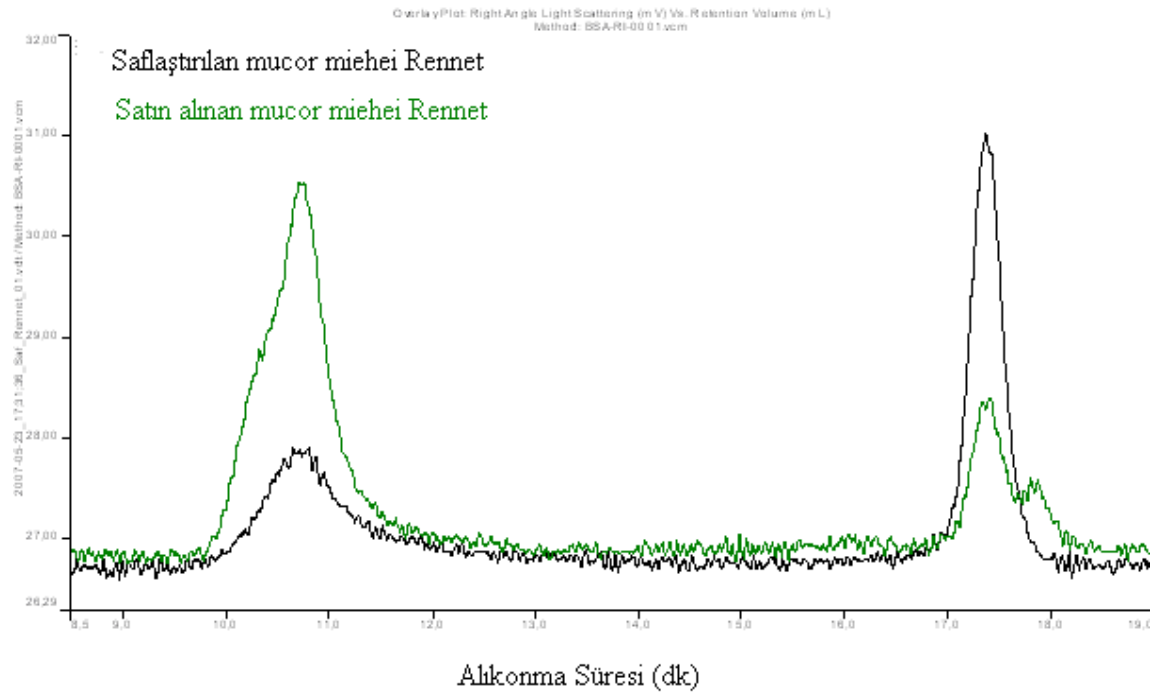
Şekil 4.3 Satın alınan ve safılaştırılan *mucor miehei* Rennetin HPLC cihazı ile alınan (Jel Filtrasyon Kolonu) kromatogramı



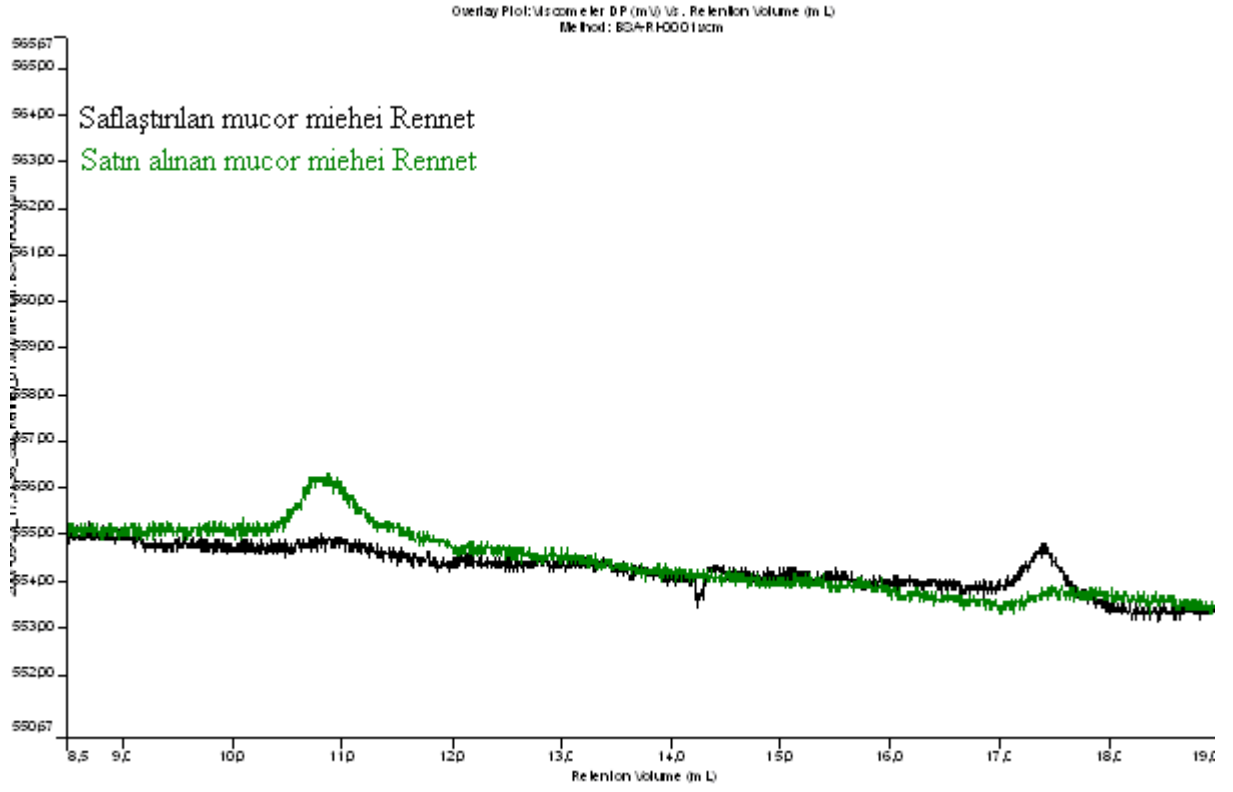
Şekil 4.4 Satın alınan ve safılaştırılan *mucor miehei* Rennetin GPC (Viskotek) cihazının UV dedektörü ile alınan kromatogramı



Şekil 4.5 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* Rennet'in GPC (Viskotek) cihazının kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogramı



Şekil 4.6 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* Rennet'in GPC (Viskotek) cihazının ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogramı



Şekil 4.7 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* Rennet'in GPC (Viskotek) cihazının viskozimetre dedektörü ile alınan kromatogramı

4.3 Satın Alınan ve Saflaştırılan *Mucor miehei* Rennetin Aktivite Sonuçları

4.3.1 Satın Alınan ve Saflaştırılan *Mucor miehei* Rennet' in Farklı pH ve Sıcaklıklarda Pıhtılaşma süreleri ve Aktiviteleri

Satın alınan ve saflaştırılan enzimin pH 7,0'de ve özellikle ve pH 8,0'de aktiviteleri çok düşüktür. En yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi pH 4,0'de gözlenmiştir. pH 4, 5 ve 6'da sıcaklık artıkcı pıhtılaşma süresi kısalmıştır.

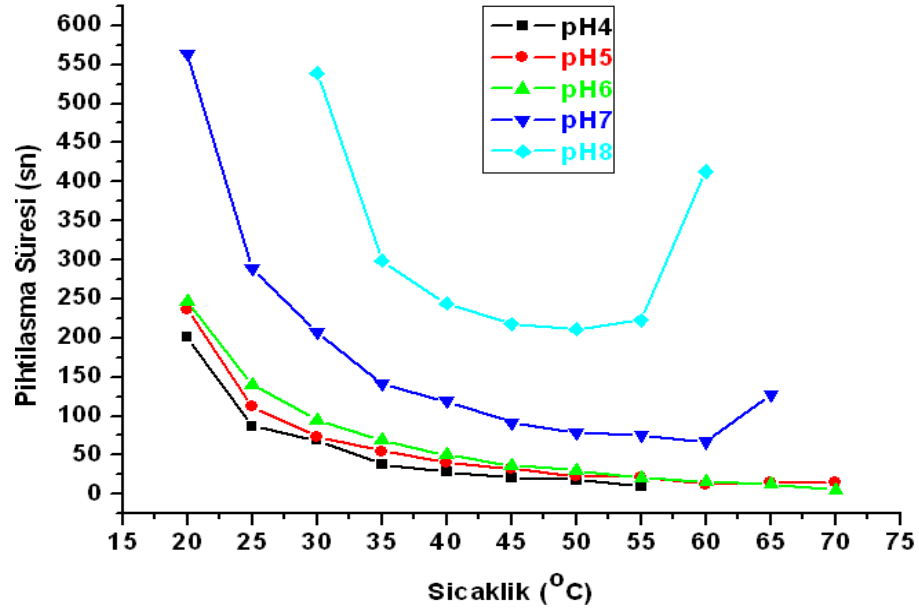
Çizelge 4.1 Satın alınan *mucor miehei* rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda ölçülen pıhtılaşma süreleri (sn)

Sıcaklık (°C)	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
	Pıhtılaşma süresi (sn)				
20	201	237	247	564	***
25	87	112	140	289	***
30	69	74	95	208	539
35	38	55	69	141	299
40	29	41	50	119	244
45	21	33	37	92	218
50	18	23	30	79	211
55	10	22	21	76	223
60	*	13	16	67	413
65		15	13	127	***
70		15	5	***	
75		*	*		

Sıcaklık ile pıhtılaşma süresi arasında çizilen grafik şekil 4.8'de gösterilmektedir.

*: Süt çözeltisi enzim ilavesi olmadan kendiliğinden pıhtılaşmıştır.

***: Enzimin süt çözeltisine ilavesinden sonra 10 dakika beklendikten sonra pıhtılaşma gözlenmediğinden dolayı aktivite yok kabul edilmiştir.



Şekil 4.8 Satın alınan *mucor miehei* rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda pıhtılaşma süreleri (sn)

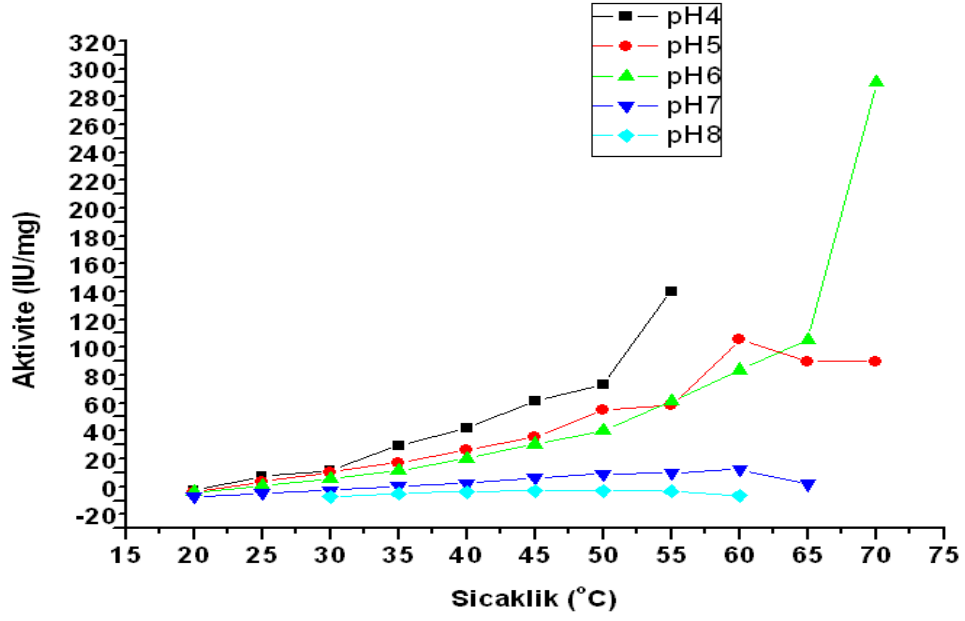
Çizelge 4.2 Satın alınan *mucor miehei* Rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerleri (IU/mg)

Sıcaklık (°C)	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
	Aktivite (IU/mg)				
20	7,5	6,3	6,1	2,7	‘**’
25	17,2	13,4	10,7	5,2	‘**’
30	21,7	20,3	15,8	7,2	2,8
35	39,5	27,3	21,7	10,6	5,0
40	51,7	36,6	30,0	12,6	6,1
45	71,4	45,5	40,5	16,3	6,9
50	83,3	65,2	50,0	19,0	7,1
55	150,0	68,2	71,4	19,7	6,7
60	‘*’	115,4	93,8	22,4	3,6
65		100,0	115,4	11,8	‘**’
70		100,0	300,0	‘**’	
75		‘*’	‘*’		

Farklı pH lar için sıcaklık ile aktivite değerleri arasında çizilen grafik şekil 4.9’da gösterilmektedir.

‘*’: Süt çözeltisi enzim ilavesi olmadan kendiliğinden pıhtılaşmıştır.

‘**’: Enzimin süt çözeltisine ilavesinden sonra 10 dakika beklendikten sonra pıhtılaşma gözlenmediğinden dolayı aktivite yok kabul edilmiştir.

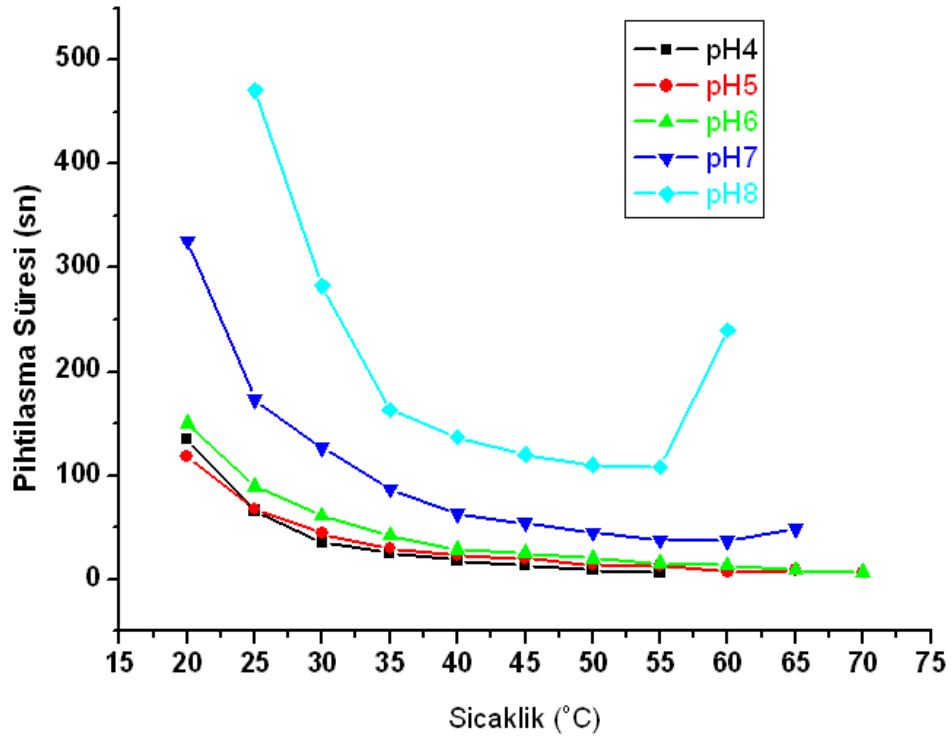


Şekil 4.9 Satın alınan *mucor miehei* rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda aktiviteleri

Çizelge 4.3 Safılaştırılan *Mucor miehei* Rennet'in farklı pH ve sıcaklıklarda ölçülen pıhtılaşma değerleri (sn)

Sıcaklık (°C)	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
	Pıhtılaşma süresi (sn)				
20	135	118	150	326	***
25	66	68	89	173	471
30	35	44	61	127	283
35	25	30	42	87	163
40	18	23	28	63	137
45	13	20	25	54	120
50	9	14	20	45	110
55	7	13	15	38	108
60	*	7	13	37	240
65		9	9	49	***
70		7	7	***	
75		*	*		

Safılaştırılan *Mucor miehei* Rennet'in farklı pH lar için, pıhtılaşma süreleri ile sıcaklık arasında çizilen grafik şekil 4.10'da gösterilmektedir.

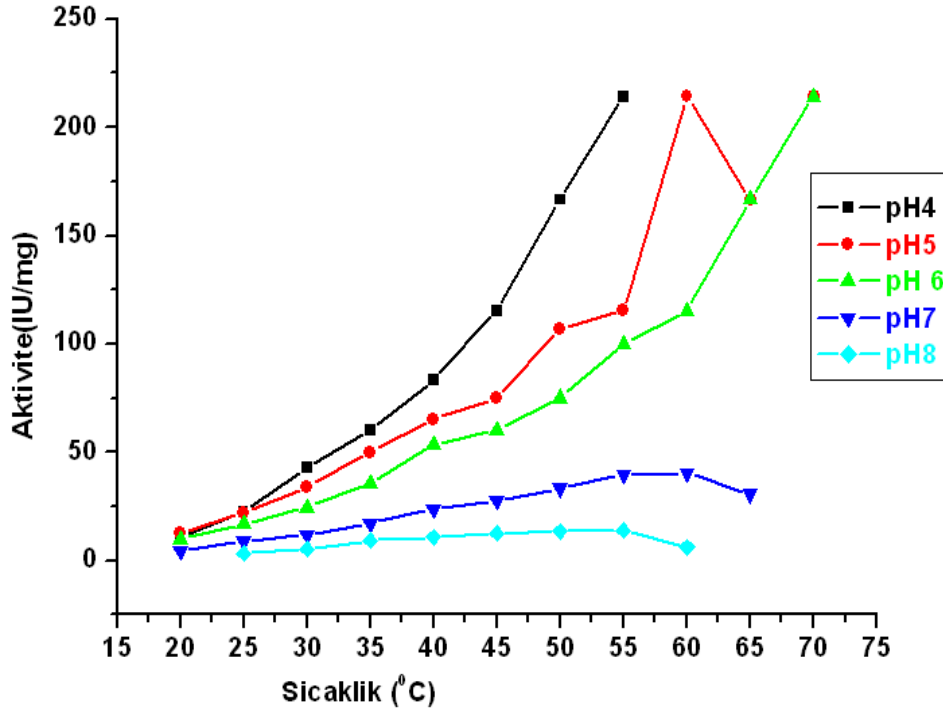


Şekil 4.10 Safılaştırılan *mucor miehei* rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda pıhtılaşma süreleri

Çizelge 4.4 Safılaştırılan *Mucor miehei* Rennet'in farklı pH ve sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerleri (IU/mg)

Sıcaklık (°C)	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
	Aktivite (IU/mg)				
20	11,1	12,7	10,0	4,6	***
25	22,7	22,1	16,9	8,7	3,2
30	42,9	34,1	24,6	11,8	5,3
35	60,0	50,0	35,7	17,2	9,2
40	83,3	65,2	53,6	23,8	10,9
45	115,4	75,0	60,0	27,8	12,5
50	166,7	107,1	75,0	33,3	13,6
55	214,3	115,4	100,0	39,5	13,9
60	*	214,3	115,4	40,5	6,3
65		166,7	166,7	30,6	***
70		214,3	214,3	***	
75		*	*		

Safılaştırılan *Mucor miehei* Rennet'in farklı pH lar için, pıhtılaşma süreleri ile sıcaklık arasında çizilen grafik şekil 4.11'de gösterilmektedir.



