

**POLİ(METİL METAKRİLAT-2-HİDROKSİETİL METAKRİLAT)
MİKROBONCUKLARINA KOVALENT BAĞLANMA İLE
GLUKOZ İZOMERAZIN İMMOBİLİZASYONU**

Ersoy ŞAHİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2007
ANKARA**

Ersoy ŞAHİN tarafından hazırlanan POLİ(METİL-METAKRİLAT-2-HİDROKSİETİL METAKRİLAT) MİKROBONCUKLARINA KOVALENT BAĞLANMA İLE GLUKOZ İZOMERAZIN İMMOBİLİZASYONU adlı bu tezin yüksek lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Serpil AKSOY
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oybirliği/oyçokluğu ile Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Muzaffer TALU

Üye : Prof. Dr. Serpil AKSOY

Üye : Prof. Dr. Erdal BAYRAMLI

Üye : Prof. Dr. Mehmet SAÇAK

Üye : Prof. Dr. Mehlika PULAT

Tarih : 26/01/2007

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

ERSOY ŞAHİN

**POLİ(METİL METAKRİLAT-2-HİDROKSİETİL METAKRİLAT)
MİKROBONCUKLARINA KOVALENT BAĞLANMA İLE GLUKOZ
İZOMERAZIN İMMOBİLİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

Ersoy ŞAHİN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2007**

ÖZET

Bu çalışmada, serbest glukoz izomerase enzimi (Gİ), siyanürik klorür (CC) ve epiklorhidrin (ECH) ile aktive edilmiş poli(metil metakrilat-2-hidroksietil metakrilat), P(MMA-HEMA), mikrob boncuklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir. Serbest Gİ için optimum pH: 7,5 siyanürik klorürle aktive edilen immobilize glukoz izomerase (CC-İGİ), ve epiklorhidrin ile aktive edilen immobilize glukoz izomerase (ECH-İGİ), için optimum pH: 8,0 bulunmuştur. Optimum sıcaklık sırasıyla serbest Gİ için 60 °C, CC-İGİ ve ECH-İGİ için 65 °C olarak bulunmuştur. Serbest Gİ, CC-İGİ ve ECH-İGİ için K_m değerleri sırasıyla $6,50 \times 10^{-5}$ mol/L, $1,26 \times 10^{-4}$ mol/L, $2,55 \times 10^{-4}$ mol/L, V_{max} değerleri sırasıyla $2,42 \times 10^{-5}$ mol/L.dak., $4,18 \times 10^{-5}$ mol/L.dak., $3,46 \times 10^{-5}$ mol/L.dak., olarak bulunmuştur. 56 gün sonunda 4 °C de depolamada, serbest Gİ, CC-İGİ ve ECH-İGİ başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %48,3 ünü, %57,1 ini ve %59,4 ünü koruduğu gözlenmiştir. Kolonda 110 dak sürekli kullanımda, CC-İGİ ve ECH-İGİ başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %73,6 sını ve %78,8 ini korumuştur.

Serbest Gİ'nin 70 °C ve 80 °C de inaktivasyon sabitleri (k_i) sırasıyla $8,0 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ ve $1,0 \times 10^{-2} \text{ dak}^{-1}$, bu sıcaklıklarda CC-İGİ için sırasıyla $5,5 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ ve $8,0 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ ECH-İGİ için sırasıyla $6,0 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ ve $7,0 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ bulunmuştur.

Bilim Kodu : 201.1.117
Anahtar Kelimeler : poli(metil metakrilat-2-hidroksietil metakrilat),
kovalent bağlanma, immobilizasyon, glukoz
izomeraz
Sayfa Adedi : 95
Tez Yöneticisi : Prof.Dr.Serpil AKSOY

**COVALENT IMMOBILIZATION OF GLUCOSE ISOMERASE ON
POLY(METHYL METHACRYLATE- 2-HYDROXYETHYL
METHACRYLATE) MICROBEADS
(M.Sc. Thesis)**

Ersoy ŞAHİN

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
January 2007**

ABSTRACT

In this study, glucose isomerase enzyme (GI) was covalently immobilized on poly(methymetacrylate-2-hydroxyethylmethacrylate), P(MMA-HEMA) microbeads, which were activated by using cyanuric chloride ($C_3N_3Cl_3$) and epichlorohydrin (C_3H_5ClO). Optimum pH was determined as 7.5 and 8.0, for free GI, cyanuric chloride immobilized glucose isomerase (CC-IGI), epichlorohydrin immobilized glucose isomerase (ECH-IGI) respectively. Optimum temperature was determined as 60 °C and 65 °C for free GI, cyanuric chloride immobilized glucose isomerase (CC-IGI), epichlorohydrin immobilized glucose isomerase (ECH-IGI) respectively. K_m values were found to be 6.50×10^{-5} mol/L, 1.26×10^{-4} mol/L, 2.55×10^{-4} mol/L, V_{mak} values 2.42×10^{-5} mol/L.dak, 4.18×10^{-5} mol/L.dak, 3.46×10^{-5} mol/L.dak for free GI, CC-IGI and ECH-IGI, respectively. After 56 days of storage at 4 °C, free GI, CC-IGI and ECH-IGI retained %48.3, %57.1 and %59.4 of their original activities, respectively. CC-IGI and ECH-IGI were retained %73.6 and %78.8 of their initial activities under continuous flow column after 110 min, respectively.

Inactivation rate constants (k_i) of free, CC-IGI and ECH-IGI were calculated as $8,0 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $5,5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $6,0 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ at 70°C , they were also calculated as $1,0 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, $8,0 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $7,0 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ respectively at 80°C .

Science Code : 201.1.117

**Key Words : poly(methyl methacrylate-2-hydroxyethyl methacrylate)
covalent binding, immobilization, glucose isomerase**

Page Number : 95

Adviser : Prof. Dr. Serpil AKSOY

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince bilgisi ve tecrübesi ile desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Serpil AKSOY'a, yardımları ve destekleri ile her zaman yanımda olan değerli hocalarım Yard.Doç.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK, Yard.Doç.Dr. Haydar ALTINOK, Uzman Ferhat ŞAHİN'e, Yaşamım boyunca her zaman yanımda olan, anlayış ve destekleri ile beni yalnız bırakmayan, her şeyim olan sevgili anneme, babama ve çok değerli kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xiv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xvi
RESİMLERİN LİSTESİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enzimler	3
2.1.1. Enzimlerin etkisi	4
2.1.2. Enzimlerin uygulama alanları	6
2.2. Enzim İmmobilizasyonu	7
2.5.1. Enzim immobilizasyonunda destek seçimi	12
2.3. İmmobilizasyon Yöntemleri	13
2.3.1. Kimyasal yöntemler	15
2.3.2. Fiziksel yöntemler	18
2.4. Glukoz İzomeraz	22
2.5. Glukoz	26
2.6. Glukoz İzomerazın İmmobilizasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar	27

	Sayfa
3. DENEYSEL KISIM	33
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.2. Polimerik Mikroboncukların Sentezi	35
3.2.1. Poli(metil metakrilat-2-hidroksietil metakrilat) mikroboncuklarının sentezi	35
3.2.2. Polimerik mikroboncuklarının karakterizasyonu.....	36
3.3. Glukoz ve Glukoz İzomeraz Çözeltilerinin Hazırlanması.....	37
3.4. Fruktoz Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	37
3.5. P(MMA-HEMA) Mikroboncuklarının Aktifleştirilmesi.....	38
3.5.1. Mikroboncukların siyanürik klorürle aktifleştirilmesi.....	38
3.5.2. Mikroboncukların epiklorhidrin ile aktifleştirilmesi.....	38
3.6. Enzim İmmobilizasyonu	39
3.7. Glukoz İzomerazın Aktivlik Tayini.....	40
3.7.1. Serbest glukoz izomerazın aktivlik tayini.....	40
3.7.2. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktivlik tayini	41
3.7.3. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktivlik tayini	41
3.8. Enzim Aktivliğine pH' nın Etkisi	41
3.8.1. Serbest glukoz izomerazın aktivliğine pH' in etkisi.....	41
3.8.2. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktivliğine pH' in etkisi	41
3.8.3. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktivliğine pH' in etkisi	42
3.9. Enzim Aktivliğine Sıcaklığın Etkisi.....	42

Sayfa

3.9.1. Serbest glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi	42
3.9.2. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi	42
3.9.3. Epiklorhidrin ile aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi	42
3.10. Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi	43
3.10.1. Serbest glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi	43
3.10.2. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi	43
3.10.3. Epiklorhidrin ile aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi	43
3.11. Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi	44
3.11.1. Serbest glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi	44
3.11.2. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi	44
3.11.3. Epiklorhidrin ile aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi	44
3.12. Enzim Aktifliğinin Sürekli Kullanım ile Değişimi.....	45
3.12.1. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi	45
3.12.2. Epiklorhidrin ile aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi	46
3.13. Enzim Bağlanma Kapasitesi	47
3.14. Termal İnaktivasyon	48
3.14.1. Serbest glukoz izomerazın termal inaktivasyonu.....	48

	Sayfa
3.14.2. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz termal inaktivasyonu	48
3.14.3. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın termal inaktivasyonu	49
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	50
4.1. Polimerik Mikroboncukların Karakterizasyonu	50
4.1.1. Fiziksel şekil analizi.....	50
4.1.2. Tanecik boyutu dağılımı analiz sonuçları.....	50
4.2. Serbest Glukoz İzomerazın Aktifliğine pH' nın Etkisi	52
4.3. İmmobilize Glukoz İzomerazın Aktifliğine pH' nın Etkisi	54
4.3.1. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' nın etkisi	54
4.3.2. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' nın etkisi	56
4.4. Serbest Glukoz İzomerazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi	58
4.5. İmmobilize Glukoz İzomerazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi	60
4.5.1. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi	60
4.5.2. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi	61
4.6. Serbest Glukoz İzomerazın Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi.....	63
4.7. İmmobilize Glukoz İzomerazın Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi	64
4.7.1. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin	64
4.7.2. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin	66

	Sayfa
4.8. Serbest Glukoz İzomerazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi	67
4.9. İmmobilize Glukoz İzomerazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	69
4.9.1. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi	69
4.9.2. Epiklorhidrin ile aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi	70
4.10. İmmobilize Glukoz İzomerazın Aktifliğinin Sürekli Kullanım ile Değişimi	72
4.10.1.Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi	72
4.10.2. Epiklorhidrin ile aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi	74
4.11. Termal İnaktivasyon	77
4.11.1. Serbest glukoz izomerazın termal inaktivasyonu.....	77
4.11.2. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın termal inaktivasyonu	78
4.11.3. Epiklorhidrin ile aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın termal inaktivasyonu	80
4.12. Enzim Bağlanma Kapasitesi.....	83
5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	84
KAYNAKLAR	86
EKLER	92
EK-1 Hazırlanan çözeltiler	93
ÖZGEÇMİŞ.....	95

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Yaygın olarak kullanılan destekler	13
Çizelge 4.1. P(MMA-HEMA) mikrobuncuklarının tanecik boyutu dağılımı analiz sonuçları	51
Çizelge 4.2. Serbest Gl' in aktifliğine pH' nın etkisi	53
Çizelge 4.3. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' nın etkisi	55
Çizelge 4.4. Epiklorhidrinle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' nın etkisi	56
Çizelge 4.5. Serbest Gl' in aktifliğine sıcaklığın etkisi	58
Çizelge 4.6. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi	60
Çizelge 4.7. Epiklorhidrinle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi	62
Çizelge 4.8. Serbest Gl' in aktifliğine glukoz derişiminin etkisi	63
Çizelge 4.9. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine glukoz derişiminin etkisi	65
Çizelge 4.10. Epiklorhidrinle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine glukoz derişiminin etkisi	66
Çizelge 4.11. Serbest Gl' in aktifliğine depolama süresinin etkisi	68
Çizelge 4.12. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi	69
Çizelge 4.13. Epiklorhidrinle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi	71
Çizelge 4.14. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi	73
Çizelge 4.15. Epiklorhidrinle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi	75

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.16. Serbest Gl' nın 70 °C' de termal kararlılığı	77
Çizelge 4.17. Serbest Gl' nın 80 °C' de termal kararlılığı	77
Çizelge 4.18. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın 70 °C' de termal kararlılığı	79
Çizelge 4.19. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın 80 °C' de termal kararlılığı	79
Çizelge 4.20. Epiklorhidrinle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın 70 °C' de termal kararlılığı	81
Çizelge 4.21. Epiklorhidrinle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın 80 °C' de termal kararlılığı	81
Çizelge 4. 22. Serbest Gl, CC-İGl ve ECH-İGl' nın 70 °C ve 80 °C' deki İnaktivasyon sabitleri ve yarılanma süreleri.....	83

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli.....	6
Şekil 2.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri	14
Şekil 2.3. Glukozun fruktoza dönüşüm tepkimesi.....	24
Şekil 2.4. Glukozun yapısı	26
Şekil 3.1. Polimerleşme tepkimesi için kullanılan düzenek	36
Şekil 3.2. Fruktoz kalibrasyon eğrisi	38
Şekil 3.3. Aktifleştirme ve immobilizasyon tepkimeleri	39
Şekil 3.4. Sürekli kullanım için düzenek	46
Şekil 3.5. Peristaltik pompa kalibrasyon eğrisi	47
Şekil 3.6. Enzim kalibrasyon eğrisi.....	48
Şekil 4.1. P(MMA-HEMA) mikrobuncuklarının tanecik boyutu dağılımı grafiği	51
Şekil 4.2. Serbest Gİ' in maksimum aktifliğinin pH ile değişimi	53
Şekil 4.3. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi.....	55
Şekil 4.4. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi.....	57
Şekil 4.5. Serbest Gİ' in maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi.....	59
Şekil 4.6. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	61
Şekil 4.7. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	62
Şekil 4.8. Serbest Gİ için Lineweaver-Burk grafiği	64

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın Lineweaver-Burk grafiği	65
Şekil 4.10. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın Lineweaver-Burk grafiği	67
Şekil 4.11. Serbest GI' in maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi	68
Şekil 4.12. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi	70
Şekil 4.13. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi	71
Şekil 4.14. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi.....	74
Şekil 4.15. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum sürekli kullanım ile değişimi.....	76
Şekil 4.16. Serbest GI' nın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	78
Şekil 4.17. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	80
Şekil 4.18. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	82

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Streptomyces rubiginosus dan elde edilen glukoz izomerazın X-ışını kırınımı ile çekilmiş fotoğrafı	23
Resim 4.1. P(MMA-HEMA) mikrobuncuklarının mikrofotografı	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

ΔA

Absorbans değişimi

k_i

İnaktivasyon hız sabiti

K_m

Michaelis-Menten sabiti

$t_{1/2}$

Yarılanma süresi

V_{mak}

Tepkimenin maksimum hızı

V

Aktiflik (hız)

Kısaltmalar

Açıklama

BPO

Benzoil peroksit

CC

Siyanürik klorür

CC-İGi

Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerase

ECH

Epiklorhidrin

ECH-İGi

Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerase

EGDMA

Etilen glikol dimetakrilat

Gi

Glukoz izomerase

MMA

Metilmetakrilat

HEMA

2-hidroksietil metakrilat

P(MMA-HEMA)

Poli(metilmetakrilat-2-hidroksietil metakrilat)

PVP

Poli(vinil pirolidon)

TCP

Trikalsiyumfosfat

1. GİRİŞ

Enzimlerin kullanımı çok eski çağlara dayanır. İlk çağlarda insanlar bilinçsiz olarak ekmek hamuru, peynir, kırmızı, yoğurt gibi gıdaların hazırlanmasında enzimlerin işlevlerinden yararlanmışlardır. Enzimlerin yapısı ve tepkime mekanizmalarının aydınlatılmasıyla enzimler gıda, ilaç, kozmetik, tekstil, temizlik maddeleri gibi çeşitli endüstriyel maddelerin üretiminde, üretime yönelik çeşitli tepkimelerin katalizlenmesinde ve fizyolojik rahatsızlıkların tedavisinden tıpta tanı çalışmalarına kadar uzanan yeni birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır [1]. Enzimoloji konusundaki gelişmeler 1897’de Büchner’in canlı maya hücrelerinden ilk aktif enzimi ekstre etmesiyle başlamıştır. Büchner bu çalışmasıyla enzimlerin katalitik aktivitelerini içinde bulundukları hücrelerin yaşamsallığına bağlı olmaksızın farklı ortamlarda da devam ettirdiğini göstermiştir. 1926’da Sumner enzimlerin protein yapısında olduğunu ortaya koymuş ve ilk enzim saflaştırmasını gerçekleştirmiştir [2].

Enzimler canlı hücrelerden elde edilmiş proteinlerdir. Değişik avantajlarından dolayı enzimler çeşitli kimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılmaktadır. Bitki , hayvan dokuları ve mikroorganizmalardan elde edilen çok sayıdaki enzim yapılarına ve kontrol ettikleri reaksiyon mekanizmalarına göre karakterize edilmişlerdir. Karakterize edilen bu enzimlerin ticari ve saf şekillerinin bulunması endüstriyel uygulamalarda kullanılmalarını sağlamaktadır. Enzimlerin spesifik olmaları ve reaksiyonları katalizleme kabiliyetleri onların biyokimyasal, endüstriyel ve analitik alanlarda uygulamalarını cazip hale getirmektedir [3].

Doğal enzimler yüksek molekül kütlesine sahip proteinler olup genellikle suda çözünürler. Ancak çözelti halinde kararlılıklarının sınırlı olması, ortamdaki ayrılmasının çok zor olması, reaksiyon denetimlerini güçleştirmelerini ve enzimlerin tekrar kullanımlarının mümkün olmaması immobilize enzim düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Sonuçta immobilizasyon ile enzimlerin ısısal,

mekanik ve kimyasal kararlılıklarının arttırılması ile tekrar kullanılabilmeleri mümkün kılınmıştır [4].

Bu çalışmada glukoz izomeraz enzimi polimerik destek üzerine kovalent bağlanma metoduyla immobilize edildi. Bu amaçla poli(metilmetakrilat-2-hidroksietil metakrilat destek materyali hazırlandı. Bu destek materyali siyanürik klorür ve epiklorhidrin kullanılarak aktifleştirildi ve glukoz izomeraz enzimi kovalent bağlanma metodu ile immobilize edildi. Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine etki eden sıcaklık, pH, substrat derişimi, depolama süresi gibi çeşitli parametrelerin etkisi ve immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Katalizörler kendileri tepkimeye girmedikleri halde aktivasyon enerjisini düşürerek tepkime hızını artıran maddeler olarak tanımlanır. Enzimler genellikle 15 000 ile birkaç milyon arasında değişen yüksek molekül ağırlığına sahip protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Enzimler tepkimenin kinetiğini etkiler. Buna karşılık tepkimenin termodinamiği üzerinde etkisi yoktur. Enzimler diğer katalizörler gibi katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini (E_a) düşürürler [4].

Enzimi oluşturan amino asitlerin sayısı, dizilişi sırası ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir ve bu düzen enzimin substrata seçiciliğini sağlar. Bazı enzimler yalnızca proteinden oluşurken, bazıları protein yanında protein olmayan bir kısım içerirler. Bu tip enzimlerde, enzimin protein kısmına “apoenzim”, protein olmayan kısmına, enzimden kolayca ayrılabiliyorsa “koenzim” veya “kofaktör”, sıkıca bağlı ise “prostetik grup” adı verilir. Koenzimler genellikle vitamin türevleri, organik moleküller ve inorganik metal anyon veya katyonlardan oluşur. Apoenzim ve koenzim birlikte “haloenzim” diye adlandırılır. Haloenzimin büyük bir kısmını apoenzim oluşturur. Apoenzim tek başına katalitik aktivite gösteremez. Enzime katalitik özelliğini veren koenzim, tek başına gerçek enzime göre çok daha düşük aktivite gösterir. Enzimin gerçek aktivitesi sadece koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda gözlenir [5,6].

Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli amino asitlerin oluşturduğu bir kısım bulunur. Protein zincirinin bu bölgesi enzimin katalitik etkisinden sorumlu olup “aktif bölge” olarak tanımlanır. Substrat ve eğer varsa koenzim bu merkeze, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar ve / veya kovalent bağlar ile bağlanır. Substratın dönüşüme katılan ve katalitik prosesi yürüten amino asitler de aktif merkezden sayılırlar [7-9].

2.1.1. Enzimlerin etkisi

Enzimlerin etki mekanizması iki farklı açıdan ele alınabilir. Bunlardan birincisi tepkime süresince gerçekleşen enerji değişikliklerinin, diğeri ise kataliz sırasında aktif bölgedeki yapısal değişikliklerin incelenmesi ile ilişkilidir.

Aktivasyon enerjisi

Moleküllerin birbirleri ile reaksiyona girebilmeleri için dışarıdan enerji almaları gereklidir. Bütün kimyasal tepkimelerde aktivasyon enerjisi olarak bir enerji engelinin aşılması gerekmektedir. Reaksiyonun hızını belirleyen en önemli faktör aktivasyon enerjisi (E_a) denilen bu enerji ihtiyacının büyüklüğüdür. Enerji engeli ne kadar yüksek olursa birim zaman içerisinde bu engeli aşan moleküllerin sayısı da o oranda az olacaktır. Reaksiyon hızını artırabilmek için sisteme kimyasal veya biyolojik bir katalizör ilave edilebilir. Bu durumda katalizör substrat ile (ES) kompleksi yaparak aktivasyon enerjisini aşağılara çekebilir.

ES kompleksinin oluşması ile daha çok substrat aktivasyon enerji engelini aşabilmekte, reaksiyon hızı artmakta ve birim zamanda oluşan ürün miktarı artmaktadır. Reaksiyon sonunda serbest kalan enzim ortamdaki diğeri substrat moleküllerine bağlanarak onların da aktivasyon enerjisini düşürecek ve onların da ürüne dönüşümünü hızlandıracaktır. Genel olarak aktivasyon enerjisi düşük olan tepkimelerin hızları yüksek olmaktadır.

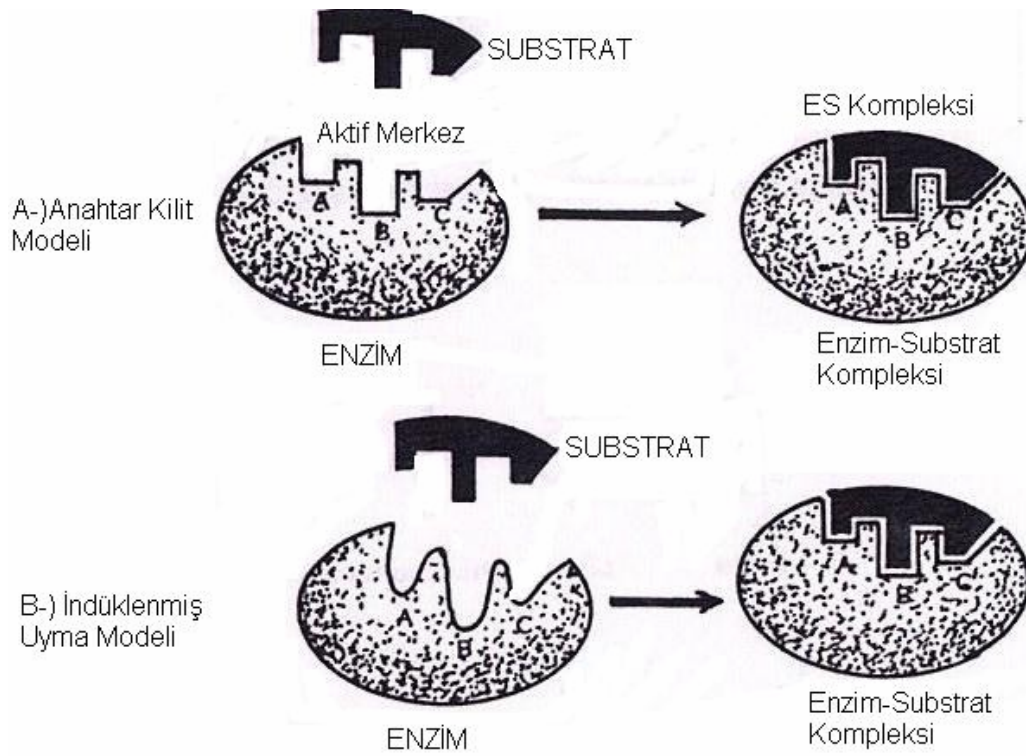
Hücrel koşullarda enzimler daha düşük aktivasyon enerjisi gerektiren alternatif yollar oluşturarak tepkimelerin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Enzimle katalizlenen reaksiyonların çoğu katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^3 ile 10^8 kere daha hızlı olarak gerçekleşir. Tipik olarak bir enzim molekülü saniyede 100-1.000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. Enzim başına düşen ürüne çevrilmiş substrat molekülü sayısına "Turnover sayısı" denir [6,7].

Aktif bölgedeki değişiklikler

Aktif yerler bir şerit yarık, çatlak, oyuklardır ve kataliz için gerekli temel polar artıklarda ihtiva ederler. Yapıları bilinen enzimlerin hepsi de substrat molekülleri çoğunlukla suyun ayrılması ile yarık veya çatlaklara bağlanırlar. Aktif yerler bir enzimin toplam hacmine oranla küçük bir kısmını teşkil eder.

Aktif merkez, bir enzimin substrata yapıştığı bölge, bir de kataliz olayının gerçekleştirildiği bölge (katalitik yer) olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Bir enzimin yapısındaki amino asit artıklarının çoğu subtratla temas halinde değildir. Birçok enzimde katalitik yerde serin, sistin, histidin, tirozin ve lizin bulunur.

Aktif merkez ile substrat, bir anahtar ile kilit gibi birbirine uygunluk gösterir. Bu şekil Emil-Fischer'in tarif ettiği "anahtar ve kilit" durumuna uyar. Ancak substrat ile buluştuktan sonra enzim özel yapısını almakta ve substrat aktif bölgeye bağlanmaktadır. Bu dinamik tanıma olayına "indüklenmiş uyum" veya "sonradan olma uyum" denir [4,5,7].