Şekil 4.11 Saflaştırılan *mucor miehei* rennetin farklı pH ve sıcaklıklarda aktiviteleri

4.3.2 Satın Alınan ve Saflaştırılan *Mucor miehei* Rennet' in pH 5,0'te Farklı Sıcaklıklarda, Farklı Bekleme Süreleri Sonrasında Pıhtılaşma Süreleri ve Aktiviteleri

Çizelge 4.5 Satın alınan ve saflaştırılan *Mucor miehei* Rennet'in farklı sıcaklıklarda belirli süreler beklemesinden sonra tayin edilen pıhtılaşma süreleri (sn)

Sıcaklık (°C)	Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet (Havuz 1)		Satın alınan <i>Mucor miehei</i> Rennet
	Bekleme Süresi (dk) ε***	Pıhtılaşma süresi (sn)	Pıhtılaşma süresi (sn)
35	ε*	24	49
	0	25	50
	5	25	53
	15	26	57
	30	26	58
	60	26	60
40	*	20	47
	0	20	47

	5	20	47
	15	20	47
	30	20	48
	60	20	48
45	‘*’	17	40
	0	17	41
	5	18	41
	15	18	41
	30	18	45
	60	19	50
50	‘*’	14	32
	0	14	33
	5	14	35
	15	14	36
	30	17	45
	60	18	53
55	‘*’	11	24
	0	13	28
	5	15	30
	15	18	32
	30	35	35
	60	43	147
60	‘*’	10	23
	0	95	123
	5	121	214
	15	300	457
	30	‘***’	465
	60		545
65	‘*’	8	8
	0	180	180
	5	195	195
	15	‘***’	‘***’

Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0’te farklı sıcaklıklarda farklı bekleme sürelerindeki pıhtılaşma süreleri ile ilgili grafikler Şekil 4.12, 4.14, 4.16, 4.18, 4.20, 4.22’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 Satın alınan ve saflaştırılan *Mucor miehei* rennetin farklı sıcaklıklarda belirli süreler beklemesinden sonra tayin edilen aktivite değerleri (IU/mg)

Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk) ***	Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> rennet (IU/mg)	Satın alınan <i>Mucor miehei</i> rennet (IU/mg)
35	‘*’	62,5	30,6
	0	60,0	30,0
	5	60,0	28,3
	15	57,7	26,3
	30	57,7	25,9
	60	57,7	25,0
40	‘*’	75,0	31,9
	0	75,0	31,9
	5	75,0	31,9
	15	75,0	31,9
	30	75,0	31,3
	60	75,0	31,3
45	‘*’	88,2	37,5
	0	88,2	36,6
	5	83,3	36,6
	15	83,3	36,6
	30	83,3	33,3
	60	78,9	30,0
50	a*	107,1	46,9
	0	107,1	45,5
	5	107,1	42,9
	15	107,1	41,7
	30	88,2	33,3
	60	83,3	28,3
55	‘*’	136,4	62,5
	0	115,4	53,6
	5	100,0	50,0
	15	83,3	46,9
	30	42,9	42,9
	60	34,9	10,2
60	‘*’	150,0	65,2
	0	15,8	12,2
	5	12,4	7,0
	15	5,0	3,3
	30	‘**’	3,2

	60		2,8
65	‘*’	187,5	187,5
	0	8,3	8,3
	5	7,7	7,7
	15	‘**’	‘**’

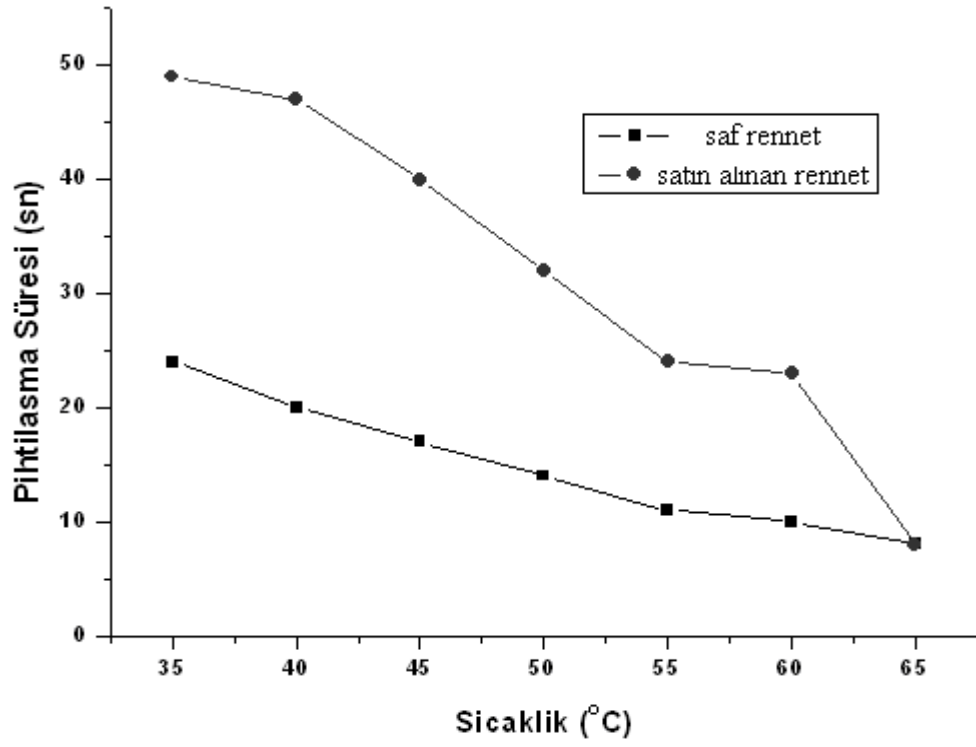
Satın alınan ve saflaştırılan *Mucor miehei* rennetin pH 5,0’te farklı sıcaklıklarda farklı bekleme sürelerindeki aktivite değerleri (Çizelge 3.8’deki pıhtılaşma değerleri kullanılarak hesaplanmıştır) ile ilgili grafikler Şekil 4.13, 4.15, 4.17, 4.19, 4.21, 4.23’de gösterilmiştir.

Oda sıcaklığında bekleyen satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin aktivitesi, pH 5,0’te, 35 °C’den 60 °C’ye kadar olan sıcaklık aralığında artmıştır. Saflaştırılan enzimin aktivitesi 60 IU/mg dan 155 IU/mg a yükselirken, satın alınan enzimin ise 30 IU/mg’dan 60 IU/mg’a yükselmiştir. 0 dakika bekleme süresi sonunda, satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0’te 55 °C’ye kadar aktivitelerinde artış gözlenmiştir. En yüksek aktivite değerleri 55 °C de, saflaştırılan enzim için 115 IU/mg, satın alınan enzim için 45 IU/mg dir. Fakat daha yüksek sıcaklıklarda her iki enzimde aktivitesini kaybetmiştir. 5 ve 15 dakika bekleme süreleri sonunda, satın alınan enzimin aktivitesi en yüksek aktivite değerine 50 °C’de ulaşırken, saflaştırılan enzim 55 °C’de ulaşmaktadır. En yüksek aktivite değerleri, saflaştırılan enzim için 50 °C de, 100 IU/mg, satın alınan enzim için 55 °C de 40 IU/mg dir. Daha sonraki yüksek sıcaklıklarda her iki enzimde aktivitesini kaybetmektedir. 30 ve 60 dakika bekleme süreleri sonunda, satın alınan enzimin ve saflaştırılan enzimin aktivitelerinde hızlı bir düşüş gözlenmiştir.

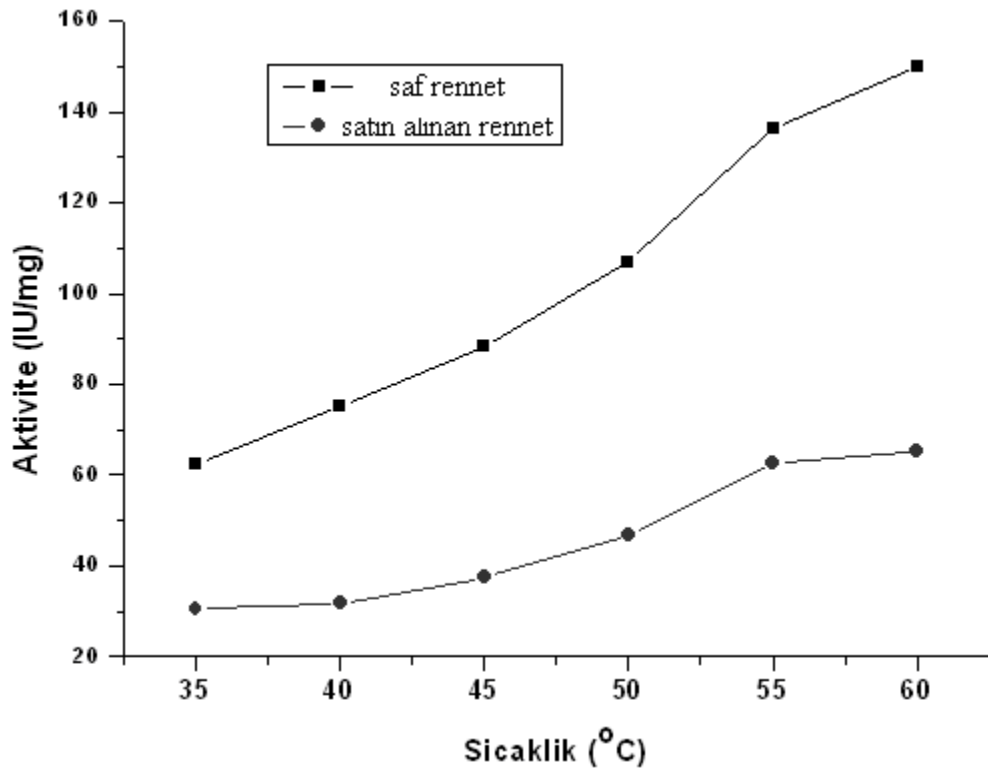
‘*’ : Enzim süt çözeltisine ilave edilmeden önce oda sıcaklığındadır. Su banyosundaki süt çözeltisi aktivitenin ölçüleceği sıcaklığa geldiğinde oda sıcaklığında bekleyen enzim süt çözeltisine ilave edilir ve aktivitesi ölçülür.

‘**’: Enzimin süt çözeltisine ilavesinden sonra 10 dakika beklendikten sonra pıhtılaşma gözlenemediğinden dolayı enzimin aktivitesini kaybettiği kabul edildi.

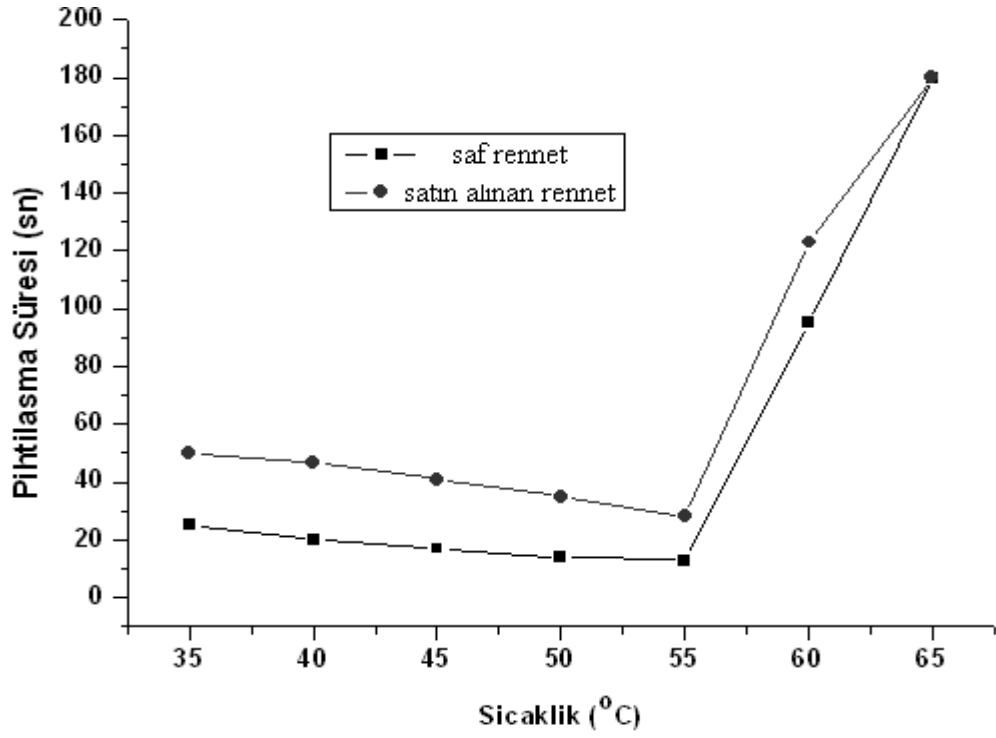
‘***’ : Sıfırıncı dakikada, enzim aktivitenin ölçüleceği sıcaklığa gelene kadar su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra süt çözeltisine ilave edilmiştir. Benzer şekilde, satın alınan ve saflaştırılan enzim farklı sıcaklıklarda 5, 15, 30 ve 60 dakika bekleme süreleri sonunda pH 5’te hazırlanan süt çözeltisine ilavesine ilave edilmiştir.



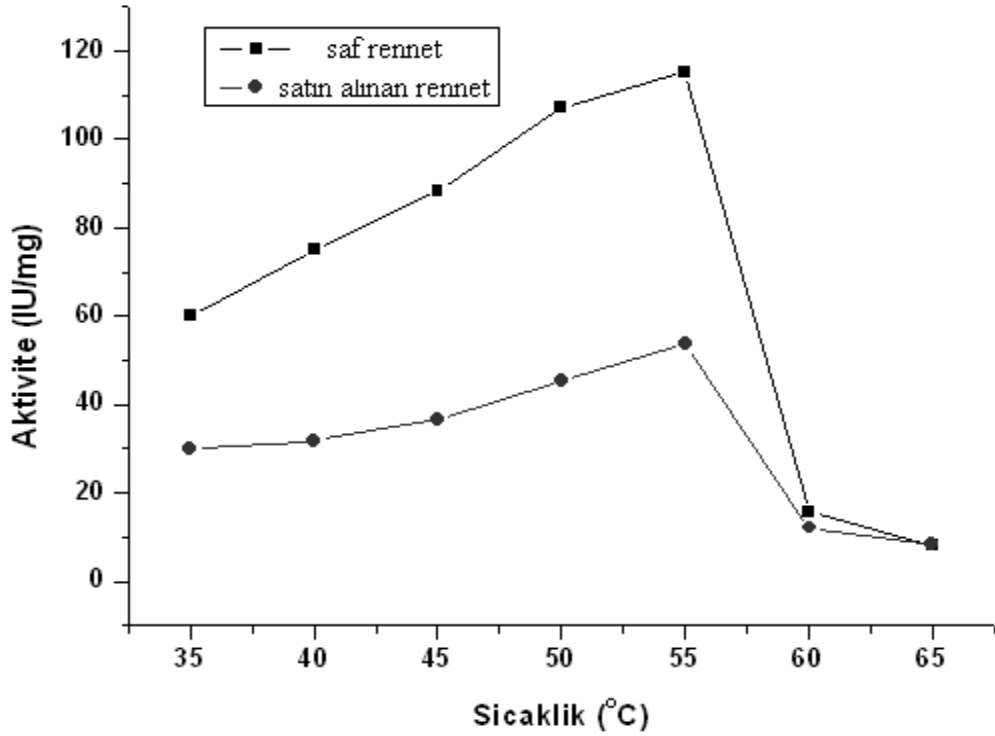
Şekil 4.12 Oda sıcaklığında bulunan satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklardaki süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri



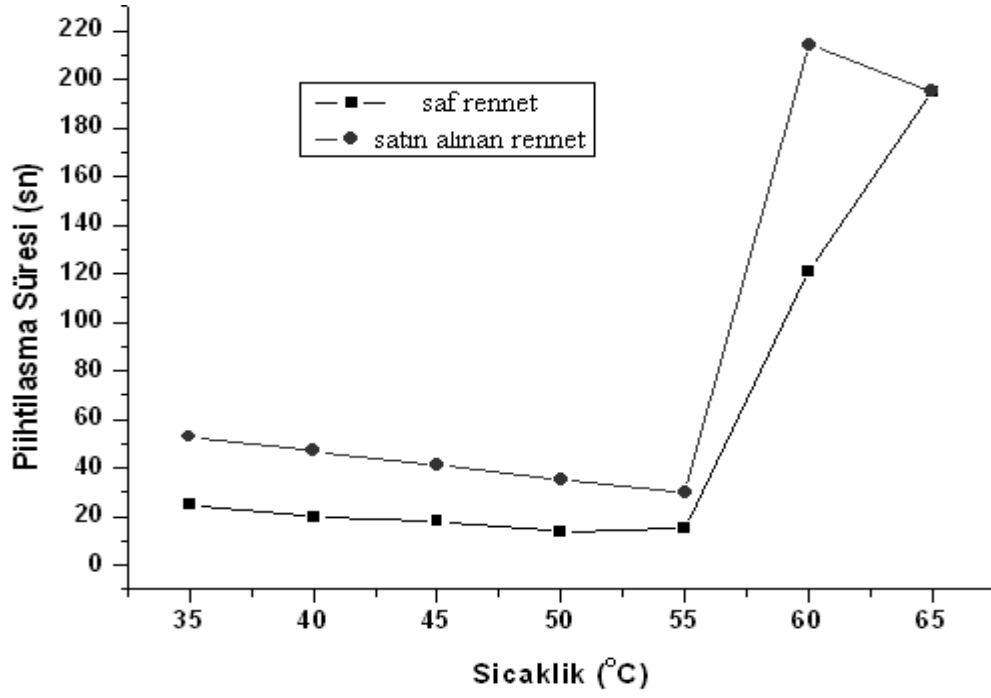
Şekil 4.13 Oda sıcaklığında bulunan satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te ve farklı sıcaklıklardaki süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri



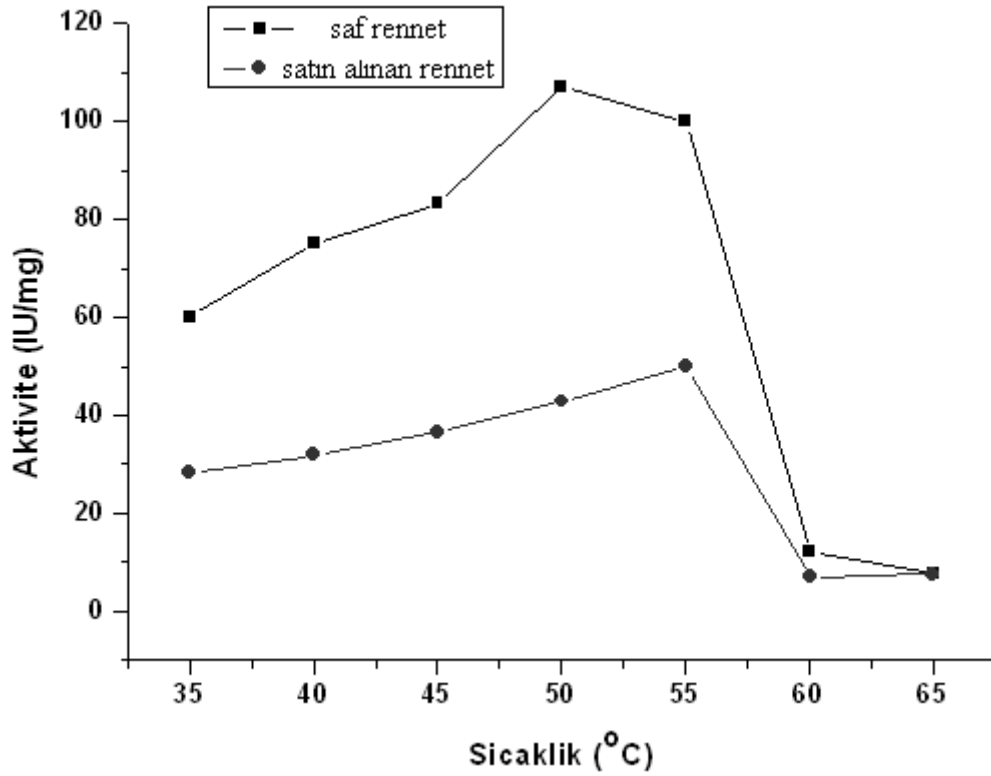
Şekil 4.14 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 0 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri



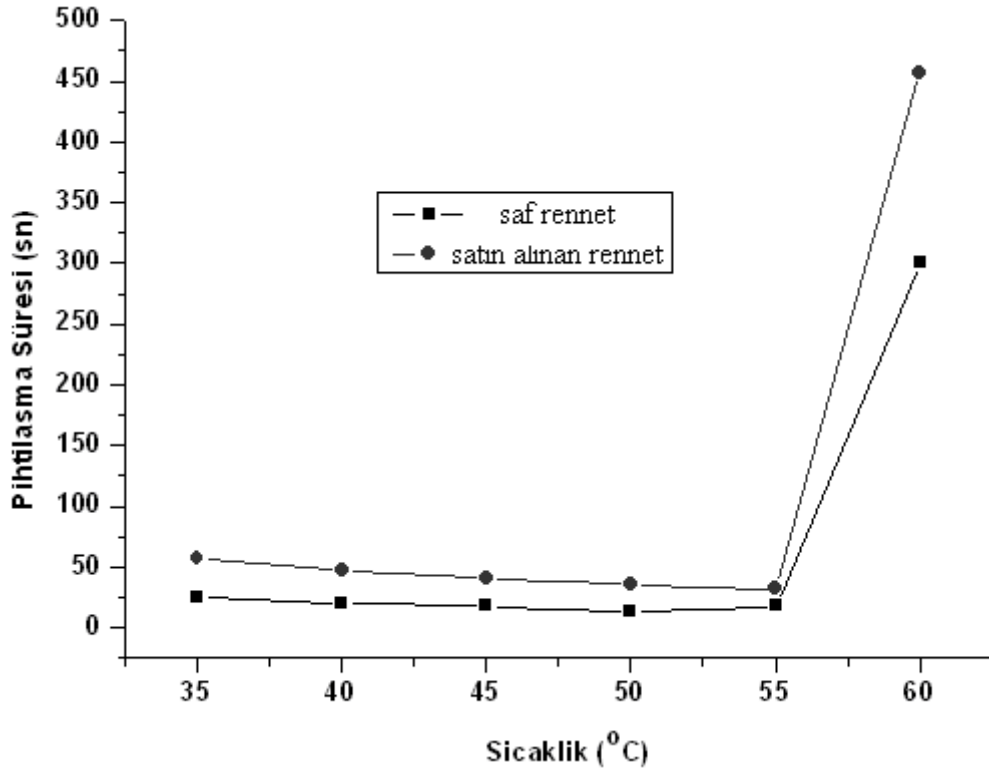
Şekil 4.15 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 0 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen aktivitesi



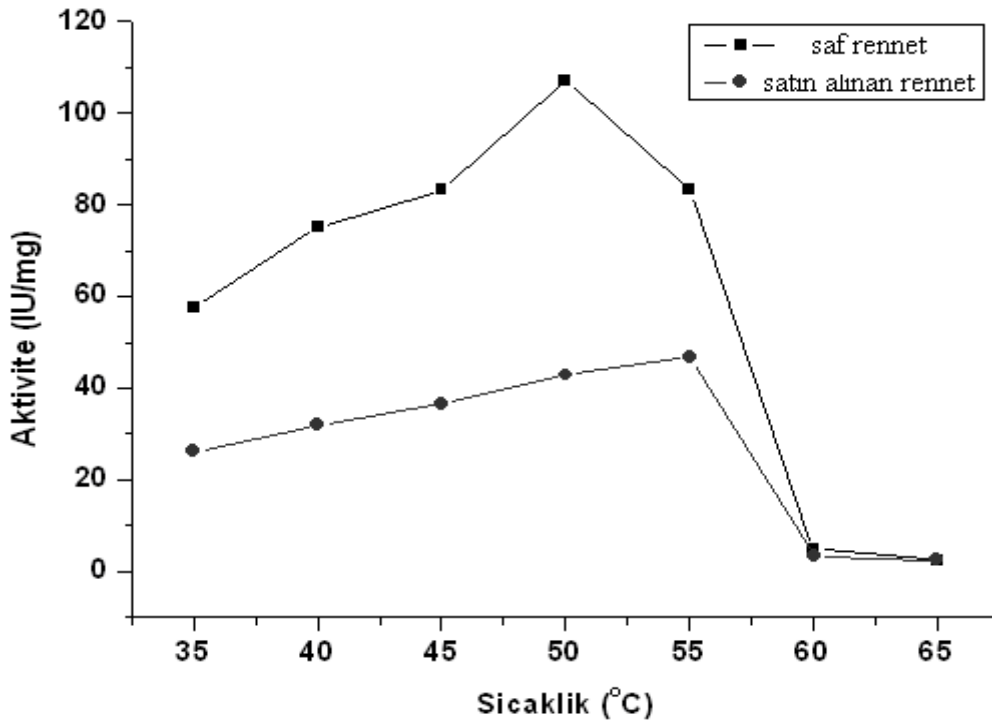
Şekil 4.16 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 5 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri



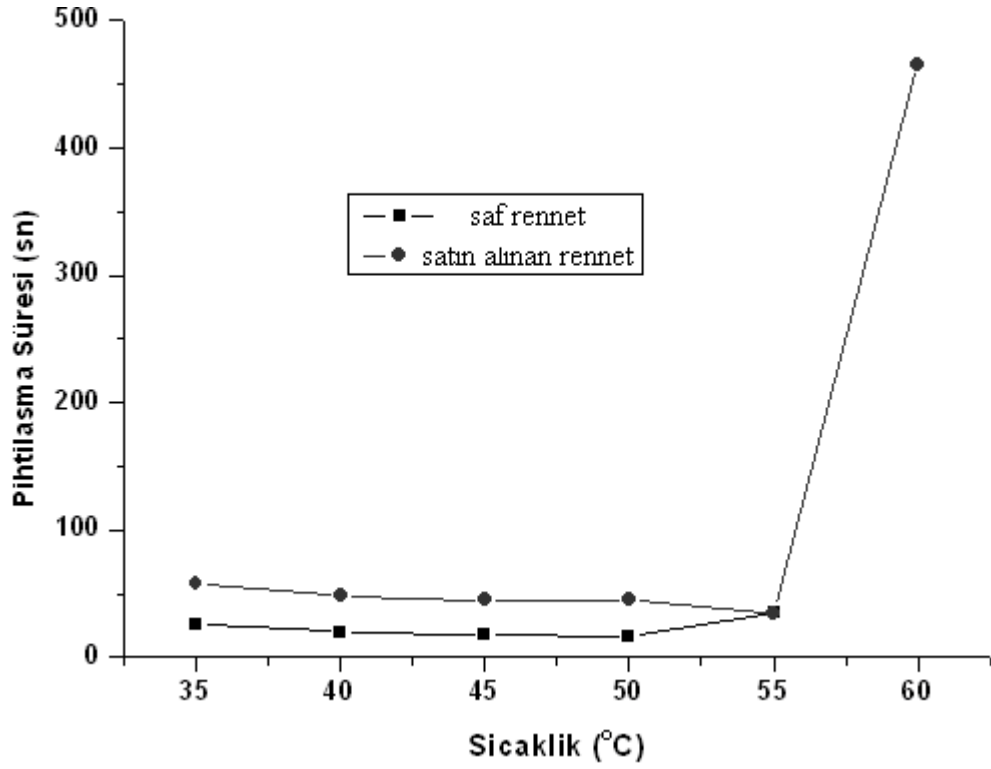
Şekil 4.17 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 5 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen aktiviteleri



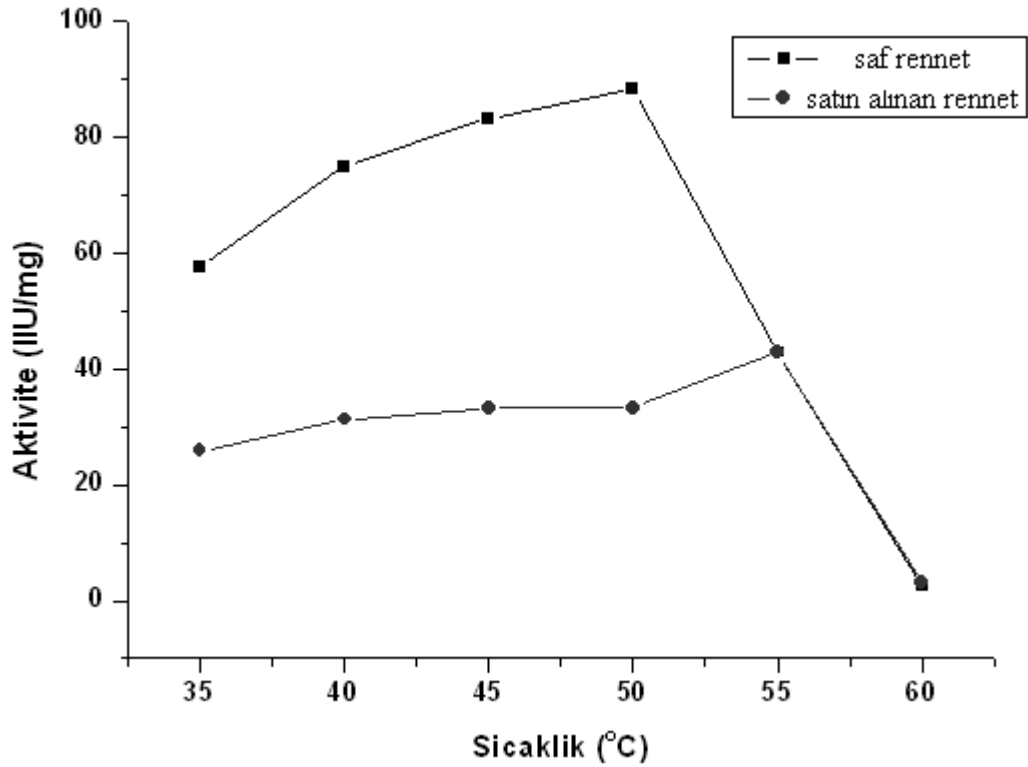
Şekil 4.18 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 15 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri



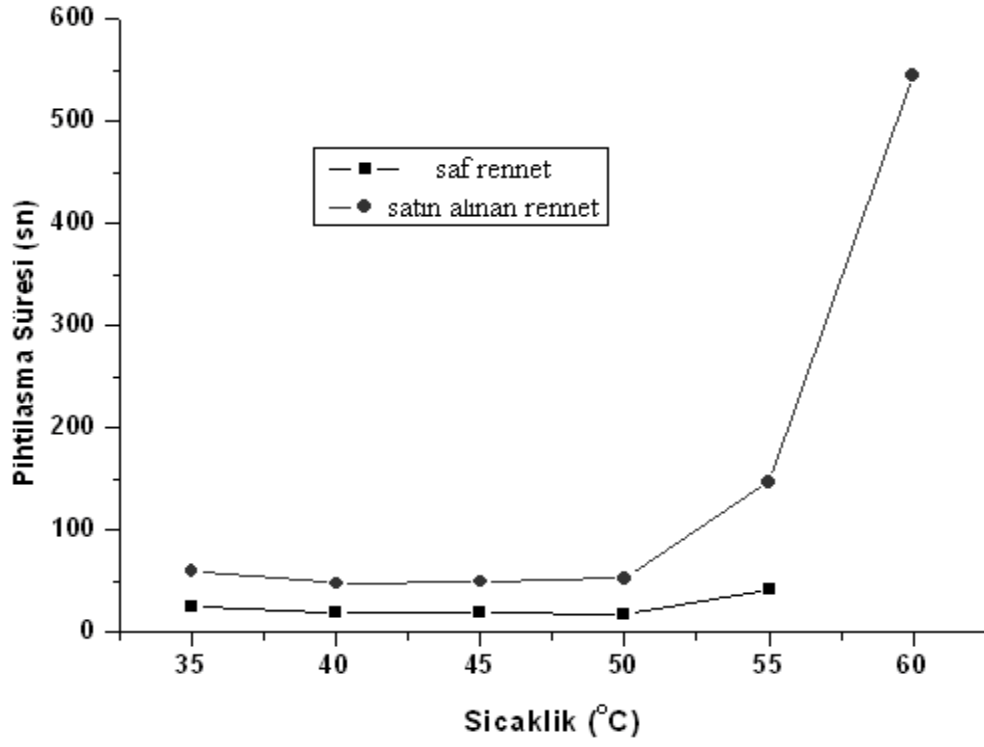
Şekil 4.19 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 15 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen aktivitesi



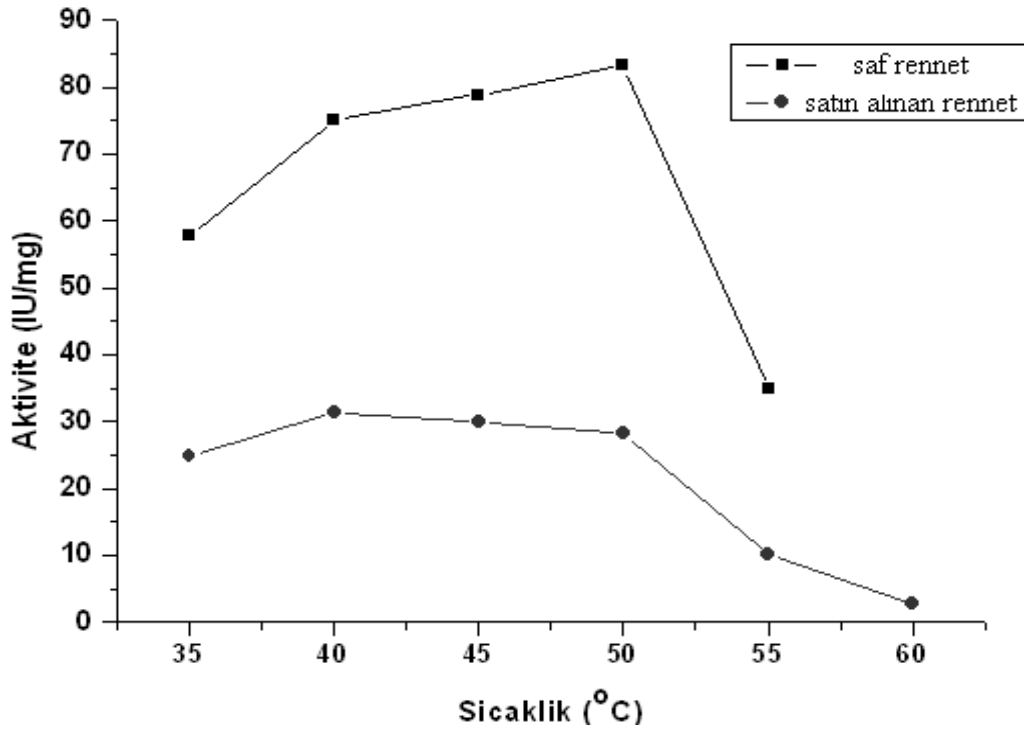
Şekil 4.20 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 30 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri



Şekil 4.21 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 30 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen aktivitesi



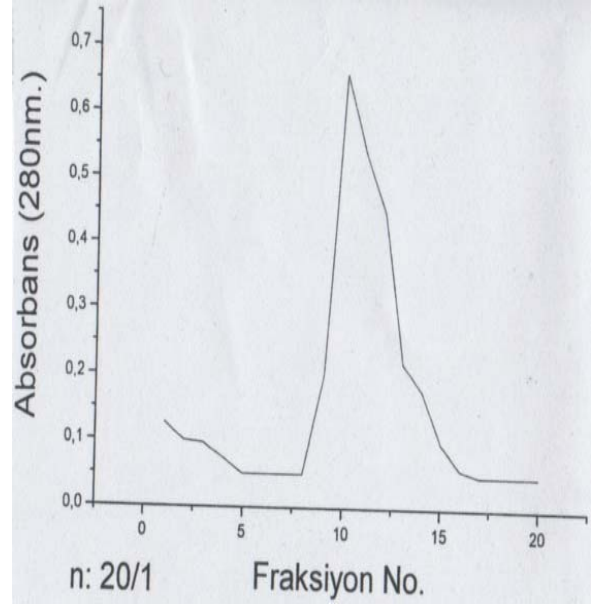
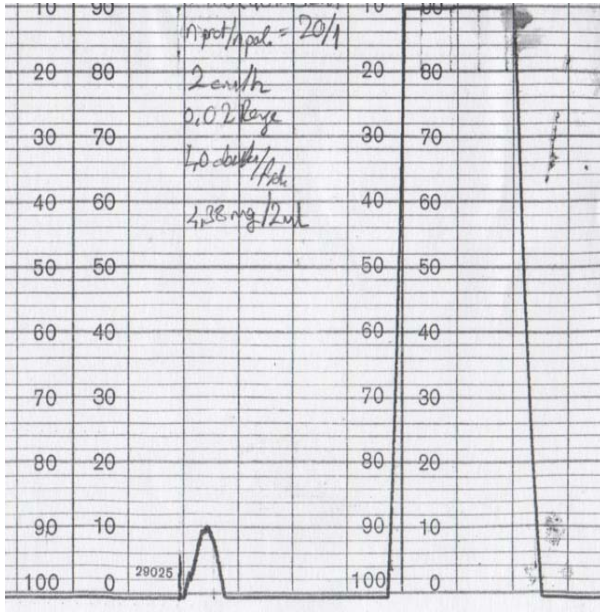
Şekil 4.22 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 60 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen pıhtılaşma süreleri



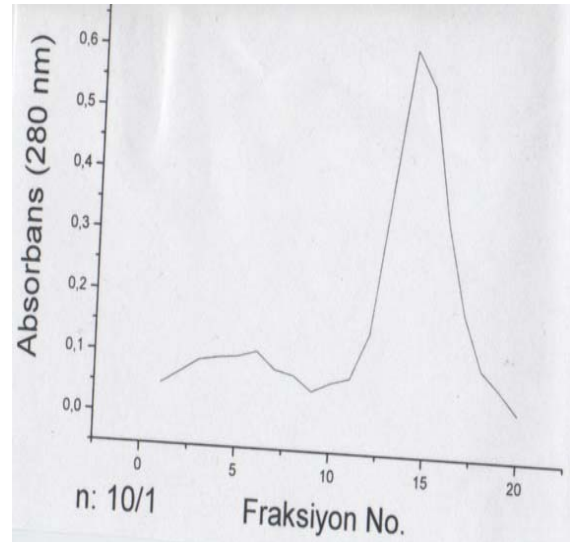
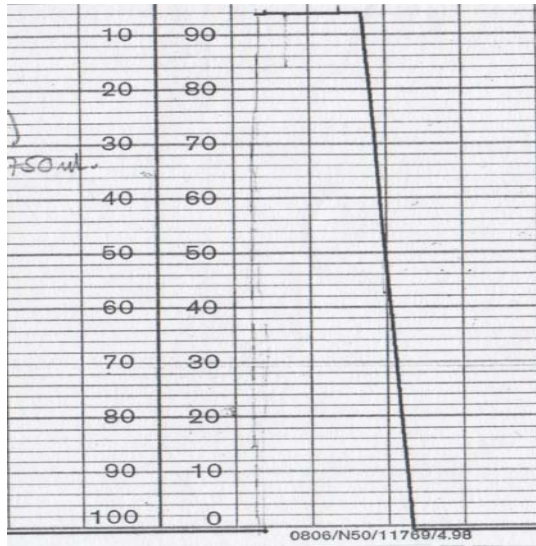
Şekil 4.23 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda 60 dakika bekleme sonrasında süt örneğine ilavesiyle tayin edilen aktivitesi

4.3.3 Konjugatların Jel Filtrasyon Kromatografisi ile (G-100, Sephadex) Saflaştırılması

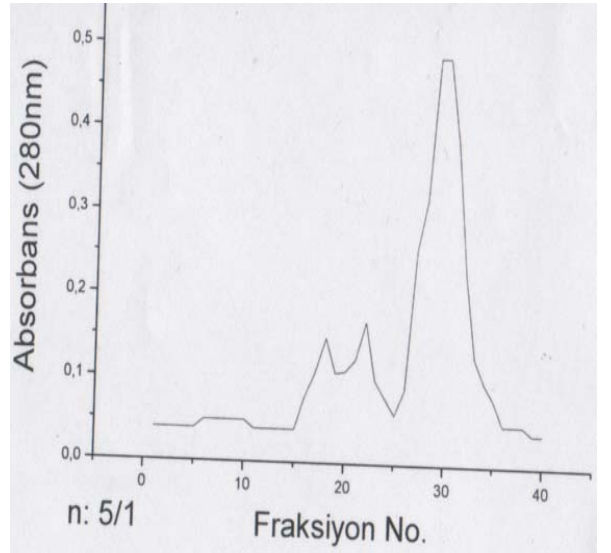
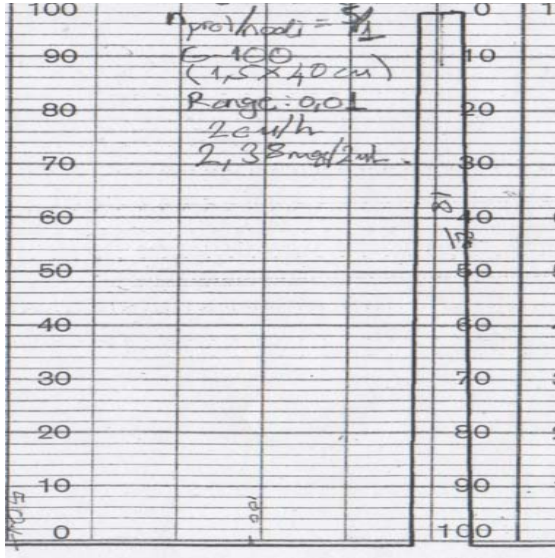
Sentezlenen bütün konjugatlar jel filtrasyon kromatografisi ile Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak saflaştırılmıştır ve protein saflaştırma sisteminde fraksiyonları toplanmıştır. Bu fraksiyonların UV cihazında 280 nm de absorbanları ölçülmüştür. Önde safsızlıklar veya agregat daha sonra ise saf pik elde edilmiştir (Şekil 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.30).



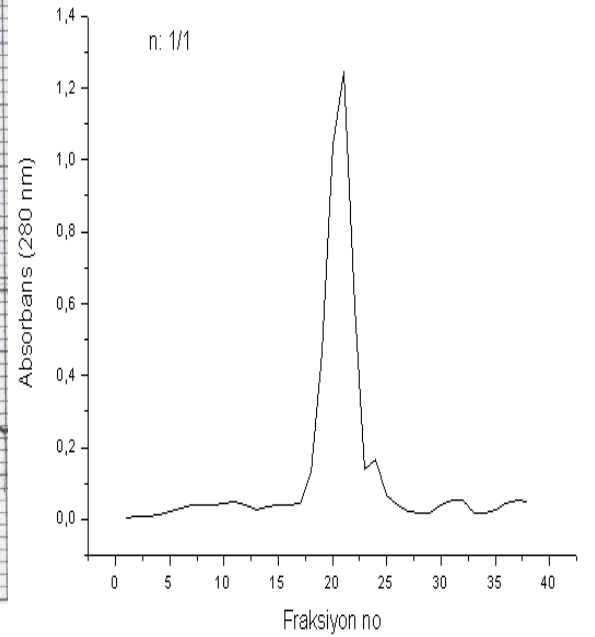
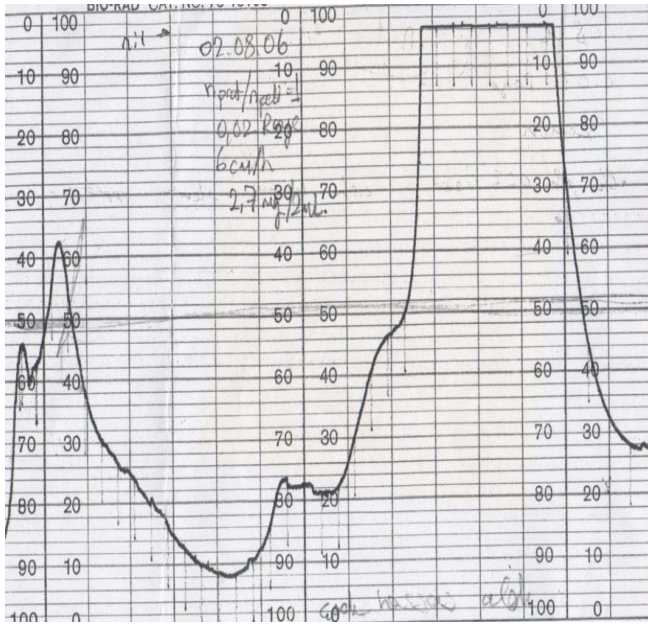
Şekil 4.24 20/1 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram



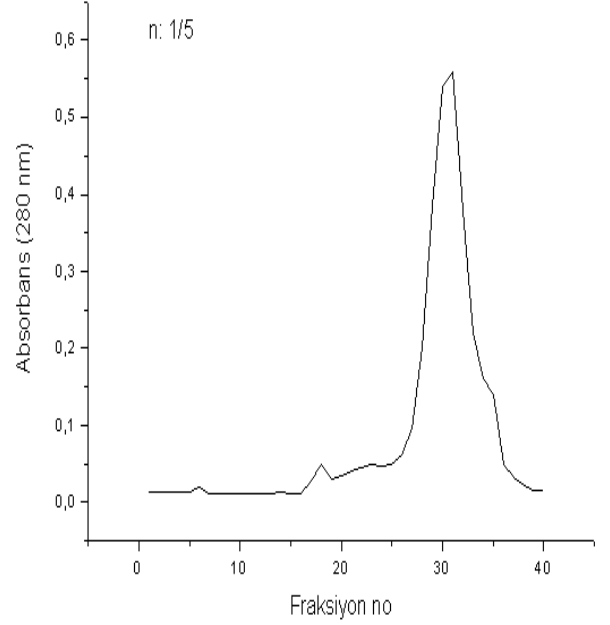
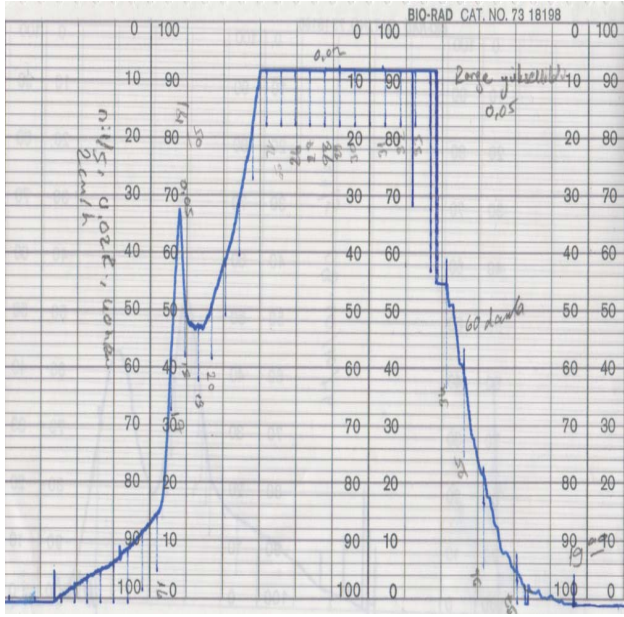
Şekil 4.25 10/1 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram



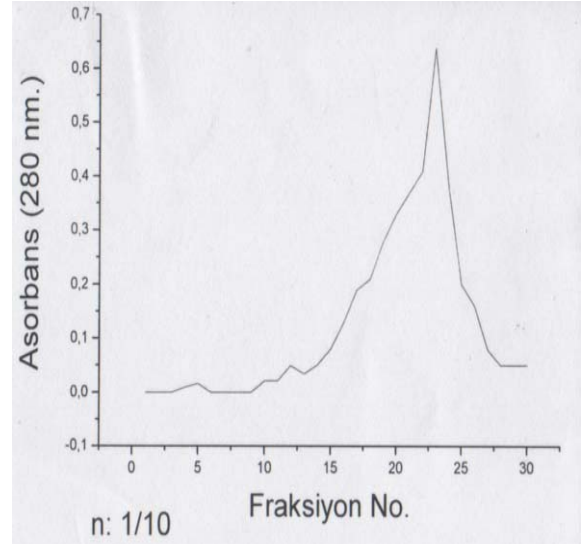
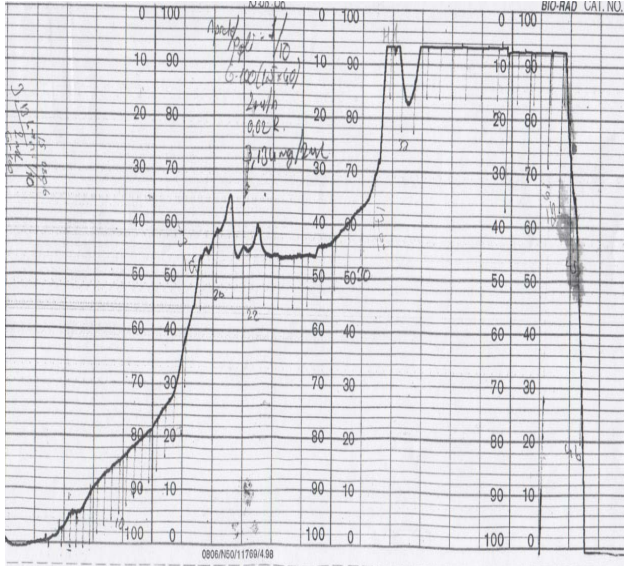
Şekil 4.26 5/1 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadexs G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram



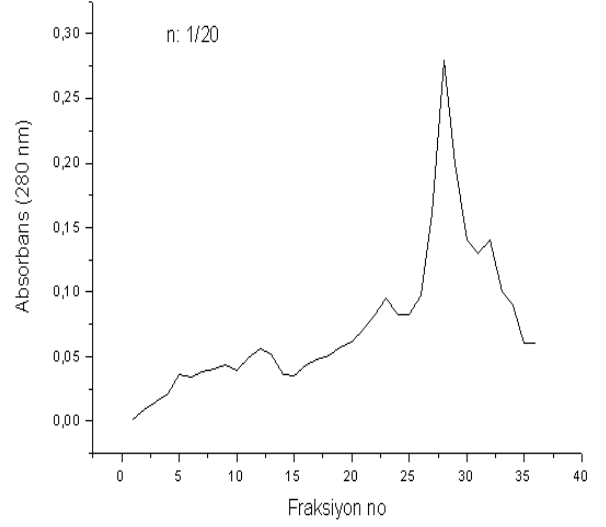
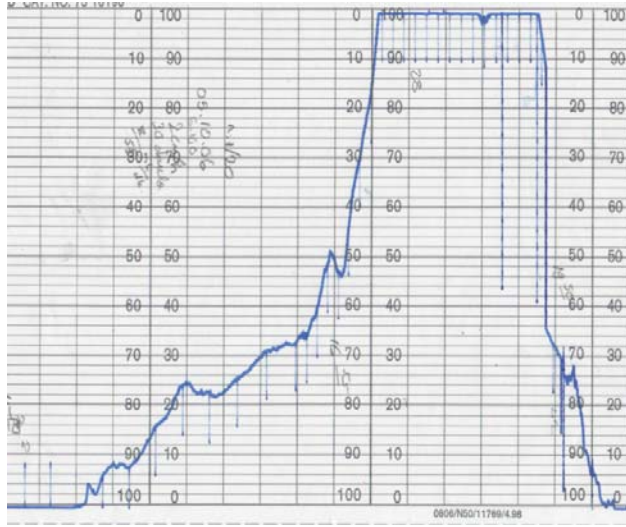
Şekil 4.27 1/1 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadexs G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram



Şekil 4.28 1/5 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram



Şekil 4.29 1/10 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram



Şekil 4.30 1/20 konjugatının jel filtrasyon kolonundan Sephadex G-100 dolgu maddesi kullanılarak protein saflaştırma sisteminden alınan kromatogramı ve saflaştırma sonrası protein saflaştırma sisteminde toplanan fraksiyonların UV-VIS cihazında 280 nm de okunan absorbans değerler ile fraksiyonlar arasında çizilen kromatogram

4.3.4 Saflaştırılan *Mucor miehei* Rennet' in ve Konjugatların pH 5,0'te Farklı Sıcaklıklarda, Farklı Bekleme Süreleri Sonrasında Aktiviteleri

Çizelge 4.7 Farklı oranlardaki $n_{\text{protein/polimer}}$ konjugatlarının farklı sıcaklıklarda belirli süreler beklemeden sonra tayin edilen pıhtılaşma süreleri (sn)

Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk) '***'	n: 20/1	n:10/1	n: 5/1	n: 1/1	n: 1/5	N: 1/10	n: 1/20
		Pıhtılaşma Süresi (sn)						
35	'*'	26	28	31	28	30	31	568
	0	26	28	32	28	30	31	569
	5	26	28	34	28	31	32	569
	15	26	29	36	28	31	33	569
	30	27	29	36	28	34	35	569
	60	28	29	36	30	40	37	570
40	'*'	18	21	21	20	30	24	394
	0	20	21	23	20	31	26	547
	5	20	22	25	21	31	30	'**'
	15	23	22	26	23	33	33	
	30	23	22	30	25	40	35	

	60	23	23	31	27	43	41	
45	‘*’	15	15	18	18	28	30	317
	0	17	17	20	22	33	32	555
	5	18	19	21	30	36	51	‘**’
	15	23	22	23	37	47	73	
	30	23	32	26	43	58	84	
	60	26	53	34	57	89	120	
50	‘*’	12	11	19	16	26	30	
	0	38	31	22	24	34	64	‘***’
	5	48	60	26	35	40	124	
	15	90	78	35	46	75	222	
	30	121	121	66	78	139	303	
	60	156	215	114	118	261	‘***’	
55	‘*’	11	9	13	14	19	21	
	0	39	62	180	102	220	‘***’	
	5	71	132	240	244	450		
	15	112	243	458	542	‘***’		
	30	230	378	‘***’	‘***’			
	60	425	‘***’					
60	‘*’	10	6	11	12	16		
	0	542	334	420	‘***’	‘***’		
	5	‘***’	‘***’	‘***’				
	15							
	30							
	60							
65	‘*’	8	5	10	11	14		
	0	‘***’	‘***’	‘***’	‘***’	‘***’		

‘*’: Konjugat süt çözeltisine ilave edilmeden önce oda sıcaklığındadır. Su banyosundaki süt çözeltisi aktivitenin ölçüleceği sıcaklığa geldiğinde oda sıcaklığında bekleyen enzim süt çözeltisine ilave edilir ve aktivitesi ölçülür.