Şekil 2.1. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli

2.1.2. Enzimlerin uygulama alanları

Enzimlerin endüstriyel analitik ve tıbbi uygulamaları gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Enzimlerin katalitik potansiyelleri yalnız analitik amaçlar için değil aynı zamanda sentetik amaçlar ve modifikasyonlar için de değerlendirilmektedir. Bu çerçevede başta gıda sektörü olmak üzere, ilaç sanayi, kimya sanayi, deri ve tekstil sanayi gibi birçok sanayi dalında enzimler geniş uygulama alanları bulmuşlardır.

Yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları enzimlerin doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yaralanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır.

Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 30-35'i deterjan sanayinde, % 20-25'i nişasta ile ilgili alanlarda, % 20'si süt ve süt ürünleri sanayinde kullanılmaktadır. Bira, meyve ve şarap, unlu mamuller, tekstil, kağıt, deri ve yem sanayinde kullanılan enzimler için her alanın yaklaşık % 1-5 arasında bir payı bulunmaktadır [9].

2.2. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler özel bazı bioorganik reaksiyonların oluşumunu hızlandıran ve verimini arttıran protein yapısında molekülleridir. Çok yüksek katalizleme gücüne sahip olan protein yapısındaki enzimler metabolizmaya katılan madde moleküllerini etkinleştirirler. Şekerlerden alkolün teşekkülü, peynir yapılması, şarabın sirkeleşmesi ve idrarda amonyak teşekkülü gibi enzimatik olaylar çok eski zamanlardan beri bilinmektedir [10].

Protein yapılarından dolayı enzimler ısı, ışık, basınç, kuvvetli asit ve baz etkisi ile bozunurlar. Aslında her enzimin kendine özgü sıcaklık, pH ve basınç koşulları bulunmakla beraber etkinlik optimumu 40°C dolaylarındadır.

Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin, aktivitesini yitirmeden geri kazanılması oldukça zor ve pahalı bir proses gerektirir. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek zor olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar [10-12].

Bilim adamları tüm bu sorunları olumlu yönde çözümleyebilmek, enzimleri endüstriyel ve biyoteknolojik alanda daha çekici hale getirmek için, daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yönelmişlerdir. Böylece enzimlerin ısısal, mekanik ve kimyasal kararlılıklarını artırma ve birçok kez kullanılabilme düşüncesi immobilize enzim olgusunu doğurmuştur. Özellikle son yıllarda gıda ve ilaç sanayilerinde, analitik kimya uygulamalarında saf ürün elde etmek amacıyla katalizör olarak kullanılan enzimlerin immobilize edilerek teknolojiye de kullanılmaları büyük önem kazanmıştır. Özellikle son 30 yılda enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmış olup bu alanda yapılan yayınların sayısı yıldan yıla artmaktadır.

Enzimler suda çözünmeyen bir matrisle bağlandıklarında , matrisin içinde tutuklandıklarında veya katalitik etkileri kaybolmadan birbirlerine bağlandıklarında immobilize olurlar. Immobilize enzimlerin özellikleri kullanılan metoda ve matrisin yapısına bağlı olarak değişebilir.

İmmobilizasyon işlemi ile:

1. Immobilize enzimin optimum pH ' ı değişebilir.
2. K_m değeri immobilizasyondan etkilenebilir
3. Enzimin optimum sıcaklığında artışlar olabilir.
4. Matris enzim için yeni bir ortam oluşturarak enzimin aktivitesini değişik yollardan etkiler. Enzimin aktif bölgesi değişikliğe uğrayabilir veya matris substratın hareketini engelleyebilir [10].

Matris enzim için yeni bir ortam oluşturarak enzimin aktivitesini değişik yollarla etkiler. Kelime anlamı olarak hareketi sınırlandırma anlamına gelen “immobilizasyon” tutuklanmış enzim moleküllerinin sürekli bir işlemde kullanılmasıdır.

Enzim moleküllerinin tutuklanma işlemi :

1. Enzimin suda çözünmeyen polimere kovalent olarak bağlanması

2. Suda çözünmeyen organik veya inorganik desteklerde adsorpsiyonu
3. Suda çözünmeyen jel matrisler veya yarı geçirgen mikrokapsüller içinde tutulması süretiyle yapılmaktadır. Her durumda enzimin yerleşmesi için suda çözünmeyen bir materyal gereklidir [10].

Son yıllarda immobilizasyon teknolojsinin önemi hızla artmakta olan araştırma alanlarının başlıcalarındandır. Uygun destek maddelerine ilaç, protein, enzim, mikroorganizma, bitki yada hayvan hücreleri yüksek düzeylerde tutuklanıp yapay organ sistemleri biyosensör ve reaktör uygulamaları ile kontrollü ilaç salınım sistemlerinde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır.

Tarihte ilk enzim immobilizasyonu Nelson ve Grifftin (1916) tarafından adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Modern anlamda ise ilk olarak Grubhofer ve Schleith (1954) tarafından bazı immobilize enzim türevleri hazırlanarak kinetik parametreleri incelenmiştir. Daha sonra bu alandaki çalışmalar dünyanın her tarafında popülerite kazanmış olup enzimler değişik amaç ile immobilize edilmiştir [13].

Başta Amerika Birleşik Devletleri ve Japonya olmak üzere birçok ülkede immobilize enzimler yardımıyla üretim yapan fabrikalar kurulmuştur. Ülkemizde ise bu konuda endüstriyel boyutta herhangi bir uygulamaya henüz rastlanmamıştır [10,13].

Enzimlerin adlandırılmasında olduğu gibi immobilize enzimler için kullanılan terimlerde de bir kargaşa meydana gelmiştir. Suda çözünmeyen enzim, bağlanmış enzim, matrikse bağlı enzim, tutuklanmış enzim gibi terimler de kullanılmıştır. 1971 yılında yapılan 3.Biyoteknoloji Biyomühendislik Sempozyumu ve 1.Enzim Mühendisliği Konferansında “immobilize enzim” terimi tavsiye edilmiş böylece modifiye enzimlerin isimlendirilmesine açıklık getirilmiştir. Immobilize enzim çerçeve bir isim olup tüm değerleri kapsarken

“tutuklanmış“, “çözünmez hale getirilmiş“, “bağlanmış“ gibi terimler yalnız alt bir immobilizasyon yöntemini ifade etmektedirler [10].

Enzim immobilizasyonunda dikkat edilmesi gereken hususlar; enzim immobilize edilirken aktif merkezin bu işlemlerden kesinlikle etkilenmemesi gerekir. Aktif merkezde iki bölge vardır. Bunlardan biri katalitik merkez diğeri ise substrat spesifikliğı sağlayan merkezdir. Aktif merkezdeki amino asitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değişirse katalitik aktivite düşer ve substrat spesifikliğı değişir. İmmobilizasyonun sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir. Enzim ile destek arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise bu bağlanmanın aktif merkez üzerinde gerçekleşmeyeceğı destekler seçilmeli veya immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Bu koruma görevi bazen kompetitif inkübatör tarafından sağlanır. İmmobilizasyon işlemi ılıman koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yüksek basınç , kuvvetli asidik veya bazik ortam , organik çözücüler veya yüksek tuz konsatrasyonu ile muamele denatürasyona dolayısıyla aktivite kaybına neden olur [10].

İmmobilizasyon yöntemi seçiminde :

- Güvenirlik
- Enzim aktivitesinin korunması
- Maliyet
- İmmobilize enzimin kararlılığı

dikkat edilmesi gereken 4 ana husustur.

Enzimatik aktivitenin korunması çok önemli olup, özellikle kovalent bağlanma ile immobilizasyonda enzim ile destek arasında oluşan bağların aktiviteyi ve kararlılığı doğrudan etkilediğı göz önünde bulundurulmalıdır.

Destek seçiminde ise, immobilizasyon yöntemi birim hacimdeki aktivite ve istenen mekanik özellikler üzerinde durulur. İyonik veya kovalent bağlanma

ile gerçekleştirilen immobilizasyonda desteknin fonksiyonel gruplar içermesi zorunludur. Yüklü desteklerin kullanılması enzimin optimum pH'sının 1-2 birim, K_m değerinin ise 10 katı kadar değişimine sebep olabilir. Substrat büyük ise tutuklanma yöntemleri ve poröz destekler uygun değildir. Gözeneksiz destekler için enzim aktivitesi, destek partikülün dış yüzeyi ile orantılıdır.

İmmobilizasyon sırasında enzim molekülleri konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. İmmobilize enzimin zincir hareketleri çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar aşağıda verilmiştir.

- İmmobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi
- Destek ile enzimin karşılıklı etkileşmesi
- Aktifleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesi gibi.

Enzimler içinde bulundukları çevre tarafından etkilenirler. Enzimin katı destek üzerinde immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikroçevreyi etkileyebilir. Buda enzmin görünen davranışları üzerinde bazı değişiklikler oluşturur [14].

İmmobilize enzimlerin en önemli avantajları şu şekilde sıralanabilir [10,15].

1. İmmobilize enzimler , reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılabilir. (süzme, santrifüjleme gibi) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
2. İmmobilize enzimler, çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı dayanıklıdır.
3. İmmobilize enzimler birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
4. İmmobilize enzimler doğal enzime göre daha karardır.
5. İmmobilize enzimlerde ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
6. İmmobilize enzimler, birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
7. İmmobilize enzimler bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir

aktivite gösterebilirler.

8. İmmobilize enzimlerde kendi kendini parçalama olasılığı azdır.

Enzimin immobilize edilmesinin bazı dezavantajları da vardır. Bunların başlıcaları aşağıda özetlenmiştir [16].

1. İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir veya kaybolabilir.
2. Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
3. Enzim desteklerinin maliyeti yüksektir.

2.2.1. Enzim immobilizasyonunda destek seçimi

Enzime göre destek seçimi çok önemlidir. Destek seçiminde partikül büyüklüğü, toplam yüzey, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve desteğin kimyasal bileşimi kriterleri esas alınır. Bağlanmış enzim miktarı ve enzimin immobilizasyon sonrasındaki aktivitesi desteğin yapısına bağlıdır. Genel olarak desteğin hidrofil karakteri ve yüzeyi arttıkça birim destek başına bağlı enzimin miktarı da artar.

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Destek membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Destekte olması gereken özellikler aşağıda verilmiştir [15,17].

- Hidrofil karakter
- Suda çözünmeme
- Gözenekli (poröz) yapı
- Mekanik kararlılık ve uygun partikül formu
- Kimyasal ve termal kararlılık
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik
- Zehirsizlik
- Rejenere olabilme

- Kovalent bağlanmada kullanılacak destekler ılıman koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı

Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan destekler Çizelge 3.1' de verilmiştir.

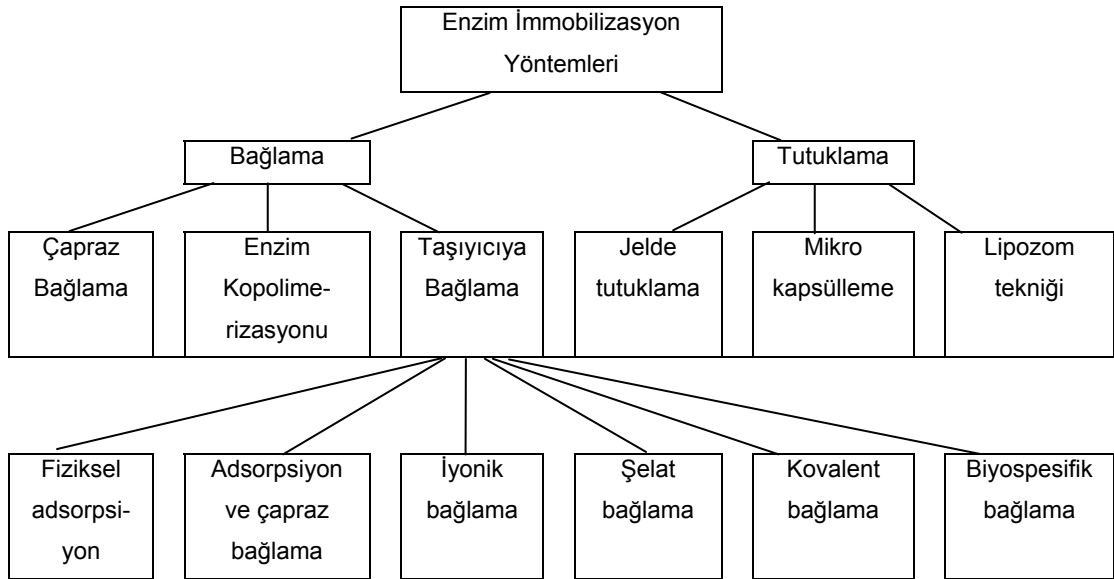
Çizelge 2.1. Yaygın olarak kullanılan destekler

Anorganik	Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Kil , cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamidler
Bentonit	Dekstran	Naylonlar
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerleri
Titandioksit	Karragenan	Oksiranlar
Zirkonyumdioksit	Kollojen	Metakrilat polimerleri
Nikeloksit	Kitin ve kitosan	İyon değiştirici reçineler
Pomza taşı	Jelatin	Maleik anhidrit polimerleri
Aktif karbon	Albümin	
Metaller	İpek	
Metal oksitler	Aljinat	

2.3. İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon enzim moleküllerinin hareketini veya serbest difüzyonunun sınırlayan bir proses olarak tanımlanabilir. Genellikle bu proses suda çözünmeyen bir desteğe bağlanması ile gerçekleşir.

1960'lı yıllardan bu yana enzimlerin immobilizasyonu için birçok immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Genel olarak enzimlerin immobilizasyon yöntemleri şekilde verilmiştir [10,18].



Şekil 2.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile destek arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği destekler seçilmeli yada immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır [19].

Enzim immobilizasyon yöntemleri çok farklı kaynaklarda değişik şekillerde sınıflandırılmalarına karşın fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir.

1. Kimyasal Yöntemler

- Kovalent bağlanma
- Çapraz bağlanma

2. Fiziksel Yöntemler

- Adsorpsiyon ile immobilizasyon
- Hapsetme ile immobilizasyon

- Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi
- Kafes tipi hapsetme yöntemi

2.3.1. Kimyasal yöntemler

Bu yöntem, suda çözünmeyen aktifleştirilmiş polimer ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu veya birden fazla enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumunu gerektirir. Bu yöntem çoğunlukla tersinmezdir yani serbest enzimin yeniden geri kazanılması mümkün değildir [20,21].

Kimyasal yöntemle immobilizasyonla birlikte enzimin kimyasal ve fiziksel özellikleri de değişebilir. Bazı organik fonksiyonel gruplar çıkarılarak , farklı yapıda ve aktivitede gruplar elde edilebilir. Böylece immobilize edilmiş enzimlerin, serbest haldeki özelliklerine göre değişimler gözlemlenebilir. Kararlılık ve dayanıklılık açısından pek çok üstünlükleri ortaya çıkarken kinetik özelliklerinde de farklılıklar görülür.

Kimyasal bağlanma yönteminde suda çözünmeyen fonksiyonlu polimer ile bir veya daha çok enzim molekülü arasında en az bir kovalent bağın meydana gelmesi gerekmektedir [20].

Kimyasal yöntem ile immobilize edilmiş enzimin serbest haline göre farklı aktiviteye sahip olmasında, seçilen enzim ve destek maddesinden başka spesifik birleşme şartları da önem taşır. Bir enzimin desteğine başarılı bir şekilde bağlanabilmesi ve aktivasyonun sağlanabilmesi için enzim ile desteğin çok özel uygulamalardan geçmesi gereklidir [22]. Elde edilen enzim-destek sistemi, serbest enzime göre daha düşük katalitik etkinlik gösterebilmektedir [23]. Bu durumun büyük molekül ağırlıklı substratların ve makromoleküllerin sterik engellenmesinden ileri geldiği öne sürülmüştür [24].

Kimyasal bağlanma ile immobilizasyonun üstünlüğü, immobilize enzimin çok kararlı olması, destek maddesinin çok dayanıklı olması gibi önemli avantajları

vardır. Bunun yanında immobilizasyon veriminin sınırlı olması, reaksiyon şartlarının çok özel olması , kimyasal olarak inert olan destek maddelerine uygulanamaması gibi bazı dezavantajları da vardır [34]. Kimyasal bağlanma ile immobilizasyon iki grupta incelenir.

Kovalent bağlanma

Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzim immobilizasyonunda sık kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin sağladığı yararlar, enzim türevlerinin kararlı olması ve enzimin çözeltiye geçmemesi olarak sıralanabilir.

Kovalent bağlı enzim sistemleri ile ilgili ilk çalışmalar Grubhofer ve Schleith tarafından 1953 yılında diazoaktiflenmiş poliamino stirene; α -amilaz, pepsin ve ribonükleazın immobilizasyonu ile başlamıştır.

Kovalent bağlanma genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Kovalent bağlı destek-enzim kompleksinin aktifliği doğal enziminkinden farklı olabilir. Bu farkın büyüklüğü destek materyalin biçim ve büyüklüğüne, etkileşme metodunun doğasına, destek materyalin bileşimine, enzimin yapısına ve reaksiyon sırasındaki spesifik şartlara bağlıdır [25].

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon, destek yüzeylerde uygun bir yöntemle etkin bölgeler oluşturarak enzim molekülleri ile destek yüzeyler arasında kovalent bağ oluşturur. Enzim molekülleri destek yüzeye α ve β – amino gruplar, karboksil, hidroksil, imizadol, sülfidrilgrupları, fenol halkaları gibi bazı özel fonksiyonel gruplar üzerinden bağlanır. Bu gruplardan –SH ve β -amino grupları destek yüzeyindeki uygun gruplar ile doğrudan tepkimeye girebilir. Bunun yanında –OH grupları gibi bazı grupların destek grupla tepkimeye girmeden önce aktive edilmeleri gerekir.

Bağlanması istenilen grubun aktivasyonu destek yüzeyinde gerçekleşir, böylelikle katalitik aktivite azalma riski ortadan kaldırılır. Grupların aktivasyonu için, -OH gruplarının siyanojen bromür (CNBr) ile aktivasyonu veya -COOH gruplarının klorla aktivasyonu örnek olarak verilebilir.

Kovalent bağlanma yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması, böylece her türlü akış ortamından kullanılabilirliğidir. Enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması kolaydır. Ayrıca enzim molekülü ve destek materyali birlikte genellikle ısı kararlılık gösterirler. Yöntemin dezavantajı, destek materyali ile enzim arasındaki sıkı etkileşim enzimin doğal konformasyonunu bozabilir [26].

Çapraz bağlanma

Küçük molekülü iki veya daha çok fonksiyonlu maddeler (reaktifler), enzim molekülleri ile aralarında bağ yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. Molekül içi bağlanmalar yanında moleüller arası bağlanmalarda söz konusudur [27].

Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve oluşturulması zordur [28]. Enzim aktifliği; reaksiyon süresi, iyonik şiddet, pH, sıcaklık, çapraz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır.

Bu yöntemin en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Yöntemin dezavantajı ise moleüller arası çapraz bağlanma reaksiyonun kontrol edilmesindeki güçlüklerdir. Çapraz bağlanma reaksiyonu çok ılımlı şartlarda

gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Bunun yanı sıra çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdır. Bu sebeplerden dolayı sık kullanılan bir yöntem değildir [10].

2.3.2. Fiziksel yöntemler

Fiziksel yöntemler kovalent bağ oluşmasına dayanmayan ,enzimin belirli bir yere tutturulmasını içerir. Enzim immobilizasyonu elektrostatik etkileşme, iyonik bağ oluşumu, proteinler arası etkileşme gibi belirli fiziksel kuvvetlere bağlı kalmaktadır. İmmobilizasyon, enzimin destek maddesindeki mikro bölmeler içerisinde veya gözenekli membranlarda tutturulmasıyla sağlanır. Bu yöntemi, kovalent bağlanma ve çapraz bağlanma ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün kimyasal olarak herhangi bir desteye bağlanmamış olmasıdır. Prensipte fiziksel immobilizasyon metotları tamamen tersinirdir. Bunun yanı sıra pek çok özel metotta, belirlenen ideal davranışlar görülmez ve önemli ölçüde tersinmez bağ oluşumu gözlenir. Bu arada çok değişkenli ve kesin bir şekilde sınıflandırılması mümkün olmayan immobilizasyon türleri mevcuttur [10].

Adsorpsiyon ile immobilizasyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve basit yöntemdir. Adsorpsiyonun asıl amacı enzim immobilizasyonu olmayıp enzim saflaştırmaktır. Ancak son 20-25 yıldan beri suda çözünmeyen desteklerde adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonunda oldukça sık kullanıldığı görülmektedir [29].

Yöntem; yüzey aktif, suda çözünmeyen katı matriksin (adsorban) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin katı matriks üzerinde fiziksel adsorpsiyonuna veya iyonik bağlanmasına dayanır. Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyondan sorumlu kuvvetler hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik

etkileşmelerdir. İyonik bağlanma ile immobilizasyon proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karşıt yükleri arasında çekim kuvvetine dayanır.

Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işleminden geçirilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar, aktifkarbon, gözenekli cam, diatometoprağı, CaCO_3 , kül, paladyum, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluta ve kalsiyum fosfattır [28]. Bir enzimin suda çözünmeyen destekte adsorpsiyonu pH, çözücü, iyon şiddeti, enzim adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere çok bağlıdır.

Metodun dezavantajı, enzim ile adsorban (destek maddesi) arasındaki zayıf bağlardan dolayı adsorplanan enzimin kullanım esnasında destekten uzaklaşabilmesidir. Bu yöntemde enzim aktifliğini büyük ölçüde veya tamamen korur. Ayrıca adsorpsiyon ile immobilizasyon tersinirdir ve buda destek maddesinin ve enzimin başka amaçlar için tekrar kullanımını sağlar.

Hapsetme ile immobilizasyon

Bu yöntem polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesine dayanır. Enzim sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer oluşumu; ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınlarıyla başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir. Bu yöntem her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için kullanılabilir. Hapsetme ile immobilizasyon yöntemi mikrokapsül ve kafes tipi immobilizasyon olmak üzere iki gruba ayrılır [25].

Mikrokapsül ile hapsetme

Mikrokapsül ile hapsetme metodu gözenekleri 10-1000µm çaplı, yarı geçirgen membranlar içinde enzim moleküllerinin hapsedilmesine dayanır.

Yarı geçirgen membran, büyük protein ve enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürünlerin serbestçe girip çıkmasına izin verir.

Yarı geçirgen mikrokapsüllerin hazırlanmasında iki genel metot uygulanmaktadır. Bunlardan birincisi koagülasyona dayalı olup kimyasal bir reaksiyon içermeyen basit bir yöntemdir. Faz ayrımı polimerizasyonu olarak adlandırılır. Çözücü içerisinde enzim ve membran maddesi çözülür ve bu çözelti mikrodamlacıklar halinde maddeye aktarılır. Bu yöntem ile yapılan immobilizasyonda, enzim aktivitesinde büyük ölçüde bir artış sağlanmaktadır [30]. Tekniğin spesifik olmayışı ve basitliğinden dolayı bütün enzimlere uygulanabilmektedir.

Diğer mikrokapsülleme metodu, kimyasal özellik taşıyan ara yüzey polimerizasyon metodudur. Bu metotta çöktürücü madde içinde enzim çözeltisinin mikrodamlacıkları hazırlanır. İki sıvının birleşme noktasında polimerleşme görülür. Yarı geçirgen mikrokapsül membranı, iyi bilinen poliamit (nylon) sistemi ile yapılır ve çok çeşitli diaminlerle, diasit halojenürleri kullanılarak amit kopolimerleri elde edilir [30]. Bu yarı geçirgen mikrokapsül membranlarının gözenek çapları, substrat molekülerinin kapsül içine girişine ve ürün molekülerinin çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır.

Mikrokapsülleme ile hapsetme yönteminde herhangi bir modifikasyon olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine çok yakındır. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır [31]. Yüzey-hacim oranının büyük olması mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat reaksiyonunu artırır. Yöntemin dezavantajları, mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein konsantrasyonuna gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler için sınırlı olmasıdır. Bu dezavantajlara rağmen enzimler daha çok mikrokapsülleme ile immobilize edilmektedirler.

Kafes tipi immobilizasyon

Bu yöntem, enzim çözeltisi içinde yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin oluşturulması temeline dayanır. Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın olduğu ortamda enziminde bulunması ile enzim çapraz bağlanma sonucu oluşan odacıklarda tutuklanır. Bu amaçla en çok kullanılan polimerler N,N-metilenbisakrilamit ile çapraz bağlanmış poliakrilamittir.

Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Yöntemde enzim içeren monomer veya polimer çözeltilerine UV veya gama ışınları uygulanarak yüksek oranda çapraz bağlı bir polimer şebekesi oluşturulur.

Kafes tipi immobilizasyonda, enzim moleküllerinin tutuklanabilmesi ve substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşması için çapraz bağ yüzdesi ayarlanmalıdır. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması sonucunda substratın enzim aktif merkezlerine ulaşması engellebilir veya substrat enzimin zincir yapısını zorlayıp aktivitesini kaybetmesine neden olabilir.

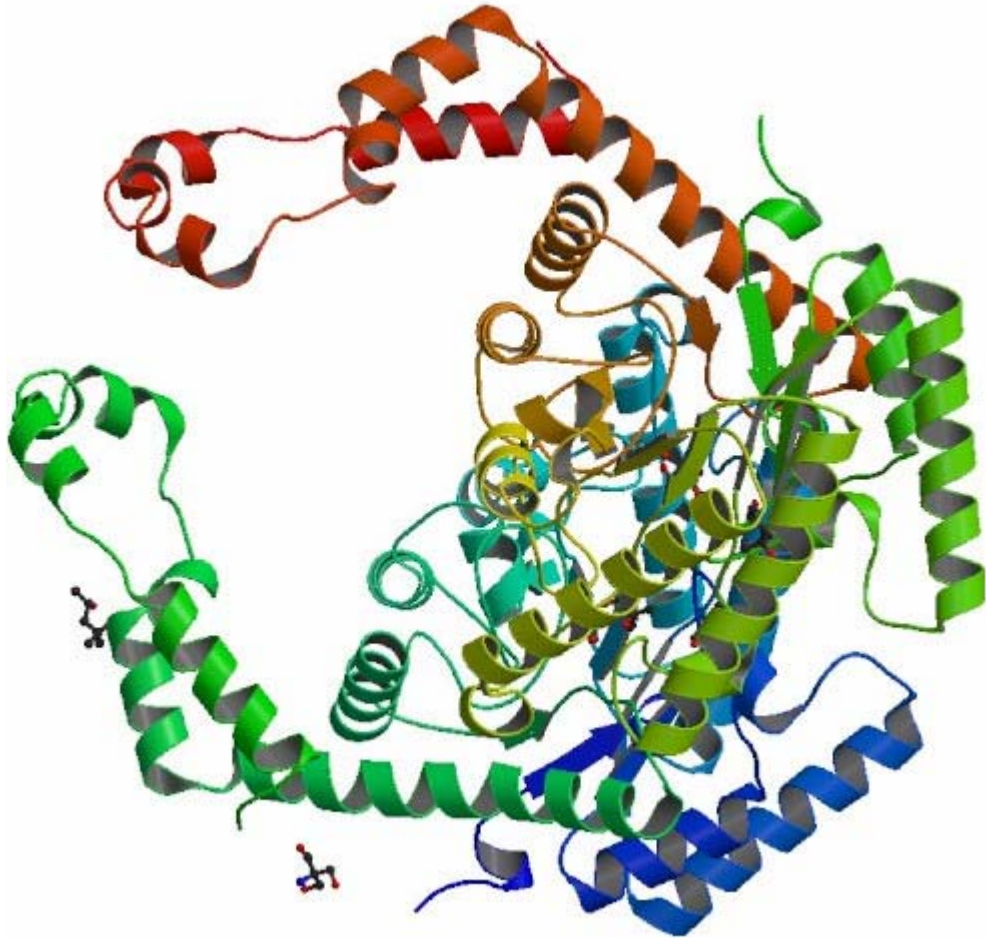
Bu yöntemin avantajları

- Çok kolay uygulanabiliyor olması
- Gerçek bir fiziksel yöntem olması
- Çok az miktar enzim ile gerçekleşebilmesi
- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama ve UV ışınları enzim yapısını ve aktifliğini kimyasal proseslerden daha az etkilemesi
- Ortamdaki çapraz bağlayıcı ve monomer konsantrasyonunu değiştirmek suretiyle farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafes üretilbilmesi
- Polimerleşmenin genelde hem kolay hem de hızlı bir şekilde gerçekleşebilmesidir [32,33].

Yöntemin dezavantajları ise; immobilizasyon işleminde, jel oluşumu sırasında yürüyebilecek kimyasal olayların ve reaksiyon sıcaklığının enzimi inaktif hale getirmesi olanağının bulunmasıdır. Ayrıca çapraz bağlı polimerin ağ örgüsü arasından enzimin sızma ihtimali de mevcuttur. Immobilizasyon işlemi sırasında deney koşullarına çok sıkı bağlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir.

2.4. Glukoz İzomeraz

Gl glukozu, daha tatlı olan fruktoza dönüştürebilen bir enzimdir (Resim 2.1). Marshall ve Kooi 1957 yılında glukoz izomerazı (*Pseudomonas hydrophila* dan elde edilmiş) keşfetmişler ve enzimatik izomerizasyon ile ticari olarak uygulanabilir miktarda üretilmesini sağlamışlardır. Bu keşifle birlikte Gl' in enzimatik izomerizasyonu ile fruktoz üretilmesine olanak sağlanmıştır. Öncelikle suda çözünabilir enzimlerle birlikte reaktörlerde kullanılmıştır [34-36]. Fruktozca zengin mısır şurubu (High Fructose Corn Syrup; HFCS) üretiminde ekonomik ilginin artmasından dolayı, nişasta üreten yada ithal eden birçok ülkede İGl ile glukozun fruktoza endüstriyel enzimatik dönüşümü dikkate alınmaya başlanmıştır [37,38]. Günümüzde Avrupa Birliği Ülkelerinde, geliştirilmiş kolonlarda İGl kullanılarak nişastanın hidrolizinden elde edilen konsantre şurubun sürekli izomerizasyonu ile fruktoz ve HFCS üretilmektedir [37,39].

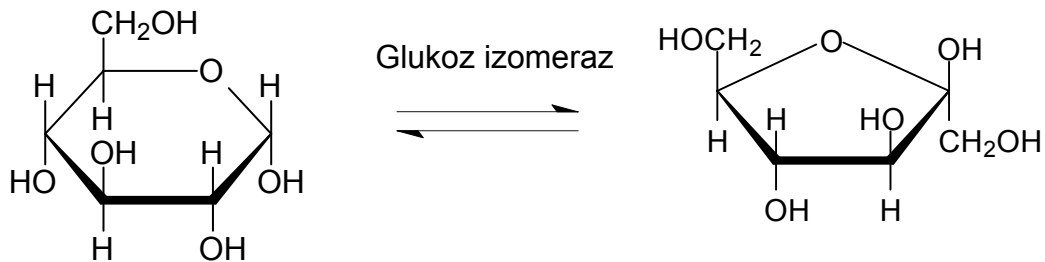


Resim 2.1 .Streptomyces Rubiginosus dan elde edilen glukoz izomerazın X-ışını kırınımı ile çekilmiş fotoğrafı [40]

Nişastanın sıvılaştırılıp hidroliz edilmesiyle “mısır şurubu” elde edilir. Mısır nişastasından saflaştırma ile besin değeri olan sakkaritler elde edilir, fakat endüstride kullanımı sınırlıdır. Glukoz, sakarozdan daha az tatlıdır ve besin sanayinde sakarozun yerini alamaz. Glukozun fruktoza dönüşümü bir grup tepkimelerle bazik koşullarda ve yüksek sıcaklıklarda olur. Bazik izomerizasyon seçici değildir, renkli yan ürünlerin oluşmasına neden olur ve bunların uzaklaştırılması pahalıdır. Diğer taraftan seçici enzimatik izomerizasyon ile ürün olarak fruktoz ve glukozdan başka bir monosakkarit meydana gelmez. Yeterli seviyede (%10) fruktoz içeren mısır şurubu; fruktozca zengin mısır şurubu (HFCS) olarak adlandırılır. %42 fruktoz içeren

HFCS sakaroza eşit miktarda, standart oranda tatlılık içerir. HFCS eldesinde, glukozun fruktoza dönüşümü sanayide önemli bir tepkimedir (Şekil 2.4). Mısır nişastasından elde edilen glukoz şurubu İGİ ile kütlece %42 lik fruktoz şurubuna dönüştürülebilir.

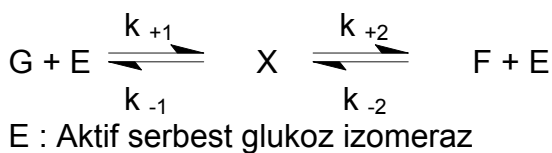
Glukoz şurubundaki peptid, aminoasit ve tuz gibi safsızlıklar aktif karbonla ve sonra iyon değıştiricilerle, glukoz şurubundaki proteinler ise süzme yolu ile uzaklaştırılırlar. Bu saflaştırma basamaklarından sonra glukoz şurubu, izomerizasyon için reaktörün ilgili bölümüne gelir. Şurubun reaktörde uzun bekleme süresi, yan ürünler oluşmasına ve pH' nın düşmesine neden olur. Bu da enzim aktifliğine ve kararlılığına olumsuz yönde etki eder. Neticede reaktörde kısa bekleme süresi önem kazanır, bundan dolayı sabit yataklı reaktörler kullanılmaktadır [41-43].



Şekil 2.3. Glukozun fruktoza dönüşüm tepkimesi

Glukoz izomerazın izomerizasyon kinetiğı aşağıda özetlenmiştir.

Enzimlerle katalizlenen bazı tersinir tepkimelerin kinetiğı, glukozun fruktoza izomerizasyonu gibi, Briggs-Haldane mekanizması ile gösterilebilir [37,42,44,45].



G : Glukoz

F : Fruktoz

X : Aktifleşmiş kompleks (enzim ile glukoz arasında (EG) veya enzim ile fruktoz arasında (EF))

Bu mekanizmaya göre Michaelis-Menten sabitleri aşağıda verilmiştir.

$$K_{m,i} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad K_{m,g} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{-2}}$$

$$K = \frac{F_d}{G_d} = \frac{V_{mak,i} \times K_{m,g}}{V_{mak,g} \times K_{m,i}}$$

V_{mak} = maksimum hız

$V_{mak,i}$ = İleri tepkime için maksimum hız

$V_{mak,g}$ = Geri tepkime için maksimum hız

K_m = Michaelis-Menten sabiti

$K_{m,i}$ = İleri tepkime için Michaelis-Menten sabiti

$K_{m,g}$ = Geri tepkime için Michaelis-Menten sabiti

K = Denge sabiti

G_d = Denge glukoz derişimi

F_d = Denge fruktoz derişimi

Enzim tepkime hızı, V , Michaelis-Menten Eşitliği ile verilir.

$$V = \frac{V_{mak} \times S}{K_m + S} \quad \text{Michaelis-Menten Eşitliği}$$

Michaelis-Menten Eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk Eşitliği elde edilir.

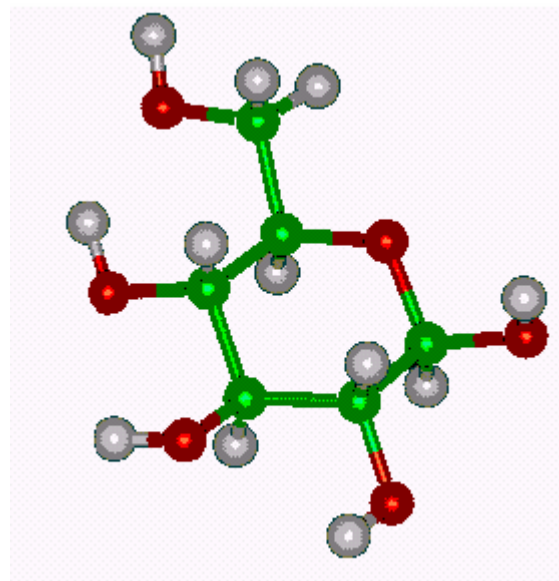
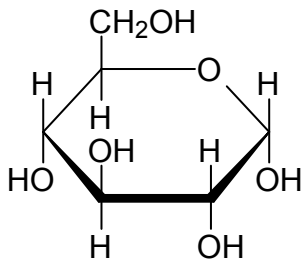
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m}$$

Lineweaver-Burk Eşitliği

Lineweaver-Burk Eşitliğine göre, $1/V$ nin $1/S$ ye karşı çizilen grafiği bir doğru verir. Bu doğrunun y-kayması $1/V_{\max}$ değerini verir ve maksimum hız hesaplanır. Maksimum hız bulunduktan sonra eğimden (eğim= $K_m/V_{\max}$) veya x-kaymasından K_m hesaplanır.

2.5. Glukoz

D-Glukoz ($C_6H_{12}O_6$, MA:180.16), erime noktası $146^\circ C$ olan altı karbondan oluşmuş bir şekerdir ve pek çok meyve suyunda bulunur (Şekil 2.5). İnsan diyetinin büyük bölümünü glukozun serbest veya polimerleşmiş hali oluşturur. Glukoz ve glukoz içeren şuruplar endüstriyel olarak nişastadan üretilmektedir. Bu işlem için genelde mısır nişastası kullanılır. Mısır nişastası haricinde arpa, buğday, pirinç, patates nişastası veya diğer nişastalar da kullanılabilir. Dünyada üretilen mısır nişastasının %70' i glukoz içeren tatlandırıcılara dönüştürülür [46,47].



Şekil 2.4. Glukozun yapısı

2.6. Glukoz İzomerazın İmmobilizasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Lee ve arkadaşları tarafından 1976' da yapılan çalışmada, glukoz izomeraz enzimi (Gİ) aktifleştirilmiş gözenekli cam üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir. Serbest enzimin aktiflik tayini pH 7,0' da yapılmıştır. Gİ aktifliğinin Mg^{2+} ve Co^{2+} iyonlarıyla arttığı görülmüştür (pH 7,0 ,sıcaklık 55 °C, Mg^{2+} derişimi 0,01 M Co^{2+} derişimi 10^{-4} M ve substrat derişimi 1,0 M alınmıştır). Mg^{2+} derişimi 0,1 M olduğunda en yüksek aktiflik gözlenmiştir. Ortama Co^{2+} iyonları eklendiğinde bu aktiflik % 40 artmıştır. İnceleme pH 5,4-7,0 arasında yapılmıştır. Maksimum aktiflik pH 7,0' da gözlenmiştir. pH 5,0' ın altında aktiflik gözlenmemiştir [48].

D.Y Ryu ve S. H. Chung tarafından 1977' de yapılan çalışmada, fruktoz şurubunun üretilmesinde sürekli Gİ reaktör sistemleri incelenmiştir. Aktiflik tayini glukoz ve fruktoz çözeltilerinde (0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 1,0 M) fosfat tamponu ile pH 7,0' de 70 °C' de yapılmıştır. Fruktoz tayininde sistein-karbazol metodu, glukoz tayininde glukoz oksidaz metodu kullanılmıştır. Isıl işlemle hücresinde kurutulmuş Gİ enzimi *Streptomyces Phaeochromogenus* dan hazırlanarak çift yönlü substrat tepkime kinetiği, glukoz ve fruktozun izomerizasyonunda çalışılmıştır. $K_{m,i}$ değeri 0,238 M, $K_{m,g}$ değeri 0,49 M, $V_{m,i}$ değeri $8,75 \times 10^{-3}$ mol/L.dak, $V_{m,g}$ değeri 0,0132 mol/L.dak olarak bulunmuştur [49].

W. P. Chen ve A. W. Anderson tarafından 1979' da yapılan çalışmada, *Streptomyces Flavogriseus* dan elde edilen Gİ, dietilaminoetil (DEAE)-selüloz üzerine immobilize edilerek, serbest enzim ve ısıl işlemle hücresinde kurutulmuş Gİ ile bazı parametreler karşılaştırılmıştır. Substrat olarak glukoz ve xylose kullanılmıştır. Hücresinde kurutulmuş Gİ' in substrata olan ilgisi yani K_m değeri serbest enzime göre daha yüksek çıkmıştır. Serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 70 °C, hücresinde kurutulmuş Gİ için 75 °C olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzimler için optimum pH değeri 7,5 olarak tespit edilmiştir. İGİ ve hücresinde kurutulmuş enzim

akışkan yataklı kolonda Mg^{2+} ve Co^{2+} varlığında 70 °C' de 5 gün glukozun sürekli izomerizasyonu incelenmiştir [50].

Gong ve arkadaşları tarafından 1980' de yapılan çalışmada, Gl saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir (Gl actinoplanes missouriensis den elde edilmiştir). Serbest Gl iyonik adsorpsiyonla DEAE-selüloz kolonlarında immobilize edilmiştir. Ayrıca kovalent bağlanma ile jelatin ve kazein üzerine immobilize edilmiştir. Enzim aktifliğini incelerken, fruktoz çözeltisine pH 7,0' da Mg^{2+} ve Co^{2+} iyonları ilave edilmiş, optimum koşullar belirlenmiştir. Gl pH 7,0-7,5 arasında ve 60 °C' de maksimum aktiflik göstermiştir. pH 7,0' ın üzerinde enzimatik ve kimyasal izomerizasyon olmuştur. Aktifleşme enerjileri kimyasal ve enzimatik izomerizasyon için sırayla 0,1 ve 1,4 kcal/mol olarak bulunmuştur. $K_{m,i}$ değeri 1,33 mol/L, $K_{m,g}$ değeri 1,67 mol/L olarak verilmiştir [51].

J. Gram ve M. D. Bang tarafından 1990' da yapılan çalışmada, ticari İGl (Sweetzyme Q, NOVO) ile glukoz izomerizasyonunun termodinamiği ve tepkime kinetiği incelenmiştir. Fruktoz tayinleri sistein-karbazol metoduna göre yapılmıştır [41].

M. Sushama Gaikwad ve V. Vasanti Deshpande 1992' de yaptıkları bir çalışmada glukoz izomeraz Indion 48-R reçinesine adsorpsiyon ile immobilize edilmiştir. Adsorpsiyon kapasitesi ve aktifliği sırasıyla % 60 ve 25 U g⁻¹ bulunmuştur. Enzim kararlılığının yüksek sıcaklık ve asidik pH' larda immobilizasyon ile arttığı belirlenmiştir. Immobilize glukoz izomerazın 7. kullanım sonunda aktifliğinin %61' ini koruduğu gözlenmiştir [52].

Houng ve arkadaşları tarafından 1993' de yapılan çalışmada, Gl' ın Indion 48-R (çapraz bağlı, büyük gözenekli, iyon değiştirici polistiren reçine) üzerinde immobilizasyonu incelenmiştir. Serbest ve immobilize enzim aynı pH (1 μ M Co^{2+} ve 5 μ M Mg^{2+} içeren fosfat tamponu) ve sıcaklıkta maksimum aktiflik göstermiştir (pH: 7,0 ve sıcaklık 70 °C). Serbest enzim 80 °C' de

aktifliğini tamamen korurken, immobilize enzim aynı sıcaklıkta % 30' unu korumuştur. İmmobilizasyon neticesinde K_m değerinde artma, V_{mak} değerinde azalma gözlenmiştir. İGİ' in depolama kararlılığı yüksek bulunmuş ve 30 gün sonunda aktiflikte bir azalma gözlenmemiştir. İGİ beş kez kullanım sonunda aktifliğinin yaklaşık % 40' ını kaybetmiştir [53].

Fournier ve arkadaşları tarafından 1996' da yapılan çalışmada, yeni bir pH kontrol sistemi kullanılmıştır. Ticari İGİ için optimum pH 7,5 olarak bulunmuştur [54].

Weigel ve arkadaşları tarafından 1996' da yapılan çalışmada, çeşitli şekerlerin immobilize enzimler ile püskürtmeli akım analizi yöntemi ile yapılan çalışmalarında optimum pH 7,5 ve Mg^{2+} derişimi 90 g/L olacak şekilde ayarlanmıştır [55].

A. Converti ve M. C. Borghi tarafından 1997' de yapılan çalışmada, ticari İGİ (Sweetzyme T) kullanılarak (batch test) glukozun izomerizasyonunda termodinamik parametreler üzerinde enzim immobilizasyonunun etkileri incelenmiştir (pH 7,0; sıcaklık 60-80 °C, G_o ve F_o 0,3 M, 0,5 M, 1,0 M, 2,0 M). Glukoz ve fruktoz tayinleri HPLC ile yapılmıştır. 60 °C' de $V_{m,i}$ değeri $4,75 \times 10^{-6}$ mol/L.dak, $K_{m,i}$ değeri 0,70 mol/L, $V_{m,g}$ değeri $3,11 \times 10^{-6}$ mol/L.dak, $K_{m,g}$ değeri 0,45 mol/L olarak bulunmuştur [37].

V. Bravo ve arkadaşları tarafından 1998' de yapılan çalışmada, İGİ (Sweetzyme A) ile 60 °C' de fruktoz-glukoz enzimatik izomerizasyonunun kinetik çalışması yapılmıştır. Michael-Menten sabiti, K_m , 1,24 M olarak bulunmuştur [56].

Y. B. Ge ve arkadaşları tarafından 1998' de yapılan çalışmada, moleküler depolama tekniği kullanılarak gözenekli p-trimetilamin polistiren (TMPS) boncuklarına bilayer glukoz izomeraz immobilize edilmiştir. İGİ' in aktifliğini etkileyen bazı faktörler optimize edilmiştir. Enzim derişimi 308 IU/ml, enzim-

matriks oranı 924 IU/g, ıslak taşıyıcı ve hekzametilen bis(trimetilamonyum iodin) derişimi 15 mg/ml iken, immobilize bilayer glukoz izomeraz maksimum katalitik aktiflik (2238 IU/g kuru jel, %68,5) göstermiştir. Yarı ömrü pH 8,5 ve 60 °C' de yaklaşık olarak 45 gün bulunmuştur [57].

E. Palazzi ve A. Converti tarafından 1999' da yapılan çalışmada, glukozun fruktoza izomerizasyonunda kinetik parametreler ve İGİ (Sweetzyme T) in inaktivasyonu değişik koşullarda incelenmiştir (pH 7,0, sıcaklık 60 °C iken 0,05 M lık tampon çözelti kullanılmıştır). Glukoz ve fruktoz ölçümleri HPLC ile yapılmıştır [42].

Ge ve arkadaşları tarafından 1999' da yapılan çalışmada, Gİ ve glukoamilaz (GA) in büyük gözenekli trimetilamin polistiren (TMPS) tanecikleri üzerine moleküler depolama tekniği ile koimmobilizasyonu incelenmiştir (Gİ actinoplanes missouriensis den elde edilmiştir). Gİ' in aktifliği 1780 IU/ml olarak verilmiştir. Gİ' in immobilizasyonu pH 7,0 ve 4 °C de TMPS üzerinde yapılmıştır. Enzim aktifliği sistein-karbazol metodu ile tayin edilmiştir. İGİ aktifliği; 1,0 µmol fruktozun 1 dakikada 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7,0), 60 °C de oluşması için gereken enzim miktarı olarak verilmiştir. İGİ in ve Gİ in maksimum aktiflikleri pH 7,3 civarında gözlenmiştir. İGİ 75 °C de maksimum aktiflik göstermiştir. K_m artarken V_{mak} azalmıştır [43].

H. S. Lee ve J. Hong tarafından 2000' de yapılan çalışmada, immobilize enzim-ceket reaktöründe immobilize D-glukoz izomerazın (Sweetzyme T, EC 5.3.1.5) kinetik parametreleri araştırılmıştır (pH 7,5 ve sıcaklık 60 °C, glukoz derişimi 0,028 mol/L). $V_{m,i\alpha}$ değeri 0,083 mol/L.dak, $V_{m,i\beta}$ değeri 0,075 mol/L.dak, $K_{m,i\alpha}$ değeri 0,21 mol/L ve $K_{m,i\beta}$ değeri 0,29 mol/L olarak bulunmuştur [58].

A. Mishra ve M. Debnath tarafından 2002' de yapılan çalışmada, endüstride fruktoz şurubu üretiminde kullanılan glukoamilaz ve glukoz izomerazın

(*Streptomyces Griseus*) üretimini açıklamışlardır. Kullanılan tampon çözeltiye bağlı olarak glukoz izomeraz için optimum pH 7,0 ile 8,5 arasında değişme gösterirken, optimum sıcaklık 60 °C olarak bulunmuştur [59].

I. Gancarz ve arkadaşları tarafından 2003' de yapılan çalışmada glukoz izomeraz enzimi amonyak, n-bütülin ve alilaminle modifiye edilmiş polisülfon filmlerde kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir. Spektroskopik yöntemlerle enzim bağlanması incelenmiş ve en iyi immobilize alilaminle modifiye edilmiş filmlerde gözlenmiştir [60].

L. I. Sapunova ve arkadaşları tarafından 2003' de yapılan çalışmada, *arthrobacter* sp. B-5 hücreleri ihtiva eden kobalt hidroksit jel içine glukoz izomeraz immobilize edilmiştir. Immobilizasyon sonucunda enzimin substrata ilgisi, optimum sıcaklık ve pH dengesi artmıştır. Immobilizasyon sonucunda izomerizasyon ortamına dengeleyici kobalt iyonlarının eklenmesine gerek duyulmamıştır [61].

S. Zeinab ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan çalışmada İGİ (Sweetzyme T, EC.5.3.1.5) kullanılarak glukozun izomerizasyonunda kinetik parametreler incelenmiş 55 °C' de K_m 18,39 mmol/L V_{mak} 1,71 mmol/L.dak olarak bulunmuştur [62].

A. Eduardo ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada ticari İGİ (Sweetzyme IT) kullanılarak glukozun izomerizasyonunda kinetik parametreler incelenmiş, (pH: 7,7-7,8 ; sıcaklık 65 °C, glukoz ve fruktoz derişimleri 0,5 M, 1,0 M, 2,0 M, 3,0 M). 65 °C' de $V_{m,i}$ değeri $3,15 \times 10^2$ μ mol/L.dak, $K_{m,i}$ değeri 0,26 mol/L, $V_{m,g}$ değeri $2,76 \times 10^2$ μ mol/L.dak, $K_{m,g}$ değeri 0,24 mol/L olarak bulunmuştur [63].

G. Demirel ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan çalışmada glukoz izomeraz poli(akril amid), poli(akril amid)/ χ -karagenan, poli(akril amid)/aljinat

hidrojellerinde hapsetme yöntemi ile immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize glukoz izomerase için optimum pH: 7,5 sıcaklık ise 60 °C bulunmuştur. Km değeri serbest glukoz izomerase ve poli(akril amid), poli(akril amid)/ χ -karagenan, poli(akril amid)/aljinat hidrojellerinde immobilize edilmiş glukoz izomerase için sırasıyla 18,87; 1,22; 2,78 ve 4,54 mg/mL bulunmuştur. V_{mak} değerleri sırasıyla 2,51; 0,63; 0,72 ve 0,82 mg/mL.dak bulunmuştur. 42 gün depolama süresi sonunda immobilize enzimlerin sırasıyla aktifliklerinin %81, %33, %32, korudukları gözlenmiştir. 5 günde 25 kez kullanım sonucunda poli(akril amid), poli(akril amid)/ χ -karagenan, poli(akril amid)/aljinat hidrojellerinde immobilize edilmiş glukoz izomerase için sırasıyla %98, %71, ve %72 aktifliklerini koruduğu gözlenmiştir [64].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Glukoz İzomeras: (Gensweet SGI, D-xylose ketol-isomerase, E.C.5.3.1.5, *Streptomyces Rubiginosus*, 3000 IU/g), Genencor International, Inc. (ABD) firmasından temin edilmiştir.