‘**’ : Konjugatın süt çözeltisine ilavesinden sonra on dakika geçmesine rağmen pıhtılaşma gözlenmedi. Konjugatın aktivitesini kaybettiği kabul edildi.

‘***’ Sıfırıncı (0.) dakikada konjugat aktivitenin ölçüleceği sıcaklığa gelene kadar su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra süt çözeltisine ilave edilmiştir. Benzer şekilde, konjugat farklı sıcaklıklarda 5, 15, 30 ve 60 dakika bekleme süreleri sonunda pH 5’te hazırlanan süt çözeltisine ilavesine ilave edilmiştir.

Çizelge 4.8 Farklı mol oranlı enzim/ polimer konjugatlarının farklı sıcaklıklarda belirli süreler beklemeden sonra tayin edilen aktivite değerleri (IU/mg)

Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk) ^{****}	n: 20/1	n:10/1	n: 5/1	n: 1/1	N: 1/5	N: 1/10	n: 1/20
		Aktivite (IU/mg)						
35	‘*’	57,7	53,6	48,4	53,6	50,0	48,4	2,6
	0	57,7	53,6	46,9	53,6	50,0	48,4	2,6
	5	57,7	53,6	44,1	53,6	48,4	46,9	2,6
	15	57,7	51,7	41,7	53,6	48,4	45,5	2,6
	30	55,6	51,7	41,7	53,6	44,1	42,9	2,6
	60	53,6	51,7	41,7	50,0	37,5	40,5	2,6
40	‘*’	83,3	71,4	71,4	75,0	50,0	62,5	3,8
	0	75,0	71,4	65,2	75,0	48,4	57,7	2,7
	5	75,0	68,2	60,0	71,4	48,4	50,0	2,0
	15	65,2	68,2	57,7	65,2	45,5	45,5	
	30	65,2	68,2	50,0	60,0	37,5	42,9	
	60	65,2	65,2	48,4	55,6	34,9	36,6	
45	‘*’	100,0	100,0	83,3	83,3	53,6	50,0	4,7
	0	88,2	88,2	75,0	68,2	45,5	46,9	2,7
	5	83,3	78,9	71,4	50,0	41,7	29,4	2,0
	15	65,2	68,2	65,2	40,5	31,9	20,5	
	30	65,2	46,9	57,7	34,9	25,9	17,9	
	60	57,7	28,3	44,1	26,3	16,9	12,5	
50	‘*’	125,0	136,4	78,9	93,8	57,7	50,0	
	0	39,5	48,4	68,2	62,5	44,1	23,4	2,0
	5	31,3	25,0	57,7	42,9	37,5	12,1	
	15	16,7	19,2	42,9	32,6	20,0	6,8	
	30	12,4	12,4	22,7	19,2	10,8	5,0	
	60	9,6	7,0	13,2	12,7	5,7	2,0	
55	‘*’	136,4	166,7	115,4	107,1	78,9	70,0	
	0	38,5	24,2	8,3	14,7	6,8	2,0	
	5	21,1	11,4	6,3	6,1	3,3		
	15	13,4	6,2	3,3	2,8	2,0		
	30	6,5	4,0	2,0	2,0			
	60	3,5	2,0					
60	‘*’	150,0	250,0	136,4	125,0	93,8		
	0	2,8	4,5	3,6	2,0	2,0		
	5	2,0 ^{***}	2,0	2,0				
	15							
	30							

	60							
65	‘*’	187,5	300,0	150,0	136,4	107,1		
	0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	

Konjugatların pH 5,0’te farklı sıcaklıklarda farklı bekleme süreleri sonundaki aktivite değerleri (Çizelge 3.12’deki pıhtılaşma süreleri kullanılarak hesaplanmıştır) ile ilgili grafikler Şekil 4.31, 4.32, 4.33, 4.34, 4.35, 4.36’de gösterilmiştir.

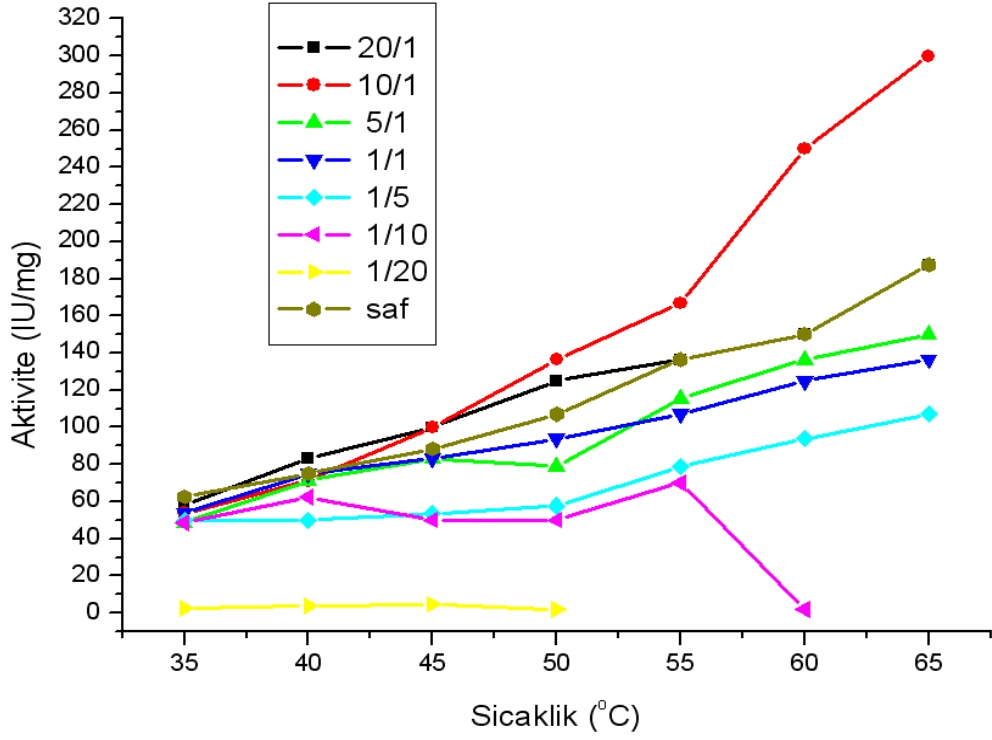
Farklı sıcaklıklarda, 0, 5 ve 15 dakika bekleme sonrasında yüksek polimer oranlı konjugatların (1/1, 1/5, 1/10 ve 1/20) saflaştırılan enzime göre sıcaklığa dirençinde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.28, 4.29, 4.30). Özellikle 55 °C ve 60 °C’de daha uzun süre (30, 60 dakika) bekleyen konjugatların sıcaklığa olan direnci çok zayıflamıştır (Şekil 4.35, 4.36). Polimer oranı en yüksek olan 1/20 konjugatı 45 °C’de 15 dakika bekleme sonrasında aktivitesini kaybetmiştir (Şekil 4.34).

‘*’: Konjugat süt çözeltisine ilave edilmeden önce oda sıcaklığındadır.

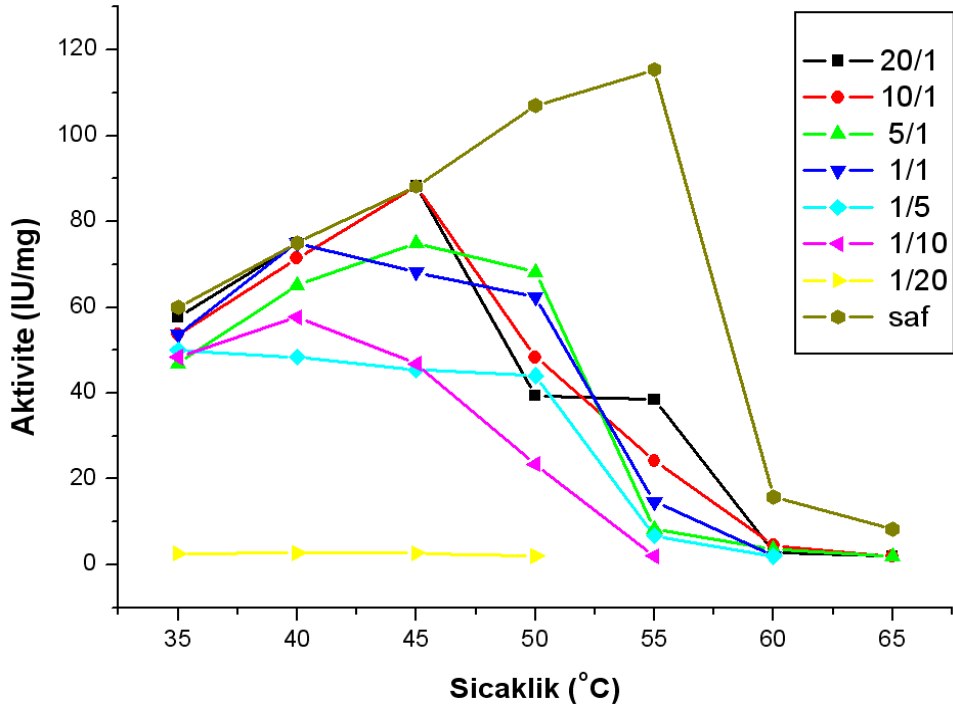
‘**’ : Konjugatın süt çözeltisine ilavesinden sonra on dakika geçmesine rağmen pıhtılaşma gözlenmedi. Konjugatın aktivitesini kaybettiği kabul edildi. Bu değerler on dakika dikkate alınarak 2.0 IU/mg olarak hesaplandı.

‘***’ 0.; sıfırıncı dakikada konjugat aktivitenin ölçüleceği sıcaklığa gelene kadar su banyosunda bekletilmiştir.

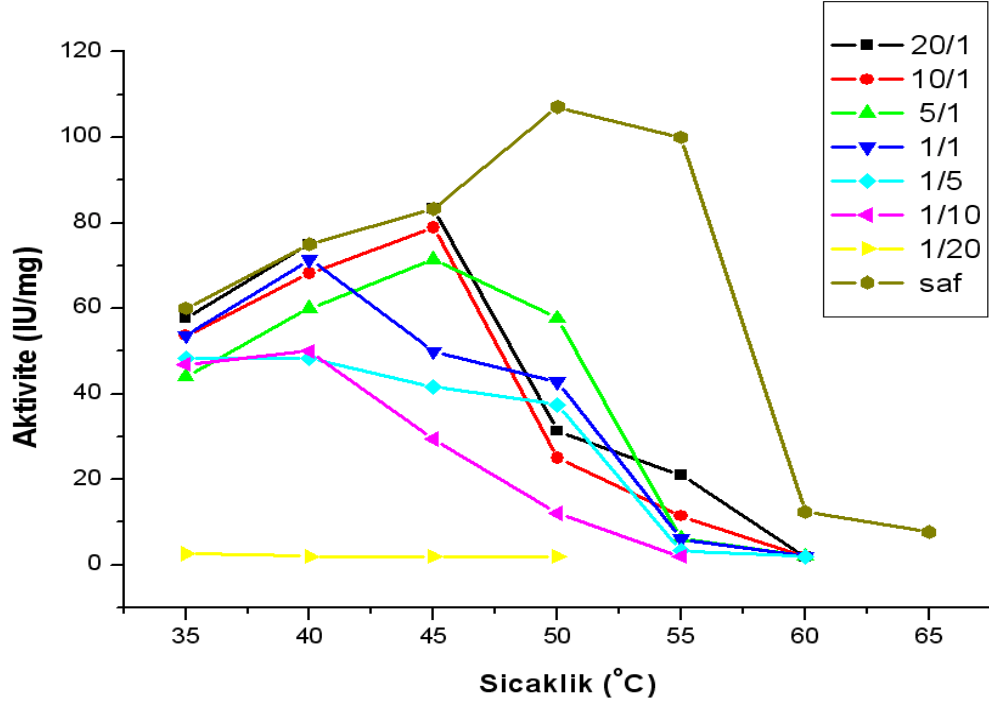
Daha sonra süt çözeltisine ilave edilmiştir. 5., 15., 30., ve 60. dakikalarda ise; konjugatlar pH 5,0’te farklı sıcaklıklarda 5, 15, 30 ve 60 dakika bekleme sonrasında ölçülen süt pıhtılaşma süreleridir.



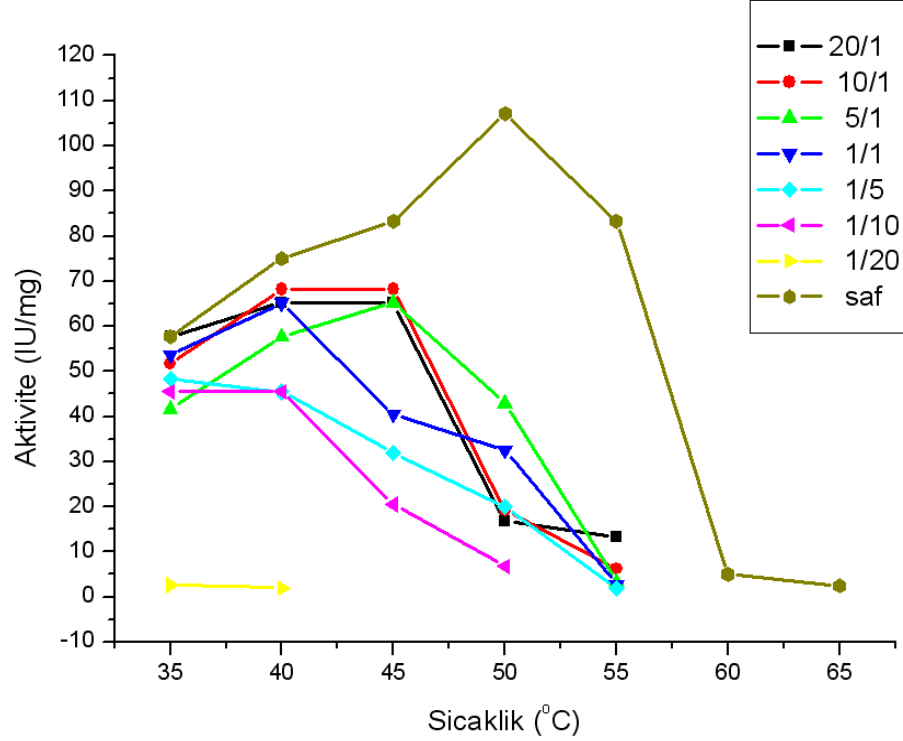
Şekil 4.31 Oda sıcaklığındaki saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların, farklı sıcaklıklarda aktiviteleri



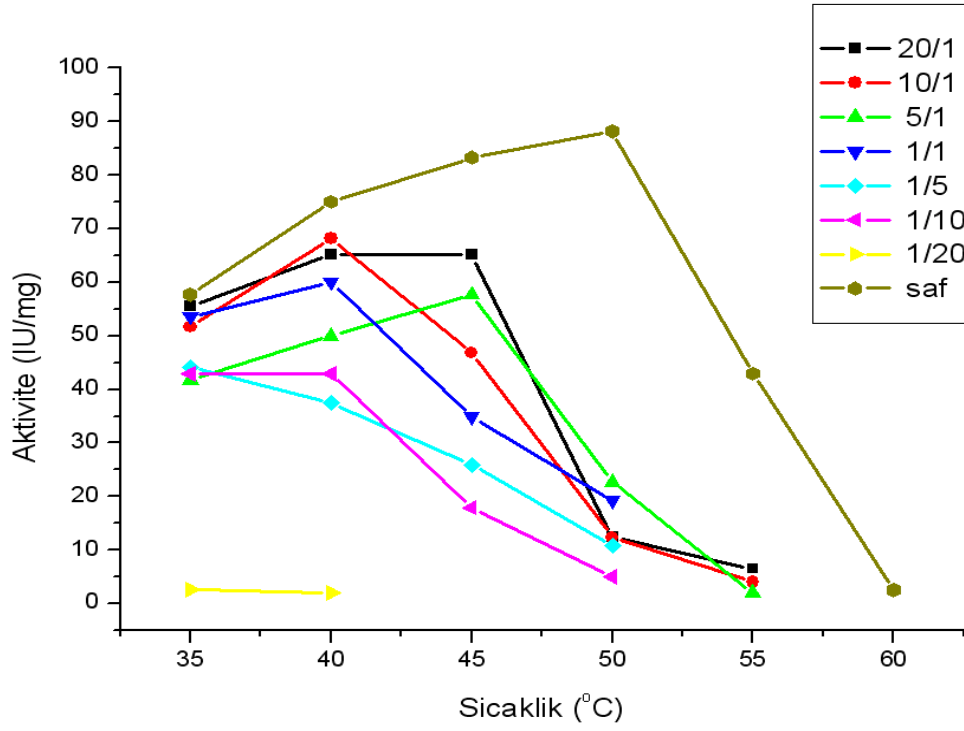
Şekil 4.32 Saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların farklı sıcaklıklarda 0 dakika bekleme sonrasındaki aktiviteleri



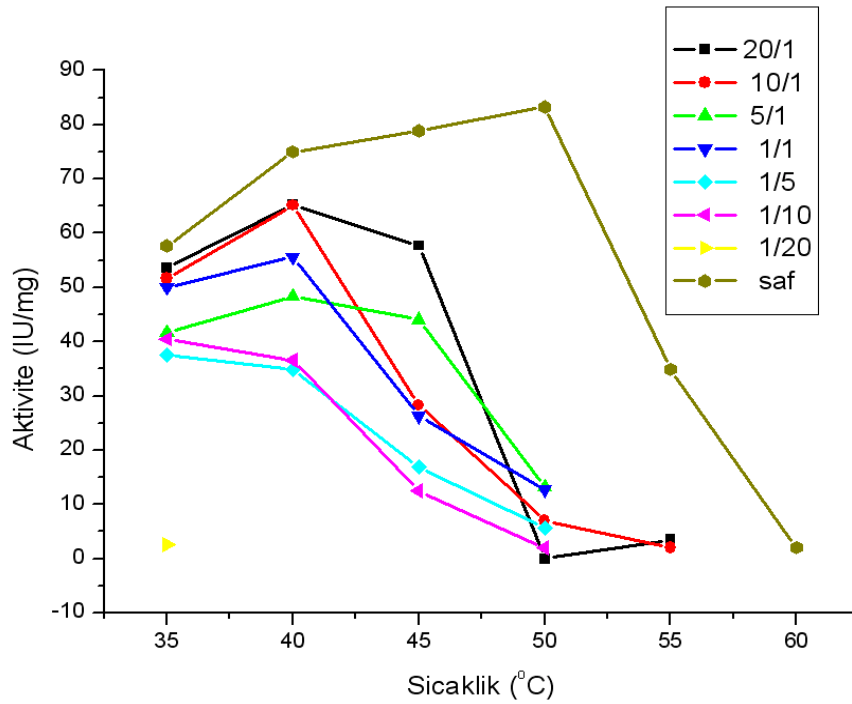
Şekil 4.33 Saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların farklı sıcaklıklarda 5 dakika bekleme sonrasındaki aktiviteleri



Şekil 4.34 Saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların farklı sıcaklıklarda 15 dakika bekleme sonrasındaki aktiviteleri

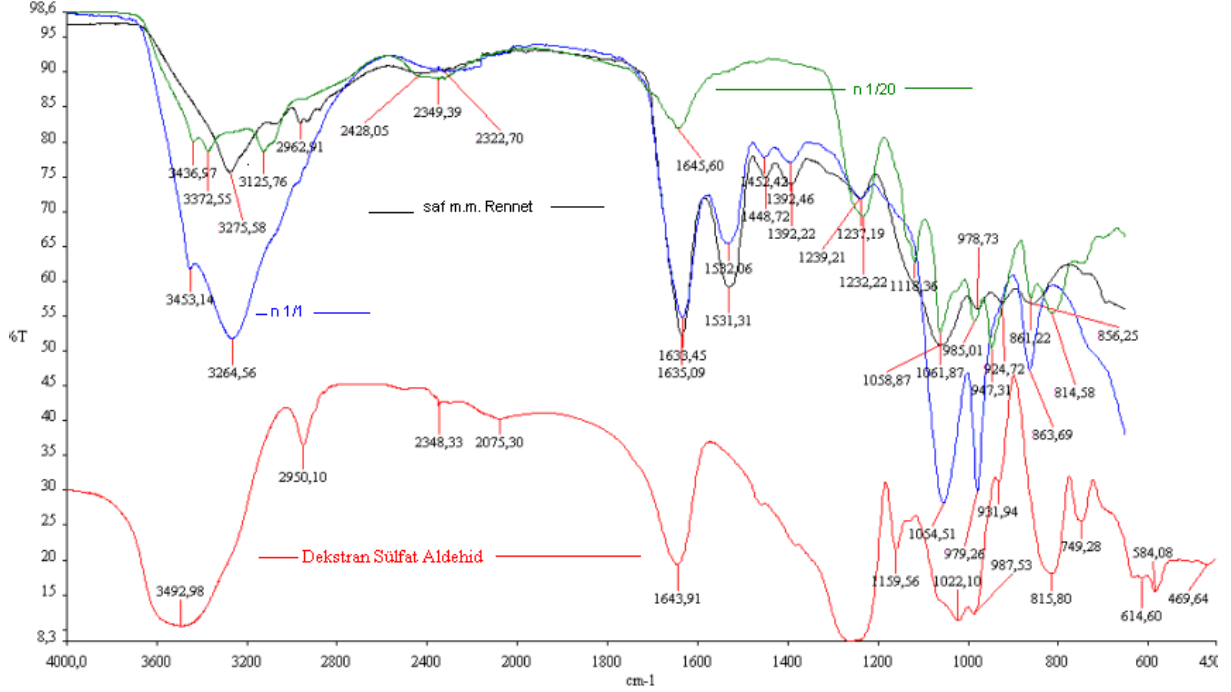


Şekil 4.35 Saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların farklı sıcaklıklarda 30 dakika bekleme sonundaki aktiviteleri



Şekil 4.36 Saflaştırılan enzimin ve farklı oranlı konjugatların farklı sıcaklıklarda 60 dakika bekleme sonundaki aktiviteleri

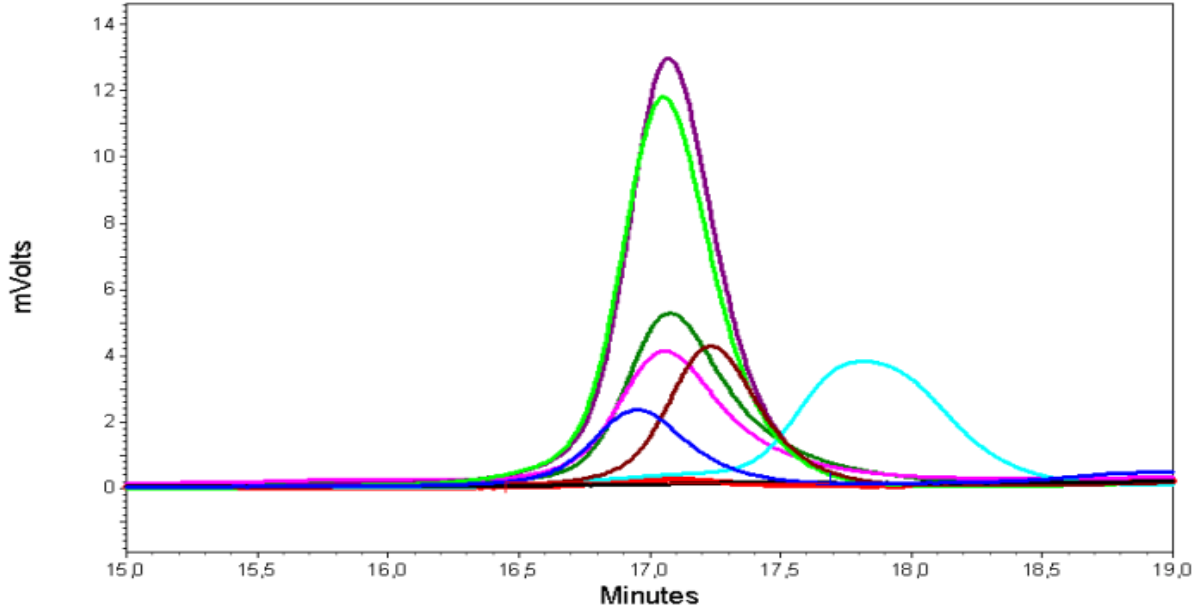
4.4 (*Mucor miehei* Rennet)-(Dekstran Sülfat), Protein/Polimer: 1/1 ve 1/20 Olan Konjugatlarının FTIR Spektrumları



Şekil 4.37 dekstran sülfat aldehidin, saflaştırılan *mucor miehei* rennet ve $n_{\text{protein}}/n_{\text{polimer}}$: 1/1, 1/20 konjugatların FTIR spektrumları

4.5 Sentezlenen Konjugatların HPLC Cihazının UV Dedektörü ile Alınan Kromatogramı

Eşit protein konsantrasyonlarında HPLC cihazına saf *mucor miehei* rennet, dekstran aldehid sülfat ve konjugatları HPLC jel filtrasyon kolonuna verilmiştir. UV dedektörü ile 280 nm’de dedektör sinyali elde edilmiştir. Saflaştırılan *mucor miehei* rennetin ve konjugatların HPLC kolonunda alıkonma süreleri farklıdır. Saflaştırılmış rennetin kolonda alıkonma süresi en uzundur (Şekil 4.38). Protein oranı yüksek olan konjugatların dedektör cevabı daha yüksektir. 1/20 konjugatının dedektör cevabı ise çok azdır. Dekstran sülfat aldehidin 280 nm de dedektör yanıtı görülmemektedir (Şekil 4.38).

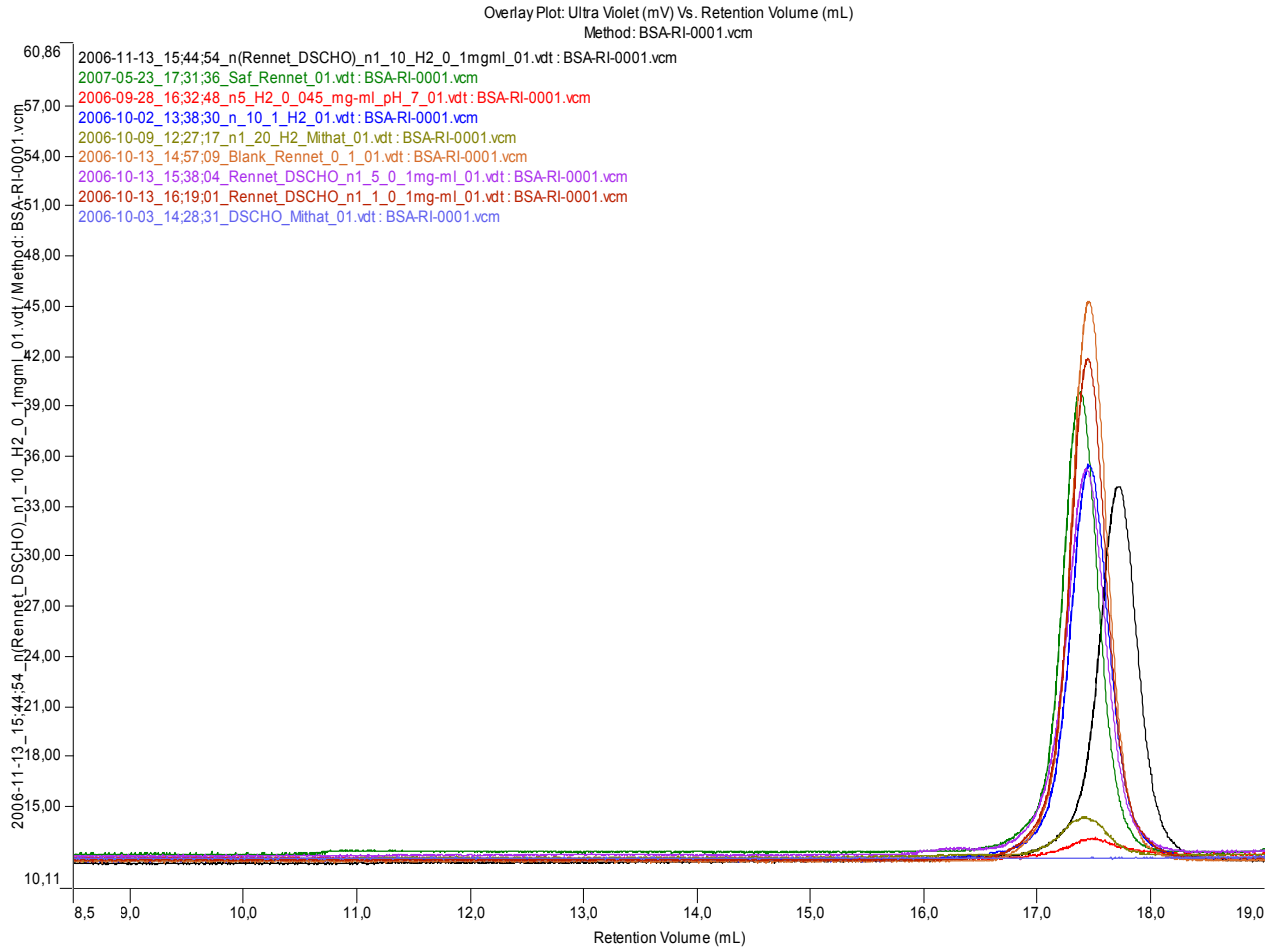


Şekil 4.38 Dekstran sülfat aldehidin, saflaştırılan *mucor miehei* rennetin ve konjugatların HPLC cihazı ile alınan kromatogramları

___ saflaştırılan *mucor miehei* Rennet ___ Dekstran Sülfat Aldehid, ___ n: 20/ 1, ___ n: 10/1, ___ n: 1/1, ___ n: 5/1, ___ n: 1/5, ___ n: 1/10, ___ n: 1/20.

4.6 Sentezlenen Konjugatların GPC (ViskoteK) Cihazının Farklı Dedektörleri ile Alınan Kromatogramları

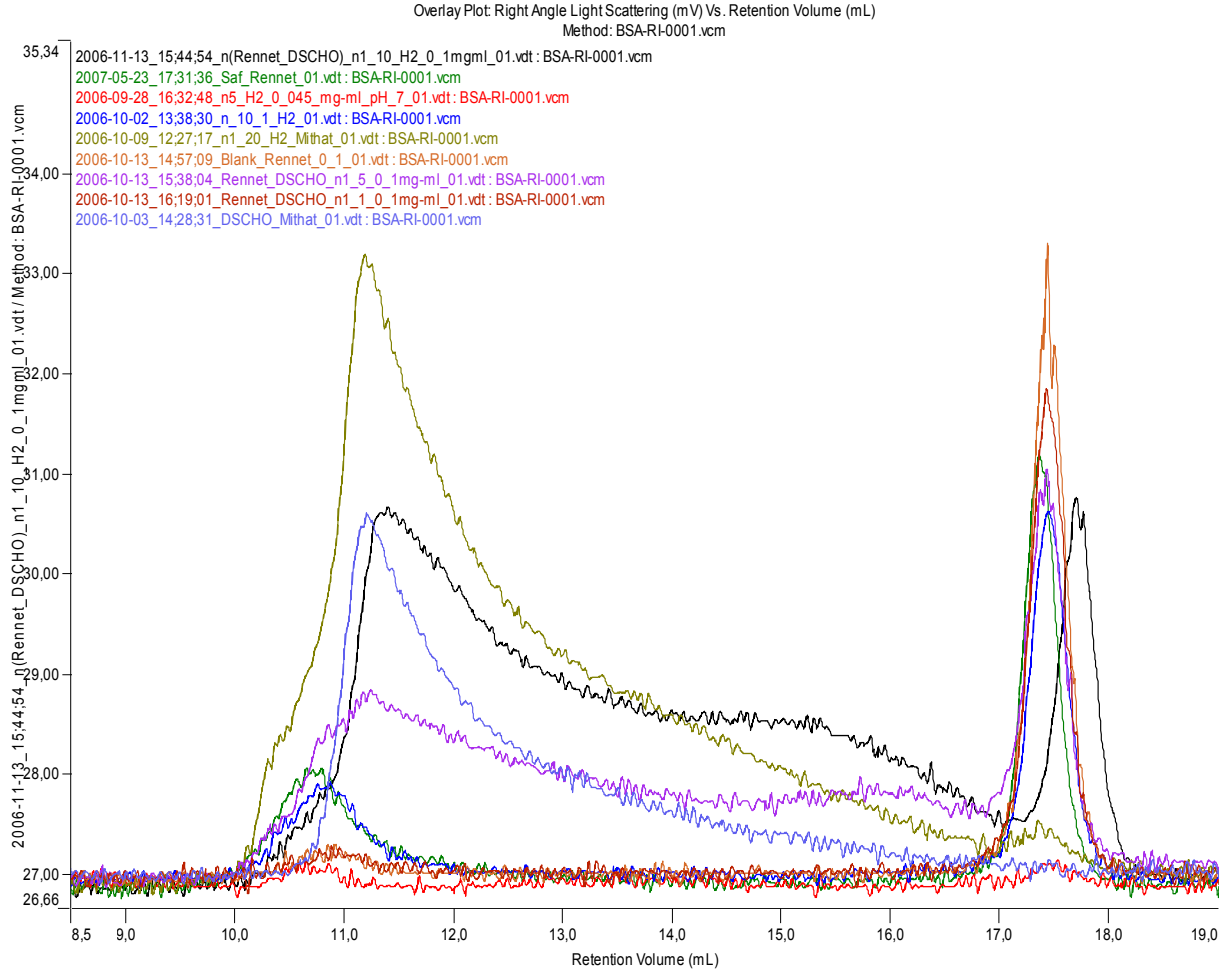
Farklı mol oranlarında sentezlenen *mucor miehei* rennet-dekstran sülfat konjugatları ve saflaştırılmış *mucor miehei* rennet 4 dedektörlü GPC cihazıyla incelenmiştir (Şekil 4.39, 4.40, 4.41, 4.42). Saflaştırılan konjugatların ve enzimin alıkonma süreleri ve dedektör şiddetleri kıyaslanarak karakterize edilmiştir. GPC (ViskoteK) cihazının ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogramlarda, polimer oranı yüksek olan konjugatlarının pikleri geniş bir aralığa yayılmıştır (Şekil 4.40). Kırılma indisi dedektörü ile alınan sonuçlarda, 1/10 konjugatında şiddeti yüksek pik görülmektedir (Şekil 4.41). Viskozimetre dedektöründe ise, 1/20 ve 1/5 konjugatlarında 10–11. alıkonma süreleri arasında pikler gözlenmektedir (Şekil 4.42).