D (+) – Glukoz: ($C_6H_{12}O_6$, MA : 180,16 g/mol), Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Sodyum dihidrojen fosfat: ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, MA:156,01 g/mol), Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Disodyum hidrojen fosfat: ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ MA:358,15 g/mol), Merck(Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Magnezyum sülfat: ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, MA:246,48 g/mol), Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

L-Sistein hidroklorür monohidrat : ($C_3H_8ClNO_2S \cdot H_2O$, MA:175,64 g/mol), Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Karbazol: ($C_{12}H_9N$, MA:167,21 g/mol), Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Sülfürik asit: (H_2SO_4 , MA:98,08 g/mol), Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

2-Hidroksietil metakrilat: ($H_2C=C(CH_3)CO_2CH_2CH_2OH$, MA:130,14 g/mol) Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir.

Etilen glikol dimetakrilat: ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{CH}_2-$)₂, MA:198,22 g/mol), Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir.

Benzoil peroksit: ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2$, MA:242,23 g/mol), Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Dioksan: ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, MA:88,11 g/mol), BDH (İngiltere) firmasından temin edilmiştir.

Poli(vinil pirolidon): ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}$)_n, MA:1 300 000 Acros (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Siyanürük klorür: ($\text{C}_3\text{N}_3\text{Cl}_3$, MA:184,41 g/mol), Acros (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Trikalsiyum fosfat: [$\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$], MA:502,32 g/mol), Riedel (İsviçre) firmasından temin edilmiştir.

Perklorik asit: (HClO_4 , MA:100,47 g/mol), Carlo Erba (İtalya) firmasından temin edilmiştir.

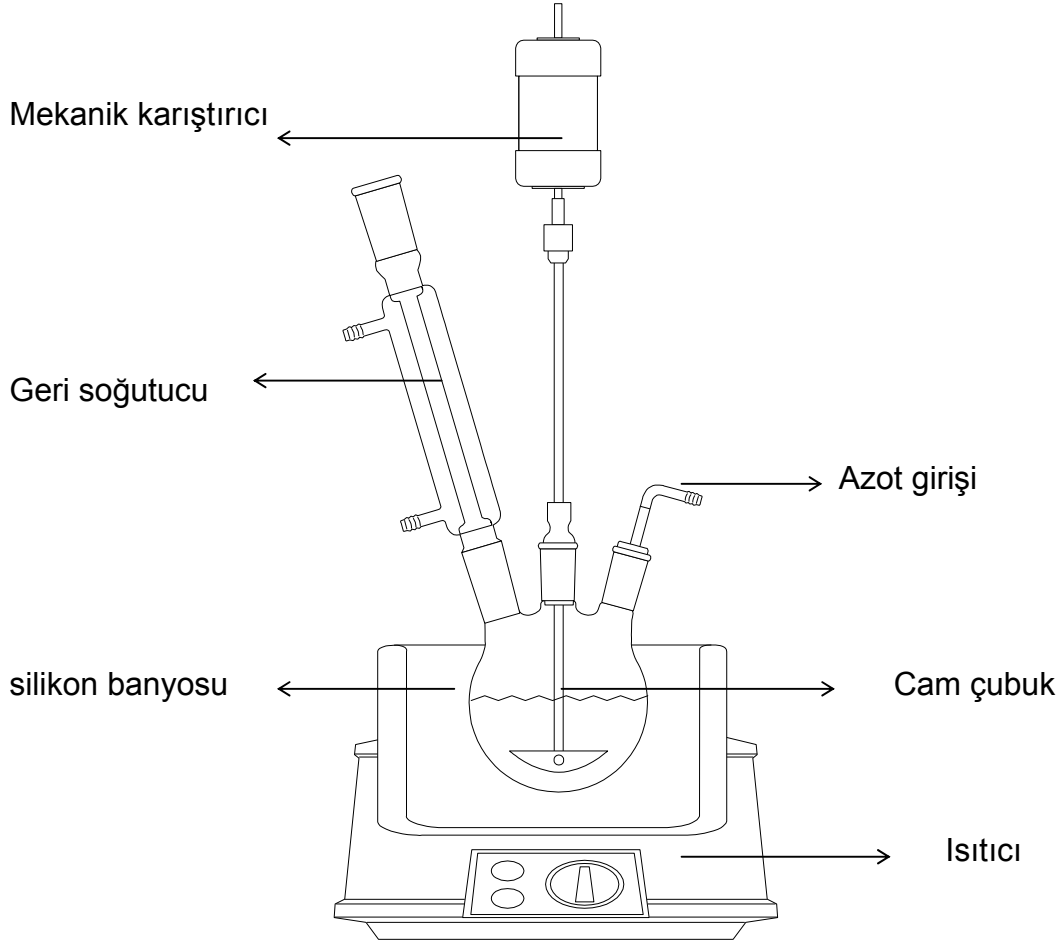
Epiklorhidrin: ($\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$, MA:92,53 g/mol), Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir.

Metil metakrilat: ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{CH}_3$, MA:100,52 g/mol), Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Polimerik Mikroboncukların Sentezi

3.2.1. Poli(metil metakrilat- 2-hidroksietil metakrilat) mikroboncuklarının sentezi

P(MMA-HEMA) mikroboncukları süspansiyon polimerleşmesi tekniği ile hazırlanmıştır. Polimerleşme tepkimesi; soğutucu, azot girişi, örnek girişi ve mekanik karıştırıcı (Heidolp RZR 2041, Almanya) olmak üzere dört boyunlu balonda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Tepkime balonuna bir gün önceden 70°C' de 50 mL damıtık H₂O da çözülmüş 0,325 g poli(vinil pirolidon), (PVP), çözeltisi stabilizör olarak konulmuştur. Bu çözeltiliye 0,325 g trikalsiyum fosfat (TCP) eklenerek, 70°C' de 450 rpm karıştırma hızında ve ortamdan N₂ gazı geçirilerek 1 saat karıştırılmıştır. Monomer-su fazı oranı 1/5 olarak seçilmiştir (10 mL monomer fazı/50 mL H₂O). 8,0 mL HEMA (monomer fazının hacimce %80 i), 2,0 mL MMA (monomer fazının hacimce %20 i), çapraz bağlayıcı olarak 1,0 mL etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) (monomer fazının %10 u) ve başlatıcı olarak 0,1 g benzoil peroksit (BPO) (monomer fazının %1 i) ayrı bir balonda karıştırılarak dağılma ortamına yavaş yavaş ilave edilmiştir. Polimerleşme tepkimesi 70°C' de 450 rpm de N₂ gazı geçirilerek 6 saat sürdürülmüştür. Sistem oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra ortamdan TCP uzaklaştırmak için 10 mL %37 lik 1/2 oranında seyreltilmiş HCl çözeltisi ile karıştırılmış, oluşan mikroboncuklar süzülerek ayrılmıştır. Mikroboncuklar iki kez damıtık su (50 mL), iki kez etanol (50 mL), iki kez aseton ile yıkanarak (50 mL), asetonu yarım saat bekletilmiştir. Süzme işlemleri dekantasyon ile yapılmış ve elde edilen mikroboncuklar buzdolabında 4°C' de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Polimerleşme tepkimesi için kullanılan düzenek

3.2.2. Polimerik mikrobuncukların karakterizasyonu

Fiziksel şekil analizi

P(MMA-HEMA) mikrobuncuklarının optik mikroskop (Solf XSP-6A CCD Color Camera, Universal) ile mikrofotografı çekilmiştir.

Tanecik boyutu dağılım analizi

P(MMA-HEMA) mikrobuncuklarının tanecik boyutu dağılım analizi, tanecik boyutu dağılım analiz cihazı (Mattersizer S Ver. 2.15, Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) kullanılarak etanolde yapılmıştır.

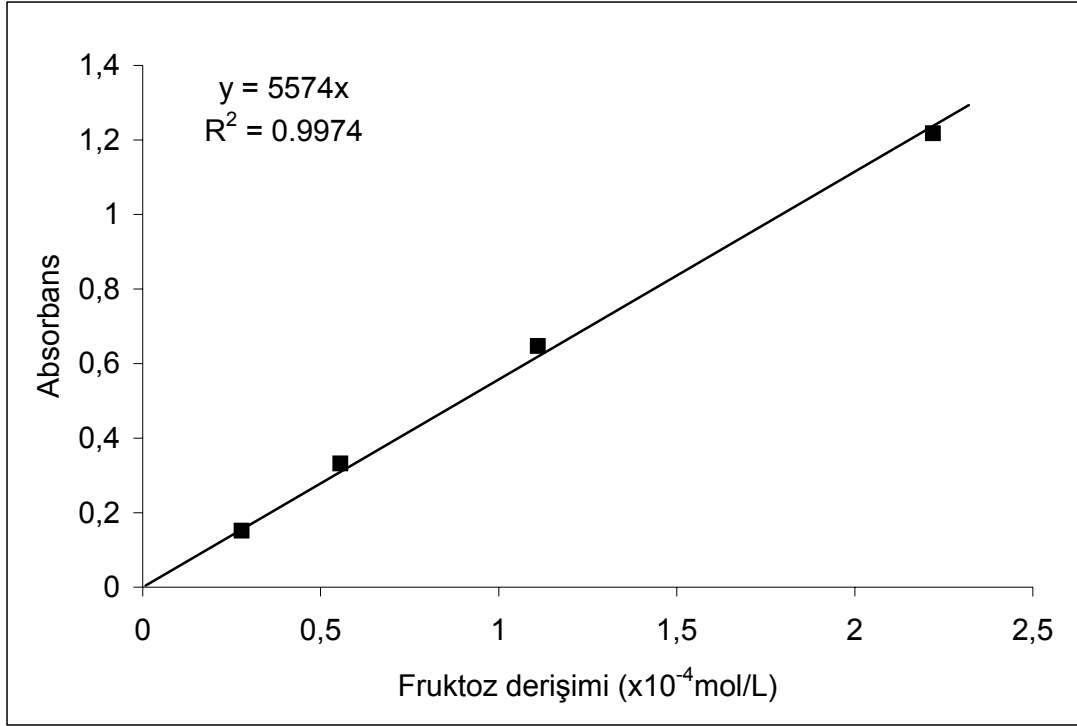
3.3. Glukoz ve Glukoz İzomeraz Çözeltilerinin Hazırlanması

Glukoz çözeltisi: Stok glukoz çözeltisinden (0,36 g glukoz/100 mL H₂O) 1 mL alınmış, 100 mL ye damıtık su ile seyreltilerek 2×10^{-4} M lık glukoz çözeltisi hazırlanmıştır. Glukoz çözeltileri her deneyden önce taze hazırlanarak kullanılmıştır.

Glukoz izomeraz çözeltisi (Gİ); 2,25 mL Gİ'nin damıtık su ile 50 mL ye seyreltilmesiyle (%4,5 v/v) Gİ çözeltisi hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi her deneyden önce taze hazırlanarak kullanılmıştır.

3.4. Fruktoz Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Fruktoz kalibrasyon eğrisini hazırlamak amacıyla fruktozun stok çözeltisi hazırlanmıştır (0,1 g fruktoz/100 mL H₂O). Hazırlanan stok çözeltisinden sırasıyla 0,5 mL, 1,0 mL, 2,0 mL, 4,0 mL alınarak seyreltme ile 0,5 mg/100 mL, 1,0 mg/100 mL, 2,0 mg/100 mL, 4,0 mg/100 mL fruktoz çözeltileri hazırlanmıştır. Fruktoz tayinleri sistein-karbazol metoduna göre yapılmıştır [49]. Bu metoda göre hazırlanan çözeltilerden 1,0 mL alınarak, üzerlerine 0,1 mL L-sistein çözeltisi (%2 v/v) ilave edildikten sonra 40 °C lik su banyosunda 5,0 mL H₂SO₄ çözeltisi (%75 v/v suda) ilave edilmiştir ve buz banyosunda karıştırılarak 0,15 mL karbazol çözeltisi (%0,12 v/v) eklenmiştir. Çözeltiler 40 °C' lik su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda su banyosundan çıkartılan çözeltiler 1,5 dakika buz banyosunda ve 4 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra blank çözeltisine karşı UV-görünür bölge spektrofotometresi (Unicam UV/Vis Spectrometer, UV2-100) kullanılarak 566,0 nm de absorbans değerleri ölçülmüştür. Fruktoz yerine aynı miktar damıtık su alınarak, yukarıdaki işlemlerin aynısı yapılmış ve blank çözeltisi hazırlanmıştır. Fruktoz derişimlerine karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilmek suretiyle fruktoz kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Fruktoz kalibrasyon eğrisi

3.5. P(MMA-HEMA) Mikroboncuklarının Aktifleştirilmesi

3.5.1. Mikroboncukların siyanürik klorürle aktifleştirilmesi

0,1 g siyanürik klorür 5,0 mL dioksanda çözülmüş ve bu çözeltiye 0,1 g P(MMA-HEMA) mikroboncukları ilave edildikten sonra çalkalamalı su banyosunda 30°C' de 4 saat karıştırılmış ve oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Aktifleştirilmiş mikroboncuklar süzülerek ayrıldıktan sonra sırasıyla 15 mL aseton ve 15 mL fosfat tamponu (0,5 M, pH: 7,0) ile yıkanmıştır.

3.5.2. Mikroboncukların epiklorhidrinle aktifleştirilmesi

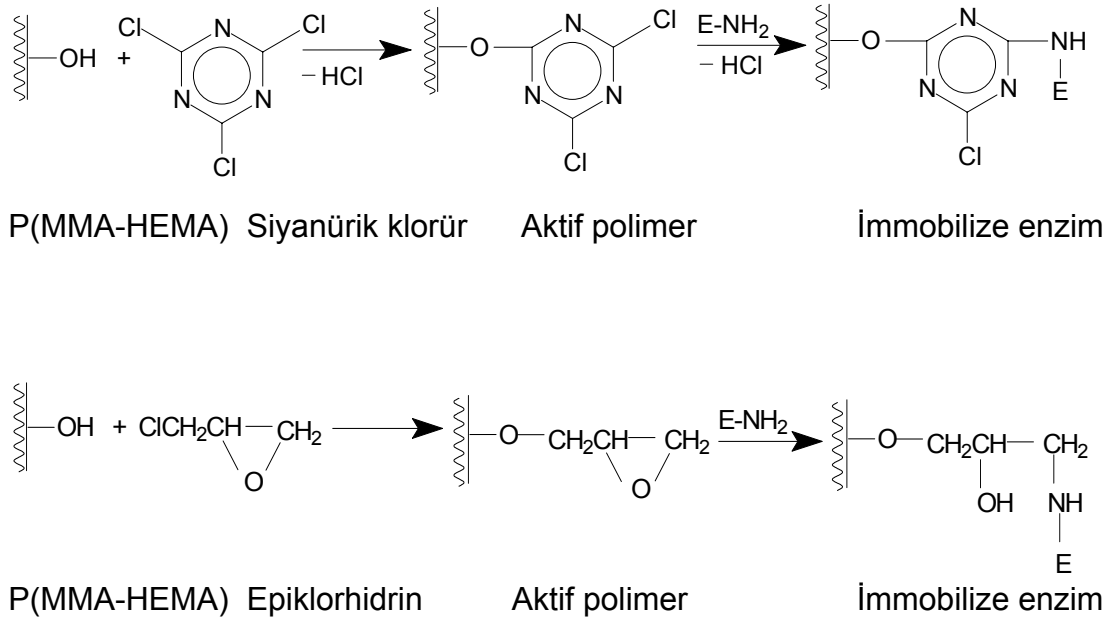
5,0 mL epiklorhidrin içerisine 0,1 g P(MMA-HEMA) mikroboncukları eklendikten sonra çalkalamalı su banyosunda 30°C' de 4 saat karıştırılmış ve oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Aktifleştirilmiş mikroboncuklar

süzülerek ayrıldıktan sonra sırasıyla 15 mL aseton ve 15 mL fosfat tamponu (0,5 M, pH: 7,0) ile yıkanmıştır.

3.6. Enzim İmmobilizasyonu

Aktifleştirilmiş 0,1 g P(MMA-HEMA) mikrobuncukları üzerine 5,0 mL enzim (%4,5 v/v) çözeltisi ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 16 saat süreyle immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. İmmobilize enzim, çözeltiden süzülerek ayrılmış ve deneylerde kullanılmak üzere buzdolabında 4°C' de saklanmıştır.

Siyanürik klorürle ve epiklorhidrin ile aktifleştirme ve enzim immobilizasyon tepkimeleri Şekil 3.3' de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Aktifleştirme ve immobilizasyon tepkimeleri

3.7. Glukoz İzomerazın Aktivlik Tayini

3.7.1. Serbest glukoz izomerazın aktiflik tayini

Serbest Gl' in aktifliği sistein-karbazol metoduna göre tayin edilmiştir. 3,0 mL glukoz çözeltisi (2×10^{-4} M) su banyosunda 60 °C' de 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 1,0 mL fosfat tamponu (0,5 M; pH: 7,0), 1,0 mL $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi (0,05 M) ve 0,5 mL enzim çözeltisi ilave edilmiştir. Bu çözelti 10 dakika çalkalamalı su banyosunda 60 °C' de çalkalanmıştır. Daha sonra 5,0 mL $HClO_4$ çözeltisi (0,5 M) eklenerek tepkime durdurulmuş ve karışım süzölmüştür. Süzöntüden 1,0 mL alınarak üzerine 0,1 mL L-sistein çözeltisi (%2 v/v) ve 40 °C' lik su banyosunda karıştırılarak 5,0 mL H_2SO_4 çözeltisi (%75 v/v) eklenmiştir. Daha sonra çözeltiye buz banyosunda 0,15 mL karbazol çözeltisi (%0,12 v/v) eklenmiş ve çözelti 40 °C' de su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda su banyosundan alınan çözelti 1,5 dakika buz banyosunda ve 4 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak 566,0 nm de aynı şekilde hazırlanan ancak süzöntü yerine aynı miktar damıtık su ve diğer reaktifleri içeren blank çözeltisine karşı okuma yapılmıştır.

Tepkime hızı, zamana karşı ölçülen absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen eğrinin başlangıç eğiminden ve fruktoz kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hız (V)} = \frac{\Delta A_{566}}{\Delta t} \times \frac{\Delta c}{\Delta A_{566}} = \frac{\Delta c}{\Delta t} \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte Δc , mol/L olarak fruktoz derişimindeki değışimi, ΔA_{566} ($A_0 - A_t$) absorbansındaki değışimi ve Δt zamanındaki değışimi gösterir. Gl için 1 unite enzim veya birim aktiflik, 1 dakikada 1 μ mol glukozu fruktoza dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.7.2. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktiflik tayini

Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın (CC-İGİ) aktifliği 0,1 g P(MMA-HEMA) mikrobuncukları kullanılarak Bölüm 3.7.1' de anlatıldığı gibi tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 60 °C, pH: 7,0 ve başlangıç glukoz derişimi 2×10^{-4} M alınarak sabit tutulmuştur.

3.7.3. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktiflik tayini

Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın (ECH-İGİ) aktifliği 0,1 g P(MMA-HEMA) mikrobuncukları kullanılarak Bölüm 3.7.1' de anlatıldığı gibi tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 60 °C, pH 7,0 ve başlangıç glukoz derişimi 2×10^{-4} M alınarak sabit tutulmuştur.

3.8. Enzim Aktifliğine pH' ın Etkisi

3.8.1. Serbest glukoz izomerazın aktifliğine pH' ın etkisi

Serbest GI' ın aktifliğine pH' nın etkisi, çeşitli pH' larda (5,0-5,5-6,0-6,5-7,0-7,5-8,0-8,5-9,0) fosfat tamponları hazırlanarak incelenmiştir. Bölüm 3.7.1' de anlatıldığı gibi enzim aktiflikleri tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 60 °C ve başlangıç glukoz derişimi 2×10^{-4} M sabit tutulmuştur.

3.8.2. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' ın etkisi

Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' ın etkisi, çeşitli pH' larda (5,0-5,5-6,0-6,5-7,0-7,5-8,0-8,5-9,0) fosfat tamponları hazırlanarak incelenmiştir. Bölüm 3.7.1' de anlatıldığı gibi enzim aktiflikleri tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 60 °C ve başlangıç glukoz derişimi 2×10^{-4} M sabit tutulmuştur.

3.8.3. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' ın etkisi

Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' ın etkisi, çeşitli pH' larda (5,0-5,5-6,0-6,5-7,0-7,5-8,0-8,5-9,0) fosfat tamponları hazırlanarak incelenmiştir. Bölüm 3.7.1' de anlatıldığı gibi enzim aktiflikleri tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 60 °C ve başlangıç glukoz derişimi 2×10^{-4} M sabit tutulmuştur.

3.9. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

3.9.1. Serbest glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest Gl' ın aktifliğine sıcaklığın etkisi çeşitli sıcaklıklarda (50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C) incelenmiştir. Bölüm 3.7.1' de anlatıldığı gibi enzim aktiflikleri tayin edilmiştir. Tepkime süresince pH: 7,0 ve başlangıç glukoz derişimi 2×10^{-4} M sabit tutulmuştur.

3.9.2. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi çeşitli sıcaklıklarda (50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C), Bölüm 3.7.1' de anlatıldığı gibi enzim aktiflikleri tayin edilmiştir. Tepkime süresince pH: 7,0 ve başlangıç glukoz derişimi 2×10^{-4} M sabit tutulmuştur.

3.9.3. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi çeşitli sıcaklıklarda (50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C), Bölüm 3.7.1' de anlatıldığı gibi enzim aktiflikleri tayin edilmiştir.

Tepkime süresince pH: 7,0 ve başlangıç glukoz derişimi 2×10^{-4} M sabit tutulmuştur.

3.10. Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

3.10.1. Serbest glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest Gl' ın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli derişimlerdeki glukoz çözeltileri hazırlanmış (3×10^{-3} M; 5×10^{-3} M; 1×10^{-2} M; 2×10^{-2} M), aktiflikleri Bölüm 3.7.1' de ki metoda göre tayin edilmiştir. Tepkime süresince pH: 7,0 ve sıcaklık 60°C ' de sabit tutulmuştur.

3.10.2. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli derişimlerdeki glukoz çözeltileri hazırlanmış (3×10^{-3} M; 5×10^{-3} M; 1×10^{-2} M; 2×10^{-2} M), aktiflikleri Bölüm 3.7.1' de ki metoda göre tayin edilmiştir. Tepkime süresince pH: 7,0 ve sıcaklık 60°C ' de sabit tutulmuştur.

3.10.3. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli derişimlerdeki glukoz çözeltileri hazırlanmış (3×10^{-3} M; 5×10^{-3} M; 1×10^{-2} M; 2×10^{-2} M), aktiflikleri Bölüm 3.7.1' de ki metoda göre tayin edilmiştir. Tepkime süresince pH: 7,0 ve sıcaklık 60°C ' de sabit tutulmuştur.

3.11. Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

3.11.1. Serbest glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Serbest Gl' in aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla, buzdolabında 4 °C' de saklanan enzim çözeltisinden (%4,5) belirli aralıklarla (0., 7., 14., 21., 28., 35., 42., 49., 56. gün) 0,5 mL örnekler alınarak aktiflikleri tayin edilmiştir. Tepkime süresince başlangıç glukoz derişimi 2×10^{-4} M, pH: 7,0 ve sıcaklık 60 °C' de sabit tutulmuştur.

3.11.2. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla, buzdolabında 4 °C' de saklanan immobilize mikrobuncuklardan belirli aralıklarla (0., 7., 14., 21., 28., 35., 42., 49., 56. gün) 0,1 g örnekler alınarak aktiflikleri tayin edilmiştir. Tepkime süresince başlangıç glukoz derişimi 2×10^{-4} M, pH: 7,0 ve sıcaklık 60 °C' de sabit tutulmuştur.

3.11.3. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla, buzdolabında 4 °C' de saklanan immobilize mikrobuncuklardan belirli aralıklarla (0., 7., 14., 21., 28., 35., 42., 49., 56. gün) 0,1 g örnekler alınarak aktiflikleri tayin edilmiştir. Tepkime süresince başlangıç glukoz derişimi 2×10^{-4} M, pH: 7,0 ve sıcaklık 60 °C' de sabit tutulmuştur.

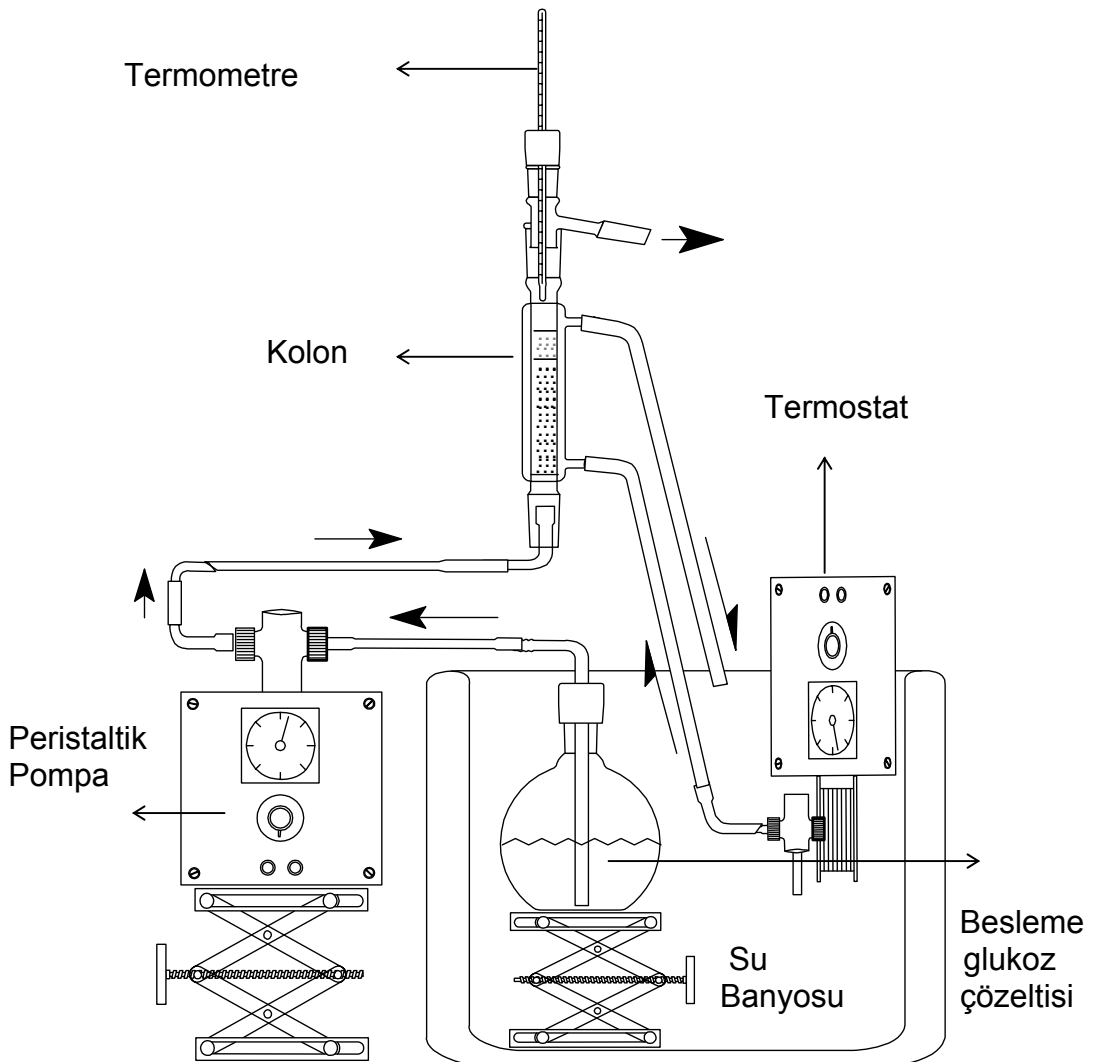
3.12. Enzim Aktifliğinin Sürekli Kullanım ile Değişimi

3.12.1. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi

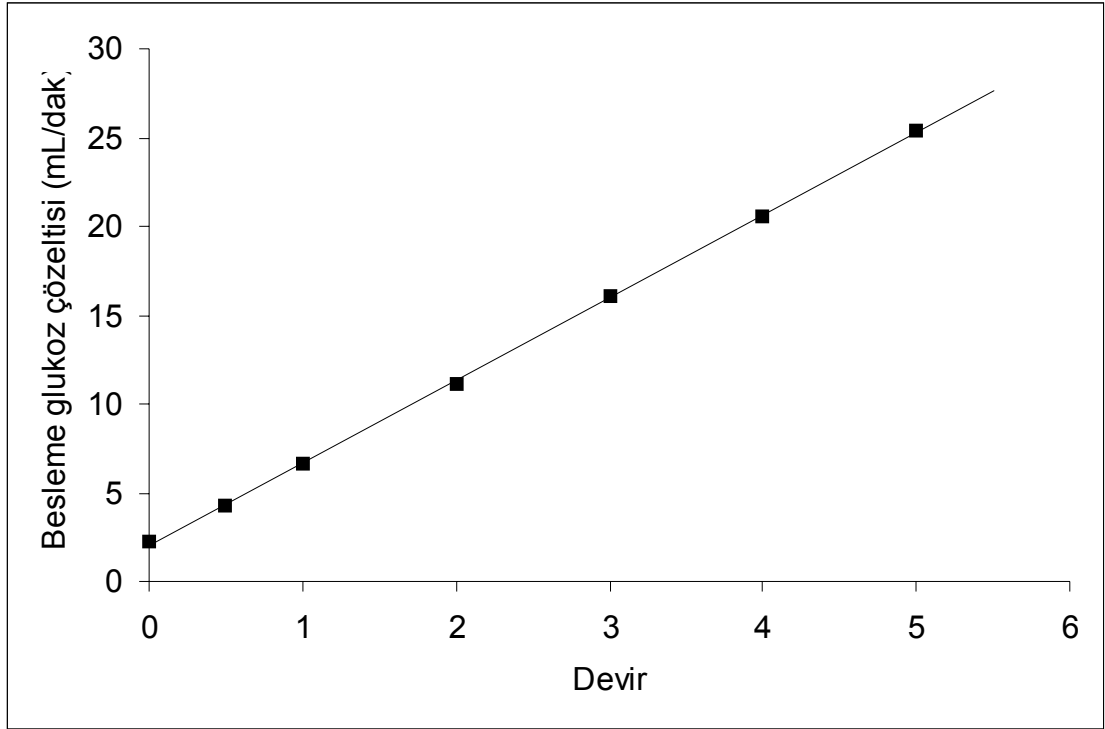
Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimini incelemek amacıyla kolon düzeneği hazırlanmıştır (Şekil 3.4). Kolon 20 cm yüksekliğinde, 1,0 cm iç çapında ve ceketli-camdan yapılmıştır. Kolonun alt kısmından yukarıya doğru sırasıyla pamuk (0,5 cm), küre şeklinde cam boncuk (kolondaki boyu 12 cm, çapları 2,0 mm), ince gözenekli tül bez, 1,0 g siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomeraz mikrobuncukları (yükseklik 2,0 cm), ince gözenekli tül bez konulmuştur. Kolonu çalışma sıcaklığında sabit tutmak için termostatlı su banyosu kullanılarak kolon ceketinden devamlı su geçirilmiştir. Kolona önce fosfat tamponu pompalanmış ve sistemin termal dengeye gelmesi için bir saat bekletilmiştir. Ayrı bir balonda, 300 mL glukoz çözeltisi (2×10^{-4} M), 100 mL fosfat tamponu (pH: 7,0) ve 100 mL $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden (0,05 M) hazırlanan 500 mL besleme glukoz çözeltisi 60 °C' de sabit sıcak su banyosuna yerleştirilmiştir. Bu çözeltinin kolona gönderilmesinde kullanılan peristaltik pompanın (Labor-Schlauch Pumpe PLP 33, behr Labor-Tecnik-Düsseldorf) kalibrasyonu yapılmıştır (Şekil 3.5). Bu çözeltiden peristaltik pompa yardımıyla çözelti balonundan kolona dakikada 3,0 ml örnek alınacak şekilde pompalanarak deney gerçekleştirilmiştir. 5 dakika aralıklarla toplanan örneklerle HClO_4 çözeltisi (0,5 M; 5,0 mL) eklenerek tepkime durdurulmuş ve sistein-karbazol metodu kullanılarak aktiflikler tayin edilmiştir.

3.12.2. Epiklorhidrinle aktiveştirilen glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi

Epiklorhidrine aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimini incelemek amacıyla Bölüm 3.12.1' de ki işlemler uygulanmış ve sistein-karbazol metodu kullanılarak aktiflik tayini yapılmıştır.



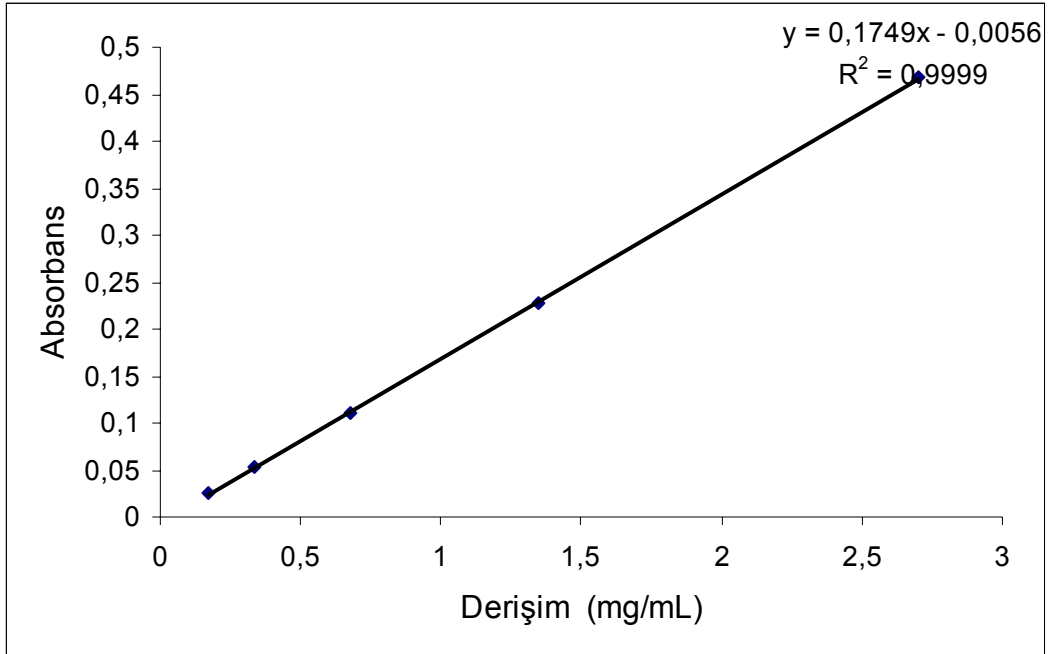
Şekil 3.4. Sürekli kullanım için kullanılan kolon düzeneği



Şekil 3.5. Peristaltik pompa kalibrasyon eğrisi

3.13. Enzim Bağlanma Kapasitesi

0,1 g P(MMA-HEMA) mikrobuncukları üzerine 5 mL Gİ çözeltisi (%4,5 v/v) eklenerek immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Süzüntü ve yıkama çözeltilerinin absorbansı 280 nm de ölçülmüştür. Bu absorbans değerine karşılık gelen bağlanmayan Gİ miktarı, enzim kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Immobilizasyon için kullanılan Gİ ve bağlanmayan Gİ miktarları farkından P(MMA-HEMA) mikrobuncuklarına bağlanan Gİ miktarları tayin edilmiştir.



Şekil 3.6. Enzim kalibrasyon grafiği

3.14. Termal İnaktivasyon

3.14.1. Serbest glukoz izomerazın termal inaktivasyonu

Serbest glukoz izomerazın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla 70 °C ve 80 °C' de (10. dk, 20. dk, 30. dk, 40. dk, 60. dk, 80. dk) 0,5 mL örnekler alınarak aktiflikleri tayin edilmiştir. Tepkime süresince glukoz çözeltisi 2×10^{-4} M ve pH: 7,0' de sabit tutulmuştur.

3.14.2. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın termal inaktivasyonu

Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla 70 °C ve 80 °C de (10. dk, 20. dk, 30. dk, 40. dk, 60. dk, 80. dk) 0,1 g örnekler alınarak aktiflikleri tayin edilmiştir. Tepkime süresince glukoz çözeltisi 2×10^{-4} M ve pH: 7,0' de sabit tutulmuştur.

3.14.3. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın termal inaktivasyonu

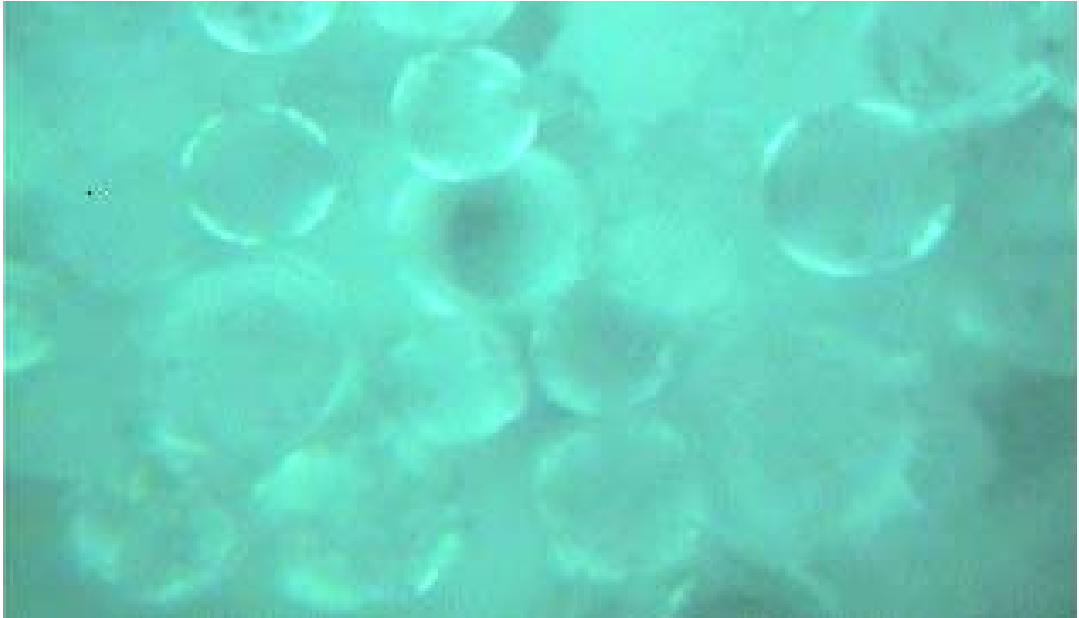
Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla 70 °C ve 80 °C' de (10. dk, 20. dk, 30. dk, 40. dk, 60. dk, 80. dk) 0,1 g örnekler alınarak aktiflikleri tayin edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Polimerik Mikroboncukların Karakterizasyonu

4.1.1. Fiziksel şekil analizi

Sentezlenen P(MMA-HEMA) mikroboncuklarının optik mikroskop ile çekilmiş mikrofotografı Resim 4.1' de gösterilmiştir. Sentezlenen P(MMA-HEMA) mikroboncukları küreseldir.



Resim 4.1. P(MMA-HEMA) mikroboncuklarının mikrofotografı

4.1.2. Tanecik boyutu dağılımı analiz sonuçları

P(MMA-HEMA) mikroboncuklarının tanecik boyutu dağılım analiz sonuçları Çizelge 4.1' de verilmiş ve tanecik boyutu dağılımı Şekil 4.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. P(MMA-HEMA) mikrobuncuklarının tanecik boyutu dağılım analiz sonuçları

	D(0,1)	D(0,5)	D(0,9)	D[3,2]	D[4,3]
	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)
P(MMA-HEMA)	89,85	187,22	347,65	156,73	204,49

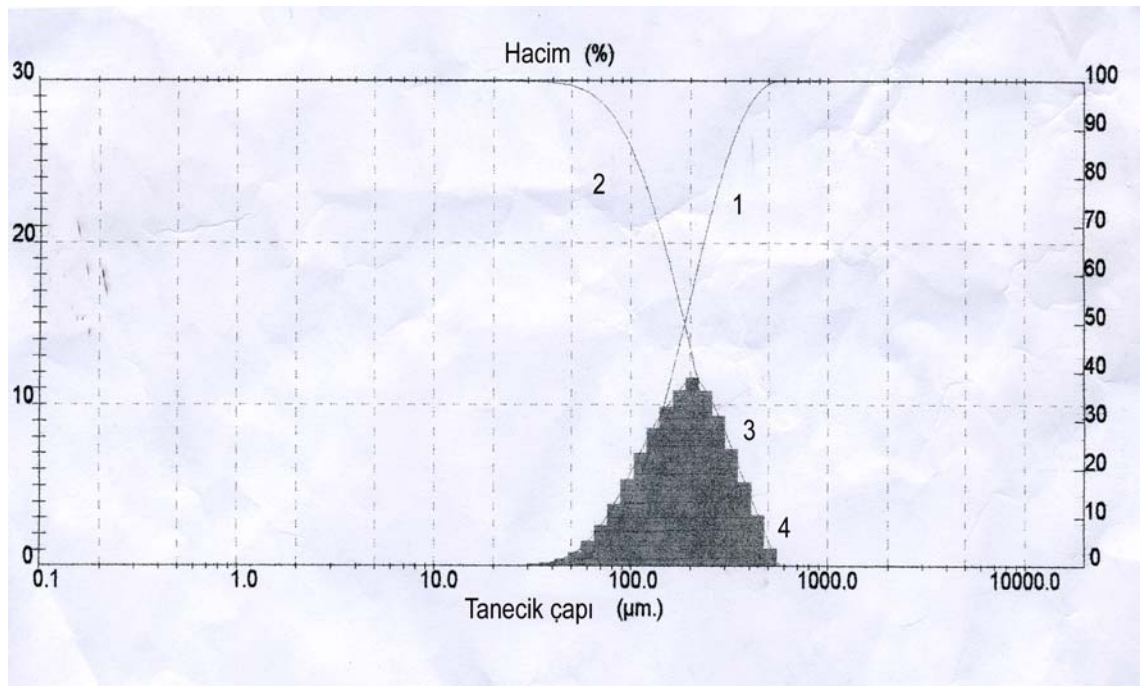
D(0,1) ; örneğin hacimce %10 unun belirtilen büyüklüğün altında olduğunu gösterir

D(0,5) ; örneğin hacimce %50 sinin belirtilen büyüklüğün altında olduğunu gösterir

D(0,9) ; örneğin hacimce %90 nın belirtilen büyüklüğün altında olduğunu gösterir

D[3,2] ; yüzey alanı ortalama tanecik büyüklüğünü gösterir

D[4,3] ; hacimce ortalama tanecik büyüklüğünü gösterir



Şekil 4.1. P(MMA-HEMA) mikrobuncuklarının tanecik boyutu dağılımı grafiği

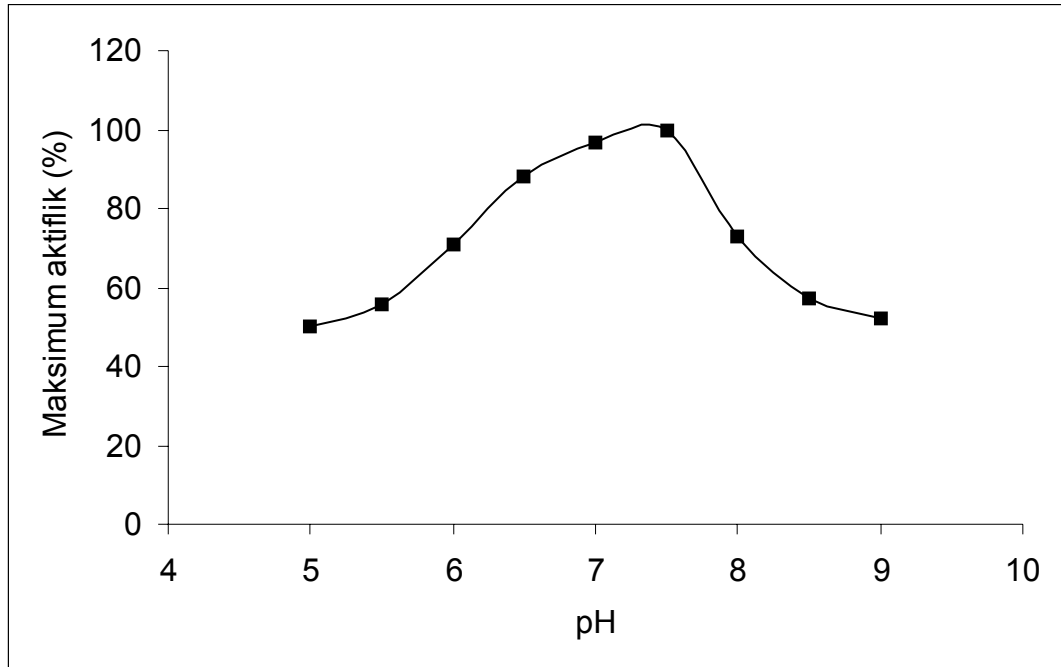
Bu şekillerde, 1 ve 2 nolu eğriler sırasıyla belirli büyüklüğün altında ve üstünde olan taneciklerin hacimce yüzdelerini göstermektedir. Her iki eğri için hacim yüzdeleri sağ taraftaki koordinatta belirtilmiştir. 3 nolu eğri frekans eğrisidir ve 1 nolu eğrinin türevi ile elde edilir. Bu eğrinin tepe noktası parçacıkların en yaygın bulunan çap büyüklüğünü belirtir. 4 nolu histogram grafiği, belirli büyüklük aralığında bulunan taneciklerin örnek içindeki hacimce yüzdelerini gösterir ve sol taraftaki koordinat değerlerine karşılık gelir. Sentezlenen P(MMA-HEMA) mikrobuncuklarının hacimce %14' ünün çapı 33 μm ile 93 μm arasında, hacimce %40' ının çapı 100 μm ile 197 μm arasında ve geriye kalan hacimce %46' sının çapı 212 μm ile 879 μm arasında değişme göstermiştir.

4.2. Serbest Glukoz İzomerazın Aktifliğine pH' ın Etkisi

Serbest Gl' ın aktifliğine pH' ın etkisini incelemek amacıyla çeşitli pH' larda (5,0-9,0), glukoz çözeltisi (2×10^{-4} M) kullanılarak 60 °C' de aktiflik tayini için deneyler yapılmış elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.2' de verilmiştir. Serbest Gl için optimum pH 7,5 olarak bulunmuştur. pH 7,5' in maksimum aktiflik değeri 100 kabul edilerek diğer pH' larda elde edilen maksimum aktiflik değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen maksimum aktifliklerin pH ile değişimi Şekil 4.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Serbest Gl' ın aktifliğine pH' ın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak.)	Maksimum aktiflik (%)
5,0	0,063	1,13	50,0
5,5	0,070	1,26	55,8
6,0	0,089	1,60	70,8
6,5	0,111	1,99	88,1
7,0	0,122	2,19	96,9
7,5	0,126	2,26	100,0
8,0	0,092	1,65	73,0
8,5	0,072	1,29	57,1
9,0	0,066	1,18	52,2



Şekil 4.2. Serbest Gl' ın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik ve bazik grupların varlığı, pH değişimi ile enzim-substrat (ES) kompleksinin kararlılığını etkiler. Kararlı ES kompleksi oluştuğunda tepkime hızı maksimumdur. Bu nedenle serbest enzimler için tepkime hızının maksimum olduğu optimum pH değerleri belirlenir. Genellikle enzimlerin optimum pH değerleri 3,0-8,0 arasındadır. Pek çok enzimin optimum pH değeri 7,0 civarındadır. Çok asidik veya çok bazik ortamlarda enzim denatüre olacağından reaksiyon hızı tersinmez olarak azalır ve sıfıra kadar düşebilir. Şekil 4.2' den de görüldüğü gibi serbest Gl' in aktifliğinde asidik ve bazik bölgelerde azalmalar gözlenmiştir.

Çalışmalarda kullanılan Gl menşesine bağlı olarak farklı pH' larda maksimum aktiflik gösterebilir. Bu çalışmada *Streptomyces Rubiginosus* dan elde edilen Gl' in optimum pH değeri 7,5 olarak bulunmuştur. Takasaki yaptığı çalışmada, *Streptomyces Albus* den elde ettiği Gl için optimum pH değeri 7,0 [65], *Streptomyces Flavogriseus* dan elde edilen Gl' in optimum pH değeri 7,5 [50], *Actinoplanes Missouriensis* den elde edilen Gl için optimum pH 7,0-7,5 arasında [51], 1999' da yapılan başka bir çalışmada *Actinoplanes Missouriensis* den elde edilen glukoz izomeraz pH 7,3 civarında maksimum aktiflik göstermiştir [43]. 2002' de yapılan diğer bir çalışmada *Streptomyces Griseus* dan elde edilen Gl için kullanılan tampon çözeltiye bağlı olarak optimum pH 7,0 ile 8,5 arasında değişme göstermiştir [59].

4.3. İmmobilize Glukoz İzomerazın Aktifliğine pH' ın Etkisi

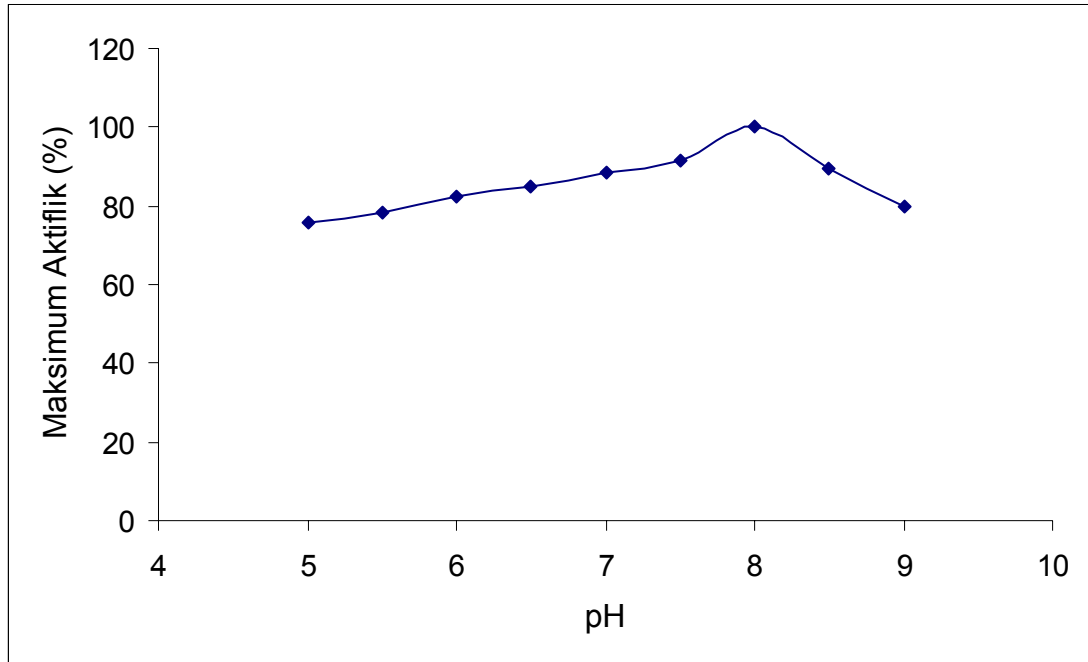
4.3.1. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' ın etkisi

Siyanürik klorür ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın (CC-İGl) aktifliğine pH' ın etkisini incelemek amacıyla çeşitli pH' larda (5,0-9,0) glukoz çözeltisi (2×10^{-4} M) kullanılarak 60 °C' de aktiflik tayini için deneyler yapılmış, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.3'

de verilmiştir. CC-İGİ için optimum pH: 8,0 olarak bulunmuştur. CC-İGİ' in maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.3' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Siyanürik klorürle aktiveleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' ın etkisi

pH	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
5,0	0,094	1,68	75,7
5,5	0,097	1,74	78,4
6,0	0,102	1,83	82,4
6,5	0,105	1,88	84,7
7,0	0,110	1,97	88,7
7,5	0,113	2,03	91,4
8,0	0,124	2,22	100
8,5	0,111	1,99	89,6
9,0	0,099	1,77	79,7



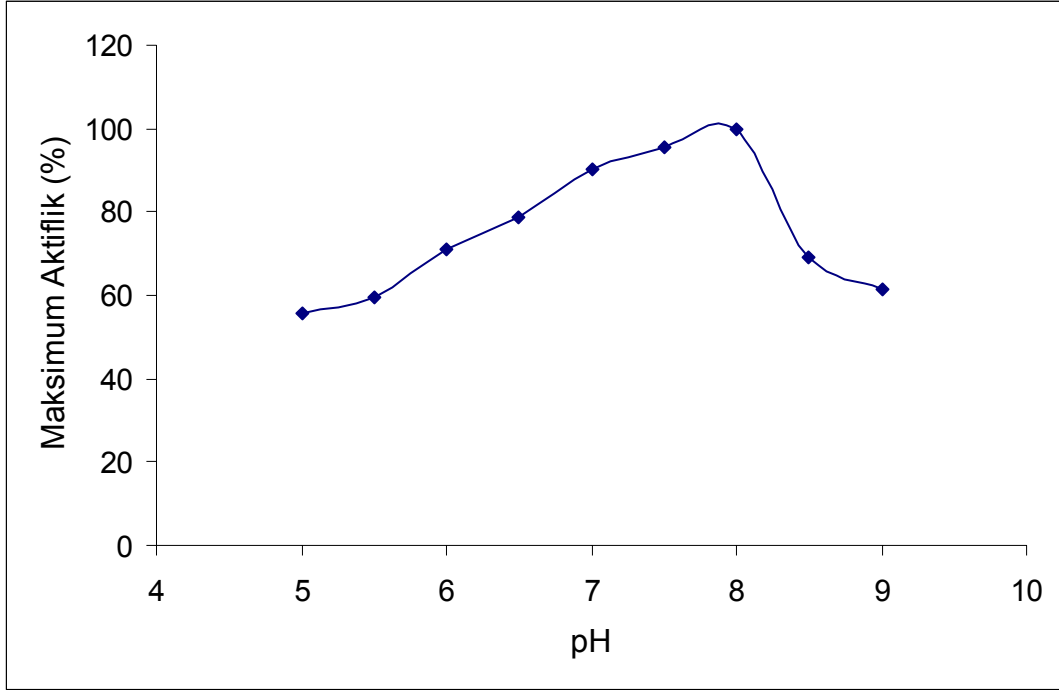
Şekil 4.3. Siyanürik klorürle aktiveleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

4.3.2. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' ın etkisi

Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın (ECH-İGİ) aktifliğine pH' ın etkisini incelemek amacıyla çeşitli pH' larda (5,0-9,0) glukoz çözeltisi (2×10^{-4} M) kullanılarak 60 °C' de aktiflik tayini için deneyler yapılmış, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.4' de verilmiştir. ECH-İGİ için optimum pH: 8,0 olarak bulunmuştur. ECH-İGİ' ın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.4' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine pH' ın etkisi

pH	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
5,0	0,058	1,04	55,6
5,5	0,062	1,11	59,4
6,0	0,074	1,33	71,1
6,5	0,082	1,47	78,6
7,0	0,094	1,69	90,4
7,5	0,098	1,79	95,7
8,0	0,104	1,87	100,0
8,5	0,072	1,29	69,0
9,0	0,064	1,15	61,5



Şekil 4.4. Epiklorhidrinle aktive edilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktivitesinin pH ile değişimi

Serbest Gl için optimum pH 7,5 iken immobilizasyon ile optimum pH'nın hafif bazik bölgeye (pH: 8,0) kaydığı gözlenmiştir. Poliyonik matrisler enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak kullanıldığında, enzimin mikro çevresi ile tepkimenin ana çözeltisi arasında protonların farklı derişimlerde bulunmasına neden olurlar. Polianyonlar enzim etrafındaki protonları çekme eğiliminde iken polikasyonlar bunları iterler. Dolayısıyla polimerik destek çevresindeki pH, ana çözeltinin pH değerinden farklı olabilir [66-68]. pH'daki kayma aynı zamanda enzim tepkimesinin tipine ve matrisin yapısına da bağlıdır. Diffüzyonel sınırlamalar nedeniyle de ana çözeltinin pH'ı tepkimenin meydana geldiği matris çevresinin pH değerinden oldukça farklı olabilir [69]. Diğer taraftan, enzim ile polimerik destek maddesi arasında oluşabilecek farklı etkileşim kuvvetlerinde (hidrojen bağı oluşumu, dipol-dipol etkileşimi gibi) pH değerini etkilediği bilinmektedir [44].

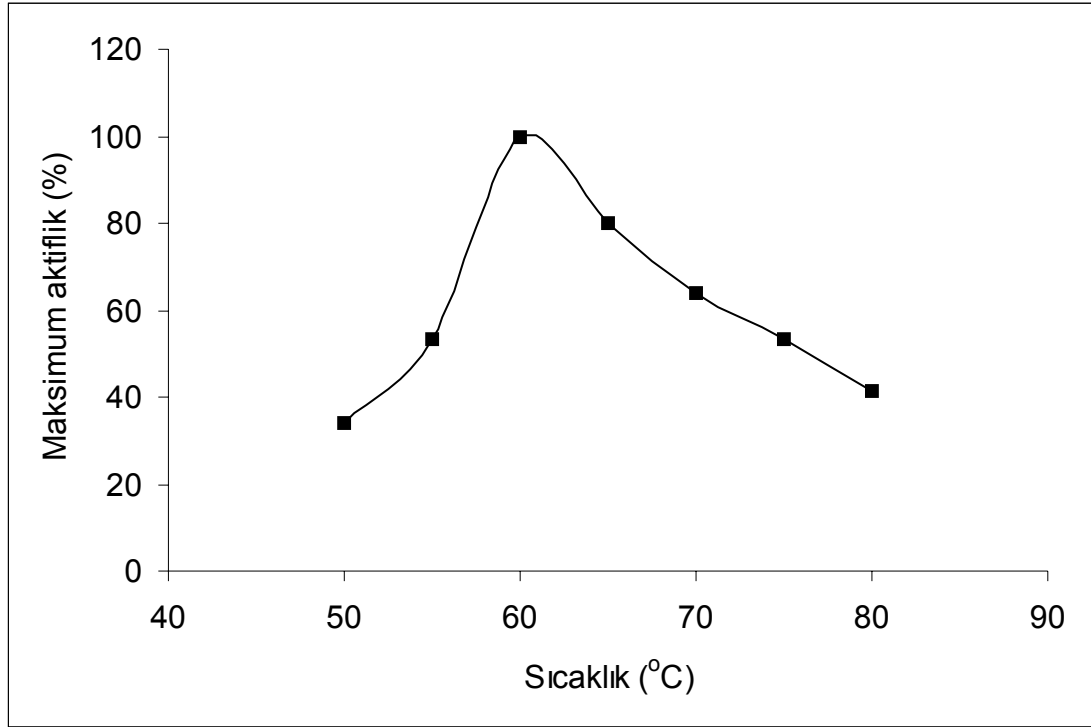
Bu çalışmada siyanürük klorür ve epiklorhidrin ile aktifleştirilerek P(MMA-HEMA) mikrobuncukları üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilen Gl için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur. 1976' da yapılan çalışmada Gl, glutaraldehit ile aktifleştirilmiş ve gözenekli cam üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir. İGl için optimum pH 8,0 bulunmuştur [48]. DEAE-selüloz üzerine immobilize edilmiş Gl' in optimum pH' sı 7,5 [50], indion 48-R üzerine immobilize edilen Gl' in optimum pH' sı 7,0 [53], büyük gözenekli trimetilamin polistiren (TMPS) tanecikleri üzerine moleküler depolama tekniği ile immobilize edilen Gl için optimum pH 7,3 olarak bulunmuştur [43].

4.4. Serbest Glukoz İzomerazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Serbest Gl' in aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (50 °C-80 °C), glukoz çözeltisi (2×10^{-4} M) kullanılarak pH 7,0' de aktiflik tayini için deneyler yapılmış, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.5' de verilmiştir. Serbest enzim için optimum sıcaklık 60 °C olarak bulunmuştur. Serbest Gl' in maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi Şekil 4.5' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Serbest Gl' in aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak.)	Maksimum Aktiflik (%)
50	0,068	1,22	34,2
55	0,106	1,90	53,2
60	0,199	3,57	100,0
65	0,159	2,85	79,8
70	0,127	2,28	63,9
75	0,106	1,90	53,2
80	0,082	1,47	41,2



Şekil 4.5. Serbest Gİ' in maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi

60 °C' nin üzerinde sıcaklık artışıyla, 60 °C' nin altında sıcaklığın azalmasıyla enzim aktifliğinin azaldığı gözlenmiştir. Sıcaklığın artması, moleküllerin kinetik enerjisini artırdığından dolayı tüm kimyasal tepkimelerin ve biyokimyasal tepkimelerin hızlarını artırır. Genelde sıcaklığın 10 °C artmasıyla, tepkime hızları da yaklaşık olarak iki kat artar. Biyokimyasal tepkimelerde de aynı durum gözlenmekle birlikte protein yapısında bulunan enzimlerin çoğu belirli bir sıcaklıktan sonra denatüre olmaya başlarlar. Sıcaklık arttıkça enzim molekülünün önce tersiyer yapısı, sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapısı) bozulur. Bu olaylardan enzimin aktif merkezi de etkilenir ve enzim aktifliğini yitirir [69].

Bu çalışmada serbest Gİ için optimum sıcaklık 60 °C olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda *Actinoplanes Missouriensis* den elde Gİ için optimum sıcaklık 60 °C [51], *Streptomyces Flavogriseus* dan elde edilen Gİ için optimum sıcaklık 70 °C [50], *Streptomyces Griseus* dan elde edilen Gİ için

optimum sıcaklık 60 °C [59] ve Houng ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada serbest Gl için optimum sıcaklık 70 °C olarak bulunmuştur [53].

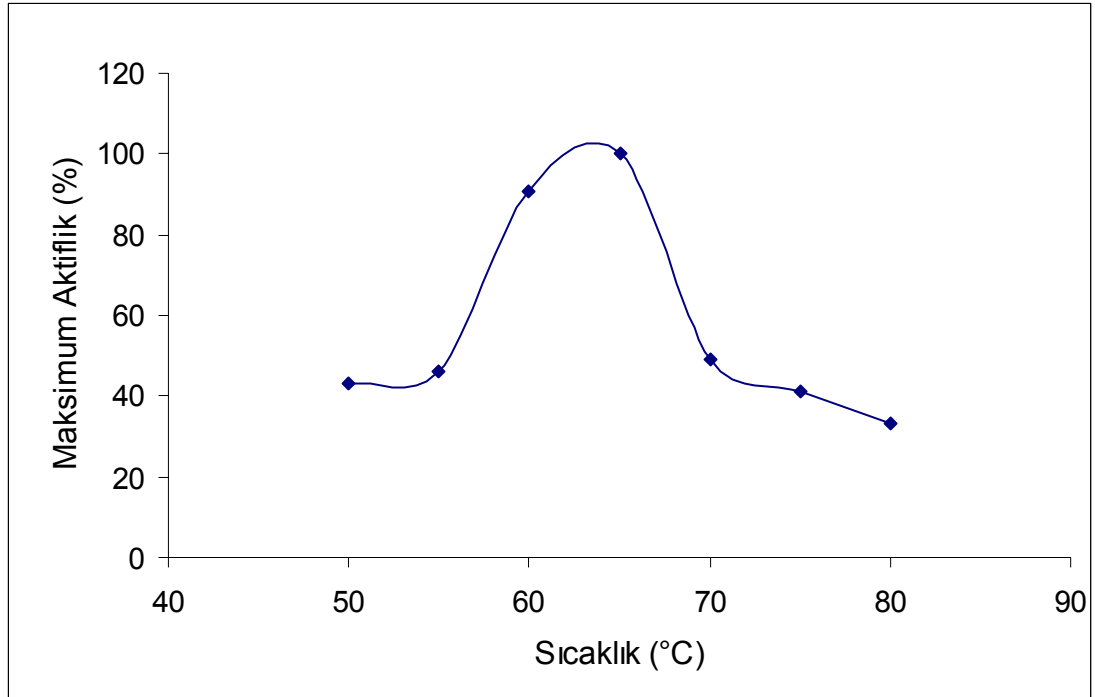
4.5. İmmobilize Glukoz İzomerazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

4.5.1. Siyanürik klorürle aktiveleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Siyanürik klorür ile aktiveleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi 50 °C-80 °C arasında, glukoz çözeltisi (2×10^{-4} M) kullanılarak pH 7,0' de aktiflik tayini için deneyler yapılmış, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.6' da verilmiştir. CC-İGl için optimum sıcaklık 65 °C olarak bulunmuştur. CC-İGl' in maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi Şekil 4.6' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Siyanürik klorürle aktiveleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
50	0,054	0,97	42,9
55	0,058	1,04	46,0
60	0,114	2,05	90,7
65	0,126	2,26	100,0
70	0,062	1,11	49,1
75	0,052	0,93	41,2
80	0,042	0,75	33,2



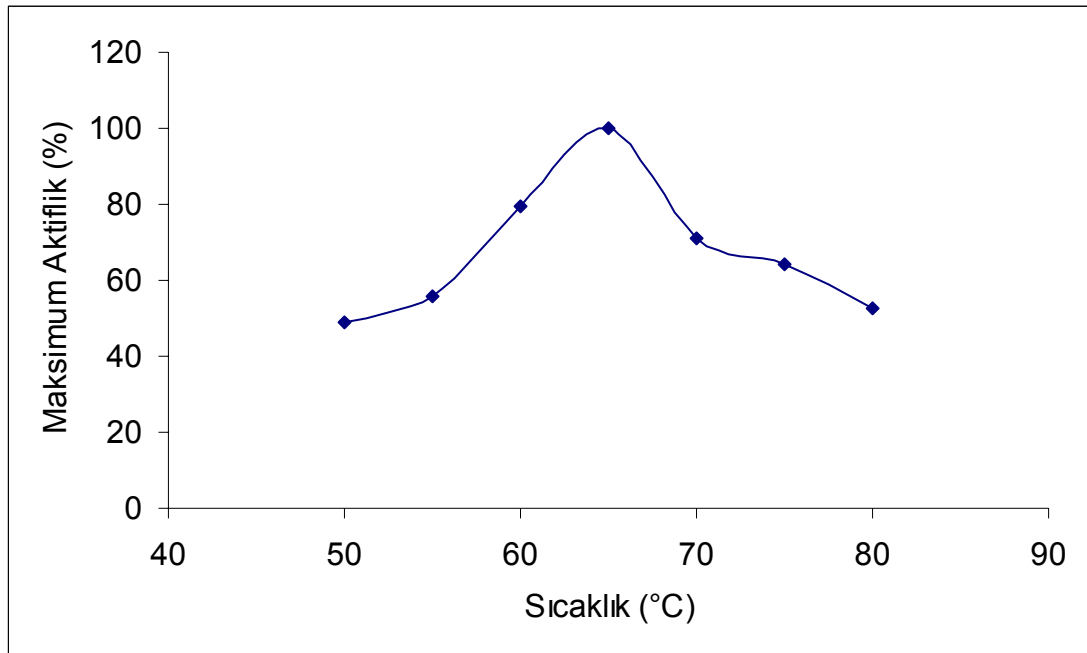
Şekil 4.6. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

4.5.2. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi 50 °C-80 °C arasında, glukoz çözeltisi (2×10^{-4} M) kullanılarak pH 7,0' de aktiflik tayini için deneyler yapılmış, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.7' de verilmiştir. ECH-İĞİ için optimum sıcaklık 65 °C olarak bulunmuştur. ECH-İĞİ' in maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi Şekil 4.7' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
50	0,058	1,04	49,1
55	0,066	1,18	55,7
60	0,094	1,69	79,7
65	0,118	2,12	100,0
70	0,084	1,51	71,2
75	0,076	1,36	64,2
80	0,062	1,11	52,4



Şekil 4.7. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

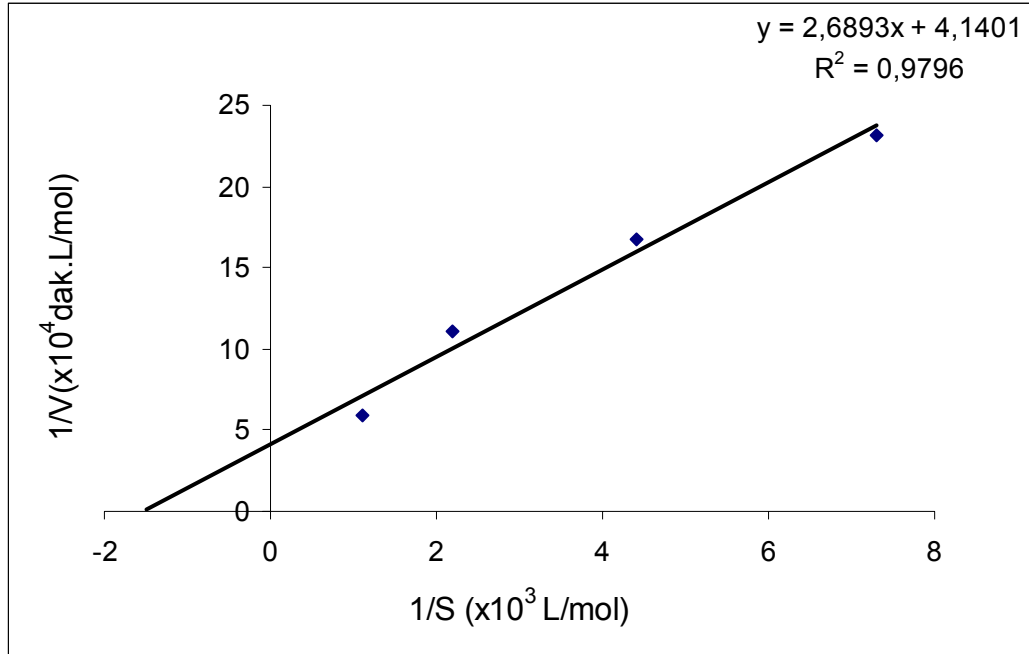
Serbest Gl için optimum sıcaklık 60 °C iken immobilizasyon ile optimum sıcaklık 65 °C ye yükselmiştir. Dolayısıyla serbest enzime göre sıcaklığa daha dayanıklı hale gelmiştir. Enzim ile polimerik destek arasında kovalent bağların oluşması enzim hareketlerinde konformasyonel sınırlamaların doğmasına neden olabilir ve optimum sıcaklıkta artış gözlenebilir. Dolayısıyla enzim katalitik aktifliğini gösterebilmek için daha büyük aktifleştirme enerjisine sahip olabilir. Yapılan çalışmalarda, DEAE-selüloz üzerine immobilize edilmiş Gl için optimum sıcaklık 70 °C [50], TMPS tanecikleri üzerine moleküler depolama tekniği ile immobilize edilen Gl için optimum sıcaklık 75 °C [43], indion 48-R üzerine immobilize edilen Gl için optimum sıcaklık 70 °C olarak bulunmuştur [53].

4.6. Serbest Glukoz İzomerazın Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest Gl' in aktifliğine substrat derişiminin etkisi incelemek için çeşitli glukoz derişimlerinde çözeltiler hazırlanmış (3×10^{-3} M; 5×10^{-3} M; 1×10^{-2} M; 2×10^{-2} M), 60 °C ve pH: 7,0' de aktiflik tayini için deneyler yapılmış, elde edilen absorbans derişimleri ve aktiflik değerleri, 1/S ve 1/V değerleri hesaplanarak Çizelge 4.8' de verilmiştir. Serbest Gl için Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.7' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Serbest Gl' in aktifliğine glukoz derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-4}$ mol/L)	1/S ($\times 10^3$ L/mol)	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	1/V ($\times 10^4$ dak.L/mol)
1,37	7,3	0,240	4,30	23,2
2,28	4,4	0,334	5,99	16,7
4,57	2,2	0,502	9,01	11,1
9,14	1,1	0,937	16,81	5,9



Şekil 4.8. Serbest Gİ için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.8' de görülen $1/S$ nin $1/V$ ye karşı grafiğe geçirilmesi suretiyle, serbest Gİ için K_m değeri $6,5 \times 10^{-5}$ mol/L ve V_{mak} değeri $2,42 \times 10^{-5}$ mol/L.dak olarak bulunmuştur.

4.7. İmmobilize Glukoz İzomerazın Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

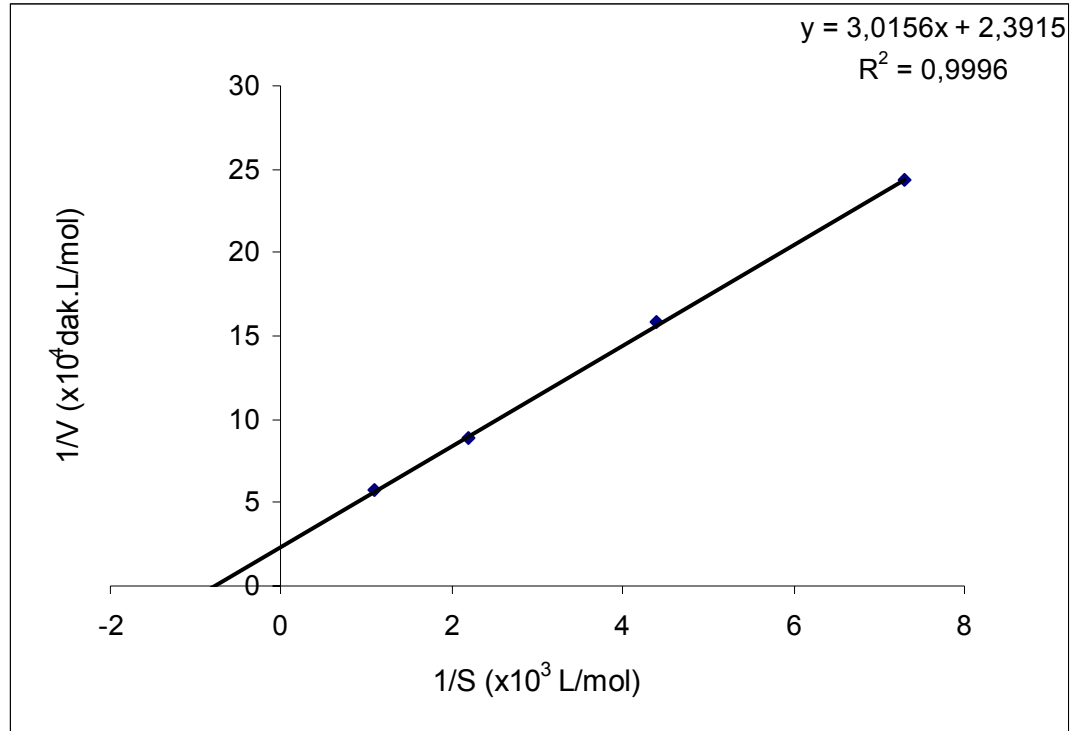
4.7.1. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın (CC-İGİ) aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için çeşitli glukoz derişimlerinde çözeltiler hazırlanmış (3×10^{-3} M; 5×10^{-3} M; 1×10^{-2} M; 2×10^{-2} M), 60 °C ve pH: 7,0' de aktiflik tayini için deneyler yapılmış, elde edilen absorbans değışimleri ve aktiflik değeri, $1/S$ ve $1/V$ değeri hesaplanarak

Çizelge 4.9' da verilmiştir. CC-İĞİ için Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.7' de gösterilmiştir

Çizelge 4.9. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine glukoz derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-4}$ mol/L)	1/S ($\times 10^3$ L/mol)	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	1/V ($\times 10^4$ dak.L/mol)
1,37	7,3	0,229	4,11	24,3
2,28	4,4	0,350	6,28	15,9
4,57	2,2	0,627	11,25	8,9
9,14	1,1	0,972	17,44	5,7



Şekil 4.9. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın Lineweaver-Burk grafiği

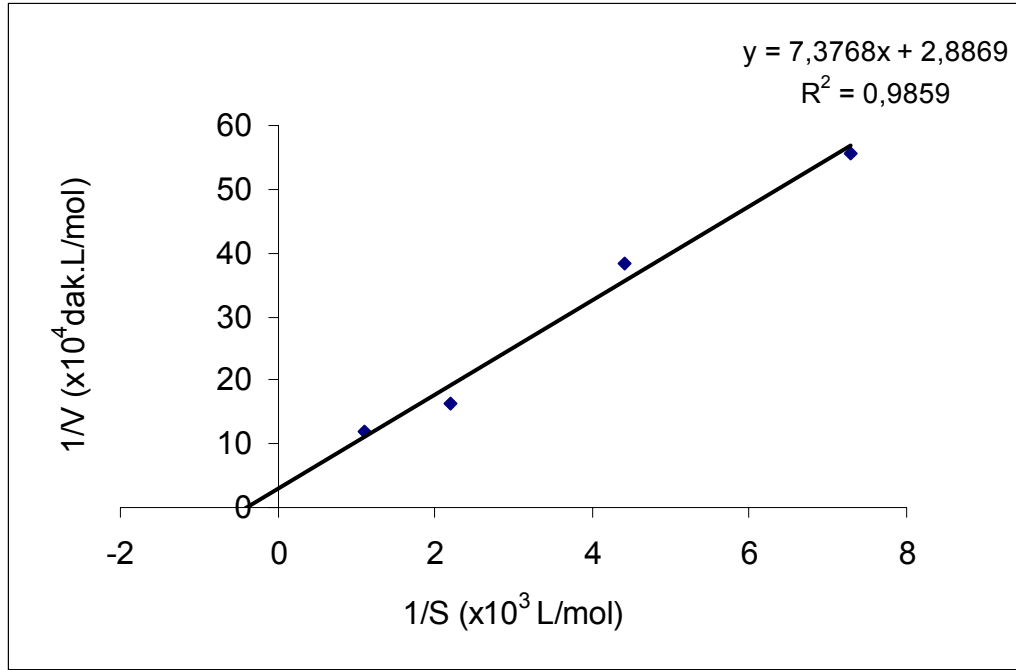
Çizelge 4.9’ da görülen $1/S$ nin $1/V$ ye karşı grafiğe geçirilmesi suretiyle CC-İĞİ için K_m değeri $1,26 \times 10^{-4}$ mol/L ve V_{mak} değeri $4,18 \times 10^{-5}$ mol/L.dak olarak bulunmuştur.

4.7.2. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın (ECH-İĞİ) substrat derişiminin etkisini incelemek için çeşitli glukoz derişimlerinde çözeltiler hazırlanmış (3×10^{-3} M; 5×10^{-3} M; 1×10^{-2} M; 2×10^{-2} M), 60°C ve pH: 7,0’ de aktiflik tayini için deneyler yapılmış, elde edilen absorbans değışimleri ve aktiflik değeri, $1/S$ ve $1/V$ değeri hesaplanarak Çizelge 4.10’ da gösterilmiştir. ECH-İĞİ için Lineweaver-Burk grafiğı Şekil 4.10’ da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine glukoz derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-4}$ mol/L)	1/S ($\times 10^3$ L/mol)	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	1/V ($\times 10^4$ dak.L/mol)
1,37	7,3	0,100	1,79	55,7
2,28	4,4	0,146	2,62	38,2
4,57	2,2	0,339	6,08	16,4
9,14	1,1	0,468	8,40	11,9



Şekil 4.10. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın Lineweaver-Burk grafiği

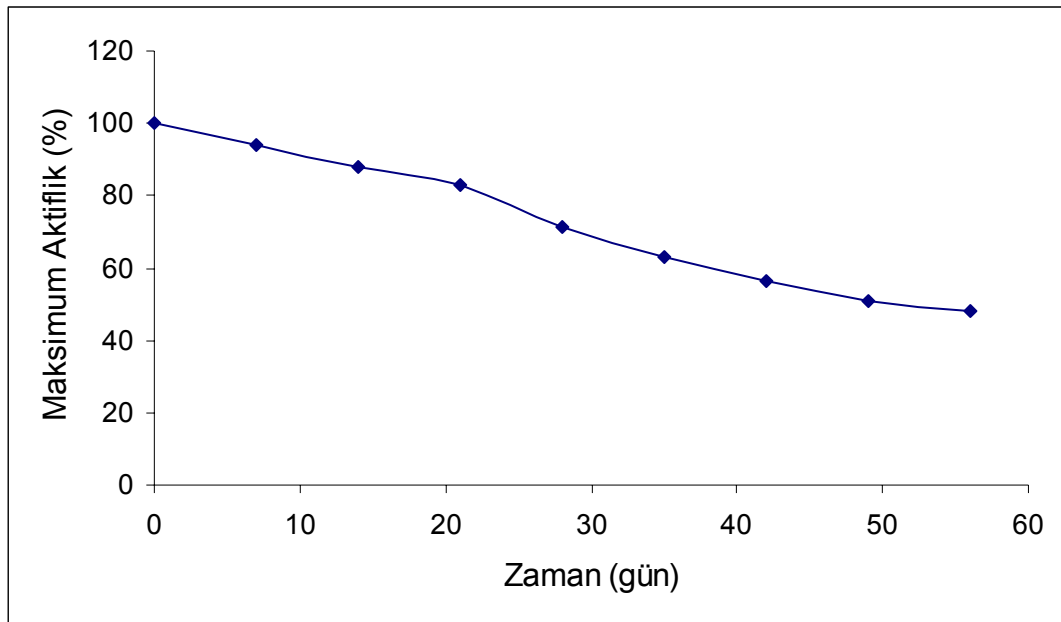
Çizelge 4.10' da görülen $1/S$ nin $1/V$ ye karşı grafiğe geçirilmesi suretiyle ECH-İGİ için K_m değeri $2,55 \times 10^{-4}$ mol/L ve $V_{\max}$ değeri $3,46 \times 10^{-5}$ mol/L.dak olarak bulunmuştur. İmmobilizasyonla K_m değerlerinde bir artma gözlenmiştir. Substrat ve polimerik destek arasındaki etkileşmeyle, substrat-enzim kompleks oluşum ihtimalini düşüren enzimdeki yapısal değişikliklerle, sterik etkilerle, diffüzyonel sınırlamalarla K_m değişebilir ve genellikle immobilizasyonla K_m değerlerinde artma gözlenebilir [43,52].

4.8. Serbest Glukoz İzomerazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest Gİ' in aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla, enzim çözeltisi 4°C ' de saklanmıştır. Belirli zaman aralıklarında (0., 7., 14., 21., 28., 35., 42., 49., 56. gün) 0,5 mL (%4,5 v/v) örnekler alınarak aktiflik tayinleri yapılmıştır. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.11' de verilmiştir. Serbest Gİ maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Şekil 4.11' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Serbest Gl' ın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak.)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,143	2,57	100,0
7	0,135	2,42	94,2
14	0,126	2,26	87,9
21	0,119	2,13	82,9
28	0,102	1,83	71,2
35	0,090	1,62	63,0
42	0,081	1,45	56,4
49	0,073	1,31	51,0
56	0,069	1,24	48,3



Şekil 4.11. Serbest Gl' ın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Serbest Gl' ın 42 gün boyunca 4 °C' de depolanması sonucunda başlangıç aktifliğinin %56,4' ünü koruduğu gözlenmiştir. Pek çok enzim depolamada aktifliklerini tamamen veya bir kısmını kaybedebilirler. 1998' de yapılan

çalışmada α -amilaz enzimi 20 gün içinde aktifliğinin tamamını kaybetmiştir [70].

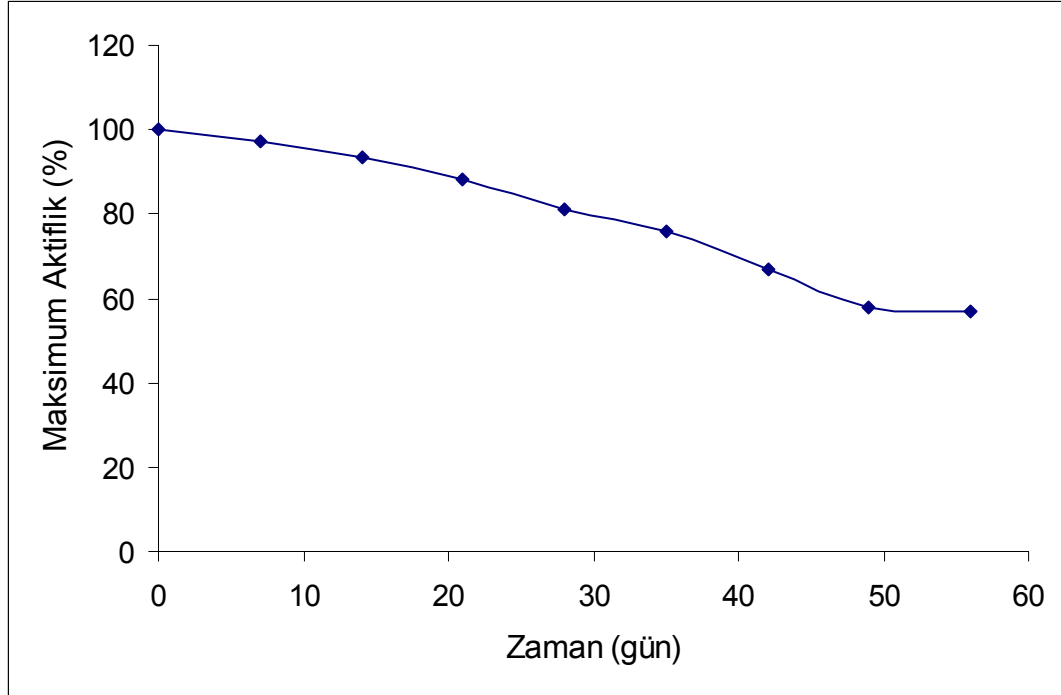
4.9. İmmobilize Glukoz İzomerazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

4.9.1.Siyanürik klorürle aktiveleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Siyanürik klorürle aktiveleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla, belirli zaman aralıklarında (0.gün-56. gün) 0,1 g örnekler alınarak aktiflik tayinleri yapılmıştır. İmmobilize mikrobuncuklar 4 °C de saklanmıştır. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.12' de verilmiştir. CC-İGİ' in maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Şekil 4.12' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. Siyanürik klorürle aktiveleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,113	2,03	100,0
7	0,110	1,97	97,0
14	0,106	1,90	93,6
21	0,100	1,79	88,2
28	0,092	1,65	81,3
35	0,086	1,54	75,9
42	0,076	1,36	67,0
49	0,066	1,18	58,1
56	0,065	1,16	57,1



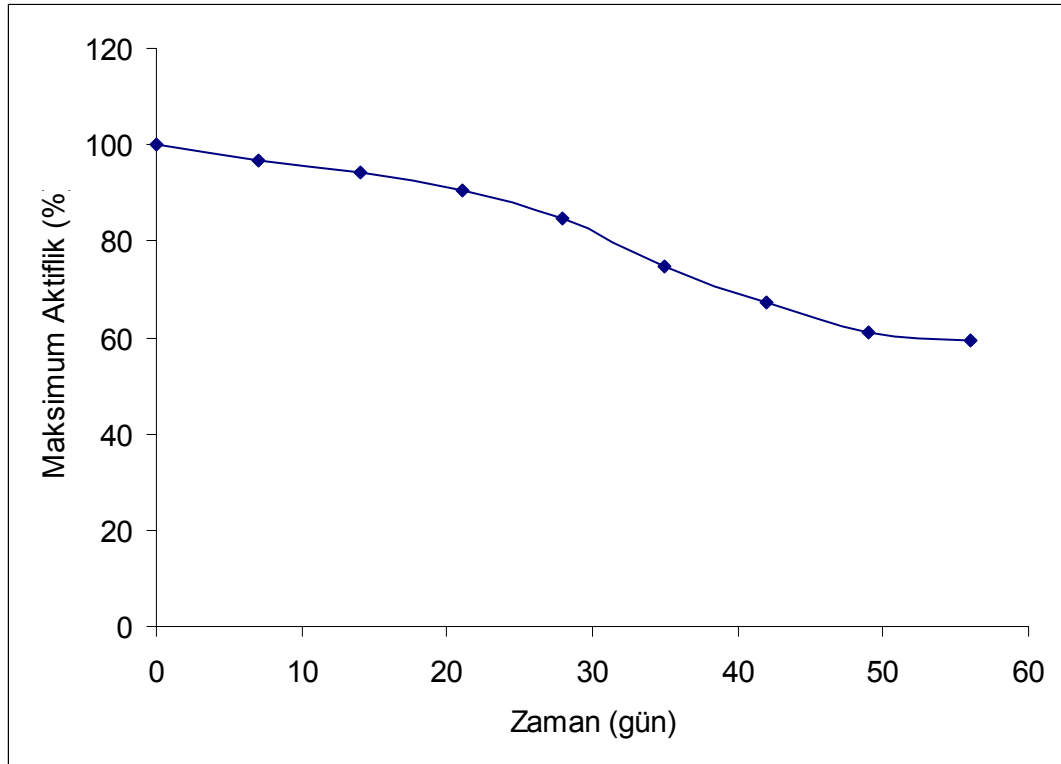
Şekil 4.12. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

4.9.2. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla, belirli zaman aralıklarında (0., 7., 14., 21., 28., 35., 42., 49., 56. gün) 0,1 g örnekler alınarak aktiflik tayinleri yapılmıştır. İmmobilize mikrobuncuklar 4 °C' de saklanmıştır. Elde edilen absorban değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.13' de verilmiştir. CC-İGİ' in maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Şekil 4.13' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,104	1,87	100
7	0,101	1,81	96,8
14	0,098	1,76	94,1
21	0,094	1,69	90,4
28	0,088	1,58	84,5
35	0,078	1,40	74,9
42	0,070	1,26	67,4
49	0,064	1,14	60,9
56	0,062	1,11	59,4



Şekil 4.13. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

CC-İGl' in 4 °C' de 42 gün depolanması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 67,0' sini ECH-İGl' in başlangıç aktifliğinin %67,4' ünü koruduğu gözlenmiştir. 1998' de yapılan çalışmada karbodiimit (CDI) ve tiyonil klorür (SOCl₂) ile aktifleştirilen poli(metil metakrilat- akrilik asit) mikrokürelerine kovalent bağlanma ile α -amilaz enzimi immobilize edilmiştir. CDI-immobilize enzim ve SOCl₂-immobilize enzim 4 °C' de 30 gün depolanması sonucunda başlangıç aktifliklerini sırasıyla %24,5 ve %52,5 korumuştur. Ortamda Ca²⁺ varlığında ise aktifliklerini sırasıyla %90,3 ve %83,7 koruduğu gözlenmiştir [70]. Başka bir çalışmada epiklorhidrin (ECH) ile aktifleştirilen α -amilaz enzimi kovalent bağlanma ile P(HEMA) ve P(S-HEMA) üzerine immobilize edilmiştir. P(HEMA)-immobilize enzim ve P(S-HEMA)-immobilize enzim 4 °C de Ca²⁺ varlığında 30 gün depolama sonucunda sırasıyla aktifliklerini %90,7 ve %74,0 koruduğu gözlenmiştir [71].

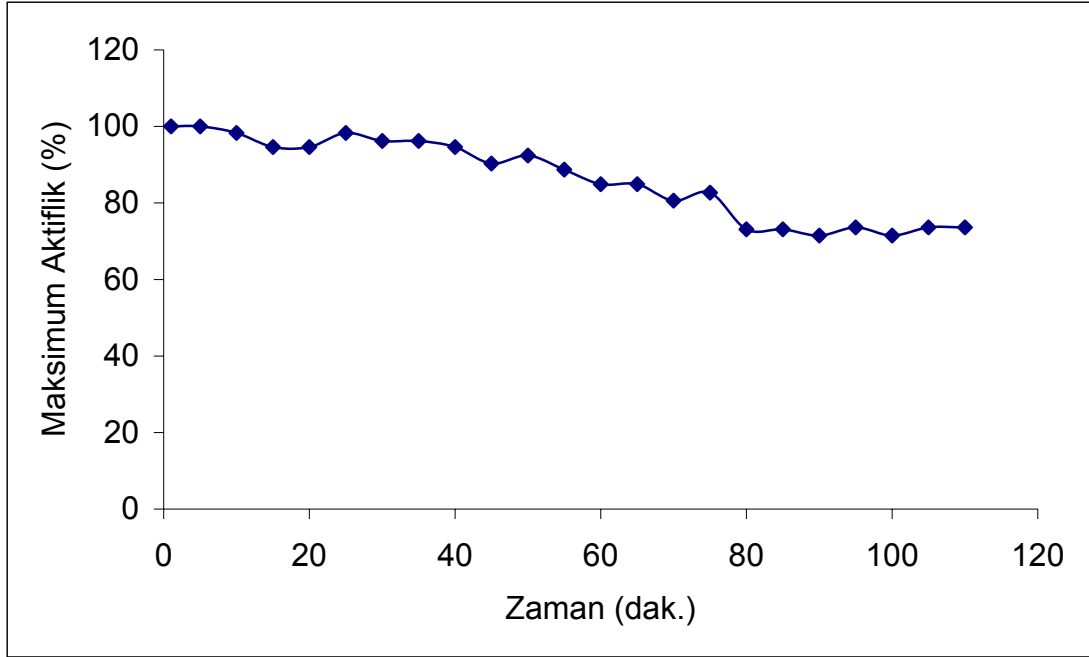
4.10. İmmobilize Glukoz İzomerazın Aktifliğinin Sürekli Kullanım ile Değişimi

4.10.1. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi

Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimini incelemek amacıyla hazırlanan besleme glukoz çözeltisinden Bölüm 3.12.1' de verilen kolondan sürekli kullanım yöntemine göre örnekler toplanmış ve aktiflikleri tayin edilmiştir. Elde edilen absorbans değişimleri ve hesaplanan aktiflik değerleri Çizelge 4.14' de verilmiştir. CC-İGl' in aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi Şekil 4.14' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. Siyanürik klorürle aktiveştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi

Zaman	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,052	1,86	100
5	0,052	1,86	100
10	0,051	1,83	98,3
15	0,049	1,76	94,6
20	0,049	1,76	94,6
25	0,051	1,83	98,3
30	0,050	1,79	96,2
35	0,050	1,79	96,2
40	0,049	1,76	94,6
45	0,047	1,68	90,3
50	0,048	1,72	92,4
55	0,046	1,65	88,7
60	0,044	1,58	84,9
65	0,044	1,58	84,9
70	0,042	1,50	80,6
75	0,043	1,54	82,7
80	0,038	1,36	73,1
85	0,038	1,36	73,1
90	0,037	1,33	71,5
95	0,038	1,36	73,6
100	0,037	1,33	71,5
105	0,038	1,36	73,6
110	0,038	1,36	73,6



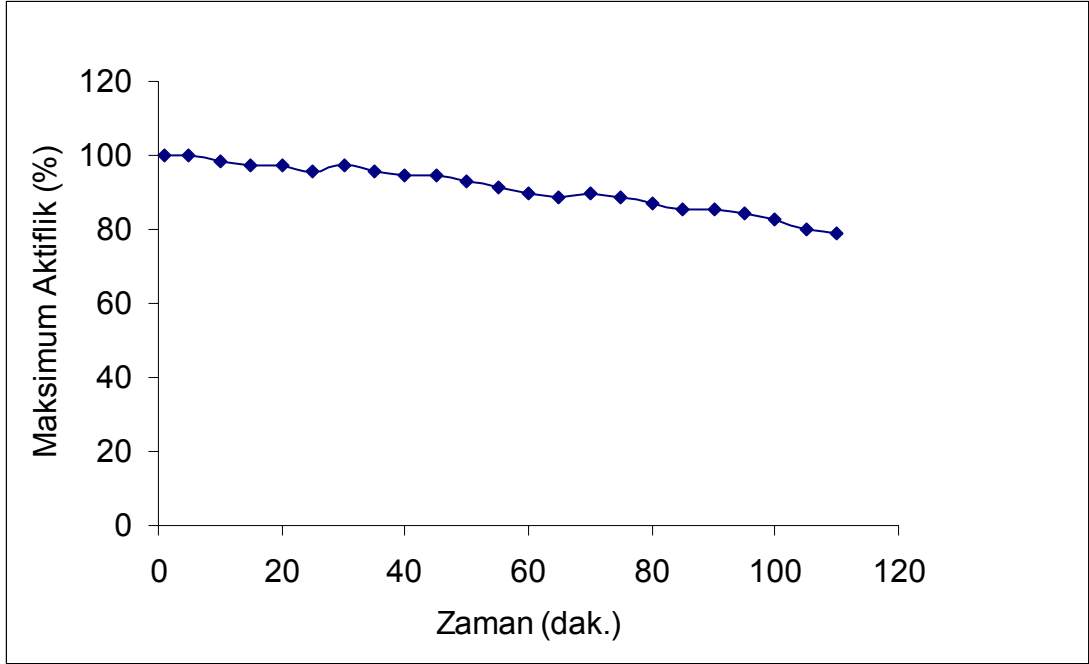
Şekil 4.14. Siyanürik klorürle aktiveleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi

4.10.2. Epiklorhidrin ile aktiveleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi

Epiklorhidrin ile aktiveleştirilen immobilize glukoz izomerazın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimini incelemek amacıyla hazırlanan besleme glukoz çözeltisinden Bölüm 3.12.1’ de verilen kolondan sürekli kullanım yöntemine göre örnekler toplanmış ve aktiflikleri tayin edilmiştir. Elde edilen absorbans değişimleri ve hesaplanan aktiflik değerleri Çizelge 4.15’ de verilmiştir. ECH-İGI’ ın aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi Şekil 4.15’ de gösterilmiştir

Çizelge 4.15. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi

Zaman	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,070	2,51	100
5	0,070	2,51	100
10	0,069	2,47	98,4
15	0,068	2,44	97,2
20	0,068	2,44	97,2
25	0,067	2,40	95,6
30	0,068	2,44	97,2
35	0,067	2,40	95,6
40	0,066	2,37	94,4
45	0,066	2,37	94,4
50	0,065	2,33	92,8
55	0,064	2,30	91,6
60	0,063	2,26	90,0
65	0,062	2,22	88,4
70	0,063	2,26	90,0
75	0,062	2,22	88,4
80	0,061	2,19	87,2
85	0,060	2,15	85,6
90	0,060	2,15	85,6
95	0,059	2,12	84,5
100	0,058	2,08	82,9
105	0,056	2,01	80,1
110	0,055	1,98	78,8



Şekil 4.15. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın maksimum aktifliğinin sürekli kullanım ile değişimi

CC-İGİ' in 110 dakika boyunca kolonda sürekli kullanılması sonucunda aktifliğinin %73,6' sını ECH-İGİ ise aktifliğinin %78,8' ini korumuştur. 1998' de yapılan çalışmada karbodiimit (CDI) ve tiyonil klorür (SOCl_2) ile aktifleştirilerek poli(metil metakrilat-akrilik asit) mikrokürelerine kovalent bağlanma ile α -amilaz enzimi immobilize edilmiştir. 3 gün içinde 20 kez kullanımı sonucunda başlangıç aktifliklerini sırasıyla %78,2 ve %76,9 korumuştur. Ortamda Ca^{2+} varlığında ise sırasıyla %91,2 ve % 90,0 koruduğu gözlenmiştir [70]. Başka bir çalışmada epiklorhidrin (ECH) ile aktifleştirilen α -amilaz enzimi kovalent bağlanma ile P(HEMA) ve P(S-HEMA) üzerine immobilize edilmiştir. Ca^{2+} varlığında, 3 gün içinde 20 kez kullanımı sonucunda başlangıç aktifliklerini sırasıyla %90,0 ve %80,0 koruduğu gözlenmiştir [71].

4.11. Termal İnaktivasyon

4.11.1. Serbest glukoz izomerazın termal inaktivasyonu

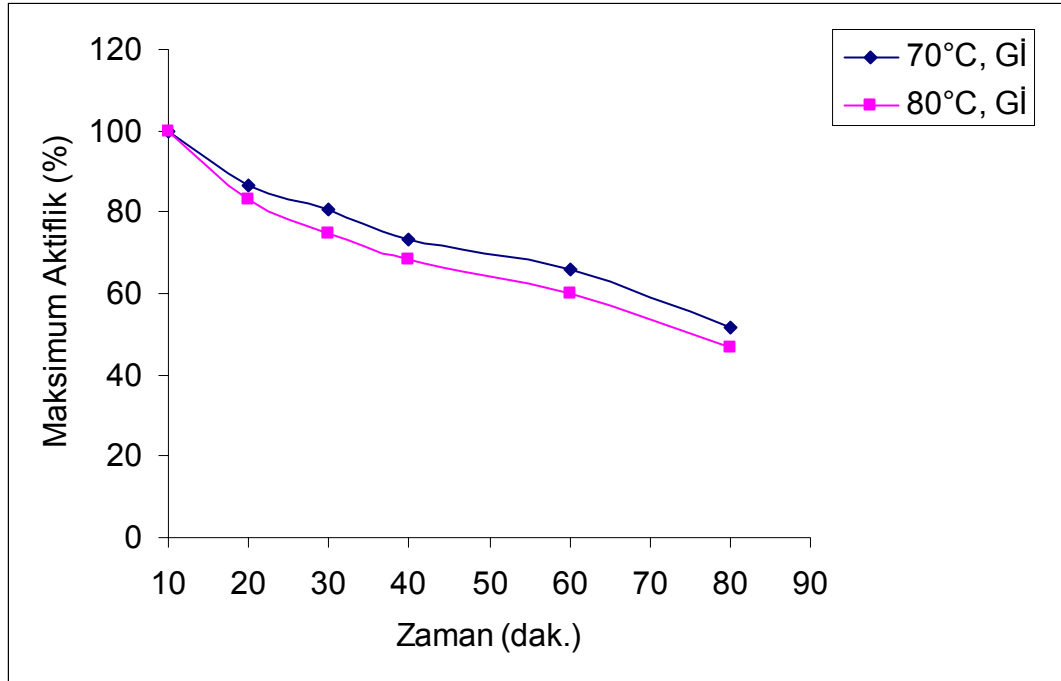
Serbest Gl' nın termal inaktivasyonunu incelenmek amacıyla 70°C ve 80°C' de ve farklı zaman aralıklarında (10-80 dakika) inkübe edilen enzim çözeltilerinin aktiflikleri tayin edilmiştir. Serbest Gl' nın 70 °C ve 80 °C' de termal kararlılığı Çizelge 4.16 ve 4.17' de verilmiş, sıcaklığın etkisi Şekil 4.16' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. Serbest Gl' nın 70°C' de termal kararlılığı

Zaman	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
10	0,136	2,44	100,0
20	0,118	2,12	86,8
30	0,110	1,97	80,7
40	0,100	1,79	73,4
60	0,090	1,61	66,0
80	0,070	1,26	51,6

Çizelge 4.17. Serbest Gl' nın 80°C' de termal kararlılığı

Zaman	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
10	0,119	2,15	100
20	0,100	1,79	83,2
30	0,090	1,61	74,8
40	0,082	1,47	68,4
60	0,072	1,29	60
80	0,056	1,01	46,9



Şekil 4.16. Serbest GI' nin termal kararlılığına sıcaklığın etkisi

Serbest GI' nin 70°C' de 40. dakikadan sonra başlangıç aktivliğinin %73,4' ünü, 80°C' de %68,4' ünü koruduğu gözlenmiştir.

4.11.2. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın termal inaktivasyonu

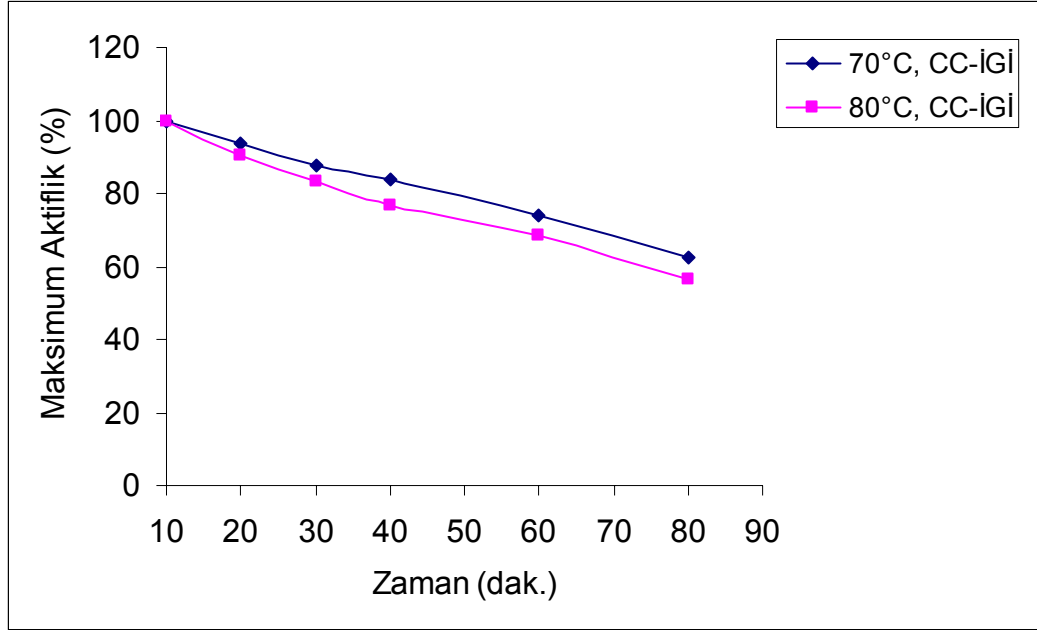
CC-İGI' nin termal inaktivasyonunu incelenmek amacıyla 70°C ve 80°C' de, ve farklı zaman aralıklarında (10-80 dakika) inkübe edilen CC-İGI' nin aktiflikleri tayin edilmiştir. CC-İGI' nin 70 °C ve 80 °C' de termal kararlılığı Çizelge 4.18 ve Çizelge 4.19' da, sıcaklığın etkisi Şekil 4.17' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın 70°C' de termal kararlılığı

Zaman	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
10	0,089	1,60	100,0
20	0,084	1,50	93,8
30	0,078	1,40	87,5
40	0,075	1,34	83,7
60	0,066	1,18	73,8
80	0,056	1,00	62,5

Çizelge 4.19. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın 80°C' de termal kararlılığı

Zaman	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
10	0,076	1,36	100,0
20	0,069	1,23	90,4
30	0,063	1,13	83,1
40	0,058	1,04	76,5
60	0,052	0,93	68,4
80	0,043	0,77	56,6



Şekil 4.17. Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi

Siyanürik klorürle aktifleştirilen immobilize glukoz izomeraz 70 °C' de 40. dakikadan sonra başlangıç aktifliğinin %83,7' sini, 80 °C' de %76,5' ini koruduğu gözlenmiştir.

4.11.3. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın termal inaktivasyonu

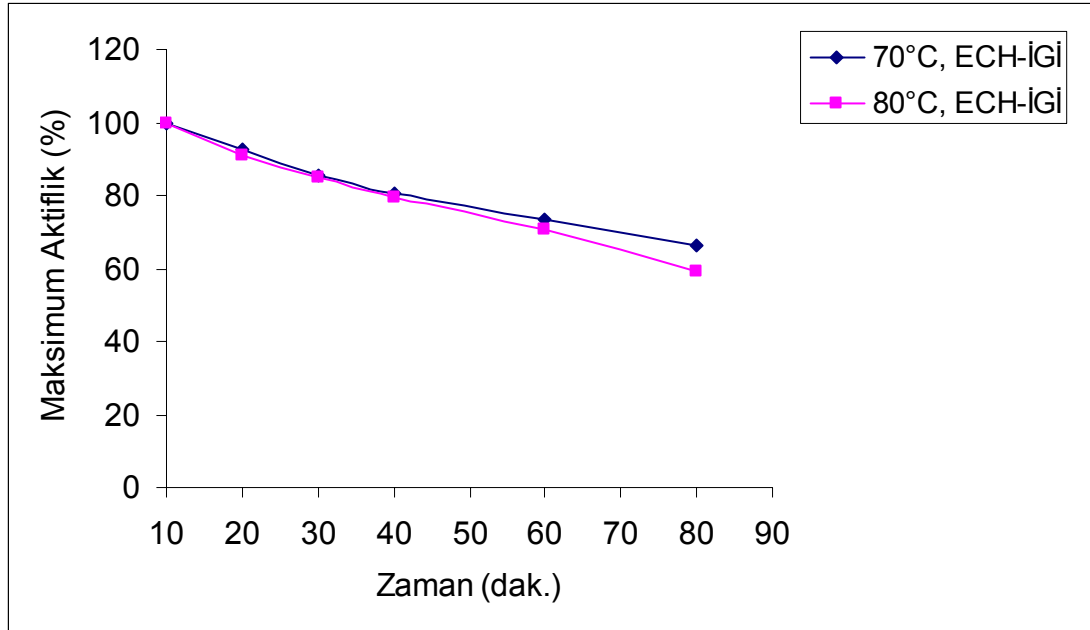
ECH-İGi' nin termal inaktivasyonunu incelenmek amacıyla 70°C ve 80°C' de, ve farklı zaman aralıklarında (10-80 dakika) inkübe edilen ECH-İGi' nin aktiflikleri tayin edilmiştir. ECH-İGi' nin 70 °C ve 80 °C' de termal kararlılığı Çizelge 4.20 ve Çizelge 4.21' de, sıcaklığın etkisi Şekil 4.18' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın 70°C' de termal kararlılığı

Zaman	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
10	0,058	1,22	100,0
20	0,052	1,11	90,9
30	0,048	1,04	85,2
40	0,044	0,97	79,5
60	0,038	0,86	70,5
80	0,030	0,72	59,0

Çizelge 4.21. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın 80°C' de termal kararlılığı

Zaman	Absorbans Değişimi (ΔA_{566})	Aktiflik ($\times 10^{-6}$ mol/L.dak)	Maksimum Aktiflik (%)
10	0,084	1,51	100,0
20	0,078	1,40	92,7
30	0,072	1,29	85,4
40	0,068	1,22	80,8
60	0,062	1,11	73,5
80	0,056	1,00	66,2



Şekil 4.18. Epiklorhidrin ile aktifleştirilen immobilize glukoz izomerazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi

Epiklorhidrinle aktifleştirilen immobilize glukoz izomeraz 70°C’ de 40. dakikadan sonra başlangıç aktivitesinin %79,5’ ini, 80°C de %80,8’ ini koruduğu gözlenmiştir.

Enzim inaktivasyonu için birinci dereceden tepkime kinetiğine göre aşağıdaki eşitlikler yazılır.

$$\frac{-dA}{dt} = k_i \times A_0 \quad (4.1)$$

$$\ln A_t = -k_i \cdot t + \ln A_0 \quad (4.2)$$

Burada A_0 ve A_t sırasıyla başlangıçtaki ve t anındaki aktiflikleri gösterir. Sebest Gİ, CC-İGİ ve ECH-İGİ için çizilen $\ln A_t - t$ grafikleri yardımıyla hesaplanan inaktivasyon hız sabitleri, k_i değerleri Çizelge 4.22’ de verilmiştir.

Ayrıca birinci derece tepkime kinetiğine göre yarılanma süreleri, $t_{1/2}$ hesaplanmıştır.

Çizelge 4.22. Serbest Gİ, CC-İGİ ve ECH-İGİ farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon sabitleri ve yarılanma süreleri

Enzim	70°C		80°C	
	k_i (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak.)	k_i (dak ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dak.)
Serbest Gİ	$8,0 \times 10^{-3}$	87	$1,0 \times 10^{-2}$	70
CC-İGİ	$5,5 \times 10^{-3}$	126	$8,0 \times 10^{-3}$	87
ECH-İGİ	$6,0 \times 10^{-3}$	116	$7,0 \times 10^{-3}$	99

Serbest Gİ, CC-İGİ ve ECH-İGİ' nin k_i değerleri sıcaklıkla artmıştır. Ayrıca serbest Gİ' nin 70 °C ve 80 °C' deki k_i değerleri, CC-İGİ ve ECH-İGİ' nin aynı sıcaklıklardaki k_i değerlerinden daha büyüktür. Bu sonuçlardan sıcaklık artışıyla enzim denatürasyonunun arttığı ve immobilize enzimlerin serbest enzime göre denatürasyona karşı daha dirençli olduğu söylenebilir. Converti A. ve Del Borghi M. *Streptomyces Murinus* dan elde edilen serbest Gİ enzimi için 70 °C ve 80 °C de k_i değerlerini sırasıyla 0,2306 saat⁻¹ ve 2,380 saat⁻¹ immobilize glukoz izomeras için sırasıyla 0,0062 saat⁻¹ ve 0,0343 saat⁻¹ olarak bulmuşlardır [72].

4.12. Enzim Bağlanma Kapasitesi

CC-İGİ ve ECH-İGİ için enzim bağlanma kapasitesi sırasıyla %72 ve %75 olarak bulunmuştur.

5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Süspansiyon polimerleşmesi tekniği ile sentezlenen P(MMA-HEMA) mikroboncukları küreseldir. Mikroboncukların, hacimce %14' ünün çapı 33 μm ile 93 μm arasında, hacimce %40' ının çapı 100 μm ile 197 μm arasında ve geriye kalan hacimce %46' sının çapı 212 μm ile 879 μm arasında değişme göstermiştir.
2. Siyanürik klorür ve epiklorhidrin ile aktifleştirilen P(MMA-HEMA) mikroboncuklarına kovalent bağlanma ile Gİ immobilize edilmiştir.
3. Serbest Gİ için optimum pH değeri 7,5, CC-İGİ ve ECH-İGİ için pH değeri 8,0 olarak bulunmuştur.
4. Serbest Gİ için optimum sıcaklık 60 °C, CC-İGİ ve ECH-İGİ için optimum sıcaklık 65 °C olarak bulunmuştur.
5. Serbest Gİ için K_m değeri $6,50 \times 10^{-5}$ mol/L, V_{mak} değeri $2,42 \times 10^{-5}$ mol/L.dak, olarak bulunmuştur.
6. CC-İGİ için K_m değeri $1,26 \times 10^{-4}$ mol/L, V_{mak} değeri $4,18 \times 10^{-5}$ mol/L.dak, olarak bulunmuştur.
7. ECH-İGİ için K_m değeri $2,55 \times 10^{-4}$ mol/L, V_{mak} değeri $3,46 \times 10^{-5}$ mol/L.dak, olarak bulunmuştur.
8. Serbest Gİ' in, 42 gün, 4 °C' de depolanması sonucunda başlangıç aktifliğinin %56,4' ünü korumuştur.

9. CC-İGİ ve ECH-İGİ 42 gün, 4 °C' de depolanması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 67' sini ve % 67,4' ünü korumuştur.

10. CC-İGİ ve ECH-İGİ' in 110 dakika boyunca kolonda sürekli kullanımı sonucunda başlangıç aktifliğinin %73,6' sını ve %78,8' ini koruduğu gözlenmiştir.

11. CC-İGİ ve ECH-İGİ için enzim bağlanma kapasitesi sırasıyla %72 ve %75 olarak bulunmuştur.

12. Serbest Gİ, CC-İGİ ve ECH-İGİ' nin k_i değerleri sıcaklıkla artmıştır. Ayrıca serbest Gİ' nin 70 °C ve 80 °C' deki k_i değerleri, CC-İGİ ve ECH-İGİ' nin aynı sıcaklıklardaki k_i değerlerinden daha büyüktür.

KAYNAKLAR

1. Bailey, J. E. ve Ollis, F. D., "Biochemical Engineering Fundamentals 2nd ed.", **McGraw Hill International Editions**, New York 984-985 (1986).
2. Geminos, G., Greenfield, P.F., "An enzymatic technique for the detection of dextran in cane juice and prediction of viscosity increases", **Int. Sugar J.**, 80: 227-231 (1978).
3. Zaborsky, O., "Immobilized Enzyme", **CRC Pres**, Ohio, 1-3 (1973).
4. Onat T., Emerk K., Sözmen, E.Y., "İnsan Biyokimyası", **Palme Yayıncılık**, Ankara, 197-202 (2002).
5. Aksoy, C., Yanardağ, R., "Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu" Yüksek Lisans Tezi, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 1-2 (2003).
6. Tekman, Ş., Öner, N., "Genel Biyokimya", **İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi**, İstanbul, 47 (1994).
7. Tüzün, C., "Biyokimya", **Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi**, Ankara, 131-133 (1997).
8. Bailey, J. E., Gllis, F.D., "Biochemical Engineering Fundamentals", **Mc Graw Hill**, New York, 984-985 (1986).
9. Telefoncu, A., "Enzimoloji", **Ege Üniversitesi Fen Fakültesi**, İzmir, 1-305 (1997).
10. Telefoncu A., "İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri", Temel ve Uygulamalı Enzimoloji , **Ege Üniversitesi Fen Fakültesi**, İzmir, 193-249 (1986).
11. Tahran, L. and Uslan, A., "Characterization and operational stability of immobilized catalase", **Process Biochem.**, 14: 345-373 (1990).
12. Howard, H., Weetall., "Storage stability of water-insoluble enzymes covalently coupled to organic and inorganic carries", **Biochem. Biophys. Acta**, 212: 1-7 (1970).
13. Aksoy, C., Yanardağ, R., "Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 1-10 (2003).
14. Rempp, P., Merril, E.W., "Polymers", Polymer Synthesis 2nd ed, **Hutting&Wepf.**, USA, 331-320 (1991).

15. Shan, Y., Shan, D., "Immobilized enzymes; industrial biocatalysts", **Ind. J. Hosp. Pharm.**, 29 (2) :51-58 (1992).
16. Trevon, M.D., "Techniques Of Immobilization In Immobilized Enzyme", **John Wiley and Sons**, New York, 1-11 (1985).
17. Monsan, P., Combes, D., "Enzyme Stabilization By Immobilization, Methods In Enzymology", **Academic Pres**, New York, 137 (1988).
18. Wiseman, A., "Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd ed.", **John Wiley&Sons Chicester**, İngiltere, 12 (1986).
19. Chase, H., A. and Yang, Y., "Immobilization of α -amilase on poly(vinyl alcohol)-coated perfluoro polymer supports for use in enzyme reactors", **Biotechnol. Biochem.**, 28: 145-154 (1998).
20. Zaborsky, O., "Adsorption In Immobilize Enzyme", **CRC.Press.**, Ohio, 75-78 (1973).
21. Srere, P., A., Uyeda, K., "Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices methods in enzymology". ed. by Mosboch ,K., **Academic Pres, Inc.**, New York , 11-19 (1987).
22. Zaborsky, O., "Covalent attachment to water-insoluble functionalized polymers", Immobilized enzyme, **CRC Pres**, Ohio, 5-27 (1974).
23. Valentova, M., M., Svec., F., Stamberg, J., Vodrazka, Z., "Comparisaon of different methods of glucose oxidase immobilization", **Biotechnol. Bioeng.**, 23: 1093-2104 (1981).
24. Axen, R., Ernback, S., "Chemical fixation of enzyme to cyanogen Halide activated polysaccharide carrier", **Eur. J. Biochem.**, 18: 351-357 (1971).
25. Dumitriv, S., Papu, M., Dumitriv, M., "Polymeric biomaterials as enzyme and drup carriers", **J. Bioact. Compat. Pol.**, 3: 243-312 (1988).
26. Gerharts, W., "Enzyme in Industry", Production And Applications, **UCH Velosgesellschaft Mblt**, Weinheim, 35-43 (1990).
27. Zaborsky, O., " Biomedical Application Of Immobilized Enzymes Proteins", Chang T.M.S., **Plenum**, New York, 237-262 (1977).
28. Boz, B.G., "Üreaz enziminin polianilin'e immobilizasyonu ile üreye duyarlı enzim mikroeletrotunun hazırlanması", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 28-55 (2001).

29. Jones, J., B., Sh., C., S., Periman, D., "Techniques in Chemistry", Mosboch, K., **Interscience Publisher**, New York, 969 (1976).
30. Chang, T. M. S., "Microcapsules of artifical cells", **Science**, 146: 524-530 (1964).
31. Chang, T. M. S., "Microencapsulation of enzymes and biological methods in enzymology", **Academis Press Inc.**, New York, 44: 201-218 (1976).
32. Arica, Y. M., Hasirci, V. N., "Immobilization for the production of membranes", **Biomaterials**, 8: 489-495 (1987).
33. Kaetsu., I., Kamura, M., Yoshida, M., "Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low temperature", **Biotechnol. Bioeng.**, 21: 847-861 (1979).
34. Dadvar, M. and Sahimi, M., "Pore network model of deactivation of immobilized glucose isomerase in packed-bed reactors II: three-dimensional simulation at the particle level", **Chem. Eng. Sci.**, 57: 939-952 (2002).
35. Marshall, R. O., Kooi, E. R., "Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose", **Science**, 125 (3249): 648-649 (1957).
36. Takasaki, Y., "Kinetic and equilibrium studies on D-glucose-D-fructose isomerization catalyzed by glucose isomerase from. *Streptomyces* sp., **Agr. Biol. Chem.**, 31: 309 (1967).
37. Converti, A. and Borghi, M. D., "Simultaneous effects of immobilization and substrate protection on the thermodynamics of glucose isomerase activity and inactivation", **Enzyme Microb. Tech.**, 21: 511-517 (1997).
38. Lloyd, N. E. and Nelson, W. J., "Glucose and fructose containing sweetners from starch", Starch-Chemistry and Technology, **Academic Prees**, New York, 611-660 (1984).
39. Mac, A. R., "Manufacture of high fructose corn syrup using immobilized glucose isomerase", Immobilized Enzyme for Food Processing, (Pitcher, W., Ed.), **CRC Press**, Boca Raton, 81-111 (1980).
40. Ramagopal U. A., Dauter M., Dauter Z., "SAD manganese in two crystal forms of glucose isomerase", **Acta crystallographica Section D**, 59: 75-868 (2003).

41. Gram, J., Bang, M. D. And Villadsen, J., "An automated glucose isomerase reactor system with online flow injection analyzers for monitoring of pH, glucose and fructose concentrations", **Chem. Eng. Sci.**, 45: 1031-1042 (1990).
42. Palazzi, E. and Converti, A., "Generalized linearization of kinetics of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase", **Biotechnol. Bioeng.**, 63 (3): 273-284 (1999).
43. Ge, Y., Wang, Y., Zhou, H., Wang, S., Tong, Y. and Li, W., "Coimmobilization of glucoamylase and glucose isomerase by molecular deposition technique for one-step conversion of dextrin to fructose", **J. Biotechnol.**, 67: 33-40 (1999).
44. Chen, K. C. and Wu, J. K., "Substrate protection of immobilized glucose isomerase", **Biotechnol. Bioeng.**, 30: 817-824 (1987).
45. Roels, J. A., "Energetics and kinetics in biotechnology", **Elsevier**, Amsterdam, 163-203 (1983).
46. Uludağ, B. Y., "İmmobilize glucoamilaz ile maltodekstrinden glukoz üretimi", Yüksek Lisans Tezi, **Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü**, Gebze, 20-22 (2000).
47. Olsan, A. "Glucose and glucose containing syrups", Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, **VCH Publishers**, New York, A.12: 457-475 (1991).
48. Lee, Y.Y., Fratzke, A. R., Wun, K. and Tsao, G.T., "Glucose isomerase immobilized on porous glass", **Biotechnol. Bioeng.**, 18: 389-413 (1976).
49. Ryu, D.Y., Chung, S. H., "Performance of the continuous glucose isomerase reactor system for the production of fructose syrup", **Biotechnol. Bioeng.**, 19: 159-184 (1977).
50. W. P. Chen ve A. W. Anderson, "Purification, immobilization and some properties of glucose isomerase from streptomyces flavogriseus", **Appl. Environ. Microb.**, 38 (6): 1111-1119 (1979).
51. Gong, C. S., Chen, L. F. and Tsao, G. T., "Purification and properties of glucose isomerase of actinoplanes missouriensis", **Biotechnol. Bioeng.**, 22: 833-845 (1980).
52. Gaikwad, M. S., Deshpande, V. V., "Immobilization of glucose isomerase on Indion 48-R", **Enzy. Micro. Technol.**, 14 (10): 855-858 (1992).

53. Houn, J. Y., Yu, H. Y., Chen, K. C. and Tiu, C., "Analysis of substrate protection of an immobilized glucose isomerase reactor", **Biotechnol. Bioeng.**, 41: 451-458 (1993).
54. Fournier, R. L., Varanasi, S., Byers, J. P. and Chen, G. D., "Demonstration of pH control in a commercial immobilized glucose isomerase", **Biotechnol. Bioeng.**, 52: 718-722 (1996).
55. Weigel, B., Hitzmann, B., Kretzmer, G., Schügerl, K., Huwig, A. and Giffhorn, F., "Analysis of various sugars by means of immobilized enzyme coupled flow injection analysis", **J. Biotechnol.**, 50: 93-106 (1996).
56. Bravo, V., Jurado, E., Luzon, G. and Cruz, N., "Kinetics of fructose-glucose isomerization with Sweetzym Type A", **Can. J. Chem. Eng.**, 76: 778 (1998).
57. Ge, Y. B., Zhou, H., Kong, W., Tong, Y., Wang, S. Y. and Li, W., "Immobilization of glucose isomerase and its application in continuous production of high fructose syrup", **Appl. Biochem. Biotech.**, 69 (3): 203-215 (1998).
58. Lee, H. S. And Hong, J., "Kinetics of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase: anomeric reactivity of D-glucose in kinetic model", **J. Biotechnol.**, 84: 145-153 (2000).
59. Mishra, A., Debnath, M., "Effect of pH on simultaneous saccharification and isomerization by glucoamylase and glucose isomerase", **Appl. Biochem. Biotech.**, 102: 193-199 (2002).
60. Gancarz, I., Bryjak, J., Pozniak, G., Tylus, W., "Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization II. Amines plasma", **Eur. Polym. J.**, 39: 2217-2224 (2003)
61. Sapunova, L. I., Lobanok, A. G., Parakhnia, E. V., Kazakevich, I. O., "Xylose (glucose) isomerase reactivity of immobilized *Arthrobacter* sp.", **Mikrobiology**, 72: 395-399 (2003).
62. Salehi, Z., Sohrabi, M., Kaghazchi, T., Bonakdarpour, B., "Application of down jet loop bioreactors in implementation and kinetic determination of solid-liquid enzyme reactions", **Process Biochem.** 40: 2455-2460 (2005).
63. Silva da borges, A.E, Souza de Ulson, A.A., Souza de U Geleli, S., Rodrigues E. A., "Analysis of the high-fructose syrup production using reactive SMB technology", **Chem. Eng. J.**, 118: 167-181 (2006)

64. Demirel, G., Özçetin, G., Şahin, F., Tümtürk, H., Aksoy, S., Hasirci, N., "Semi-interpenetrating polymer networks (IPNs) for entrapment of glucose isomerase", **React. Funct. Polym.**, 66: 389-394 (2006).
65. Takasaki, Y., "Studies on sugar isomerizing enzymes", **J. Agric. Biol. Chem.**, 31: 37 (1976).
66. Pappel, K., Kostner, A., "Glucose isomerase", **Chem. Abstr.**, 79: 72 (1973).
67. Strumeyer, D. H., Constantinides, A. and Freudenberger, I., "Preparation and characterization of α -amylase immobilized on collagen membranes", **J. Food. Sci.**, 39: 498-502 (1974).
68. Kiseleva, E. M., Mirgorodskaya, O. A., Momot, N. N., Avizhenis, V., Moskvichev, B. V. And Samsonov, G. V., "Kinetics of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase" **Prikl. Biokhim. Mikrobial.**, 13: 577 (1977).
69. Arica, Y. M., Hasirci, V. N., "Immobilization of glucose oxidase comparison of entrapment and covalent bonding", **J. Chem. Technol. Biot.**, 58: 287-292 (1993).
70. Aksoy, S., Tümtürk, H., Hasirci, N., "Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres", **J. Biotechnol.**, 60: 37-46 (1998).
71. Aksoy, S., Tümtürk, H., Hasirci, N., "Covalent immobilization of α -amylase onto poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(styrene-2 hydroxyethyl methacrylate) microspheres and the effect of Ca^{2+} ions on the enzyme activity", **Food. Chem.**, 68: 259-266 (2000).
72. Converti, A., Del Borghi, M., "Kinetics of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase in the presence of substrate protection", **Bioprocess. Eng.**, 18: 27-33 (1998).

EKLER

EK-1 Hazırlanan çözeltiler

Çeşitli pH' larda Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (g/250 mL)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g/250 mL)
5,0	0,28	19,50
5,5	0,87	18,90
6,0	2,66	18,34
6,5	7,46	16,25
7,0	17,28	11,97
7,5	29,84	6,50
8,0	38,65	2,66
8,5	42,64	0,93
9,0	44,77	0,29

0,5 M fosfat tamponu hazırlamak için yukarıdaki tabloda verilen miktarlarda $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alınarak damıtık suda çözülüp hacmi 250 mL ye tamamlanmıştır.

Magnezyum Sülfat Çözeltilerinin Hazırlanması (0,05 M)

1,23 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ alınarak damıtık suda çözülüp hacmi 100 mL ye tamamlandı.

Perklorik Asit Çözeltisinin Hazırlanması (0,5 M)

% 65 lik HClO_4 çözeltisinden 4,8 mL alınarak hacmi 100 mL ye tamamlandı.

L-Sistein Çözeltisinin Hazırlanması (% 2 lik)

2 g L-sistein alınarak damıtık suda çözülüp hacmi 100 mL ye tamamlandı.

EK-1 (Devam) Hazırlanan çözeltiler

Sülfürik Asit Çözeltisinin Hazırlanması (% 75 lik)

% 96 lık H_2SO_4 çözeltisinden 78,1 mL alınarak hacmi 100 mL ye tamamlandı.

Karbazol Çözeltisinin Hazırlanması (0,1 M)

60 mg karbazol alınarak 50 mL susuz etanol de (% 96 lık) çözüldü.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ŞAHİN, Ersoy
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 15.09.1977 Ankara
 Medeni hali: : Bekar
 Telefon : 0 (312) 344 57 43
 e-mail : ersoyshintr@mynet.com.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/ Fen Bil. Ens.	2007
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	1999
Lise	Yenimahalle End. Meslek Lisesi	1994

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2002-2005	Milli Eğitim Bakanlığı	Öğretmen
2005-2007	Milli Eğitim Bakanlığı	Müdür V.

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Hobiler

Futbol, Basketbol