Şekil 4.39 Dekstran sülfat aldehydin, saflaştırılan *mucor miehei* rennetin ve konjugatların GPC (Viskotek) cihazının UV dedektörü ile alınan kromatogramları

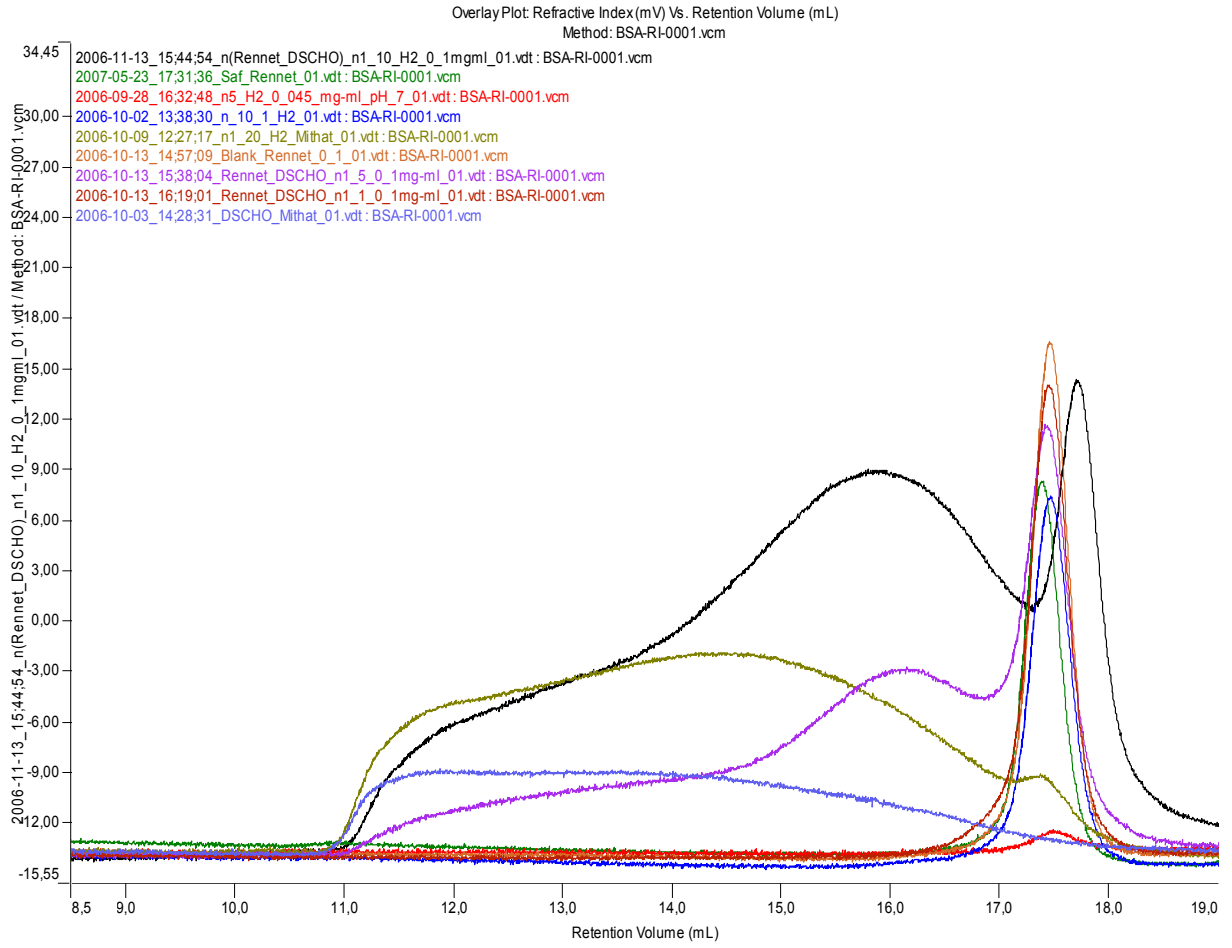
___ saflaştırılan *mucor miehei* Rennet, ___ Dekstran Sülfat Aldehyd, ___ n: 20/ 1, ___ n: 10/1, ___ n: 1/1, ___ n: 5/1, ___ n: 1/5, ___ n: 1/10, ___ n: 1/20, Blank.

Blank; konjugatların eldesi sırasında uygulanan işlemlerin tamamının aynı koşullarda saf enzim çözeltisine uygulandığı sıfır örneğidir.



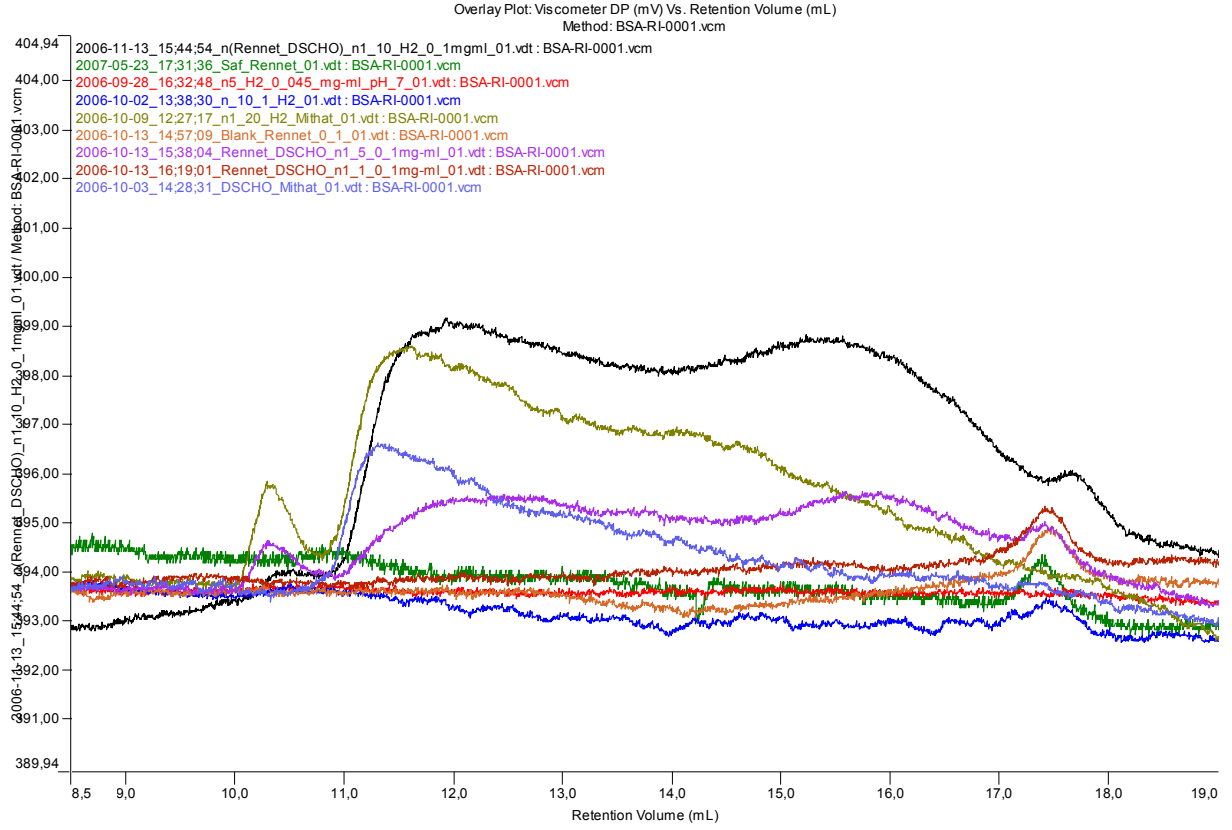
Şekil 4.40 Dekstran sülfat aldehydin, saflaştırılan *mucor miehei* rennetin ve konjugatların GPC (Viskotek) cihazının ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogramları

___ saflaştırılan *mucor miehei* Rennet ___ : Dekstran Sülfat Aldehyd; ___ n: 20/ 1, ___ n: 10/1 H2, ___ n: 1/1 H2, ___ n: 5/1 H2, ___ n: 1/5 H2, ___ n: 1/10 H2, ___ n: 1/20 H2, ___ Blank



Şekil 4.41 Dekstran sülfat aldehydin, saflaştırılan *mucor miehei* rennetin ve konjugatların GPC (Viskotek) cihazının kırılma dedektörü ile alınan kromatogramları

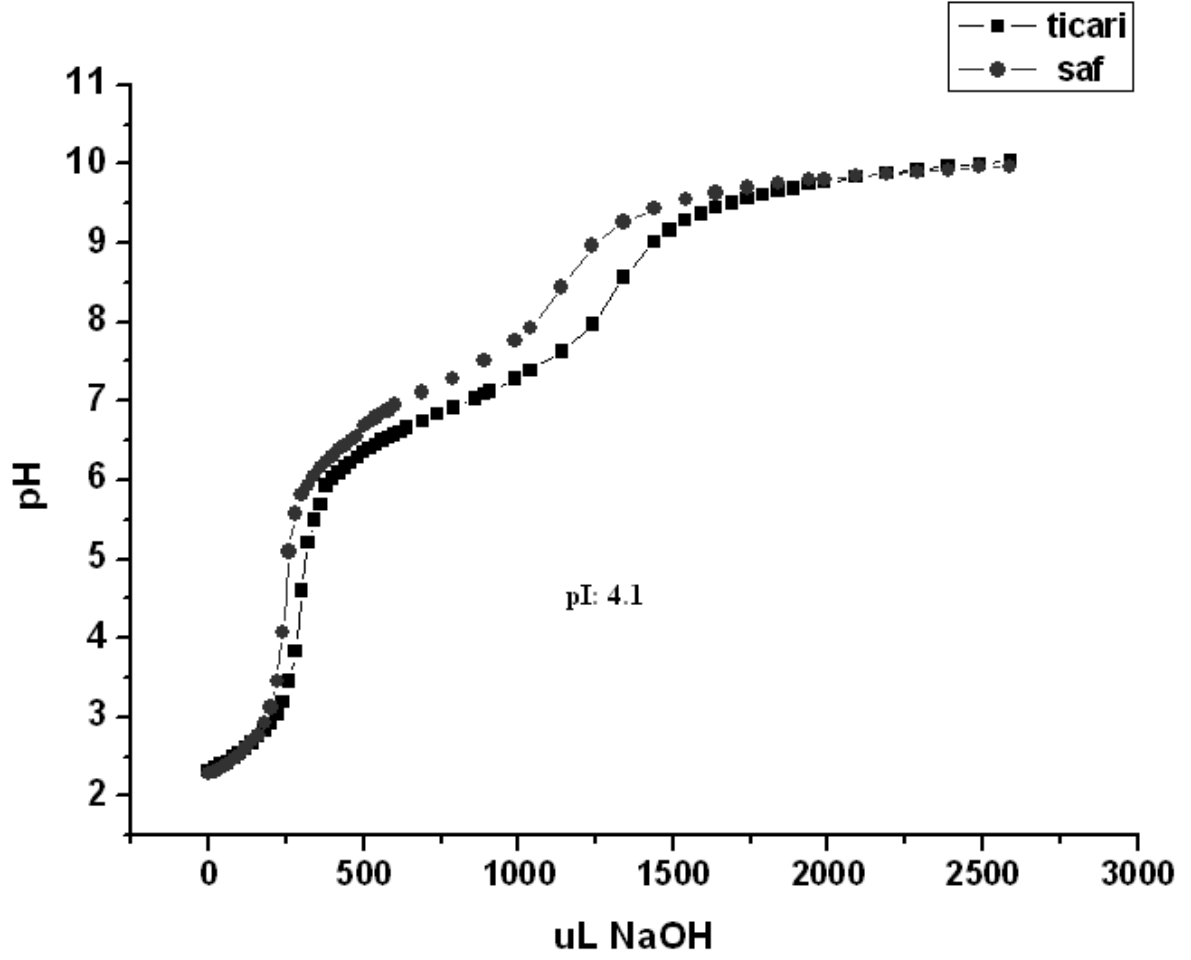
___ saflaştırılan *mucor miehei* Rennet ___ Dekstran Sülfat Aldehyd, ___ n: 20/ 1, ___ n: 10/1, ___ n: 1/1, ___ n: 5/1, ___ n: 1/5, ___ n: 1/10, ___ n: 1/20, Blank Rennet.



Şekil 4.42 Dekstran sülfat aldehydin, saflaştırılan *mucor miehei* rennetin ve konjugatların GPC (Viskotek) cihazının viskozimetre dedektörü ile alınan kromatogramları

___ saflaştırılan *mucor miehei* Rennet ___ Dekstran Sülfat Aldehyd, ___ n: 20/ 1, ___ n: 10/1, ___ n: 1/1, ___ n: 5/1, ___ n: 1/5, ___ n: 1/10, ___ n: 1/20, Blank Rennet.

4.7 Satın Alınan ve Saflaştırılan *Mucor miehei* Rennetin İzoelektrik Noktası



Şekil 4.43 Satın alınan ve saflaştırılan *mucor miehei* rennetin izoelektrik noktası

4.8 *Mucor miehei* Rennet ve Dekstran Sülfatın Fiziksel Karışım ile Kovalent Bağlanmanın (Konjugasyonun) Aktiviteleri Yönünden Karşılaştırılması

Çizelge 4.9 Saflaştırılan *Mucor miehei* rennet' in ve $n_{\text{protein/polimer}}$ 1/10 oranlı fiziksel karışımının pıhtılaşma süreleri

Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk)	Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet	1/10
		Pıhtılaşma Süresi (sn)	
35	‘*’	18	22
	0 ‘**’	18	22
40	‘*’	15	17
	0 ‘**’	15	17
45	‘*’	12	14
	0 ‘**’	14	15
50	‘*’	10	13
	0 ‘**’	11	16
55	‘*’	8	10
	0 ‘**’	43	45
60	‘*’	7	8
	0 ‘**’	270	286

Çizelge 4.10 Saflaştırılan *Mucor miehei* Rennet' in ve $n_{\text{protein/polimer}}$ 1/10 oranlı fiziksel karışımının aktiviteleri

Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk)	Saflaştırılan <i>Mucor miehei</i> Rennet	1/10
		Aktivitesi (IU/mg)	
35	‘*’	83.3	68.2
	0 ‘**’	83.3	68.2
40	‘*’	100.0	88.2
	0 ‘**’	100.0	88.2
45	‘*’	125.0	107.1
	0 ‘**’	107.1	100.0
50	‘*’	150.0	115.4
	0 ‘**’	136.4	93.8
55	‘*’	187.5	150.0
	0 ‘**’	34.9	33.3
60	‘*’	214.3	187.5
	0 ‘**’	5.6	5.2

Saflaştırılan *Mucor miehei* rennetin ve protein/polimer 1/10 fiziksel karışımının oda sıcaklığındaki ve farklı sıcaklıklarda 0 dakika bekleme süreleri sonundaki sıcaklık ile aktivite değerleri arasında çizilen grafikler Şekil 4.44 ve 4.45'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.11 Saflaştırılan *mucor miehei* rennetin ve $n_{\text{protein/polimer}}$ 1/10 oranlı fiziksel karışımının pıhtılaşma süreleri

Sıcaklık	Bekleme Süresi (dk)	Saflaştırılan <i>mucor miehei</i> rennet	20/1	10/1	5/1	1/1	1/5
		Pıhtılaşma süresi (sn)					
35 °C	‘*’	23	24	23	23	22	23
	0 ‘***’	23	24	24	24	23	23

Çizelge 4.12 Saflaştırılan *Mucor miehei* rennetin ve $n_{\text{protein/polimer}}$ farklı oranlı fiziksel karışımların pıhtılaşma süreleri

Sıcaklık	Bekleme Süresi (dk)	Saflaştırılan <i>mucor miehei</i> Rennet	20/1	10/1	5/1	1/1	1/5
		Aktivite (IU/mg)					
35 °C	‘*’	65.2	62.5	65.2	65.2	68.2	65.2
	0 ‘***’	65.2	62.5	62.5	62.5	65.2	65.2

‘*’ : Enzim ve fiziksel karışım (1/10) süt çözeltisine ilave edilmeden önce oda sıcaklığındadır.

‘***’: 0: Sıfırıncı dakikada enzim veya mucor miehei rennet/dekstran sülfat 1/10 oranındaki fiziksel karışım aktivitenin ölçüleceği sıcaklığa gelene kadar su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra süt çözeltisine ilave edilmiştir.

Çizelge 4.13 Farklı pH' lardaki $n_{\text{protein/polimer}}$ 1/1 ve 1/10 oranlı fiziksel karışımların liyofilizatörde kurutulmasından sonra elde edilen pıhtılaşma süreleri

Bekleme Süresi (dk) ^{***}	1/1, pH 3.0	1/1, pH 7.0	1/10, pH 3.0	1/10, pH 7.0
35 °C	Pıhtılaşma Süresi (sn)			
'*'	21	21	21	20
0	20	22	22	21
5	20	21	22	20
15	21	22	22	21
30	22	21	23	21
60	21	21	22	21

Çizelge 4.14 Farklı pH' lardaki $n_{\text{protein/polimer}}$ 1/1 ve 1/10 oranlı fiziksel karışımların liyofilizatörde kurutulmasından sonra elde edilen aktiviteleri

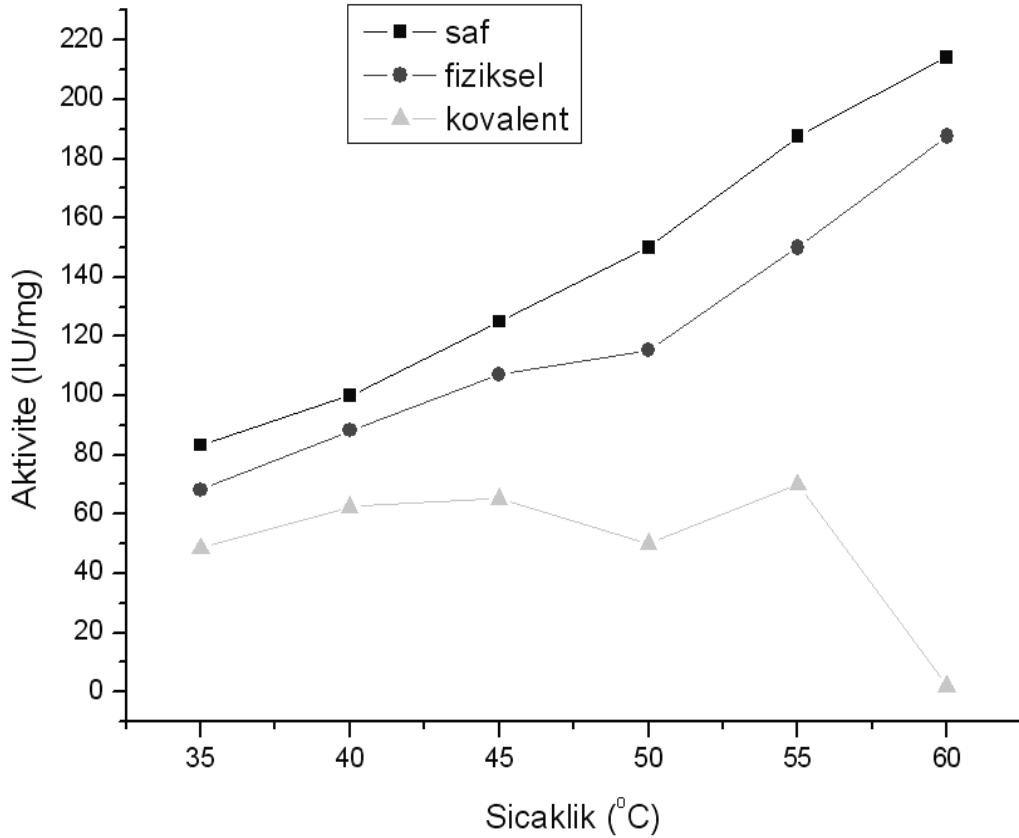
Bekleme Süresi (dk) ^{***}	1/1, pH 3.0	1/1, pH 7.0	1/10, pH 3.0	1/10, pH 7.0
35 °C	Aktivite (IU/mg)			
'*'	71.4	71.4	71.4	75.0
0	75.0	68.2	68.2	71.4
5	75.0	71.4	68.2	75.0
15	71.4	68.2	68.2	71.4
30	68.2	71.4	65.2	71.4
60	71.4	71.4	68.2	71.4

Çizelge 3.19'daki aktivite değerleri Çizelge 3.18'deki pıhtılaşma değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

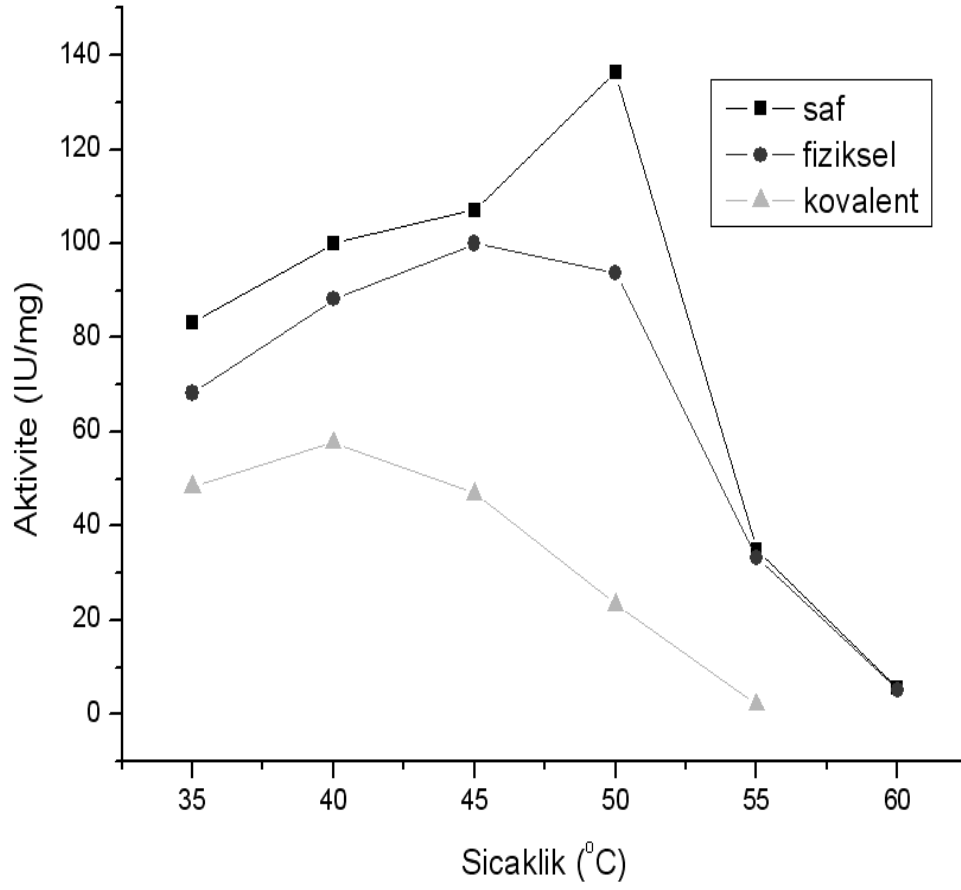
'*': Enzim veya konjugat süt çözeltisine ilave edilmeden önce oda sıcaklığındadır.

'***': Sıfırıncı dakikada konjugat aktivitenin ölçüleceği sıcaklığa gelene kadar su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra süt çözeltisine ilave edilmiştir. 5., 15., 30., ve 60. dakikalarda ise; fiziksel karışımlar pH 5,0'te 35 °C de 5, 15, 30 ve 60 dakika bekleme süreleri sonunda ölçülen süt pıhtılaşma süreleri ve aktivite değerleridir.

Protein/polimer 1/10 oranında *mucor miehei* rennet ve dekstran sülfatın fiziksel karışımından elde edilen aktivite değerleri saflaştırılan enzimin pH 5,0'teki aktivite değerleri ile birbirine oldukça benzerdir. Ve oda sıcaklığındaki saflaştırılan ve fiziksel protein-polimer konjugatının aktiviteleri birbiriyle paralel olarak artmaktadır (Şekil 4.44). Kovalent bağlı protein-polimer konjugatın ise, aktivitesi 45 °C de en yüksek değere ulaştıktan sonra artan sıcaklıklarda aktivitesi kaybolmaktadır (Şekil 4.44). Şekil 4.45'de ise benzer şekilde fiziksel karışım ve saf enzimin aktivitelerinin azalması birbiriyle paralel iken, konjugatın aktivitesinin bunlardan çok daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, konjugatlardaki sıcaklığa olan dirençteki azalmanın kovalent bağlı protein-polimer konjugatlarından kaynaklandığını göstermektedir.



Şekil 4.44 Saflaştırılan *mucor miehei* rennetin ve protein/polimer: 1/10 olan fiziksel karışımının ve 1/10 kovalent konjugatın oda sıcaklığındaki bekleme sonunda farklı sıcaklıklardaki aktivitesi



Şekil 4.45 Saflaştırılan *mucor miehei* rennetin ve protein/polimer: 1/10 olan farklı sıcaklıklarda fiziksel karışımının ve 1/10 kovalent konjugatın farklı sıcaklıklarda 0 dakikada bekleme sonundaki aktiviteleri

Yapılan Çalışmada Özet Olarak;

- Satın alınan enzimin safsızlık içerdiği HPLC ve GPC (Viskotek) cihazları ile belirlendi. Safsızlıklar Sephadex G-50 dolgu maddesi kullanarak jel filtrasyon kromatografisi ile uzaklaştırıldı. İki eluat (Havuz 1 ve Havuz 2) elde edildi. Elde edilen saf enzimin (Havuz 1) HPLC ve GPC (Viskotek) cihazlarından alınan kromatogramları, satın alınan enzimin kromatogramları ile kıyaslandı.
- Havuz 2'nin süt pıhtılaştırma aktivitesi ihmal edilebilecek kadar az olduğundan *mucor miehei* rennet-dekstran sülfat konjugatlarının sentezinde Havuz 1'in kullanılmasına karar verildi.
- Ultrafiltrasyon cihazı ile saflaştırılan enzim konsantre edildi. Liyofilizatörde kurutuldu. Bu işlem sonrası tayin edilen aktivitelerde düşme gözlemlendiğinden, liyofilizatörün kullanılmamasına karar verildi.
- Satın alınan ve saflaştırılan enzimin (Havuz 1) farklı pH ve farklı sıcaklıklarda farklı bekleme sürelerinde aktiviteleri tayin edildi
- Dekstran sülfat aldehyd türevine yükselgendi ve konsantre edilen saf enzime kovalent olarak bağlandı.
- Farklı protein/polimer oranlarında *mucor miehei* rennet-dekstran sülfat konjugatları sentezlendi. Sentezlenen konjugatlar G-100 dolgu maddesi kullanılarak jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırıldı.
- Saflaştırılan konjugatların pH 5,0'te farklı sıcaklıklarda farklı bekleme süreleri sonunda aktivite tayinleri yapıldı ve sonuçlar saf enzim ile farklı oranlardaki konjugatlar için elde edilenler ile kıyaslandı.
- Elde edilen konjugatlar FTIR, HPLC, GPC (Viskotek) cihazları ile incelendi.

5. SONUÇLAR

- Satın alınan enzimin saflaştırıldığı HPLC ve GPC (Viskotec) cihazları ile doğrulandı.
- Konjugatların HPLC kolonundaki alıkonma süreleri saflaştırılan enzime göre daha kısa olduğu bulundu.
- Polimer oranı yüksek konjugatların yüksek sıcaklıklarda 30 ve 60 dakika bekleme süreleri sonunda sıcaklığa dirençleri azaldı. Saflaştırılan ve satın alınan enzimlerin ise sıcaklığa olan direncini daha uzun süre koruduğu gözlemlendi.
- Konjugatlar ile aynı oranlı *mucor miehei* rennet-dekstran sülfat fiziksel karışımlarının süt pıhtılaştırma aktivite değerlerinin, saf enzim için ölçülen değerlere çok yakın olduğu belirlendi. Bu nedenle konjugatların sıcaklığa olan direncinin azalmasının, *mucor miehei* rennete aldehid dekstran sülfatın kovalent olarak bağlanmasından kaynaklandığı sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- Abian, O., Wilson, L., Mateo, C., (2002), "Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules new enzyme derivatives to be used in any reaction medium", J. Molecular Catalysis B, 19-20: 295-303.
- Anson, M.L., (1938), J. Gen. Physiol., 22: 79-89.
- Areces, L.B., Bonino, M.B.J., Parry, M.A.A., Fraile, E.R., Fernandez, H.M., Cascone, O., (1992), Appl. Biochem. Biotechnol., 37: 283-294.
- Arima, K., Yu, J., Iwasaki, S., Tamura, G., (1968), "Milk-clotting Enzyme from Microorganisms", American Society for Microbiology, 1727-1733.
- Balabuchevich, N., G., Zimina, E., P., Larionova, N., I., (2004), "Encapsulation of catalase in polyelectrolyte microspheres composed of melamine formaldehyde, dextran sulfate, and protamine", Biochemistry, 69: 763-769.
- Berridge, N.J., (1945), "The purification and Crystallization of Rennin", National Institute for Research in Drying, 39: 179-186.
- Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Fuentes, M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., (2004), "Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde", Journal of Biotechnology, 110: 201-207.
- Branner, S., Eigtved, P., Christensen, M., Thøgersen, H., Amino Acid and NMR Analysis of Oxidized *Mucor miehei* Rennet NOVO Industri A/S DK-2880 Bagsvaerd, Denmark.
- Branner-Jørgensen, S., Eigtved, P., Schneider, P., (1981), "Reduced thermostability of modified *Mucor miehei* rennet", Neth. Milk Dairy J., 35: 361-364.
- D'Ambrosio, A., Rossano, R., Ungaro, N., Riccio, P., (2003), "Proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from crustaceans *Munide*", J. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 22: 145-150.
- Darias, R., Villalonga R., (2001), "Functional stabilization of cellulase by covalent modification with chitosan", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 76: 489-493.
- Dickens, E., (1998), "Proteins at interfaces and in emulsions Stability, Rheology and interactions", J. Chem. Soc., Faraday Trans., 94 (12): 1657-1669.
- Dickinson, E., Galazka, V. B., (1991), "Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides", Food Hydrocolloids, 5 (3): 281-296.
- Fox, P.F., (1989), "Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening", Journal Dairy

Science., 72: 1379-1400.

Garcia-Carend, F.L., Hard, F.N., (1993), "Charecterization of Proteinase Classes in Langostilla and Crayfish extracts", *Journal of Food Biochemistry*, 17: 97-113.

Garnot, P., Thapon, L.J., Mathieu, C.M., Maubois, L.J., Dumas, B.R., (1972), "Determination of Rennin and Bovine Pepsins in Commercial Rennets and Abomasal Juices", 55, 12: 1641-1651.

Gilliland, G.L., Oliva, T.M., Jonathan, D., (1991), *Functional Implications of The Three-Dimensional Structure of Bovine Cymosine, Structure and Function of the Aspartic Proteinases*, Plenum Pres, New York.

Gladysheva, I. P., Moroz, N.A., Papisova, Larionov, N, I., (2001), "Soybean Bowman-Birk Inhibitor Conjugates with Clinical Dextran", *Biochemistry (Moscow)*, 66 (4).

Haard, N.F., (1992), *J. Aquatic Food Prod. Technol.* 1: 17–35.

Hyslop, D.P., Swanson, A.M.,Lund, D.B., (1972), " Inactivation of Milk-Clotting Enzymes different pH", *J. Dairy, Sci.*, 62,: 1227-1232.

Larm vd., (2003), *Method of covalent coupling*, United States Patent (US 6,653,457 B1).

Lawerence, K.C., Plowman, J.E., Liddell J.E., Smith, M.H., Hill, J.P., (1998), "Micelle Stability: κ -kazein Structure and Function", *Journal Dairy Science.*, 81: 3004-3012.

Lopes, A., Teixeira, G., Liberato, M.C., Pais, M.S., Clemente, A.J., (1998), *Mol. Catal. B: Enzym.* 5: 63–68.

McMahon, D. J., Brown, R. J., Ernstorm, C. A., (1984), "Enzymic coagulation of milk casein micelles", *J. Dairy Sci.*, 67: 745–748.

O' Fagain. C., (2003), "Enzyme stabilization-recent experimental progress", *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 137-149.

Payens, T. A., (1984), "The relationship between milk concentration and rennet coagulation time", *J. Appl. Biochem.* 6: 232–239.

Pires, M., Gatti, A.C., Orellana A.G., Morales, E., (2004), "Rennet coagulation of casein micelles in presence of sucroz or lactose", *Food Research International*, 37: 95-101.

pK Chemicals A/S Københavnsvej 140 DK–4600 Køge Denmark.

Rehm, H.J., Reed, G., Kennedy, J. F., (1987), *Enzymes in Food and Feed Processing*, 7a, *Enzyme Technology, Biotechnology*, 571-579.

Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E., (1988), "Interaction of hemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates", *J. Biol. Macromol.*, 10: 305-310.

Sandhya, C., Sumantha, A., Pandey, A., (2004), *Proteases*. In: *Enzyme Technology*, Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., Larroche, C., (Eds.), Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India, 312–325.

- Seker, S., Beyenal, H., Ayhan, F., Tanyolaç, A., (1998), "Production of Microbial rennin from *Mucor miehei* in a continuously fed fermenter", *Enzyme and Microbial Technology* 23: 469-474.
- Shammet, K.M., Brown, R.J., McMahon, D.J., (1992), "Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on κ -casein", *J. Dairy Science*, 75: 1373-1379.
- Simonet, F., Garnier, C., Doublier, J.-L., (2000), "Portions of proteins in the aqueous guar/dextran two-phase system", *Food Hydrocolloids*, 14: 591-600.
- Shamsuzzaman, K., Haard, N.F., (1983), "Evaluation of Harp Gastric Protease as a Rennet Substitute for Cheddar Cheese", *J. Food Sci.*, 4:179-182.
- Shmanai, V.V., Litoshko, A.A., (2001), "Solid Macrosupports for Immunoassay, Modified with Polysaccharides", *Russian Journal of Applied Chemistry*, 74, 8: 1348-1352.
- Sternberg, M.Z., (1970), "Crystalline Milk-clotting Protease from *Mucor miehei* and Some of its Properties", *Journal of Dairy Science*, 54 (2).
- Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A., (2006), "Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective Food Technol.", *Biotechnol.*, 44 (2): 211-220.
- Tamer, İ.M., (1993), "Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*", *Biotechnology Letters*, 15 (4): 427-432.
- Thakur, M.S., Karanth, N.G., Nand, K., (1990), "Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32: 409-413.
- Yada, R.Y., Nakai, S., (1986), "Secondary Structure of some Aspartyl Proteinases", *Journal Food Biochemistry*, 10: 155-183.
- Yada, R.Y., vd., (1992), "Reduction of Negative Charge in the Aspartyl Proteinase from the Fungus *Mucor miehei* by Chemical Modification of Carboxyl Groups: Effect on Structure-Function", *J. Agric. Food Chem.*, 40: 3-8.
- Yamashita, T., Higashi, S., Machida, H., Iwasaki, S., Nishiyama, M., Beppu, T., (1994), "Mutation of fungal aspartic proteinase, *mucor pusillus* rennin, to decrease thermostability for use as a milk coagulant", *Journal of biotechnology*, 32: 17-28.

İnternet Kaynakları

1. <http://www.miranda.chemistry.mcmaster.ca>
2. <http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/3www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs560/topic1/t1g/t1g.htm>
3. <http://160.114.99.91/astrojan/protein/pictures/rennin3.jpg>
4. <http://www.public.iastate.edu/~cfford/101Proteins.htm>
5. <http://class.fst.ohio-state.edu/FST822/lectures/Cafunc.htm>
6. <http://www.landfood.ubc.ca/courses/fnh/301/protein/protq3.htm>
7. wikipedia.org
8. http://chemdb.niaid.nih.gov/struct_search/an/an_struct_search.asp
9. www.dextran.net

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	1981
Doğum yeri	Havza/SAMSUN
Lise	1995–1999 Lâdik Akpınar Anadolu Öğretmen Lisesi
Lisans	1999–2004 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2004- Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı