

**ATIKSU ÖN ARITIMI İÇİN KOİMMOBİLİZE ENZİM
TASARIMI**

**COIMMOBILIZED ENZYME DESIGNING FOR
WASTEWATER PRETREATMENT**

SİNEM DİKEN GÜR

PROF. DR. NİLÜFER AKSÖZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.

2016

SİNEM DİKEN GÜR' ün hazırladığı 'Atıksu Ön Arıtımı için Ko-immobilize Enzim Tasarımı' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI' nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Başkan

.....
Cihangir

Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Danışman

.....
Aksöz

Prof. Dr. Güven URAZ

Üye

.....
Uraz

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Üye

.....
A. Ergene

Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY

Üye

.....
Seyis Bilkay

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bülent ALTEN

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

SEVGİLİ ANNEME VE BABAMA, CANIM EŞİME VE YAREN'İME

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

09/12/2016



Sinem DİKEN GÜR

ÖZET

ATIKSU ÖN ARITIMI İÇİN KO-İMMOBİLİZE ENZİM TASARIMI

SİNEM DİKEN GÜR

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Aralık 2016, 90 Sayfa

Belirli bir bölgeye katalitik aktivitesini koruyarak yerleştirilmiş, sürekli kullanılabilir ve uzun süre saklanabilir enzimler olarak tanımlanan immobilize enzimler, atıksu arıtım işlemlerinde sert kimyasal ajanların ve uzun süren biyolojik işlemlerin yerini almaktadır.

Bu çalışmada proteaz, pektinaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonu amacıyla Na aljinat, Na aljinat- κ karragenan hidrojel, glutaraldehit ile aktive edilen Na aljinat, ekleme yapılmış Na aljinat ve glutaraldehit ile aktive edilen kitosan boncuklar kullanıldı. Üç enzimin de başarılı bir şekilde ko-immobilize edilebildiği Na aljinat boncuklar ve glutaraldehit ile aktive edilen kitosan boncuklar kullanılarak çalışmaya devam edildi.

Enzimler, Na aljinat boncuklara hapsedilirken glutaraldehit kullanılarak aktive edilen kitosan boncukların yüzeyine kovalent olarak bağlandılar. Karakterizasyon çalışmaları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile gerçekleştirildi. İki farklı destek materyal ve metot kullanılarak ko-immobilize edilen enzimler sıcaklık ve pH stabilitesi, tekrarlanabilirlik ve saklama stabilitesi gibi özellikleri bakımından birbirleriyle karşılaştırıldılar.

İmmobilizasyon verimi ve bağlı aktivitesi daha yüksek olan, tekrarlanabilirlik ve saklama stabilitesi bakımından daha uygun olan enzim ko-immobilize kitosan boncuklar kullanılarak atıksu

ön arıtım işlemleri gerçekleştirildi. Bu amaçla sentetik evsel atıksu, gerçek bir atıksu örneği ve deniz suyu içerisine atık maddeler eklenerek kullanıldı. Deniz suyunda pektinaz enzimi inhibe olurken, α amilaz ve proteazda maksimum giderim miktarları saptandı. Sentetik ve gerçek evsel atıksu örneklerinde ise, ko-immobilize α amilaz ve proteaz enzimlerinin giderim oranları birbirlerine yakın sonuçlar gösterirken, pektinaz için gerçek evsel atıksudaki ürün oluşumu daha yüksek olarak saptandı.

Bu çalışmada atıksu ön arıtımı için glutaraldehit ile aktive kitosan boncuklar kullanılarak α amilaz, proteaz ve pektinaz enzimleri ko-immobilize edildi. Geliştirilen bu materyalin çoklu enzim ko-immobilizasyon çalışmalarının tasarlanması için bir model olacağına ve gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutacağına inanmaktayız.

Anahtar Kelimeler: ko-immobilizasyon, atıksu, ön arıtım, aljinat boncuk, glutaraldehit ile aktive edilen kitosan boncuk, pektinaz, proteaz, α amilaz.

ABSTRACT

CO-IMMOBILISED ENZYME DESIGNING FOR WASTEWATER PRETREATMENT

SİNEM DİKEN GÜR

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

December 2016, 90 Pages

Immobilized enzymes are defined as enzymes physically confined or localized in a particular region with retention of their catalytic activities, and which can be used continuously and stored for a long period; take the place of harsh chemical agents and long-lasting biological processes in the wastewater treatment process.

In this study Na alginate, Na alginate- κ carrageenan hydrogels, Na alginate activated with glutaraldehyde, grafted Na alginate and chitosan activated with glutaraldehyde were used with intent to co-immobilization of protease, pectinase and α amylase enzymes. The study was continued by using Na alginate beads and glutaraldehyde-activated chitosan beads in which three enzymes could be successfully co-immobilized. The enzymes were covalently bond to the surface of chitosan beads activated by glutaraldehyde while entrapped into the Na alginate beads. Characterization studies were performed with scanning electron microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy.

Enzymes, co-immobilized using two different support materials and methods, were compared with each other in terms of temperature and pH stability, reusability and storage stability characteristics. Wastewater pretreatment process was performed by using glutaraldehyde-activated chitosan beads which have a higher immobilization yield and relative activity and are more appropriate in respect

to reproducibility and storage stability. For this purpose, synthetic municipal wastewater, real wastewater sample and sea water were used in which waste materials were added. In sea water, while pectinase enzyme was inhibited, the maximum removal quantity was determined by α amylase and protease. In terms of synthetic and municipal wastewater, while the removal rates of co-immobilized α amylase and protease enzymes showed very close results, it was determined that the product formation of pectinase in municipal wastewater was higher.

In this study, pectinase, protease and α amylase enzymes were co-immobilized using glutaraldehyde activated chitosan beads for pre-treatment of wastewater. We believe that this developed material will be a model for the design of multi enzyme co-immobilization studies and will shed light on future researches on this topic.

Key words: co-immobilization, wastewater, pretreatment, alginate bead, glutaraldehyde activated chitosan bead, pectinase, protease, α amylase.

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca beni anlayışla destekleyen ve engin bilgisiyle her zaman yanımda olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ' e

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Erol AKSÖZ' e

Tez çalışmalarım boyunca manevi desteği ve bilimsel katkıları ile yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Güven URAZ' a

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesiyle destek olan ve fikirleriyle tezime katkıda bulunan değerli hocam Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR' e

Lisans eğitimimden bu yana benden yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY' a

Beni daima yapmak istediğim her iş için yüreklendiren, tüm zor süreçlerimde bilgi ve tecrübesiyle en başından beri her an yanımda olan değerli ablam Dr. Neslihan İDİL' e

Bu zorlu süreç boyunca desteğini hiç esirgemeyen değerli arkadaşım Dr. Hande AVCIOĞLU'na

Tez çalışmalarım boyunca yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK' e

Güler yüzleri ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Dr. Gülcan ŞAHAL, Dr. Doruk ARACAGÖK, Gözde KOŞARSOY AĞÇELİ, Kübra ERKAN TÜRKMEN ve Hasan AKYIL' a

Bana kız kardeş sevgisini yaşatan, hayatımın her anını güzelleştiren ve daima yanımda olan kardeşim Sezen BİLEN ÖZYÜREK' e

Tüm hayatım boyunca ailem olmalarından tarifsiz bir mutluluk ve gurur duyduğum canlarım babam Tekin DİKEN ve annem Sevda DİKEN' e

Her zaman bana destek olan kardeşlerin en yakışıklısı ve en tatlısı Mertcan DİKEN' e

Bana her zaman inanan ve yanımda olan biricik anneannem Yurdagül KURTULUŞ' a

Bana anne olma duygusunu yaşatan, hayatımın anlamı ve eşsiz bebeğim Yaren GÜR' e

Hayatı paylaşmaktan büyük mutluluk duyduğum, bana daima tam olduğumu hissettiren eşim Yusuf GÜR' e

Sonsuz Teşekkürler

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. Enzimler	4
2.1.1. Atıksu Arıtımında Enzimler	4
2.1.2. α amilaz Enziminin Özellikleri ve Atıksu Arıtımında Kullanımları	5
2.1.3. Pektinaz Enziminin Özellikleri ve Atıksu Arıtımında Kullanımları	7
2.1.4. Proteaz Enziminin Özellikleri ve Atıksu Arıtımında Kullanımları.....	8
2.2. Enzim İmmobilizasyonu	9
2.2.1. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları	10
2.2.2. Enzim İmmobilizasyon Metotları.....	10
2.2.2.1. Taşıyıcıya Bağlanma	11
2.2.2.1.1. Fiziksel Adsorbsiyon.....	11
2.2.2.1.2. Kovalent Bağlanma	11
2.2.2.1.3. İyonik Bağlanma	12
2.2.2.2. Çapraz Bağlanma	13
2.2.2.3. Tutuklama ve Kapsülleme.....	14
2.2.3. Enzim İmmobilizasyonunda Destek Materyal Olarak Kullanılan Bazı Doğal Polimerler .	14
2.2.3.1. Aljinat.....	15
2.2.3.2. Karragenan	16
2.2.3.3. Kitosan	17
2.2.4. Destek Materyallerin Aktive Edilmesinde Kullanılan Bazı Ajanlar	18
2.2.4.1. Glutaraldehit.....	18
2.2.4.2. Polietilenimin	20
2.2.5. Enzim Ko-immobilizasyonu	20

3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Kullanılan Enzimler	22
3.2. Enzimatik Aktivite Tayini	22
3.2.1. α amilaz Aktivite Tayini.....	22
3.2.2. Pektinaz Aktivite Tayini.....	22
3.2.3. Proteaz Aktivite Tayini	22
3.3. İmmobilizasyon Verimi ve Yükleme Etkinliği Değerlerinin Hesaplanması	23
3.4. α amilaz, Pektinaz ve Proteaz Enzimlerinin Ko-immobilizasyonu için Uygun Destek Materyal ve İmmobilizasyon Metodunun Seçimi	23
3.4.1. Enzimlerin Aljinat- κ Karragenan Hidrojel ile Tutuklama Yöntemiyle Ko-immobilizasyonu	23
3.4.2. Enzimlerin Glutaraldehit ile Aktive Edilen Na Aljinat Boncuklarda Kovalent Bağlanma ile Ko-immobilizasyonu	24
3.4.3. Enzimlerin Ekleme Yapılmış Na Aljinat Boncuklar ile Ko-immobilizasyonu.....	24
3.4.4. Enzimlerin Na aljinat Jelde Tutuklama Yöntemiyle Ko-immobilizasyonu	25
3.4.5. Na Aljinat Jelde Tutuklama Yöntemiyle Ko-İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu	26
3.4.5.1. Na aljinat Konsantrasyonu	26
3.4.5.2. CaCl_2 Konsantrasyonu	26
3.4.5.3. Enzim Konsantrasyonları	27
3.4.6. Enzimlerin Glutaraldehit Aracılığıyla Kitosan Boncuk Yüzeyine Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Ko-immobilizasyonu.....	27
3.4.6.1. Kitosan Boncukların Hazırlanması	27
3.4.6.2. Kitosan Boncukların Glutaraldehit ile Aktivasyonu	27
3.4.6.3. α amilaz, Pektinaz ve Proteaz Enzimlerinin Aktive Kitosan Boncuklara Ko-İmmobilizasyonu	28
3.4.7. Ko-İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu	29
3.4.7.1. Kitosan Konsantrasyonu	29
3.4.7.2. Glutaraldehit Konsantrasyonu	29
3.4.7.3. Aktivasyon süresi	30
3.4.7.4. İmmobilizasyon Süresi	30
3.4.8. Kitosan Boncukların Karakterizasyonu	30
3.4.8.1. Kitosan Boncukların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	30

3.4.8.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	30
3.5. Serbest ve İki Farklı Destek Materyal Kullanılarak Ko-immobilize Edilen Enzimlerin Bazı Özelliklerinin Saptanması	30
3.5.1. Optimum Çalışma Sıcaklıklarının Belirlenmesi	30
3.5.2. Optimum Çalışma pH' larının Belirlenmesi	31
3.5.3. Termal Kararlılıklarının Saptanması	31
3.5.4. pH Kararlılıklarının Saptanması.....	31
3.5.5. Depolama Kararlılıklarının Saptanması	31
3.5.6. Operasyon Kararlılıklarının Saptanması	32
3.6. Aktive Edilmiş Kitosan Boncuklara Ko-immobilize Enzimlerle Atıksu Ön Arıtımı	32
4. SONUÇ ve TARTIŞMA	34
4.1. α amilaz, Pektinaz ve Proteaz Enzimlerinin Ko-immobilizasyonu İçin Uygun Destek Materyal ve İmmobilizasyon Metodunun Seçimi	34
4.2. α amilaz, Pektinaz ve Proteaz Enzimlerinin Na aljinat Jelde Tutuklama Yöntemiyle Ko-immobilizasyonu	35
4.2.1. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu	36
4.2.1.1. Na Aljinat Konsantrasyonu	36
4.2.1.2. CaCl ₂ Konsantrasyonu	37
4.2.1.3. Yüklenen Enzim Konsantrasyonu	39
4.3. Enzimlerin Glutaraldehit Aracılığıyla Kitosan Boncuk Yüzeyine Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Ko-immobilizasyonu.....	40
4.3.1. Kitosan Boncukların Hazırlanması	40
4.3.2. Kitosan Boncukların Glutaraldehit ile Aktivasyonu	41
4.3.3.1 Kitosan Konsantrasyonu	42
4.3.3.2. Glutaraldehit Konsantrasyonu	44
4.3.3.3. Aktivasyon Süresi	46
4.3.3.4. İmmobilizasyon Süresi.....	47
4.3.4. Glutaraldehit ile Aktive Edilmiş Kitosan boncukların karakterizasyonu.....	49
4.3.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	49
4.4. Serbest ve İki Farklı Destek Materyal Kullanılarak Ko-immobilize Edilen Enzimlerin Bazı Özelliklerinin Saptanması	53
4.4.1. Optimum Çalışma Sıcaklıklarının Belirlenmesi	53
4.4.2. Optimum Çalışma pH' larının Belirlenmesi	57

4.4.4. pH Kararlılıklarının Saptanması.....	62
4.4.5. Depolama Kararlılıklarının Saptanması	63
4.4.6. Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Saptanması.....	68
4.4.7. Atıksuda Ko-immobilize Enzimlerle Ön Arıtım	72
5.YORUM.....	75
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ	89

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

CNBr	Siyanojen Bromür
α	Alfa
β	Beta
NH ₂	Amino
COOH	Karboksil
OH	Hidroksil
SH	Sülfidril
Ca ⁺²	Kalsiyum
Ba ⁺²	Baryum
Co ⁺²	Kobalt
Ti ⁺³	Titanyum
Al ⁺³	Alüminyum
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
Na	Sodyum
K ⁺	Potasyum
KDa	Kilo dalton
NaOH	Sodyum hidroksil
ϵ	Epsilon
NH ₃	Amonyak
μ l	Mikro litre

ml	Mililitre
nm	Nano metre
μmol	Mikro mol
mg	Miligram
M	Molarite
rpm	Dakikadaki devir sayısı
w/v	Ağırlık/ Hacim
K_2HPO_4	Di potasyum hidrojen fosfat
g	Gram
l	Litre
mm	Milimetre
CO_2	Karbon di oksit
H^+	Hidrojen
Mg^{+2}	Magnezyum
Mn^{+2}	Manganez
Zn^{+2}	Çinko
Cu^{+2}	Bakır
Co^{+2}	Kobalt
%	Yüzde
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

Kısaltmalar

BOİ	Biyolojik oksijen ihtiyacı
KOİ	Kimyasal oksijen ihtiyacı
DNA	Deoksi ribo nükleik asit
EC	Enzim Komisyonu
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
PEI	Poli etilen imin
Lys	Lizin
DNS	Di nitro salisilik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
PVC	Polivinil klorür
dk	Dakika

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Enzim immobilizasyon metotları.....	10
Şekil 2.2. Na aljinatın yapısı.....	16
Şekil 2.3. κ -Karragenanın moleküler yapısı.....	17
Şekil 2.4. Kitin ve kitosanın moleküler yapısı.....	17
Şekil 3.1. Na aljinat ile tutuklama metodlarında kullanılan düzenek.....	25
Şekil 3.2. Üç enzim ko-immobilize Na aljinat boncuklar.....	26
Şekil 3.3. Kitosan boncukların glutaraldehit ile aktivasyonu sırasında çalkalama amacıyla kullanılan cihaz.....	28
Şekil 3.4. Üç enzim ko-immobilize glutaraldehit ile aktive kitosan boncuklar.....	28
Şekil 3.5. Kitosan boncukların glutaraldehit ile aktivasyonu ve enzim ko-immobilizasyonu.....	29
Şekil 4.1. Na aljinat ile pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağıl aktivitesine farklı Na aljinat konsantrasyonlarının etkisi.....	36
Şekil 4.2. Na aljinat ile pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağıl aktivitesine farklı CaCl_2 konsantrasyonlarının etkisi.....	38
Şekil 4.3. Na aljinat ile pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağıl aktivitesine farklı enzim konsantrasyonlarının etkisi.....	39
Şekil 4.4. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağıl aktivitesine farklı kitosan konsantrasyonlarının etkisi	42
Şekil 4.5. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağıl aktivitesine farklı glutaraldehit konsantrasyonlarının etkisi.....	44

Şekil 4.6. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağıl aktivitesine glutaraldehit ile aktivasyon sürelerinin etkisi.....	46
Şekil 4.7. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağıl aktivitesine farklı enzim bağlanma sürelerinin etkisi	48
Şekil 4.8. Elektron mikroskobu görüntüleri a) kitosan boncuk 130x büyütmede b) kitosan boncuk 10000x büyütmede c) glutaraldehit ile aktive kitosan boncuk 130x büyütmede d) glutaraldehit ile aktive kitosan boncuk 10000x büyütmede.....	50
Şekil 4.9. Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri a) kitosan boncuk 40000x büyütmede b) glutaraldehit ile aktive kitosan boncuk 40000x büyütmede c) enzim immobilize kitosan boncuk 40000x büyütmede.....	51
Şekil 4.10. Normal kitosan, glutaraldehit ile aktive ve enzim ko-immobilize kitosan boncukların FTIR analizi sonuçları.....	52
Şekil 4.11. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize pektinaz enzimlerinin spesifik aktivitesine farklı sıcaklık değerlerinin etkisi.....	53
Şekil 4.12. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize proteaz enzimlerinin spesifik aktivitesine farklı sıcaklık değerlerinin etkisi.....	54
Şekil 4.13. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize α amilaz enzimlerinin spesifik aktivitesine farklı sıcaklık değerlerinin etkisi.....	55
Şekil 4.14. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize pektinaz enzimlerinin spesifik aktivitesine farklı pH değerlerinin etkisi.....	57
Şekil 4.15. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize α amilaz enzimlerinin spesifik aktivitesine farklı pH değerlerinin etkisi.....	58
Şekil 4.16. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize proteaz enzimlerinin spesifik aktivitesine farklı pH değerlerinin etkisi.....	59

Şekil 4.17. Na aljinat ve kitosana ko-immobilize pektinaz enziminin farklı sıcaklık değerlerinde tutulduklarında kalan aktiviteleri.....	60
Şekil 4.18. Na aljinat ve kitosana ko-immobilize proteaz enziminin farklı sıcaklık değerlerinde tutulduklarında kalan aktiviteleri.....	61
Şekil 4.19. Na aljinat ve kitosana ko-immobilize α amilaz enziminin farklı sıcaklık değerlerinde tutulduklarında kalan aktiviteleri.....	62
Şekil 4.20. Kitosana ko-immobilize α amilaz, proteaz ve pektinaz enzimlerinin farklı pH' larda bekletildiklerinde bağıl aktiviteleri.....	63
Şekil 4.21. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize α amilaz enziminin +4°C' deki depolanma sürelerine göre bağıl aktiviteleri.....	64
Şekil 4.22. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize α amilaz enziminin 25°C' deki depolanma sürelerine göre bağıl aktiviteleri.....	65
Şekil 4.23. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize proteaz enziminin +4°C' deki depolanma sürelerine göre bağıl aktiviteleri.....	65
Şekil 4.24. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize proteaz enziminin 25°C' deki depolanma sürelerine göre bağıl aktiviteleri.....	66
Şekil 4.25. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize pektinaz enziminin +4°C' deki depolanma sürelerine göre bağıl aktiviteleri.....	67
Şekil 4.26. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize pektinaz enziminin 25°C' deki depolanma sürelerine göre bağıl aktiviteleri.....	67
Şekil 4.27. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize proteaz enziminin tekrar kullanım sayısına göre bağıl aktiviteleri.....	69
Şekil 4.28. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize α amilaz enziminin tekrar kullanım sayısına göre bağıl aktiviteleri.....	70
Şekil 4.29. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize pektinaz enziminin tekrar kullanım sayısına göre bağıl aktiviteleri.....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2. 1. α amilazın endüstriyel uygulamaları ve elde edildikleri kaynaklar.....	6
Çizelge 3.1. Atıksu olarak kullanılan modifiye sentetik evsel atıksuyun kimyasal kompozisyonu.....	33
Çizelge 4.1. Na aljinat boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı Na aljinat konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi.....	37
Çizelge 4.2. Na aljinat boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı CaCl_2 konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi.....	38
Çizelge 4.3. Na aljinat boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı enzim konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi.....	40
Çizelge 4.4. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı kitosan konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği değerleri üzerindeki etkisi.....	43
Çizelge 4.5. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı glutaraldehit konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği değerleri üzerindeki etkisi.....	45
Çizelge 4.6. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı aktivasyon sürelerinin immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği değerleri üzerindeki etkisi.....	47
Çizelge 4.7. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı immobilizasyon sürelerinin immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği değerleri üzerindeki etkisi.....	48
Çizelge 4.8. Literatürde yer alan bazı ko-immobilizasyon çalışmaları.....	71

Çizelge 4.9. Kitosan boncuklara ko-immobilize α amilaz, proteaz ve pektinaz enzimlerinin 3 farklı atıksu ortamındaki giderim miktarları (%) ya da yıkım sonucu oluşan ürün miktarları (mg).....73

1. GİRİŞ

Ekosistemlerin tümünde yer alan canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri tatlı su kaynaklarının yeterliliğine bağlıdır. Dünya’ da ki su rezervlerinin % 97’ si tuzlu su, % 2.6’ sı kutuplarda buzullar şeklinde ve sadece % 0.4 kadarı kullanılabilir tatlı su kaynağı halinde bulunmaktadır. Bu tatlı suyun bir kısmı doğadaki su döngüsüne katılmaz, kalan kısım ise canlılar arasında paylaşılmaktadır. İnsan gereksinimi için harcanan su ise tarımsal, yaşamsal ve endüstriyel amaçlar için tüketilmektedir. Tuzlu su ve tatlı su kaynaklarında oluşan kirliliğin en önemli sebebi yetersiz arıtılmış endüstriyel ve kentsel atıksuların bu ortamlara deşarjıdır. Bu atıksularda yer alan kirleticilerin büyük bir kısmı biyobozunabilir olmakla birlikte içlerindeki toplam katı miktarı, biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ) ya da kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) gibi değerlerin artışı bakımından çok ciddi çevresel etkilere neden olurlar [1].

Kentlerdeki genel kullanım sonucunda açığa çıkan atıksuların, % 99’ u su olup içerisinde organik ve inorganik bileşenlerin yer aldığı kompleks bir karışım halindedir. Organik bileşenlerinin % 90’ ını ise karbonhidratlar ve proteinler oluşturmaktadır [2],[3]. Endüstriyel atıksu kompozisyonları ise endüstrinin ve işlenen materyalin tipine bağlı olarak çok büyük değişimler gösterebilmektedirler [4]. Bu atıksulardan bazıları organik olarak çok yüklü ve biyobozunurluğu yüksek iken bazıları inorganik ya da biyolojik üremeyi inhibe edici karakterdedir. Biyobozunurluğu yüksek olan organik maddeler içeren atıksuların sucul ekosistemlere karışması canlıların direkt ölümüne yol açmasa da sucul yaşam üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Bu maddeler su içerisine ışığın girişine engel olarak fotosentez mekanizmasına ve fotosentetik organizmaların üremesine engel olurlar. Bu durum ise besin piramidinin en alt basamağının küçülmesine neden olarak bölgedeki besin zincirini etkiler. Su kaynaklarında havadan çözülmüş olarak alınan ve fotosentetik faaliyet sonucunda oluşan oksijenin bileşkesi olan bir çözülmüş oksijen değeri vardır. Normal durumlarda bu değeri korunabilir ancak atıksu deşarjı neticesinde çözülmüş oksijen seviyesi bir kez düştüğünde aynı değerlerin tekrar yakalanması zordur. Bunun sonucu olarak anaerobik aktivite ve dolayısı ile kötü koku oluşumu artar [3],[4],[5].

Atıksuların sucul ekosistemlere boşalmadan önce fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik özelliklerini tekrar kazanmalarının sağlanması için sıklıkla fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtım yöntemlerinden faydalanılmaktadır. Birçok işe uygun katalizörler olan ve biyoteknolojide giderek artan sayıda uygulama alanına sahip enzimler, geleneksel arıtım yöntemlerinden daha avantajlı oldukları için arıtım proseslerinde giderek daha çok kullanılmaya başlanmıştır [6]. Enzimlerden,

tarımsal sanayi, yağ, deterjan, hayvan yemi, tekstil, petrol, kağıt endüstrisi, kimyasal ve biyokimyasal endüstri gibi çok sayıda farklı endüstride çevrenin korunması amacıyla yararlanılmaktadır. Ayrıca enzimler atık yönetiminde de kullanılmaları sayesinde çevrenin korunmasına yardımcı olmaktadır. Enzimler atık arıtım işlemlerinde kullanılan biyolojik ve kimyasal yöntemlere göre çeşitli avantajlara da sahiptir. Biyolojik arıtım işlemlerinde sınırlayıcı birtakım faktörler bulunmaktadır. Bazen mikrobiyal remediasyon sırasında ortama inoküle edilen mikroorganizmalar ortamda var olan popülasyonla rekabette zayıf kalmaktadır. Ayrıca mikroorganizmaların kültürasyonu hem zaman almakta hem de maliyeti arttırmaktadır. Ekstrem pH, sıcaklık değerleri, toksinlerin, predatörlerin, ya da kirleticilerin konsantrasyonlarının yüksek olması gibi durumlarda mikroorganizmalar geridönüşümsüz olarak zarar görebilir ya da metabolik faaliyetleri inaktif hale gelebilmektedir. Enzimler ise ekstrem koşullarda da çalışabilmektedirler. Enzimler arıtım işlemlerinde sert koşulların ve sert kimyasalların yerini almaktadır. Bu durum kimyasal ajanlara göre daha ılımlı koşullarda fonksiyonel olmalarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca yüksek spesifikliğe sahip olmaları nedeniyle biyoyıkım sırasında istenmeyen toksik yan ürünlerin oluşumu en aza inmektedir. Arıtmadan sonra ise enzimler ortamda doğal olarak bulunan mikrobiyal popülasyon tarafından degrade edilebilirken, canlı hücrelerin kullanıldığı biyolojik arıtım proseslerinde canlı kütlelerin oluşturduğu çamurun uzaklaştırılması için ek bir prosedürün uygulanması gerekmektedir. Arıtım proseslerinde enzimlerin kullanılmalarının diğer bir avantajı ise arıtımın gerçekleştirileceği ortama ve atık maddeye bağlı olarak istenilen stabiliteyi ve yüksek aktiviteyi gösteren enzimlerin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak düşük maliyetlerle yüksek oranda üretilebiliyor olmasıdır [7],[8]. Ancak serbest enzimlerin biyoremediyasyon ve biyodegradasyon işlemlerinde kullanımı, arıtım sırasında maliyeti arttıran en önemli faktör enzimler olduğu için mümkün değildir. Bu nedenle atıksu arıtım proseslerinde, fiziksel olarak hapsedilmiş veya kesin olarak tanımlanmış bir bölgeye, sahip oldukları katalitik aktiviteyi koruyarak yerleştirilmiş, tekrarlı ve sürekli olarak kullanılabilen enzimler olarak tanımlanabilen immobilize enzimlerin kullanımı tercih edilmektedir. İmmobilizasyon, enzimlerin canlılarda çoğunlukla hücre membranlarına tutunarak sağladıkları doğal enzim modunu taklit ederek, enzim yapısını dolayısıyla da aktivitesini kararlı hale getirir. Bu durum, immobilize enzimlerin, serbest enzimlerle kıyaslandığında çevre koşullarına karşı daha güçlü ve dirençli olmasına olanak sağlar. Ayrıca immobilize enzimler yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilirler, reaksiyon süresini azaltırlar ve çoklu enzim reaksiyonlarının gerçekleştirilmesine olanak sağlarlar. Birden fazla enzimin bir arada tutuklanması da mümkün olabilmektedir. Farklı substratlara etki eden enzimlerin

bir arada immobilize edilerek kullanılması, çeşitli basamaklarla gerçekleştirilen proseslerin kısılmasını sağladığı ve istenmeyen bir ürünün oluşumunu engellediği için öneme sahiptir. Ayrıca enzimlerin tek tek immobilize edildiklerindeki etkinlikleriyle ikili immobilize haldeki etkinlikleri karşılaştırıldığında, ortalama partikül boyutunun azaltılmasında ko-immobilize enzimlerin daha etkili oldukları saptanmıştır [9].

Bu çalışmada literatürde kullanılan bazı destek materyallere proteaz, pektinaz ve α amilaz enzimlerinin ilk kez bir arada immobilize edilmesiyle bir ko-immobilize enzim tasarımının gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır. Buna ek olarak seçilen uygun materyalde ko-immobilize edilen bu üçlü enzim sistemi kullanılarak protein, nişasta ve pektin içeren bir atıksu ortamında ön arıtımın gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir. Atıksu ön arıtımı amacıyla ko-immobilize enzim tasarımının yapılması, immobilize edilen enzim kombinasyonları değiştirilerek atık arıtımı ya da endüstriyel amaçlı yapılabilecek farklı çalışmalar için de yol gösterici olacaktır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Enzimler

2.1.1. Atıksu Arıtımında Enzimler

Atıkların arıtımında enzimlerin kullanımı ilk kez 1930' lu yıllarda önerilmesine rağmen [10], kirletici bir maddenin enzim kullanılarak yıkımı ilk olarak 1970' lerde denenmiştir [11]. Enzimlerle gerçekleştirilen biyoremediyasyon işlemleri günümüzde rutin olarak uygulanan kimyasal ve biyolojik arıtıma alternatif olarak kullanılabilir. Enzimlerin arıtım işlemlerinde kullanımı mikroorganizmaların ya da kimyasalların kullanımından daha avantajlı olduğu için tercih edilmektedir [7].

Atıksuların ön arıtımı amacıyla çok çeşitli enzim sistemleri kullanılabilir. Bunlar arasında en yaygın olan üç enzim sistemi oksidoredüktazlar EC 1, liyazlar EC 4 ve hidrolazlardır EC 3 [12]. Oksidoredüktazlar bir substrattan diğerine elektron transferini katalizleyen enzimlerdir. Yaygın atık arıtım stratejilerinde oksidasyon reaksiyonları önemli yer tutmaktadır. Bunların çoğunluğu fizikokimyasal prensiplere dayanmakta ve nonspesifik olmaları, fazla enerji tüketmeleri gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca oksidasyon reaksiyonlarının kimyasal işlemlerle gerçekleştirilmesi sırasında hem çalışanlara hem de çevreye zararlı kimyasallar kullanılmaktadır. Oksidoredüktazlar ise kirlilik kontrolü amacıyla organik kontaminantların oksidasyonunda zararlı kimyasalların alternatifi olarak yer alabilir. Çeşitli çalışmalarda bu grupta yer alan peroksidazlardan yararlanılarak, atıksulardan fenol, kloroform, mikro kirleticiler, aromatik aminler, hidrokarbonlar ve petrokimyasallar gibi atıkların giderimi gerçekleştirilmiştir [13],[14],[15],[16]. Oksidoredüktaz grubu enzimlerden lakkazlar ve tirozinazlar da fenollerin gideriminde kullanılabilir [17]. Ayrıca hem peroksidaz enzimi hem de lakkaz enzimi çeşitli renkli endüstriyel atıksuların dekolorizasyonunda rol almaktadır [18],[19].

Liyazlar kimyasal bağların kırılmasını katalizleyen enzimlerdir. Bu grupta nitril atıklarının degradasyonunda rol alan nitril hidrataz, atıksulardan siyanür gideriminde rol alan siyanür hidrataz ve pektinaz grubu enzimler içerisinde sayılan pektin liyaz gibi enzimler yer almaktadır [6],[20],[21]. Hidrolaz grubu enzimler ise hidroliz ettikleri bağların tipine göre alt gruplara ayrılmaktadır. Bu grupta yer alan enzimler ekmek, un, tahıllı gıdalar, tatlandırıcılar, balık, sebze, meyve, yumurta, et, jelatin, süt ürünleri, alkol, yağlar, deri ve kağıt gibi maddelerin üretiminin ya da işlenmesinin gerçekleştirildiği endüstrilerin atıklarının arıtımında rol almaktadır. Bu atıklar kentsel atıksularda da organik atık grubunu oluşturmaktadır. Tüm bu atıklar nişastalar, diğer

karbonhidratlar (pektin, selüloz ve diğerleri), proteinler ve yağlar olmak üzere dört kategoride gruplandırılmaktadır. Bu atıkların ön arıtmaları amacıyla kullanılan enzimlerin başında amilaz, proteaz, lipaz, selülaz ve pektinaz enzimleri yer almaktadır [6],[8]. Günümüzde atıksu arıtım sistemlerinde kullanılmak üzere, bu enzimlerle birlikte mikroorganizmaların ve inorganik nutrientlerin de içinde bulunduğu kombine ürünlerin satışı gerçekleştirilmektedir [22].

Çeşitli çalışmalarda atık maddelerin gideriminde, uygulanan immobilizasyon tekniğine de bağlı olarak immobilize enzimlerin serbest enzimlerden daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Wada ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada katyon değiştirici bir rezine immobilize edilmiş olan tirozinaz enziminin fenol gideriminde serbest haldeki enzimle kıyaslandığında daha başarılı olduğu saptanmıştır [23]. Tekstil endüstrisi atıksularında yer alan antrakinin ve azo boyalarının renk giderimi amacıyla immobilize ve serbest peroksidaz enziminin kullanıldığı bir çalışmada immobilize enzimin sıcaklık stabilitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak enzim kovalent bağlanma metoduyla immobilize edildiği için enzim aktivitesinde bir miktar düşüş meydana geldiği görülmüştür [19]. Peroksidaz enziminin immobilizasyonunda CNBr Sefaroz 4B destek materyalinin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise ambalaj atıklarında renk gideriminde immobilize enzimlerle elde edilen giderim oranının serbest enzimle elde edilenden 2.7 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir [24]. İmmobilize lakkaz enziminin atıksulardaki renk gideriminde kullanıldığı bir başka çalışmada da, reaktif tekstil boyalarının dekolorizasyonunda immobilize haldeki enzimin yüksek etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir [25].

2.1.2. α amilaz Enziminin Özellikleri ve Atıksu Arıtımında Kullanımları

Biyoteknolojide geniş bir kullanım alanına sahip olan α amilaz, endüstriyel açıdan önemli bir hidrolaz grubu enzimdir. Amilazlar nişasta molekülünün içerisindeki glikozidik bağlarını rasgele yerlerden keserek dekstrin ve oligosakkaritlere hidrolizini gerçekleştirmektedir. Bu enzim grubunda α amilaz, β amilaz ve glukoamilazlar yer almaktadır. Ayrıca ekstraselüler olan bu enzimler endo ve ekzoamilazlar olarak da sınıflandırılmaktadır. Bunlardan endoamilazlar nişasta molekülünün iç kısmını hidroliz ederek farklı uzunluklarda düz ya da dallanmış oligosakkarit zincirleri oluştururlar. Ekzoamilazlar ise indirgen olmayan uç kısımlara doğru etki ederek kısa son ürünler oluştururlar. Bir endoamilaz olan α amilazın etki ettiği substrat nişastadır. Nişasta amiloz ve amilopektin polimerlerinden oluşan bir polisakkarittir. α amilaz nişastadaki glukoz birimleri arasındaki α 1, 4-glikozidik bağlarına etki etmektedir. pH 7 en iyi çalışabildikleri pH değeridir [26]. α amilaz bitkilerden, hayvanlardan veya mikroorganizmalardan izole edilebilmesine rağmen

mikrobiyal kaynaklara olan ilgi daha yüksektir. Çünkü mikroorganizmalar hızlı gelişirler, küçük alanlar kaplarlar, bu sayede kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilmesi mümkün olmaktadır. Ayrıca genetik mühendisliği sayesinde mikrobiyal kaynaklarda amaca yönelik olarak istenilen karakterler değiştirilebilmektedir. Buna örnek olarak ısıya dirençli α amilaz üretimi verilebilmektedir. α amilaz bakteriyal türler arasında en sık *Bacillus spp.*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis* türlerinden elde edilmektedir [27]. Önemli endüstriyel faaliyetlerde α amilaz kullanımı söz konusudur (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1. α amilazın endüstriyel uygulamaları ve elde edildikleri kaynaklar [26]

Endüstriyel Uygulamalar	Mikrobiyal Kaynaklar	Enzimin rolü	Referanslar
Nişasta Dönüşümü	<i>B. amyloliquefaciens</i> ve <i>B. licheniformis</i>	Nişastayı dekstrinlere hidroliz ederek daha az yoğun bir nişasta solüsyonunun eldesi	[26]
Fırıncılık Endüstrisi	<i>B. stearothersophilus</i>	Hamur içindeki nişastayı daha küçük fermente edilebilir şekerlere dönüştürür.	[26][28]
Deterjan Endüstrisi	<i>B. licheniformis</i>	Nişasta içeren yiyeceklerin suda çözünebilir dekstrinlere yıkımı	[28]
Tekstil Endüstrisi	<i>Bacillus sp.</i>	Nişasta haşılama ajanının dokuma kumaşlardan uzaklaştırılmasında	[26][28]
Biyoetanol Üretimi	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	Nişastanın mayalar tarafından alkole çevriminin gerçekleştirildiği küçük fermente edilebilir şekerlere dönüşümü	[26][28]
Kağıt Endüstrisi	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Geobacillus</i>	Kağıdın kaplanabilmesi için nişastanın viskozitesinin azaltılmasında	[29]
Atık Arıtımı	<i>Bacillus sp.</i>	Nişasta içeren gıda atık sularının ön arıtımı	[30]

Nişasta bitkisel kaynaklı besinlerin işlenmesi sonucunda oluşan atıksularda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu atıksuların ön arıtımının gerçekleştirildiği durumlarda enzimlerin kullanımı söz konusu olmaktadır. Ayrıca Shoemaker tarafından yapılan bir çalışmada, amilazın aktif çamur yöntemiyle gerçekleştirilen atıksu arıtımını ilerleterek arıtım süresinin kısılmasına etki ettiği gösterilmiştir [30]. Atıksu arıtım tesislerinde arıtım için aktif çamurun kullanıldığı durumlarda da ekstraselüler α amilaz enziminin atıksudaki nişastalı atıkların gideriminde rol oynadığı

saptanmıştır [31].

2.1.3. Pektinaz Enziminin Özellikleri ve Atıksu Arıtımında Kullanımları

Doğada çok yaygın olarak bulunan pektinolitik enzimler yüksek yapılı bitkiler, bakteriler, küfler, mayalar, böcekler, nematodlar ve protozoalar tarafından üretilmektedir. Bitkilerde hücre duvarının genişlemesinde, ya da maturasyon ve depolama sırasında bazı bitki dokularının yumuşamasında rol almaktadır [32].

Mikrobiyal pektoliziz ise özellikle bitki patogeneğinde, simbiyozizde ve bitki artıklarının ayrışmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca pektolitik enzimler indüklenebilir özelliktedir, sadece gerektiğinde üretilmektedir ve doğadaki karbon döngüsüne katkı sağlamaktadırlar. Pektolitik enzimler veya pektinazlar olarak da adlandırılan enzim grubu ana poligalakturonon zinciri üzerindeki aktivitelerine göre 3 grupta sınıflandırılırlar [33]. (1) Poligalakturonazı (EC 3.2.1.15) içeren hidrolazlar, (2) pektin liyaz (EC 4.2.2.10) ve pektat liyaz (EC 4.2.2.2) enzimlerinin yer aldığı liyazlar/transeliminazlar, (3) pektin esteraz (EC 3.1.1.11). Pektinolitik etkiye sahip bu enzimler endüstriyel önemi oldukça yüksek olan pektinlerin degradasyonunu katalizlemektedirler. Pektin çok yönlü ve galakturonik asitçe zengin bir homopolisakkarittir. Bitkilerin birincil hücre duvarlarının ana bileşenlerinden biridir ve orta lamel yapısında da yer almaktadır. Pektin, karboksil grupların rezidülerini ve metil esterlerin değişen derecelerini içeren uzun galakturonik asit zincirlerinden oluşmaktadır. Ayrıca pektin jel benzeri bir matriks olması nedeniyle ticari olarak narenciyelerden ekstrakte edilerek gıdalarda jelleştirici ajan olarak kullanılmaktadır [32],[34].

Pektinaz grubu enzimler asidik ve alkali pektinazlar olarak da sınıflandırılmaktadır. Genellikle fungal kaynaklardan elde edilen asidik pektinazlar meyve suyu endüstrisinde ve şarap yapımında kullanılmaktadır. En önemli endüstriyel enzimlerden biri olan alkali pektinazlar ise tekstil proseslerinde, bitki liflerinin zamklarının giderilmesinde, yağ ekstraksiyonunda, pektik atıksuların ön arıtımında, kağıt yapımında, çay ve kahve fermentasyonlarında olmak üzere geniş kullanıma sahip olmalarıyla biyoteknolojik alanda büyük öneme sahiptirler [33],[34],[35].

Turunçgillerin işlenmesi sırasında açığa çıkan ve pektik maddeler içeren atıksuların arıtımı pek çok arıtım işleminin bir araya gelmesiyle gerçekleştirilebilmektedir. Bu işlemler; metan oluşumu ile sonuçlanan, fiziksel olarak suyunun alınması, spreyle yıkama, kimyasal koagülasyon, doğrudan aktif çamur arıtımı ve kimyasal hidroliz işlemleridir. Ancak bu işlemlerin maliyetinin yüksek olması, arıtım sürecinin uzun olması, ayrıca kullanılan kimyasalların çevre kirliliğine neden olması

gibi çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Bu uygulamalara alternatif olarak mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimlerle atık giderimi, uygun maliyetli ve çevre dostu olması nedeniyle kullanılmaktadır. Bitkisel gıda işleme endüstrisinden gelen pektik atıksular, ön arıtmaları enzimler ile gerçekleştirilerek aktif çamur işlemine hazırlanmaktadır [33],[34],[36].

2.1.4. Proteaz Enziminin Özellikleri ve Atıksu Arıtımında Kullanımları

Proteazlar, proteinler içindeki peptit bağlarının kırılmasını katalizleyen enzimlerdir. Hidrolazlar grubunda yer alan bu enzimler ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olarak sınıflandırılmaktadırlar. Ekzopeptidazlar direkt proteinlerin amino ve karboksil terminallerine etki ederken, endopeptidazlar iç peptit bağlarının kırılmasında rol oynarlar. Proteazların sınıflandırılmasındaki daha rasyonel bir yaklaşım ise aktif bölgelerinin karşılaştırılmasına, etki mekanizmalarına ve 3 boyutlu yapılarına dayanmaktadır. Aktif bölgelerinde yer alan fonksiyonel gruplarına göre, serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar ve metallo proteazlar olarak 4 gruba ayrılmaktadırlar. Bunlardan serin proteazlar proteolitik enzimlerin en yaygın olarak bulunan grubunu oluşturmaktadır. Aktif bölgelerinde reaktif bir serin grubu taşıyan proteazlardır. Genellikle nötral ve alkali pH değerlerinde aktif olan düşük molekül ağırlıklı enzimlerdir. Aspartik proteazlar asidik proteazlar olarak da bilinirler, katalitik aktiviteleri taşıdıkları aspartik asit rezidülerine bağlıdır. Sistein proteazlar indirgeyici ajanlarla stimüle olmaktadır ve pH 5-8 arası değerlerde aktiftirler. Metallo proteazlar ise protein yapılarının stabilizasyonu ve aktiviteleri için çinko ve kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. EDTA gibi şelatlama ajanlarına karşı duyarlıdırlar. Proteazlar ayrıca optimum aktivite gösterdikleri pH'lara göre asidik, nötral ve alkalin proteazlar olarak da sınıflandırılmaktadırlar [37].

Proteazlar hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir. Ancak sahip oldukları bazı avantajları nedeniyle, proteaz eldesinde sıklıkla mikrobiyal kaynaklar tercih edilmektedir. Mikroorganizmaların üretim süresinin kısa olması, üretimi sırasında geniş alanlara ihtiyaç duyulmaması ve istenilen özellikleri taşıyan enzimlerin üretilebilmesi için genetik olarak değiştirilebilir olmaları avantajları arasında sayılabilmektedir [38].

Proteazlar endüstriyel enzimler arasında büyük öneme sahip bir gruptur. Tüm enzim marketinin % 60' ını oluşturmaktadırlar. Süt ürünleri, gıda, deri ve ilaç endüstrisinde, fırıncılıkta, deterjanların içerisinde, soya ürünlerinin üretiminde, peynir ve et ürünlerinin işlenmesinde [39], evsel ve gıda endüstrisi atıklarının ön arıtımı [37] gibi çok çeşitli alanlarda kullanımı söz konusudur.

Proteazlar içerisinde alkali koşullarda katalitik aktivite gösterenler, çeşitli yiyecek endüstrisi atıklarının arıtımı için kullanılabilirler [30]. Lağım suları içerisindeki organik maddelerin % 40-60 kadarı proteinlerden oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda ekstraselüler proteaz enziminin lağım suları içerisine eklendiğinde katı madde miktarını azalttığı ayrıca ortamdaki patojen mikroorganizma sayısında da azalmaya sebep olduğu ve lağım suyundaki deflokülasyonun artmasını sağladığı görülmüştür [40],[41].

2.2. Enzim İmmobilizasyonu

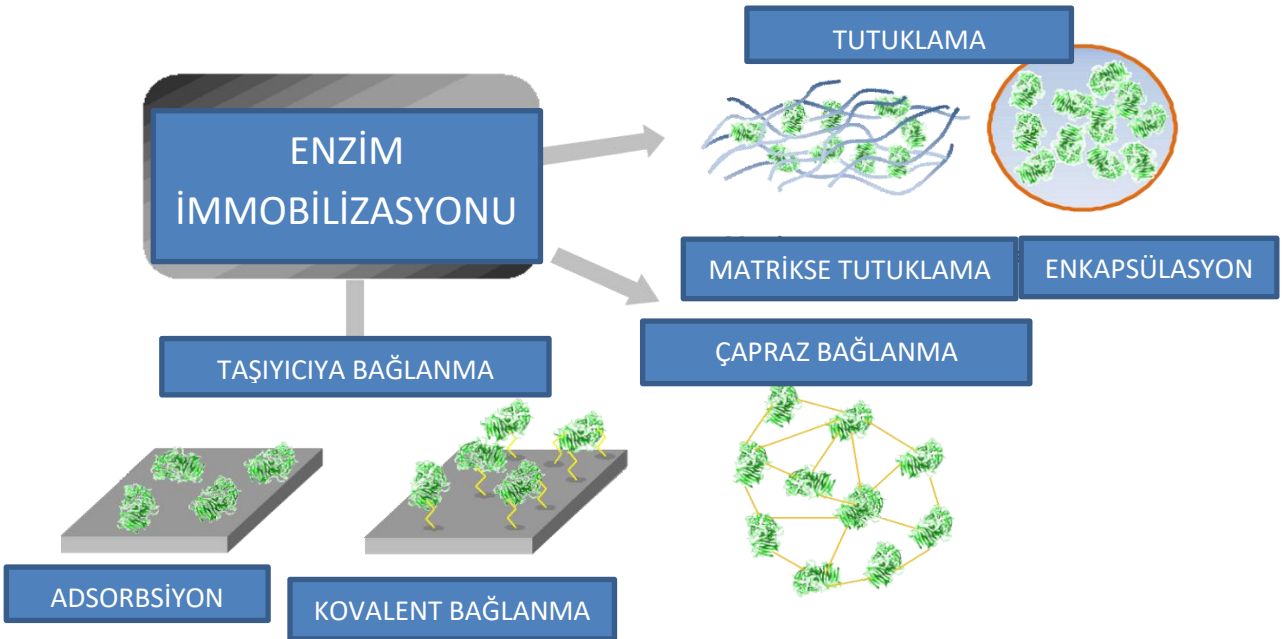
Enzimler canlılardaki metabolik reaksiyonların katalizlenmesinde rol oynamaktadır. Hücre kültürleri ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimler, çeşitli kimyasal reaksiyonlarda substratın çevrimini gerçekleştirmektedir. Enzimler, ılımlı sıcaklıkta, basınçta ve pH' da çalışabilen, uygun reaksiyon koşullarında substrat spesifikliğı gösteren ve kontamine edici ara ürünler oluşturmadan istenilen ürünün oluşmasını sağlayan potansiyel katalizörlerdir. Tüm bu özellikleri nedeniyle endüstride çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Ancak enzimlerin biyoteknolojik metodlar ile üretimi son derece pahalı olduğu için yeni metodların geliştirilmesi ile bu durum aşılmaaya çalışılmıştır. Enzimlerin stabiliteilerinin düşük olması, operasyon koşullarındaki değişimlere karşı çok duyarlı olmaları gibi kullanımlarını sınırlayan çeşitli sorunları ortadan kaldırmak için immobilizasyon teknikleri kullanılmaktadır [42]. İmmobilize enzim terimi ilk kez 1971 yılında, 1. Enzim Mühendisliğı Kongresi' nde ortaya atılmıştır. Bu tanım ile fiziksel olarak sınırlanmış enzimler veya katalitik aktivitelerini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanılabilir şekilde belirli bir bölgeye bağlanarak sınırlandırılmış enzimler anlatılmaktadır [43]. Serbest ya da çözülmüş enzimler çeşitli destek materyallere bağlanarak suda çözünmeyen hareketsiz hale getirilirler. Seçilen immobilizasyon metodu ve destek materyal biyokatalizörün özelliklerini yüksek oranda etkiler. Kullanılan destek materyalin özelliğine bağlı olarak immobilizasyon sırasında aktivite ve difüzyonda birtakım sınırlamalar meydana gelmektedir. Destek materyal seçilirken, enzimatik reaksiyon sırasında substratın ve ürünlerin difüzyonunu en az etkileyen, geniş yüzey alanına sahip olmasına dikkat edilmelidir [44]. Aynı zamanda maliyetinin uygun olmasına da dikkat edilmelidir aksi takdirde enzimden bile daha yüksek maliyetli olacağı için immobilizasyon işlemi ile hedeflenen verim elde edilemeyecektir [45].

2.2.1. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları

Serbest enzimlerin kullanımı ile immobilize formları kıyaslandığında immobilize enzimlerin ısıya dirençlerinin yüksek olması, reaksiyon sonunda reaksiyon karışımından kolaylıkla ayrılabilmesi ve tekrar tekrar kullanılabilmesi gibi avantajlar gözlenmektedir. İmmobilize enzimlerle gerçekleştirilen süreçlerin tekrarlanabilir olması özellikle enzim üretimi sırasındaki yüksek maliyet dezavantajını ortadan kaldırmaktadır [46]. Aynı zamanda immobilizasyon işlemi reaksiyon ürünlerinin katalizör ile kontaminasyonunu engeller. İmmobilize enzimler çeşitli denatüre edici ajanlara (ekstrem pH değerleri, sıcaklık ve organik çözücüler) karşı gelişmiş bir özgünlük, seçicilik, saklama ve operasyon stabilitesi göstermektedir ve immobilizasyon inhibisyonu mümkün olduğunca engellemektedir. Son olarak ancak immobilizasyon ile çoklu enzimlerle ardarda süreçlerin gerçekleştirilmesi mümkün olabilmektedir [47].

2.2.2. Enzim İmmobilizasyon Metotları

İmmobilizasyon metotları immobilizasyon sırasındaki etkileşimin yapısına bağlı olarak fiziksel ve kimyasal metotlar olarak sınıflandırılmaktadır. Başka bir yaklaşıma göre metotlar tersine çevrilebilmesine ya da çevrilememesine göre ikiye ayrılır. En yaygın sınıflandırma sistemine göre ise taşıyıcıya bağlanma, tutuklanma ve çapraz bağlanma olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.1). Ancak yapılan tüm immobilizasyon çalışmalarına rağmen enzim immobilizasyonu için evrensel olarak kabul edilen ya da her enzime uygulanabilen bir metot bulunmamaktadır [45].



Şekil 2.1. Enzim immobilizasyon metotları [48]

2.2.2.1. Taşıyıcıya Bağlanma

Enzimler taşıyıcı olarak kullanılan destek materyallerin yüzeylerine konformasyonel ve fonksiyonel özellikleri değişmeden bağlanmalıdır. Taşıyıcıya bağlanma hidrofobik ve van der Waals etkileşimleri gibi fiziksel olabilir ya da iyonik veya kovalent yapıda olabilir (Şekil 2.1.) [49].

2.2.2.1.1. Fiziksel Adsorbsiyon

Bu metot hem basit hem de ucuz bir metottur. Bir enzim solüsyonu ile suda çözünmeyen solvent bir yüzey karşılaştırılır ve daha sonra adsorbe olmayan enzimler yıkama ile uzaklaştırılır (Şekil 2.1.). Adsorbsiyon olayının meydana gelmesi destek materyalin yapısı, pH, sıcaklık, zaman ve enzim konsantrasyonu gibi bazı faktörlere bağlıdır. Adsorbsiyon olayı geri dönüşümlü bir olaydır ve kolay bir yöntem olmasının yanı sıra bir diğer avantajı ılımlı bir sistem olduğu için enzimin konformasyonunu ve aktivitesini çok düşük oranda etkilemektedir [44]. Ancak fiziksel bağlanma genellikle, yüksek reaktan ve ürün konsantrasyonun olduğu endüstriyel koşullarda ve yüksek iyonik güç altında enzimin taşıyıcıya bağlı kalmasını sağlamakta çok zayıftır [50]. Adsorban olarak alümina, bentonit, kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat, karbon, diatomlu toprak, selüloz, kömür, kil, kollajen, cam, iyon değiştirici rezinler, sefadeks ve silika jel gibi materyaller kullanılmaktadır [44].

İyonik bağlanma sırasında destek materyalin bir ön aktivasyon basamağından geçmesine gerek yoktur. Enzimle destek materyal arasındaki etkileşim destek materyalin yüzey kimyası ile enzim moleküllerinin yüzeyinde yer alan aminoasitlerin çeşidine bağlıdır. Destek materyal ile enzim arasındaki zayıf etkileşimler, iyonik veya hidrojen bağı ve van der Waals kuvvetleri gibi hidrofobik etkileşimlerdir. İşlem sırasında pH ve iyonik gücün sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir çünkü bunlar enzimin ya da destek materyalin yükünü etkileyerek adsorbsiyon miktarına etki etmektedir [43]. Bu nedenle adsorbsiyon metodu ile hazırlanan immobilize enzim operasyon stabilitesi bakımından zayıftır [51].

2.2.2.1.2. Kovalent Bağlanma

Destekler ile enzimler arasında çok sayıda bağlanmanın mümkün olması bakımından kovalent bağlanma en kompleks immobilizasyon metodudur (Şekil 2.1). Enzimlerin katı destek materyallere kovalent bağlanması enzimlerin yüzeyindeki aminoasit rezidüleri ile destek yüzeyi üzerindeki reaktif gruplar arasında kovalent bağların oluşumu ile meydana gelmektedir [45]. Kovalent bağlanmalarda lizin veya arjininin amino grupları (NH_2), aspartik asit veya glutamik

asidin karboksil grupları (COOH), serin veya treoninin hidroksil grupları (OH) ve sisteinin sülfidril grupları (SH) yer almaktadır. Enzimin destek materyale kovalent bağlarla tutunmasında diazotasyon, amino bağı, Schiff bazlarının oluşumu, amidasyon reaksiyonları, tiyol sülfid, peptit bağı ve alkilasyon reaksiyonları gibi çok sayıda reaksiyon prosedürü rol almaktadır. Enzim ve destek materyal arasındaki bağlar direkt kurulabildiği gibi desteğe eklenen ve uzatıcı kol olarak adlandırılan farklı uzunluklardaki bağlantılar aracılığıyla da kurulabilmektedir. Ara bağlantı moleküllerinin kullanımı enzime hareket kabiliyeti katması nedeniyle son derece avantajlıdır. Bu sayede aynı koşullar altında, enzimin direkt desteğe bağlı olduğunda elde edilen aktivitesinden daha yüksek bir aktivite saptanmaktadır. Enzimin direkt olarak desteğe bağlanması konformasyonunda değişikliklere sebep olarak ya da aktif merkezin ulaşılabilirliğini azaltarak enzimin aktivitesini etkilemektedir. Uzatıcı kolun uzunluğu ne kadar fazla olursa enzim o kadar fazla serbest enzim gibi yüksek aktivite gösterir. Bu işlemde en önemli kısım ise seçilen uzatıcı kolun enzimin aktif merkezinde yer alan aminoasitlerle reaksiyona girmeyecek özellikte olmasıdır [43],[52].

Etkili bir kovalent bağlanmanın meydana gelmesi için enzimin ya da destek materyalin aktive edilmesi gerekmektedir. Enzim aktive edildiğinde enzimin tersiyer yapısında değişikliğe sebep olması nedeniyle sıklıkla destek materyaller aktive edilmektedir. Kovalent immobilizasyonda enzimle destek materyaller arasında çok güçlü bağların kurulması enzimin diğer metotlardakinden daha stabil yapıda olmasını sağlamaktadır. Ancak kovalent immobilizasyonun da bazı dezavantajları bulunmaktadır. Kovalent immobilizasyon sırasında ortam koşullarının zorlu olmasına bağlı olarak enzimin konformasyonunda değişiklikler meydana gelerek enzim inaktif olabilmektedir. Bazı durumlarda ise kurulan bağ enzimin aktif merkezine denk gelmekte ve enzim inaktif hale gelmektedir [45].

2.2.2.1.3. İyonik Bağlanma

İyonik bağ ile immobilizasyon metodu iyonik yüklü bir destek materyale, enzim molekülünün iyonik olarak bağlanmasına dayanmaktadır (Şekil 2.1). Bu metotta immobilizasyon ile taşıyıcıya ne kadar enzim bağlanacağı ve aktivitesi taşıyıcının doğasına bağlıdır. Fiziksel adsorbsiyon ile iyonik bağlanma arasındaki en temel fark etkileşimin gücüdür, bu güç iyonik bağlanma için daha yüksektir. Ancak kovalent bağlanmanın gücünden daha zayıftır. Bu metotta enzimle destek arasındaki bağlanma kuvvetinin iyonik doğası pH değişimlerine, destek materyalin yüküne, enzim konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağlıdır [43]. İyonizasyonu etkileyen pH, hidrofobisite, iyonik güç

ve karşıt yükün benzerliği gibi faktörlerin optimum koşullarda olması durumunda enzimin yapmış olduğu bağ etkili ve güçlüdür. Enzim molekülü, uç zincirlerinde yer alan aspartat, glutamat ya da lizin gibi aminoasitlerin destek materyal üzerindeki ters yüklü gruplarla etkileşimi sayesinde desteğe bağlanmaktadır. Destek ile enzim arasındaki bağlar tuz zincirleridir. Ancak tüm bunlara rağmen yüksek iyonik güç ve pH değişiklikleri durumunda kopmalar görölmektedir [45]. Bu bağlanma işlemi sıcaklık, polar ve iyonik güç koşulları değiştirilerek geri döndürölebilmektedir [42]. İyonik bağlanma için destek materyal olarak, dietilaminoetilselüloz, dekstran, kitosan, karboksimetilselüloz gibi polisakkarit türevleri, polistiren türevleri, polietilen vinil alkol gibi sentetik polimerler ya da alümina, silika ve bentonit gibi inorganik materyaller kullanılmaktadır. İyonik bağlanmanın en önemli avantajı enzimin konformasyonunda küçük değişikliklere sebep olması nedeniyle yüksek enzim aktivitesi elde edilmesidir. Ayrıca uygulaması kolay ve ucuz yöntemlerdir. En önemli dezavantajı ise diğer iyonlarla etkileşimlerin mümkün olmasıdır [43].

2.2.2.2. Çapraz Bağlanma

Çapraz bağlanma metodu ikili ya da çoklu fonksiyona sahip ajanlar aracılığıyla enzim molekülleri arasında kovalent bağların oluşumuna dayanmaktadır. Bu sayede bir destek materyal olmaksızın makropartiküller hazırlanabilmektedir. Enzimlerin apraz bağlanmasında bağ oluşumunda genellikle lizinin amino grubu, bazı durumlarda ise sisteinin sülfidril grupları, tirozinin fenolik OH grupları ya da histidinin imidazol grupları rol almaktadır. Sıklıkla kullanılan ikili fonksiyona sahip ajanlar ise glutardialdehit, glutaraldehit, glioksal, diizosiyanat, hegzemetilen diizosiyanat ve toluen diizosiyanattır.

Enzimlerin taşıyıcılara immobilizasyonu sırasında doğal aktivitelerinin % 50 kadarı kaybedilmektedir. Oysaki apraz bağlı enzim kristalleri ya da agregatlarının oluşumu ile aktivite kaybı engellenebilmektedir.

Enzim immobilizasyonunda çapraz bağlanma metodu kullanılırken avantaj ve dezavantajları göz önünde bulundurulmalıdır. Yöntemin temel avantajları, kolay uygulanabilir olması ve pahalı bir destek materyale ihtiyaç duyulmamasıdır. Bir diğer avantajı ise enzimlerin yüksek stabiliteye sahip olmasıdır. En önemli dezavantajları ise oluşan yapıların kırılğan olması ve difüzyonda meydana gelen engellerdir. Ayrıca enzim agregatlarının boyutları kontrol edilememektedir [43],[45].

2.2.2.3. Tutuklama ve Kapsülleme

Enzimlerin tutuklanması sırasında enzim ile destek materyal arasında herhangi bir reaksiyon gerçekleşmez. Enzimin etrafı çapraz bağlı sentetik veya organik bir polimer ağ ile sarılır ya da enzim polimerik bir madde içerisine koyulur ve polimerik zincirler çapraz bağlanır. Polimerik ağ substratın ve ürünlerin geçişini mümkün kılan geçirgen bir yapıdır ancak enzimin ağın içerisinde kalmasını sağlar. Yöntemin avantajları hızlı, ucuz ve reaksiyon koşullarının hafif olmasıdır. Dezavantajı ise kütle transferini sınırlandırmasıdır. Bununla birlikte bu destek matrisler, enzimleri mikrobiyal kontaminasyona karşı da korumaktadır. Mikro kapsülleme metodunda ise enzim molekülleri seçici yarı geçirgen özellikte küresel bir membran içerisinde kapsüllemektedir. Bu metot enzim ile membran arasında geniş bir yüzey alanının oluşmasını sağlar. Ancak kapsülleme sırasında enzimin inaktif hale gelmesi yöntemin dezavantajıdır [42]. Yöntemle ilgili diğer bir sorun ise diğer immobilizasyon metotlarına göre yöntemin yükleme etkinliğinin düşük olmasıdır. Matrikse tutuklama metodunda anahtar nokta destek materyalin seçimidir. Bu bağlamda immobilize edilecek enzimin büyüklüğü ile destek materyalin por büyüklüklerinin oranı önemli bir parametredir. Küçük porlar substratın geçişini engellerken, büyük por boyutları ise enzimin kaybına yol açmaktadır.

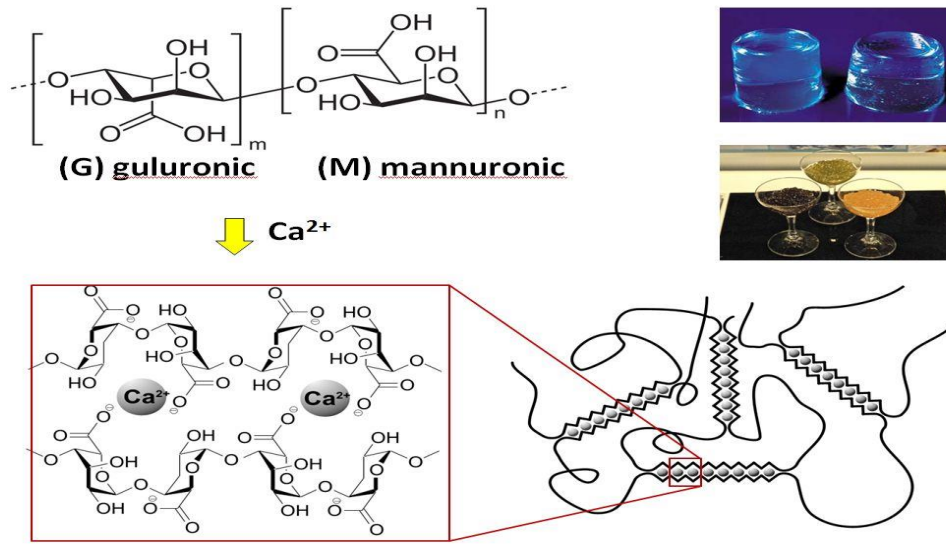
Membran yapılar içerisinde mikro kapsülasyonun temel özelliği biyokatalizörün membran duvarlarıyla sınırlanmasıdır, ancak kapsülün çekirdek kısmına doğru hareket serbesttir. Bu kapsülleme metodunda da temel faktör membran porlarının büyüklüğüdür. Mikro kapsülün iç kısmına erişimin sınırlandırılması, enzimin zor çevre şartlarından korunmasını sağladığı için yöntemin en önemli avantajıdır. Enzimin sızıntısı mümkün olmadığı için kullanıldığı süre boyunca enzim aktivitesinde azalma gözlenmez. Ancak bu yöntem büyük molekül ağırlığına sahip substratların kullanıldığı durumlarda uygun değildir [45].

2.2.3. Enzim İmmobilizasyonunda Destek Materyal Olarak Kullanılan Bazı Doğal Polimerler

Çeşitli doğal polimerler, özellikle de polisakkarit yapıdaki selüloz, nişasta, agaroz, aljinat, karragenan, kitosan ya da protein yapıdaki albümin ve jelatin enzim immobilizasyonunda taşıyıcı yüzey olarak geniş kullanıma sahiptir [50],[53]. Doğal polimerler kolay modifiye olabilen, toksik olmayan, kirletici içermeyen, çeşitli fonksiyonel gruplar taşıyan ve biyo uyumluluğu yüksek olan materyallerdir [51].

2.2.3.1. Aljinat

Aljinat ilk kez 1881 yılında İngiliz bilim adamı E.C.C Stanford tarafından tanımlanmıştır. Anyonik ve hidrofobik bir polisakkarit olan aljinat, deniz bitkileri ve bakterilerden elde edilen, doğal olarak sentezlenen materyaller arasında ilk sırada yer almaktadır. Özellikle *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera* gibi kahverengi alglerden elde edilmektedir. Ekonomik olarak çok kullanışlı olmasa da *Azotobacter* ve *Pseudomonas* türleri gibi bakterilerden de izole edilebilmektedir [54]. 1,4 bağlı β -D mannuronat ve onun C-5 epimeri α -L gluronik asit rezidülerinin homopolimerik bloklarını taşıyan bir doğrusal kopolimerdir (Şekil 2.2.). Aljinatın sahip olduğu özellikler onun biyo katalitik süreçlerde matriks olarak geniş kullanıma sahip olmasını sağlamaktadır. En önemli avantajları ucuz, kolay ulaşılabilir olmaları, suya yüksek afinite göstermeleri, toksik olmamaları ve ılımlı koşullarda jel oluşturma kapasitelerinin yüksek olmasıdır. Aljinat destekler iki değerlikli katyonların (Ca^{+2} , Ba^{+2} , Co^{+2}) varlığında gluronik asitlerin mannuronik asit rezidüleri ile çapraz bağlanması ile hazırlanmaktadır [55]. Aljinat tuzları arasında en yaygın olarak kullanılanı kalsiyum aljinattır. Kalsiyum aljinat hidrofilik karakterinden dolayı hidrofobik moleküller için etkili bir bariyerdir [56]. Ca varlığına bağlı olarak çözünebilirliği değişen, çözünebilir ve çözünemeyen şekilde tersine çevrilebilir bir polimerdir. Bu çözünmeyen jel yapısı, Ca gibi çok değerlikli katyonlara karşı gösterdiği iyon bağlama özelliğinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca Ca aljinat jelin stabil hale getirilebilmesi için Ti^{+3} ve Al^{+3} gibi diğer çok değerlikli katyonlarda kullanılabilir. Makromoleküllerin hızlı difüzyonuna izin veren gözenekli jel yapısı ve matriks içerisinde durağan sıvı bir çevre oluşturması nedeniyle çapraz bağlanan Na aljinat çeşitli biyomoleküllerin kapsüllenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [57]. Kalsiyum aljinat jel boncuk yapısında ya da kapsül olarak enzim tutuklanmasında rol almaktadır. Enzim ve Na aljinatın CaCl_2 içerisine damlatılmasıyla boncuk, enzim ve CaCl_2 ' ün Na aljinat içerisine damlatılmasıyla kapsül yapısı elde edilmektedir [58]. Ayrıca aljinat boncukların üzerine de yüzey adsorpsiyonu sayesinde enzim tutuklamak mümkün olmaktadır. Protein adsorpsiyonunu etkileyen parametrelerin başında ise pH gelmektedir. En yüksek adsorpsiyon enzimin izoelektrik noktasının altındaki pH değerlerinde görülmektedir [59]. Na aljinat içeriside ya da üzerinde tutuklanması enzimin, pH, sıcaklık, oksijen, organik çözücüler ve şelatörler gibi çeşitli çevresel faktörlere karşı korunmasını sağlar. Diğer yandan Na aljinat jel kullanımının, transferin sınırlı olması, az enzim yüklenmesi, çok ünitle immobilize enzimlerin alt ünitelerine ayrılmasına neden olarak inaktif hale gelmesi gibi dezavantajları da söz konusudur [60].



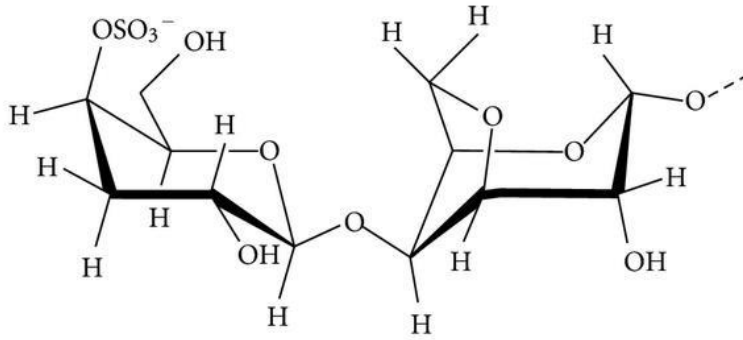
Şekil 2.2. Na aljinatın yapısı [61]

2.2.3.2. Karragenan

κ -Karragenan en yaygın olarak kullanılan immobilizasyon matrislerinden biridir. Doğrusal yapıda, kırmızı alglerden ekstrakte edilen sülfatlanmış bir polisakarittir. Primer yapısı birbirini takip eden α (1,3)-D-galaktoz-4-sülfat ve β (1,4)-3,6-anhidro-D-galaktoz rezidülerinden oluşan, yüksek molekül ağırlıklı bir biyopolimerdir (Şekil 2.3.). κ -Karragenan, sıcaklığın yükseltilmesiyle ya da metal iyonları, aminler, aminoasit türevleri ve suda çözünebilir organik çözücülerin varlığında kolayca jel formuna dönüştürülebilmektedir. Bu özelliği ve toksik olmaması nedeniyle κ -Karragenan enzim immobilizasyonu çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir doğal polimerdir [62],[63],[64]. κ -Karragenan ile jel oluşumu termal olarak dönüşümlüdür bu yüzden karragenan kullanımı çok yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilecek uygulamalara uygun değildir. Jelleşme sürecini başlatan ajanların konsantrasyonu, işlemin başarılı olması üzerinde öneme sahiptir. Düşük miktarlarda ajan kullanımında oluşan jel stabil değildir ancak fazla kullanımı da enzimin aktivitesinin kaybına neden olabilmektedir. Damlatma metodu ile bir şırınga ya da dar bir kanalın uç kısmından püskürtülerek ya da bir sıvı veya hava içerisine yayılma yoluyla da kübik, boncuk ya da membran yapısında üretilebilmektedirler [58]. κ -Karragenan jelin mekanik ve sıcaklık stabilitesini arttırmak için polimere 3,6-anhidro-D-galaktoz 2 sülfat eklenmesinin artırılması gerekmektedir. K⁺ ve Al³⁺ iyonları da jelin özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Enzim ya da hücrelerin tutuklama metoduyla immobilizasyonunda kullanılan bu biyopolimerin en önemli dezavantajı ise fonksiyonel gruplarının olmaması nedeniyle immobilizasyonun kovalent

olmayan bağlar aracılığıyla gerçekleştirilmesidir. Ayrıca 300 kDa' dan daha düşük molekül ağırlığına sahip enzimlerin bu matriks içerisinde difüzyonu söz konusu olabilmektedir.

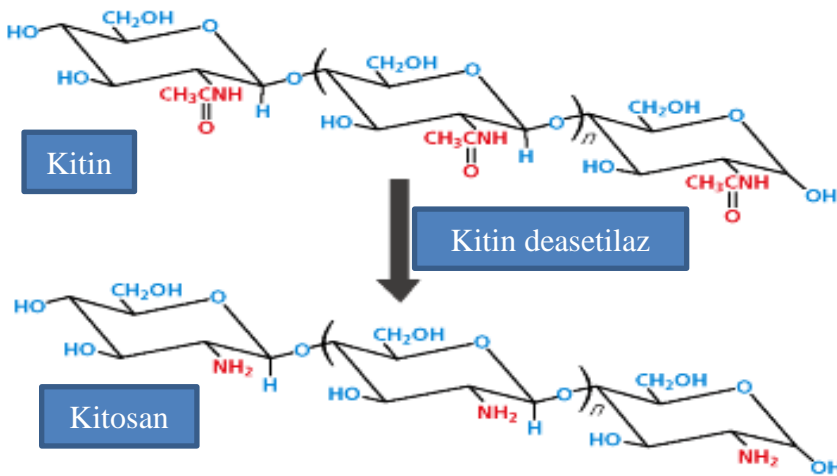
Karragenan jellerin düşük olan termal kararlılıklarının artırılması amacıyla, polielektrolit kompleks oluşturan poliaminlerle muamele edilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla doğal poliaminlerden kitosanın ya da polietileniminler (PEI) gibi sentetik olanların kullanımı jelin termal kararlılığını arttırmaktadır [65].



Şekil 2.3. κ -Karragenanın moleküler yapısı [66]

2.2.3.3. Kitosan

En yaygın olarak kullanılan organik destek materyaller polisakkaritlerdir. Ancak polisakkarit destek materyaller arasından kitinin çeşitli derecelerdeki (% 40-98) alkali deasetilasyonu ile elde edilen dönüştürülmüş bir oligosakkarit olan kitosan immobilizasyondaki avantajları nedeni ile ön plana çıkmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kitin ve kitosanın moleküler yapısı [9]

Bu avantajları arasında özellikle ucuz olmaları, toksik olmamaları, biyo uyumlu olmaları, doğada çözünebilirlik özellikleri, dayanıklılıklarının yüksek olması, çeşitli proteinlere karşı affinitelerinin yüksek olması ve farklı fiziksel özelliklerde matrislerin hazırlanmasına uygun olmaları sayılabilmektedir [67]. Kitosan yengeç, karides, ıstakoz gibi kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarından ya da işlenen deniz mahsullerinin atıklarından elde edilmektedir. Son yıllarda mantar ve böcek larvaları da kitin-kitosan üretimi için alternatif kaynaklar olarak kullanılmaktadır. Kitosan organik asitler içerisinde çözünebilmesi ve poli iyonik bileşiklerle birleşme özelliği sayesinde membran, boncuk, kapsül ya da farklı formlarda mükemmel jeller oluşturabilmektedir. Kitosan jellerin oluşturulmasında 4 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar çözücü uçurma metodu, nötralizasyon metodu, çapraz bağlama metodu ve iyonotropik jelleşme metodudur. Bu yöntemlerden nötralizasyon metodu farklı büyüklüklerde ve por özelliklerinde küresel kitosan boncukların hazırlanmasında kullanılan ana metottur, kitosan solüsyonunun damla damla NaOH ve etanol solüsyonu içerisine damlatılması ile gerçekleştirilir. Kitosan yüksek pH değerlerinde çözünebilir özellikte olmadığından polimer presipitasyonundan dolayı damlalar katılaşır [68]. Sahip olduğu tüm bu özellikler sayesinde kitosan, atıksu sistemlerinden ağır metallerin uzaklaştırılmasında, gıda endüstrisinde, yavaş ya da zamanla salınması gereken ilaçların kapsüllenmesinde, kozmetikte, ziraatte, hamur ve kağıt endüstrisinde geniş kullanım alanlarına sahip bir polimerdir. Bir poli N asetil glukozamin olan kitosan taşıdığı glukozamin zincirine bağlı, kimyasal reaktif gruplar olan katyonik amino ve polar hidroksil gruplarını içermektedir. Taşıdığı bu gruplar adsorpsiyon ve kovalent bağlanma gibi immobilizasyon yöntemlerini desteklemektedir. Böylece yüzeyleri çeşitli birleşme eğilimi yüksek ligantlarla bağlanabilmektedir. Ancak enzimlerle bağlanabilmeye uygun olan hidroksil gruplarının immobilizasyondan önce aktive edilmeye ihtiyaçları vardır [9].

2.2.4. Destek Materyallerin Aktive Edilmesinde Kullanılan Bazı Ajanlar

2.2.4.1. Glutaraldehit

Günümüzde çok sayıda aktive edici ajan ve yeni geliştirilen metot bulunmasına rağmen glutaraldehit ucuz olması ve çok etkili bir çapraz bağlayıcı olması nedeniyle, immobilizasyon çalışmalarında çok yaygın olarak kullanılmaktadır [65]. Kovalent immobilizasyon protokolleri daima ya taşıyıcının yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ya da aktivasyon basamağı ile başlar. Enzimlerin kitosan desteklere kovalent immobilizasyonunda en sık kullanılan çapraz bağlayıcı ve aktive edici ajan da glutaraldehittir. Doğrusal, 5 karbonlu bir dialdehit olan glutaraldehit şeffaf ve

renksizdir, her oranda su, alkol ve organik çözücüler içerisinde çözünebilen keskin kokulu yağsı bir sıvıdır [69]. Hem enzimler hem de kitosan yüzeyler üzerinde, bağlanmayı gerçekleştiren uygun amino gruplarının bulunması glutaraldehitin en önemli avantajıdır [70]. İlk olarak glutaraldehit kitosanın serbest amino gruplarına bağlandığında Schiff bazı yapısı oluşur. Oluşan bu yapı, glutaraldehitin serbest aldehit gruplarına sahip olan kitosan boncukların enzimlerle reaksiyonunu kolaylaştırmaktadır. Glutaraldehitin aldehit grupları, asidik ve nötral pH koşulları altında bu bağların kurulmasıyla proteinlerle reaksiyona girerler. Schiff bazı yapısının ardından protein yüzeyler üzerindeki Lys rezidularının ϵ -amino grubu glutaraldehitin serbest aldehit grupları ile bağ yapabilir. Bu sayede glutaraldehit ile aktive edilen kitosan yüzeylere enzimin kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilebilmektedir [71]. Glutaraldehit ile destek arasında oluşan bağların etkisiyle destek materyalde renk değişikliği meydana gelmektedir. Bu renk oluşumu aynı zamanda aktivasyonun derecesi ile ilgili bir ön bilgi vermektedir. Sarı renk düşük, portakal rengi orta kararlılıkta ve kahverengi ise yüksek aktivasyon varlığını işaret etmektedir. Aktive edilmiş destek materyal pH 6-8 aralığında protein bağlamaya uygun hale gelmektedir. Bu pH değerlerinde en reaktif fonksiyon lizin yerine protein terminalindedir. Bu aktivasyon işlemi hafif asidik pH' da fosfat tamponu kullanılarak gerçekleştirilen bir prosedürdür. Bu metodun en önemli avantajı destek ile enzim arasına uzun bir uzatıcı kol eklenerek sterik engel durumunun en aza indirilmesidir. Ayrıca glutaraldehit ile aktive edilen destek materyaller çoklu fonksiyona sahip taşıyıcılardır. Kovalent bağlanmaya ek olarak iyonik değişim ya da hidrofobik adsorpsiyon gibi en az iki etkileşimi daha gerçekleştirmektedirler [47]. Glutaraldehit ile enzim immobilizasyonunun 4 saat içinde ya da daha az sürede meydana gelmesinde sıcaklık olarak 25°C tercih edilmektedir [69].

Glutaraldehit çok reaktif bir madde olduğu için destek materyallerin aktivasyonunda yüksek miktarda kullanılması farklı bir iç yapıya sahip matrikslerin oluşmasına neden olmakta, hatta matrikslerin yüzeyini de etkilemektedir [65].

Glutaraldehit bu kullanımlarının dışında protein çapraz bağlayıcısı, enzim ve destek materyal çapraz bağlayıcısı olarak da kullanılmaktadır. Glutaraldehit ile çapraz bağlanması enzimin farklı sıcaklıklara, kimyasallara ve mekanik etkilere karşı stabilitesinin artmasını da sağlamaktadır. Bunun sebebi molekül içi ve moleküller arası çapraz bağların oluşması ile enzimin konformasyonel değişimlere dirençli, daha sağlam bir molekül haline gelmesidir. Glutaraldehit polimerizasyon özelliğine sahip bir fonksiyonel bir ajan olup proteinlerin amino gruplarıyla

reaksiyona girmesine rağmen tiol, fenol ve imidazol gibi farklı enzim kısımlarıyla da reaksiyona girmektedir [69],[70].

2.2.4.2. Polietilenimin

Polietilenimin (PEI), iskeletinde primer, sekonder ve tersiyer amin grupları içeren sentetik ve katyonik bir polimerdir. PEI genellikle enzimlerin destek materyal yüzeyinden ayrılmalarını engellemek için, enzimlerle reaksiyon gerçekleştirilmeden önce jel yüzeylerin çapraz bağlanması amacıyla kullanılmaktadır. PEI hem destek materyal aktivatörü olarak hem de enzimlerin destek materyalden uzaklaşarak substratıyla daha serbest ilişki kurmasını sağlayan bir uzatıcı kol olarak rol almaktadır. Ayrıca sahip olduğu pozitif yükler destek materyal yüzeyinin negatif yükleriyle reaksiyona girerek iyonik bağ oluşumunu sağlamaktadır [65]. Karragenan ve aljinat jeller polikasyonlar ile muamele edildiğinde termal stabiliteleri yüksek biyopolimerler elde edilmektedirler. Termal stabilitelerinin yanı sıra enzimler polikasyonlar sayesinde modifiye edilen jellere kovalent olarak immobilize olmaktadır [72]. Aljinat jelin yüzeyinin PEI ile kaplandığı bir çalışmada, protonlanmış amino grupları ($-NH_3^+$) taşıyan PEI aljinat jelin $-COO-$ ları ile birlikte polielektrolit kompleks oluşturmuştur. Bu sayede aljinata serbest amino grubu eklenmiştir. Daha sonra aljinat yüzeyine eklenen amino gruplarına glutaraldehit aracılığı ile enzim kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Oluşan polielektrolit yapının termal kararlılığın da gelişmesini sağladığı saptanmıştır [73]. Çeşitli çalışmalarda PEI, manyetik mikro küreler ve silika partikülleri gibi destek materyallerin yüzeylerinin kaplanmasında kullanılmaktadır. Bu sayede enzimler PEI üzerindeki uygun gruplarla bağ yaparak destek materyale immobilize olmaktadır [45].

2.2.5. Enzim Ko-immobilizasyonu

Ko-immobilize çoklu enzim sistemlerinin geliştirilmesi geleneksel çok basamaklı sentetik metotlara alternatif olmaları bakımından önemlidir. Doğada enzimler hücrede istenilen ürünün oluşturulmasını sağlamak için iş birliği içinde çalışmaktadırlar. Biyolojideki bu sistemlerin taklit edilmesi amacıyla ardışık veya birarada çalışan biyokatalizörlerin katalitik iş miktarını optimize ederek, reaksiyon kinetiklerini ve stabilitelerini arttırmak için aynı materyale immobilize edilmeleri amacıyla ko-immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Ko-immobilize enzimlerden yararlanmak için 3 neden ileri sürülmektedir. Bu nedenler, enzimlerden birinin substratının dönüşümüne olan etkisinin artırılması, çeşitli basamaklarda gerçekleştirilen geleneksel işlemlerin basitleştirilmesi ve enzimatik reaksiyonlarda açığa çıkan istenmeyen

ürünlerin ortadan kaldırılmasıdır. Günümüzde bilim yüksek etkinlik, seçicilik ve spesifikklik gösteren enzim sistemlerinden, tanımlama, teşhis veya endüstriyel öneme sahip ürünlerin elde edilmesi amacıyla faydalanmaktadır [74]. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre yüksek sıcaklık, ekstrem pH gibi ağır çevre koşullarına daha dayanıklı olmaları ve tekrar kullanım olanağına sahip olmaları ile çoklu enzim sistemlerinin yararları birlikte değerlendirildiğinde destek materyal üzerinde çok sayıda enzimin bir arada immobilize edilmesi için uygun tekniklerin geliştirilmesi de önem göstermektedir. Çoklu enzim ko-immobilizasyonu için tek bir enzimin immobilizasyonunda kullanılan metotlardan yararlanılmaktadır. Ancak çok sayıda enzimin bir arada immobilizasyonu sırasında seçilen yönteme enzimlerden her birinin farklı tolerans gösterebilmesi ve her bir enzimin yapısı ve fonksiyonunun farklı olduğu göz önünde bulundurularak uygun metot seçilmelidir. Ko immobilizasyonun temel zorluğu çoklu enzimlerin destek üzerindeki bağıntılı pozisyonlarının etkili bir şekilde kontrol altında tutulmasıdır [75]. Çoklu enzim immobilizasyonuna en uygun olan metot kovalent immobilizasyondur [47]. Uygun metodun seçiminin ardından ko-immobilizasyonu gerçekleştirecek olan tüm enzimlere uygun bir destek materyalin seçimi de önemlidir. Ancak son 20 yıldır bu konuda yapılan çalışmalara rağmen ko-immobilize enzimlerin tekrarlayan sayıda kullanımlarına ve stabiliteilerinin arttırılmasına dair çalışmalara gereksinim duyulmaktadır [75].

Enzimlerin ko-immobilizasyonunda her bir enzimin ayrı olarak immobilizasyonuna göre daha az miktarda destek materyal ve kimyasal kullanılmaktadır. Bu nedenle ko-immobilize enzimlerin kullanımı ekonomiktir, ayrıca daha az zaman harcanarak istenilen enzimatik süreç tamamlanabilmektedir. Serbest enzimlere göre ko-immobilize enzimler, oluşan reaktif ve kısa ömürlü ara ürünler, reaksiyonun etkinliğini hızlandırmak ve reaksiyonu istenilen ürüne yönlendirmek için daha hızlı bir şekilde diğer aktif bölgeyi bulurlar. Özellikle çok basamaklı ardışık reaksiyonlarda ara ürünlerin aktif bölgeler arasındaki hızlı iletimi önemli rol oynamaktadır [76].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Enzimler

Çalışmada kullanılan α amilaz ve proteaz enzimleri Sigma' dan, pektinaz enzimi Ultrazyme' den temin edilmiştir.

3.2. Enzimatik Aktivite Tayini

3.2.1. α amilaz Aktivite Tayini

α amilaz enzim aktivitesinin tayini amacıyla iyodimetrik metot kullanıldı [77]. Reaksiyon tüpü 500 μ l enzim solüsyonuna 500 μ l substrat solüsyonu (% 0.5 w/v nişasta, 0.1 M, pH 7 sodyum fosfat tamponunda) ilave edilerek hazırlandı ve 30 dk 25°C' de inkübasyon gerçekleştirildi. Ardından tüplere 3 ml HCl ilave edildi ve reaksiyon durduruldu. Reaksiyon tüpünde kalan nişastanın tesbiti amacıyla iyot çözeltisi eklenerek oluşan rengin spektrofotometrik (Shimadzu-UV 1700) olarak ölçümü gerçekleştirildi. Ölçümler 620 nm' de yapıldı. İmmobilize enzim aktivitesinin tayini amacıyla serbest enzimle eşit miktarda enzim içeren 3 adet boncuk kullanıldı. Sonuçlar nişasta standart eğrisi ile karşılaştırıldı. 1 unit aktivite, sabit reaksiyon koşulları altında 1 dakikada 1 μ mol nişasta yıkımına neden olan enzim miktarı olarak belirlendi.

3.2.2. Pektinaz Aktivite Tayini

Pektinaz enziminin aktivitesinin tayininde Miller' ın kolorimetrik metodu kullanıldı [78]. Bu metotta 500 μ l enzim 1000 μ l substrat (% 0.5 w/v pektin, 0.1 M, pH 7 sodyum fosfat tamponunda) ile 25°C' de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüplere 1.5 ml DNS (Dinitro salisilik asit) solüsyonu eklenip 5 dk boyunca kaynayan su içerisinde bekletildiler. Reaksiyon sonrasında oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede, 540 nm' de ölçüldü. İmmobilize enzim aktivitesinin tayini amacıyla serbest enzimle eşit miktarda enzim içeren 3 adet boncuk kullanıldı. Sonuçlar glukoz eğrisi ile karşılaştırıldı. 1 unit aktivite, sabit reaksiyon koşulları altında 1 dakikada 1 μ mol redükte şeker oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak belirlendi.

3.2.3. Proteaz Aktivite Tayini

Proteaz enziminin aktivitesi modifiye Kunitz metodu kullanılarak gerçekleştirildi [79]. Reaksiyon karışımı, 100 μ l enzim ve 400 μ l kazein solüsyonu (% 0.5 w/v kazein, 0.1 M, pH 7 sodyum fosfat tamponunda) koyularak hazırlandı. 25 °C' de 30 dk' lık inkübasyonun ardından reaksiyonu

durdurmak için trikloro asetik asitten (%10 v/v) 500 µl ilave edildi. Ardından oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı 10.000 rpm' de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmındaki protein miktarı Lowry metodu ile tayin edildi [80]. Spektrofotometrede 660 nm' de absorbans değerleri ölçüldü. İmmobilize enzim aktivitesinin tayini amacıyla serbest enzimle eşit miktarda enzim içeren 3 adet boncuk kullanıldı. Sonuçlar tirozin eğrisi ile karşılaştırıldı. 1 unit proteolitik aktivite, sabit reaksiyon koşulları altında 1 dakikada 1 µg tirozin oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak belirlendi.

3.3. İmmobilizasyon Verimi ve Yükleme Etkinliği Değerlerinin Hesaplanması

-Yükleme etkinliği Eş. 3.1' e göre hesaplandı.

$$\frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} * 100 \quad \text{Eş. 3.1.}$$

C_i = Başlangıç protein konsantrasyonu (mg/ml)

C_f = Filtratın protein konsantrasyonu (mg/ml)

V_i = Başlangıç hacim

V_f = Filtratın hacmi

-İmmobilizasyon Verimi Eş. 3.2'ye göre hesaplandı.

$$\frac{\text{İmmobilize Enzim Aktivitesi}}{\frac{\text{Serbest Enzim Aktivitesi}}{\text{Aktivitesi}}} * 100 \quad \text{Eş. 3.2.}$$

3.4. α amilaz, Pektinaz ve Proteaz Enzimlerinin Ko-immobilizasyonu için Uygun Destek Materyal ve İmmobilizasyon Metodunun Seçimi

3.4.1. Enzimlerin Aljinat- κ Karragenan Hidrojel ile Tutuklama Yöntemiyle Ko-immobilizasyonu

Enzimlerin ko-immobilizasyonu için Şahin ve arkadaşları ile Hung ve arkadaşlarının immobilizasyon metodları kullanıldı [57],[81]. Eşit miktarlarda Na aljinat (Sigma) (% 1 w/v) ve κ Karragenan (Sigma) (% 1 w/v) distile su içerisinde çözüldü ve ardından α amilaz (0.1 mg/ml), pektinaz (7mg/ml) ve proteaz (5mg/ml) enzimlerinin solüsyonları ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda karıştırılmasının ardından karışım peristaltik pompa (Watson Marlow SCI 400, USA) kullanılarak damla damla 0.2 M CaCl_2 içerisine ilave edildi (Şekil 3.1). İçerisine tutuklama metoduyla üç enzimin immobilize edildiği Na aljinat ve κ Karragenan hidrojelden oluşan

boncuklar elde edildi. Daha sonra boncuklar distile su ile yıkanarak bağlanmamış enzim fraksiyonu ayrıldı. CaCl_2 çözeltisi ve yıkama suyunun protein içerikleri Lowry metodu kullanılarak saptandı. Boncuklar kullanılıncaya kadar 0.2 M CaCl_2 içerisinde $+4^\circ\text{C}$ ' de saklandılar. Enzimlerin ko-immobilize olup olmadıklarının araştırılması için hazırlanan boncuklar kullanılarak α amilaz, pektinaz ve proteaz enzimlerinin aktivite tayinleri yapıldı.

3.4.2. Enzimlerin Glutaraldehit ile Aktive Edilen Na Aljinat Boncuklarda Kovalent Bağlanma ile Ko-immobilizasyonu

Bu yöntemde Na aljinat (% 2.5 w/v) 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7) içerisinde çözüldü. Na aljinatın peristaltik pompa (Watson Marlow SCI 400, USA) aracılığıyla 0.2 M CaCl_2 solüsyonuna damlatılmasıyla aljinat boncuklar elde edildi. Boncukların aktive edilmesi için sodyum fosfat tamponu içerisinde % 2.5 v/v konsantrasyonda hazırlanan glutaraldehit solüsyonunda ve oda sıcaklığında, 2 saat 150 rpm' de karıştırma (Heidolph Rotamax 120, Germany) işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra aktive boncuklar 3 kez distile su ile yıkandılar. Kovalent enzim immobilizasyonu aşamasında α amilaz (0.1 mg/ml), pektinaz (7 mg/ml) ve proteaz (5 mg/ml) enzimlerinin solüsyonları ilave edildi ve her bir enzim için 60 dk' lık bağlanma süresinin ardından elde edilen enzim immobilize boncuklar filtrasyon ile ortamdan uzaklaştırıldı. Boncuklar enzim aktivitesi saptanmayıncaya kadar 3 kez distile suyla yıkandı ve kullanılıncaya kadar 0.2 M CaCl_2 içerisinde, $+4^\circ\text{C}$ ' de saklandılar. [82][83]. Enzimlerin ko-immobilize olup olmadıklarının araştırılması için hazırlanan boncuklar kullanılarak α amilaz, pektinaz ve proteaz enzimlerinin aktivite tayinleri yapıldı.

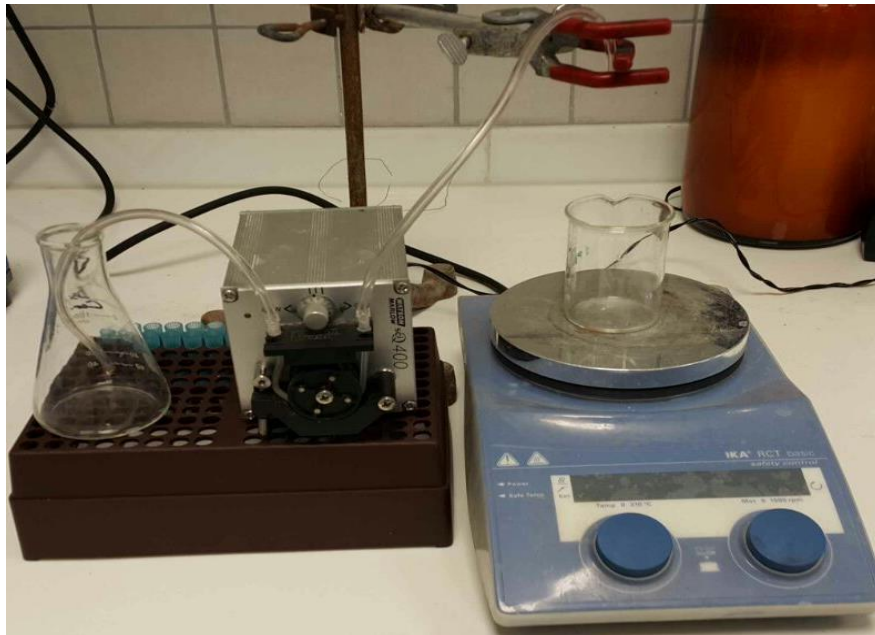
3.4.3. Enzimlerin Ekleme Yapılmış Na Aljinat Boncuklar ile Ko-immobilizasyonu

% 2' lik CaCl_2 içerisinde % 4' lük olarak poli etilen imin (PEI) hazırlandı. % 2.5' luk olarak sodyum fosfat tamponu içerisinde hazırlanan Na aljinat solüsyonu, bu karışım içerisine peristaltik pompa (Watson Marlow SCI 400, USA) aracılığıyla damlatılarak boncuklar hazırlandı. İşlenmiş Na aljinat boncukların % 2.5 v/v glutaraldehit konsantrasyonunda 2 saat karıştırılması (Heidolph Rotamax 120, Germany) ile yeni fonksiyonel aldehit grupları taşıyan makro küreler elde edildi. Kovalent enzim immobilizasyonu aşamasında α amilaz (0.1 mg/ml), pektinaz (7mg/ml) ve proteaz (5mg/ml) enzimlerinin solüsyonları ilave edildi ve her bir enzim için 60 dk'lık bağlanma süresinin ardından elde edilen enzim immobilize küreler filtrasyon ile ortamdan ayrıldı. Küreler 3 kez distile suyla yıkandı ve kullanılıncaya kadar 0.2 M CaCl_2 içerisinde, $+4^\circ\text{C}$ ' de saklandılar [53],[73],[84]

CaCl₂ çözeltisi ve yıkama suyunun protein içerikleri Lowry metodu kullanılarak saptandı [80]. Enzimlerin ko-immobilize olup olmadıklarının araştırılması için hazırlanan boncuklar kullanılarak α amilaz, pektinaz ve proteaz enzimlerinin aktivite tayinleri yapıldı.

3.4.4. Enzimlerin Na aljinat Jelde Tutuklama Yöntemiyle Ko-immobilizasyonu

Enzimlerin ko-immobilizasyonları amacıyla, 0.1 M sodyum fosfat tamponunda (pH 7) hazırlanan Na aljinat (% 2.5 w/v) ile üç farklı enzim solüsyonu sırasıyla 1.5:0.5:0.5:0.5 oranında karıştırıldı. Elde edilen karışımın peristaltik pompa (Watson Marlow SCI 400, USA) kullanılarak, içerisinde 0.2 M CaCl₂ bulunan solüsyona 10 cm yükseklikten damlatılmasıyla her biri birbiriyle aynı büyüklükte, enzim ko-immobilize edilmiş boncuklar oluşturuldu (Şekil 3.1). Boncuklar distile su ile yıkanarak bağlanmamış enzim fraksiyonu ayrıldı ve kullanılıncaya kadar 0.2 M CaCl₂ içerisinde, +4°C' de saklandılar [60]. CaCl₂ çözeltisi ve yıkama suyunun protein içerikleri Lowry metodu kullanılarak saptandı [80]. Enzimlerin ko-immobilize olup olmadıklarının araştırılması için hazırlanan boncuklar kullanılarak α amilaz, pektinaz ve proteaz enzimlerinin aktivite tayinleri yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Aljinat ile tutuklama metotlarında kullanılan düzenek



Şekil 3.2. Üç enzim ko-immobilize Na aljinat boncuklar

3.4.5. Na Aljinat Jelde Tutuklama Yöntemiyle Ko-İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

3.4.5.1. Na aljinat Konsantrasyonu

Üç enzimin Na aljinat jel ile kapsülleme metodu kullanılarak ko-immobilizasyonu için, farklı konsantrasyonlarda Na aljinat (% 2.5-% 3-% 3.5) solüsyonları sodyum fosfat tamponu (0.1 M, pH 7) kullanılarak hazırlandı. Enzim eklenen Na aljinat solüsyonlarının peristaltik pompa aracılığıyla 0.2 M'lık CaCl_2 çözeltisine damlatılmasıyla boncuklar elde edildi. Boncuklar yıkama işleminin ardından 0.2 M CaCl_2 içerisinde, $+4^\circ\text{C}$ 'de 24 saat bekletildi. CaCl_2 çözeltilerinin ve yıkama solüsyonlarının içerisindeki protein miktarları Lowry metodu ile tayin edildi. Hazırlanan boncuklar kullanılarak ko-immobilize olan pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin bağlı aktiviteleri saptandı.

3.4.5.2. CaCl_2 Konsantrasyonu

Üç enzimin Na aljinat jel ile kapsülleme metodu kullanılarak ko-immobilizasyonu için, % 2.5' luk Na aljinat solüsyonu hazırlandı. Daha sonra enzimlerle homojen bir şekilde karıştırılan Na aljinat solüsyonlarının peristaltik pompa aracılığıyla, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan CaCl_2 çözeltilerine (0.1M-0.2M-0.3M) damlatılmasıyla boncuklar elde edildi. Boncuklar yıkama işleminin ardından 0.2 M CaCl_2 içerisinde, $+4^\circ\text{C}$ 'de 24 saat bekletildi. CaCl_2 çözeltilerinin ve yıkama solüsyonlarının içerisindeki protein miktarları Lowry metodu ile tayin edildi. Hazırlanan

boncuklar kullanılarak ko-immobilize olan pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin bağıl aktiviteleri saptandı.

3.4.5.3. Enzim Konsantrasyonları

Üç enzimin Na aljinat jel ile kapsülleme metodu kullanılarak ko-immobilizasyonu için, üç enzimin farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonları kullanıldı. Pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimleri sırasıyla 1.5:1:0.02, 2:1:0.02 ve 1.5:1.5:0.02 şeklindeki oranlarda her birinden 500' er μ l olmak üzere Na aljinat solüsyonu içerisine ilave edildiler. α amilaz enzimi için kullanılan miktardan daha fazlası tampon içerisinde çözünemediği için çözünebilir en yüksek miktar her seferinde sabit tutuldu. Na aljinat konsantrasyonu % 2.5 olacak şekilde hazırlanan enzim ve Na aljinat solüsyonu peristaltik pompa aracılığıyla 0.1 M' lık CaCl_2 çözeltisi içerisine damlatılarak boncuklar elde edildi. Boncuklar yıkama işleminin ardından $+4^\circ\text{C}$ ' de 24 saat bekletildi. CaCl_2 çözeltilerinin ve yıkama solüsyonlarının içerisindeki protein miktarları Lowry metodu ile tayin edildi. Hazırlanan boncuklar kullanılarak ko-immobilize olan pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin bağıl aktiviteleri saptandı.

3.4.6. Enzimlerin Glutaraldehit Aracılığıyla Kitosan Boncuk Yüzeyine Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Ko-immobilizasyonu

Kitosan boncukların hazırlanması ve bu boncuklara enzim immobilizasyonunda Singh ve arkadaşları ile Kamburov ve Lalov' un kullanmış oldukları metodlar modifiye edilerek kullanıldı [68],[85]. Boncuklar presipitasyon metodu kullanılarak hazırlandı.

3.4.6.1. Kitosan Boncukların Hazırlanması

% 3 oranında toz kitosan tartılıp asetik asit (% 2 v/v) çözeltisi içerisine eklendi ve 45°C ' de karıştırılarak kitosan solüsyonu hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu solüsyon şırınga yardımıyla, 1 M NaOH (% 26' lık etanol içeren) içerisine damlatıldı ve boncuklar sertleşmeleri için 3 saat boyunca karıştırılarak NaOH içerisinde bekletildiler. Elde edilen boncuklar 24 saat boyunca sodyum fosfat tamponunda (0.1 M, pH 7) $+4^\circ\text{C}$ ' de saklandı.

3.4.6.2. Kitosan Boncukların Glutaraldehit ile Aktivasyonu

Hazırlanan 1.5 g kitosan boncuk 15 ml glutaraldehit solüsyonunda 3 saat 150 rpm' de çalkalama yoluyla (Heidolph Rotamax 120, Germany) aktive edildi (Şekil 3.3). Bu işlemten sonra ortamdaki bağlanmayan glutaraldehitin uzaklaştırılması amacıyla distile su ile boncuklar 3 kez yıkandı.

3.4.6.3. α amilaz, Pektinaz ve Proteaz Enzimlerinin Aktive Kitosan Boncuklara Ko-İmmobilizasyonu

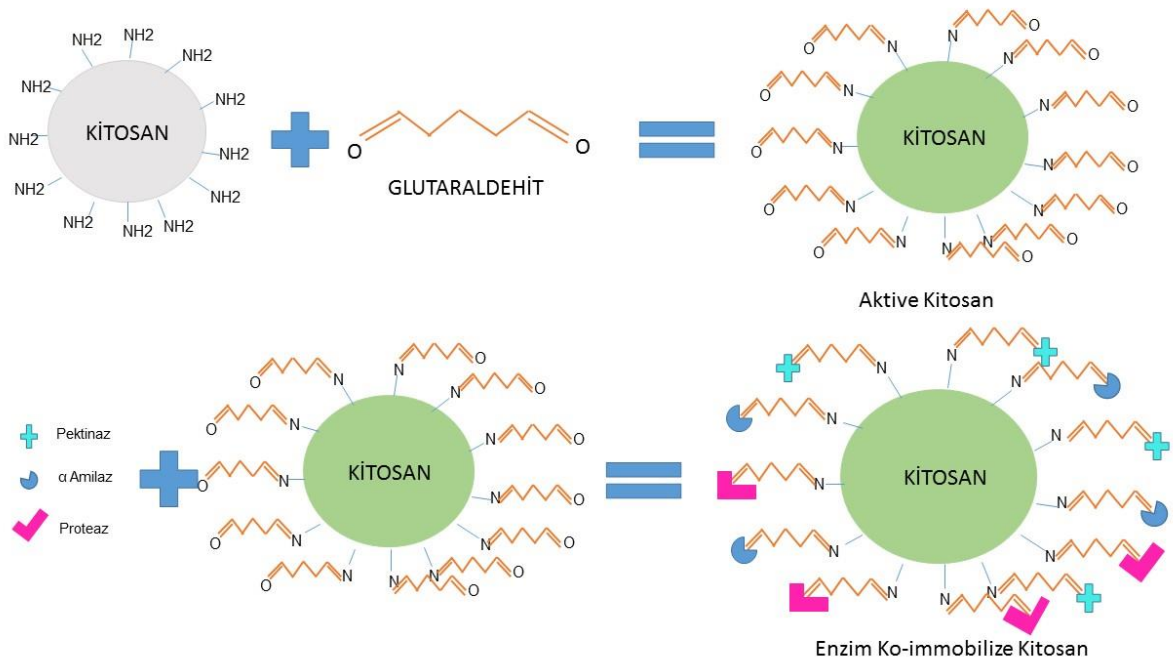
İmmobilizasyon için aktive edilen boncuklar ve sırayla α amilaz (0.1 mg/ml), pektinaz (7mg/ml) ve proteaz (5mg/ml) enzimlerinin solüsyonları, oda sıcaklığında pH 7' de 150 rpm' de karıştırılarak (Heidolph Rotamax 120, Germany) 3 saat inkübe edildi (Şekil 3.4). Her enzim için immobilizasyon işleminin ardından bağlanmayan enzimlerin uzaklaştırılması amacıyla distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra bağlanmayan enzim miktarlarının saptanabilmesi amacıyla yıkama solüsyonlarındaki protein miktarları Lowry metodu ile tespit edildi [80].



Şekil 3.3. Kitosan boncukların glutaraldehit ile aktivasyonu sırasında çalkalama amacıyla kullanılan cihaz



Şekil 3.4. Üç enzim ko-immobilize glutaraldehit ile aktive kitosan boncuklar



Şekil 3.5. Kitosan boncukların glutaraldehit ile aktivasyonu ve enzim ko-immobilizasyonu

3.4.7. Ko-İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan metotta kovalent immobilizasyon üzerine etkisi olan parametreler incelendi.

3.4.7.1. Kitosan Konsantrasyonu

Kitosan boncukların hazırlanması sırasında, kitosan konsantrasyonunun immobilizasyona etkisinin araştırılması amacıyla farklı konsantrasyonlarda (% 2.5- 3.5 w/v) % 2' lik asetik asit içerisinde hazırlanan kitosan solüsyonlarından boncuklar elde edildi. Daha sonra glutaraldehit ile gerçekleştirilen aktivasyon işleminin ardından boncuklar kovalent immobilizasyon amacıyla kullanıldılar.

3.4.7.2. Glutaraldehit Konsantrasyonu

Glutaraldehit konsantrasyonunun kovalent immobilizasyona etkisinin araştırılması amacıyla hazırlanan kitosan boncuklar farklı glutaraldehit (% 0.25- 3 v/v) konsantrasyonlarında aktive edildiler ve ardından bu boncuklara kovalent immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.4.7.3. Aktivasyon süresi

Kitosan boncukların glutaraldehit ile aktivasyon süresinin enzimlerin kovalent immobilizasyonuna etkilerinin araştırılması amacıyla kitosan boncuklar sabit konsantrasyondaki glutaraldehit solüsyonunda, farklı sürelerde (1-4 saat) bekletildiler ve ardından bu boncuklara kovalent immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.4.7.4. İmmobilizasyon Süresi

İmmobilizasyon süresinin, enzimlerin glutaraldehit ile aktive kitosan boncuklara kovalent immobilizasyonuna etkilerinin araştırılması amacıyla aktive edilen boncuklar ile enzimlerin her biri farklı sürelerde (3-6 saat) inkübe edilerek kovalent immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.4.8. Kitosan Boncukların Karakterizasyonu

3.4.8.1. Kitosan Boncukların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Normal kitosan boncukların, glutaraldehit ile aktive edilmiş boncukların ve enzimlerin ko-immobilize edildiği boncukların detaylı yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (Quanta 400F Field Emission SEM, USA) kullanılarak ODTÜ Merkez Laboratuvarında analiz edildi. SEM öncesi kitosan boncuklar kurutuldu. Daha sonra iletken bir yapıştırıcı kullanılarak SEM örnek plakası üzerine boncuklar tutturuldu. Yüzeyleri altın ile kaplanarak iletken hale getirildiler. Örneklerin farklı büyütme oranlarında resimleri çekildi [86].

3.4.8.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Kitosan boncukların glutaraldehit ile aktive edildiklerini doğrulamak için normal kitosan boncuklar, aktive edilmiş olanlar, enzim immobilize ve enzim ko-immobilize boncukların kimyasal yapısı ve kompozisyonları FTIR (Thermo Scientific İS50 NIR, USA) analizi ile belirlendi. Analiz işlemleri Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından gerçekleştirildi.

3.5. Serbest ve İki Farklı Destek Materyal Kullanılarak Ko-immobilize Edilen Enzimlerin Bazı Özelliklerinin Saptanması

3.5.1. Optimum Çalışma Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest pektinaz, α amilaz ve proteaz enzimleri ile hem Na aljinat ile hem de aktive edilmiş kitosan boncuklara ko-immobilize edilen pektinaz, α amilaz ve proteaz enzimlerinin maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklığın saptanması için 10-35°C arasındaki farklı sıcaklıklarda 30 dakikalık

inkübasyonun ardından enzim aktivitesi tayin edildi. Serbest enzimlerin aktivitesi saptanırken ko-immobilize boncuklardaki ile aynı miktarda enzim kullanıldı. Enzim aktivitesi spesifik aktivite olarak hesaplandı.

3.5.2. Optimum Çalışma pH' larının Belirlenmesi

Serbest pektinaz, α amilaz ve proteaz enzimleri ile hem Na aljinat ile hem de aktive edilmiş kitosan boncuklara ko-immobilize edilen pektinaz, α amilaz ve proteaz enzimlerinin maksimum aktivite gösterdikleri pH değerlerinin belirlenmesi için pH 6-8 arasında değişen farklı pH' larda hazırlanan sodyum fosfat tamponu (0.1 M) kullanıldı. Substrat solüsyonları bu tamponlarla hazırlandı. 30 dakika her enzim için optimum sıcaklıklardaki inkübasyonun ardından enzim aktiviteleri tayin edildi ve spesifik aktivite olarak hesaplandı.

3.5.3. Termal Kararlılıklarının Saptanması

Enzim ko-immobilize edilen Na aljinat ve aktive edilmiş kitosan boncuklar 2 saat boyunca 4°C, 25°C ve 50°C olmak üzere farklı sıcaklıklarda bekletildiler. Bekletme işlemi Na aljinat boncuklar için 0.2 M CaCl₂ içerisinde, kitosan boncuklar için ise sodyum fosfat tamponu (0.1 M, pH 7) içerisinde gerçekleştirildi. Daha sonra farklı sıcaklıkların enzimlerin aktivitelerine etkisini araştırmak için aktivite tayini yapıldı ve kalan aktivite (%) olarak hesaplandı. Sa

3.5.4. pH Kararlılıklarının Saptanması

Ko-immobilize enzimlerin pH stabiliteilerinin saptanması amacıyla enzim ko-immobilize Na aljinat ve aktive kitosan boncuklar 20 saat süreyle pH 6, 7 ve 8 olmak üzere farklı pH değerlerinde hazırlanan sodyum fosfat tamponu (0.1 M, pH 7) içerisinde bekletildiler. Ardından pH' nın enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla aktivite tayini yapıldı ve kalan aktivite (%) olarak hesaplandı.

3.5.5. Depolama Kararlılıklarının Saptanması

Enzimlerin saklanma sürelerinin enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi amacıyla enzim ko-immobilize Na aljinat boncuklar ve aktive edilmiş kitosan boncuklar 6 hafta süreyle 4°C ve 25°C sıcaklıklarda saklandılar. Saklama işlemi Na aljinat boncuklar için 0.2 M CaCl₂ içerisinde, kitosan boncuklar için sodyum fosfat tamponunda (0.1 M, pH 7) gerçekleştirildi. Her hafta, her iki sıcaklık değerinde de tutulan ko-immobilize enzimlerin aktivitelerindeki değişimler saptandı ve kalan aktivite (%) olarak hesaplandı.

3.5.6. Operasyon Kararlılıklarının Saptanması

Hem Na aljinat hem de aktive edilmiş kitosan boncuklara ko-immobilize edilen pektinaz, α amilaz ve proteaz enzimlerinin operasyon kararlılıklarının saptanması amacıyla boncuklar tekrarlayan reaksiyonlarda kullanılarak test edildiler. Her bir reaksiyonun ardından ko-immobilize enzim taşıyan boncuklar reaksiyon ortamından uzaklaştırılıp distile su ile yıkandılar ve +4°C' de 0.2 M CaCl₂ ve sodyum fosfat tamponu (0.1 M, pH 7) içerisinde saklandılar.

3.6. Aktive Edilmiş Kitosan Boncuklara Ko-immobilize Enzimlerle Atıksu Ön Arıtımı

Aktive edilmiş kitosan boncuklara ko-immobilize edilen proteaz, pektinaz ve α amilaz enzimlerinin atıksu ortamındaki organik kirleticilerin giderimine olan etkilerinin saptanması amacıyla sentetik evsel atıksu ortamı hazırlandı ve enzim ko-immobilize boncuklar bu su içerisine atıldı. Sentetik atıksu olarak Antoniadis ve arkadaşlarının hazırlamış olduğu evsel atıksu modifiye edilerek kullanıldı (Çizelge 3.1) [87]. Sentetik atık suyun içerisine ko-immobilize enzimlerin aktivitelerinin karşılaştırmalı analizi amacıyla çalışmanın önceki kısımlarında kullanılan miktarda nişasta (% 0.05 w/v), kazein (% 0.5 w/v) ve pektin (% 0.5 w/v) ilave edildi. Daha sonra enzim ko-immobilize boncuklar bu atıksu ortamına atılarak 1 saat uygun sıcaklıkta inkübe edildiler. Ko-immobilize α amilaz enziminin nişasta yıkımına etkisinin tespiti için iyodimetrik yöntemle kalan nişasta tayin edildi. Ko-immobilize proteaz enziminin kazein yıkımına etkisinin araştırılması için Bradford yöntemi kullanılarak kalan kazein miktarı belirlendi [88]. Ko-immobilize pektinaz enziminin pektin yıkımına etkisinin belirlenmesi için ise DNS metodu kullanılarak yıkım ürünü olan redükte şeker tayini yapıldı.

Çalışmada farklı atıksu ortamlarının enzimlerin aktivitelerine etkisinin araştırılması amacıyla deniz suyu içerisine atık madde olarak nişasta (% 0.05 w/v), kazein (% 0.5 w/v) ve pektin (% 0.5 w/v) ilave edilerek bir atıksu ortamı daha hazırlandı. Son olarak gerçek bir örnekle de çalışmanın ön arıtım aşamasının araştırılması amacıyla, Biosis firmasından alınan gerçek evsel atıksu kullanıldı. Bu atıksuya atık madde olarak nişasta (% 0.05 w/v), kazein (% 0.5 w/v) ve pektin (% 0.5 w/v) ilave edilerek modifiye edildi. Ko-immobilize enzimlerin farklı atıksulardaki yıkım miktarları değerlendirildi.

Çizelge 3.1. Atıksu olarak kullanılan modifiye sentetik evsel atıksuyun kimyasal kompozisyonu

Kimyasallar	Konsantrasyonları (gl⁻¹)
Kazein	5
Nişasta	5
Pektin	0.5
Üre	0.012
K₂HPO₄	0.011
NaCl	0.0028
CaCl₂.2H₂O	0.0016
MgSO₄.7H₂O	0.0008

4. SONUÇ ve TARTIŞMA

Çok yönlü katalizörler olan enzimler günümüzde biyoteknoloji alanında giderek artan sayıda uygulamada kullanılmaktadırlar. Sahip oldukları özellikler onların atık ve kirleticilerin arıtımı işlemlerinde de kullanımlarını cazip hale getirmektedir. Ayrıca geleneksel arıtım metodları yerine kullanılmaları avantajlı olabilmektedir çünkü çözücüler gibi pek çok ağır kimyasal maddenin işlevini yerine getirebilmektedirler. Kimyasal dönüşüm işlemleri yüksek sıcaklıklar ya da ekstrem pH değerleri gibi ağır şartlarda gerçekleştirilirken, enzimlerin rol aldığı dönüşüm işlemleri nötral pH'larda, normal sıcaklık derecelerinde ve çevreye zarar vermeden gerçekleşmektedirler. Atık bir su ortamındaki kirleticilerden istenilen maddenin spesifik olarak giderimi de enzimler sayesinde mümkün olabilmektedir. Aynı zamanda enzimlerin spesifik olması arıtım proseslerinin maliyetini arttıran, istenmeyen yan reaksiyonların gerçekleşmesini de engellemesi bakımından oldukça avantajlıdır. Ancak üretimi ve saflaştırılması son derece maliyetli olan enzimlerin serbest halde biyoremediyasyon ve biyodegradasyon işlemlerinde kullanımı arıtım işlemlerinin de giderimini arttıracığı için mümkün değildir [6]. Bu nedenle atıksu arıtım proseslerinde immobilize enzimler kullanılmaktadır [9]. Buna ek olarak çok basamaklı reaksiyonların yer aldığı işlemlerde kullanılmak üzere çoklu enzim immobilizasyonu gerçekleştirilerek doğadaki enzim sistemleri taklit edilebilmektedir. Ko-immobilizasyon amacıyla tek bir enzimin immobilizasyonunda kullanılan metotlardan yararlanılabilmektedir. Ancak ko-immobilizasyon işlemlerinde karşılaşılan en önemli zorluk tek bir destek materyal üzerinde çok sayıda enzim bağl pozisyonlarının etkili bir şekilde kontrol edilebilmesidir. Bu nedenle materyal seçimi ve uygun immobilizasyon metodunun seçimi önem taşımaktadır [75]. Sunulan bu çalışmada atıksu ön arıtımında kullanılmak üzere α amilaz, proteaz ve pektinaz olmak üzere üç farklı enzimin bir arada immobilize edildiği bir ko-immobilize enzim sisteminin modellemesi hedeflendi. Bu amaçla farklı destek materyaller arasından seçilen iki destek materyalin ko-immobilizasyon işlemindeki etkinliklerinin karşılaştırılması neticesinde uygun destek materyalin ve yöntemin seçimi, ko-immobilizasyon koşullarının optimizasyonu ve koimmobilize enzimlerin atıksu ön arıtımında kullanılabilirliklerinin araştırılması gerçekleştirildi.

4.1. α amilaz, Pektinaz ve Proteaz Enzimlerinin Ko-immobilizasyonu İçin Uygun Destek Materyal ve İmmobilizasyon Metodunun Seçimi

Üç enzimin birarada immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla 3 farklı materyal, 5 farklı metot kullanılarak ko-immobilizasyon çalışmaları yapıldı. Yapılan ön denemeler sonucunda Na

aljinat-κ karragenan hidrojel, glutaraldehit ile aktive edilmiş Na aljinat boncuklar ve ekleme yapılmış Na aljinat boncuklar kullanıldığında proteaz ve α amilaz enzimleri için aktivite saptanamadı. Na aljinat ile tutuklama metodu ve glutaraldehit ile aktive edilen kitosan boncuklara kovalent immobilizasyon metodu ile ko-immobilizasyon gerçekleştirildiğinde ise üç enzimde de aktivite saptandı. Bu nedenle çalışmanın devamında bu iki materyal ve yöntem kullanılarak ko-immobilizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Çalışmada yer alan tüm deney sonuçları üç paralel çalışmanın sonucunda elde edilmişlerdir. Grafikler üzerinde standart sapmalar gösterilmektedir.

4.2. α amilaz, Pektinaz ve Proteaz Enzimlerinin Na aljinat Jelde Tutuklama Yöntemiyle Ko-immobilizasyonu

İmmobilizasyon yöntemlerinden biri olan tutuklama, enzimin kimyasal yapısında bir modifikasyona neden olmaması nedeniyle oldukça avantajlıdır. Ayrıca immobilizasyon teknikleri arasında özellikle kalsiyum aljinat jel içerisinde tutuklama, yöntemin kolay olması ve toksik olmaması gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir [89]. Bu özelliklerinin yanı sıra aljinat ucuz olması, mekanik gücünün iyi olması, substrat ve ürün difüzyonuna uygun porlu bir yapıya sahip olmasından dolayı da farklı enzimlerin immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bir destek materyaldir [90].

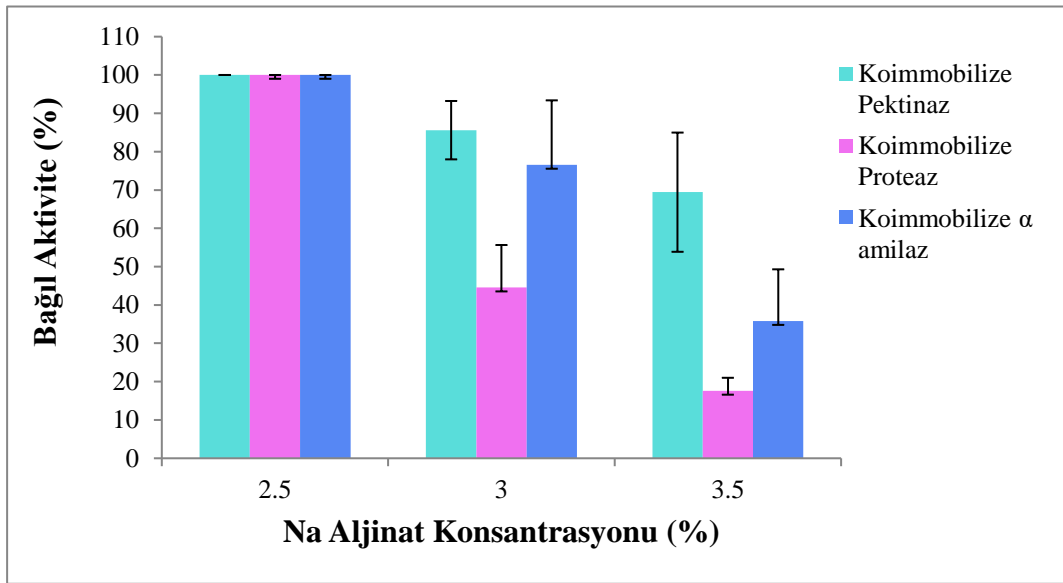
Çalışmamızda da avantajlı özellikleri nedeni ile pektinaz, α amilaz ve proteaz enzimlerinin ko-immobilizasyonu amacıyla Na aljinat boncuklar hazırlandı. Na aljinat ve 3 enzimin yer aldığı solüsyonun peristaltik pompa aracılığıyla CaCl₂ içerisine damlatılmasıyla 3 mm çapında olan eşit büyüklükte boncuklar elde edildi. Literatürde bu çalışmada kullanılan üç enzimin Na aljinat jel içerisinde ko-immobilize edildiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Farklı enzimlerin ikili ko-immobilizasyonunda Na aljinatın kullanıldığı birkaç çalışma bulunmaktadır. Blandino ve arkadaşlarının çalışmasında glukoz oksidaz ve katalaz enzimlerinin ko-immobilizasyonu için Na aljinat boncuk ve kapsül kullanılmıştır [91]. Sükrozdan izomaltoz oligosakkaritlerin üretildiği başka bir çalışmada ise dekstranaz ve dekstranatsükraz enzimleri Na aljinattan oluşan boncuklar, fiberler ve kapsüller ile ko-immobilize edilmiştir [92]. Park ve arkadaşlarının çalışmasında da amilaz ve glukoamilaz enzimleri yüzeyi modifiye edilmiş taşıyıcılara bağlanıp daha sonra da Na aljinat boncukları içerisinde ko-immobilize edilmişlerdir [93]. Çalışmamızda literatürdeki çalışmalardan farklı olarak üç enzimin, enzim aktiviteleri korunarak Na aljinat içerisine ko-immobilizasyonunun gerçekleştirilmiş olmasının yapılacak bundan sonraki ko-immobilizasyon çalışmaları bakımından yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

4.2.1. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Na aljinatın jelleşme koşulları değiştirilerek elde edilen boncukların özellikleri istenilen şekilde değiştirilebilmektedir. Çeşitli substratlara karşı geçirgenliği ya da kalınlığı gibi özellikleri farklılık gösterebilmektedir. Aljinat ve CaCl_2 konsantrasyonları enzim tutuklama için başlıca parametrelerdir çünkü aljinat ve Ca^{+2} iyonları arasındaki çapraz bağlanma jel oluşumunu sağlamaktadır [94].

4.2.1.1. Na Aljinat Konsantrasyonu

Na aljinat konsantrasyonunun enzim ko-immobilizasyonuna olan etkisi incelendiğinde üç enzim için de bağıl aktivitenin en yüksek olduğu konsantrasyon % 2.5 olarak tespit edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Na aljinat ile pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağıl aktivitesine farklı Na aljinat konsantrasyonlarının etkisi

* Üçlü enzim immobilizasyonu Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Aynı zamanda % 2.5 Na aljinat konsantrasyonunda immobilizasyon verimi değerleri pektinaz için % 46.15, proteaz için % 17.28 ve α amilaz için % 67.08' dir (Çizelge 4.1). Çalışmamızla paralel olarak Ölçer ve arkadaşlarının ikili enzim immobilizasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmalarında preimmobilize haldeki dekstranaz ve dekstransükraz enzimleri % 2' lik Na aljinat solüsyonu kullanılarak ko-immobilize edilmişlerdir [92]. Na aljinat ile α amilaz enziminin tekli immobilizasyonunun optimizasyonunun gerçekleştirildiği diğer bir çalışmada ise en yüksek enzim aktivitesi % 3 Na aljinat konsantrasyonunda gözlenmiştir [94].

Çalışmamızda saptanan Na aljinat konsantrasyonu değerini bu çalışmalardaki sonuçlarla karşılaştırmamız kullanılan enzimlerin farklı olması nedeniyle tam olarak mümkün olmamaktadır.

Çizelge 4.1. Na aljinat boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı Na aljinat konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi

İmmobilizasyon Verimi (%)			
Na aljinat konsantrasyonu (%)	Pektinaz	Proteaz	α amilaz
2.5	46.15	17.28	67.08
3	39.5	7.69	51.34
3.5	32.04	3.04	24.01

*Enzimlerin immobilizasyon verimi Bölüm 3.3’ de gösterilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

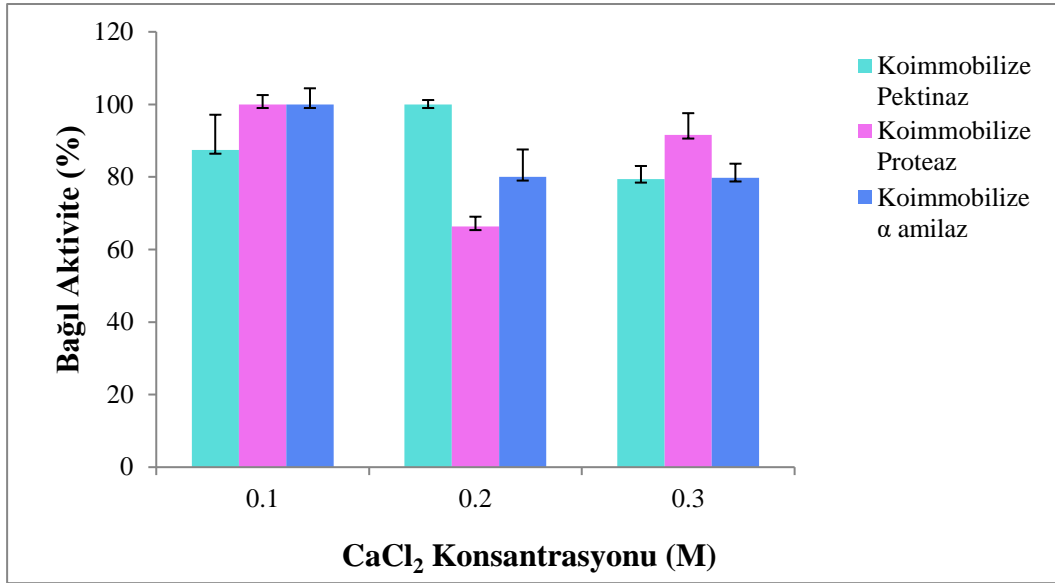
Çalışmalarda kullanılan enzimlerin ve bu enzimlerin substratlarının özellikle büyüklüklerinden kaynaklanacak farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamızda Na aljinat konsantrasyonu arttırıldığında enzimlerin aktivitesinde düşüş meydana gelmesinin, oluşan sıkı jel yapısı nedeniyle daralan porlardan substrat transferinin kısıtlanıyor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Na aljinat konsantrasyonunun artmasıyla daralan porlar nedeniyle substratların enzimlerin aktif bölgelerine ulaşımı olumsuz etkilenmiş olabilir.

4.2.1.2. CaCl₂ Konsantrasyonu

Enzim ko-immobilizasyonuna CaCl₂’ ün etkisi incelendiğinde optimum konsantrasyonun α amilaz ve proteaz enzimleri için 0.1 M, pektinaz enzimi için ise 0.2 M olduğu saptandı (Şekil 4.2.). Pektinazın 0.1 M CaCl₂ konsantrasyonundaki bağlı aktivitesinin % 80’ in üzerinde olması nedeniyle çalışmaya diğer iki enzimin aktivitesinin en yüksek olarak bulunduğu 0.1 M CaCl₂ değeri ile devam edildi. Aynı zamanda 0.1 M CaCl₂ konsantrasyonunda immobilizasyon verimi değerleri pektinaz için % 40.34, proteaz için % 26.04 ve α amilaz için % 83.8’ dir (Çizelge 4.2).

Literatürde yer alan çalışmalara baktığımızda iki farklı enzimin aljinat boncuklar içerisinde ko-immobilize edildiği bir çalışmada aljinat boncukların oluşturulması sırasında % 0.2 M CaCl₂ konsantrasyonu kullanıldığı görülmektedir [92]. Park ve arkadaşlarının glukozamilaz ve amilaz

enzimlerinin ko-immobilizasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmalarında ise çalışmamızla benzer olarak CaCl_2 konsantrasyonu 0.1 M olarak bulunmuştur [93].



Şekil 4.2. Na aljinat ile pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağıl aktivitesine farklı CaCl_2 konsantrasyonlarının etkisi

*Üçlü enzim immobilizasyonu Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.2. Na aljinat boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı CaCl_2 konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi

İmmobilizasyon Verimi (%)			
CaCl_2 konsantrasyonu (M)	Pektinaz	Proteaz	α amilaz
0.1	40.34	26.04	83.8
0.2	46.15	17.28	67.08
0.3	36.6	3.04	66.87

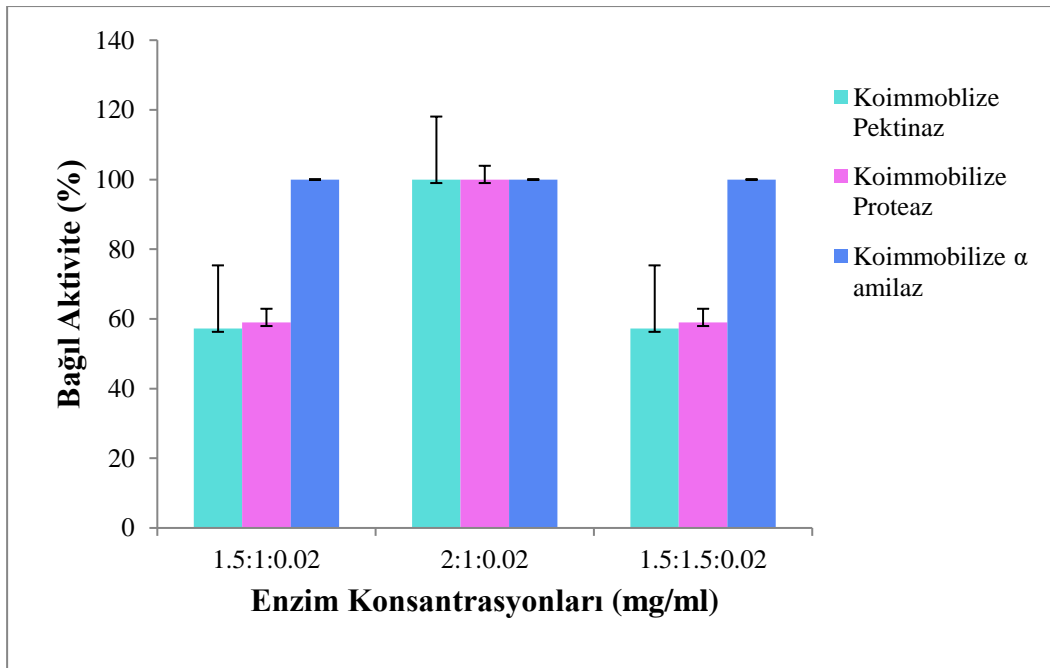
*Enzimlerin immobilizasyon verimi Bölüm 3.3' de gösterilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

Tek bir enzimin immobilizasyonunun gerçekleştirildiği bir diğer çalışmada da CaCl_2 konsantrasyonunun 0.1 M olduğu saptanmıştır [95]. Na aljinat jel oluşumu Ca iyonları gibi katyonların varlığında iyonik bir ağ yapısının oluşturulması ile gerçekleşmektedir. Bu sebeple Ca

konsantrasyonunun az olması durumunda jelin kompakt yapısı sağlanamayıp jel dışına enzim sızıntısı meydana gelirken konsantrasyonun gereğinden fazla olması ise jel yüzeyindeki porların çok küçük olmasına sebebiyet vermektedir. Porların küçük olması ise nişasta ve kazein gibi büyük molekül ağırlıklı substratların jelden geçişini engellemektedir. Bu nedenle çalışmamızda CaCl_2 konsantrasyonu arttıkça enzimlerin bağıl aktivitesinde azalma meydana gelmesi beklenen bir sonuç olmaktadır.

4.2.1.3. Yüklenen Enzim Konsantrasyonu

Na aljinat jel ile enzim immobilizasyonunu etkileyen parametrelerden bir diğeri de yüklenen enzimin miktarıdır. α amilaz enzimi için tampon içerisinde çözünebilir en yüksek miktar kullanıldığı için enzim miktarında bir değişiklik yapılamamıştır. Diğer iki enzim için konsantrasyon oranları değiştirilerek enzim aktivitesi saptanmıştır. Denenen tüm enzim konsantrasyonlarından sadece Şekil 4.3’ de görülen 3 farklı kombinasyonda ko-immobilizasyon işlemi başarılı olmuştur.



Şekil 4.3. Na aljinat ile pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağıl aktivitesine farklı enzim konsantrasyonlarının etkisi

*Üçlü enzim immobilizasyonu Bölüm 3.2’ de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bu durumun farklı konsantrasyonlardaki enzimlerin aralarında, bağlanma sırasında bir yarış oluşması nedeniyle olabileceği söylenebilir. Pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimleri için bağlı aktivitenin en yüksek olduğu oran sırasıyla 2:1:0.02 olarak saptanmıştır (Şekil 4.3). Aynı zamanda 2:1:0.02 enzim konsantrasyonunda immobilizasyon verimi değerleri pektinaz için % 83.04, proteaz için % 30.07 ve α amilaz için % 67.7' dir (Çizelge 4.3). Proteaz enziminin konsantrasyonu arttıkça aktivitesinin düştüğü saptanmıştır. Aktivitede meydana gelen bu düşüşün uygun olmayan non kovalent bağlanmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde bu üç enzimin bir arada kullanıldığı başka bir çalışmaya rastlanmaması nedeniyle karşılaştırma yapılamamıştır.

Çizelge 4.3. Na aljinat boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı enzim konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi

İmmobilizasyon Verimi (%)			
Enzim konsantrasyonu (mg/ml)	Pektinaz	Proteaz	α amilaz
1.5:1:0.02	47.58	18.10	67.7
2:1:0.02	83.04	30.7	67.7
1.5:1.5:0.02	47.58	18.10	67.7

*Enzimlerin immobilizasyon verimi Bölüm 3.3' de gösterilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

4.3. Enzimlerin Glutaraldehit Aracılığıyla Kitosan Boncuk Yüzeyine Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Ko-immobilizasyonu

4.3.1. Kitosan Boncukların Hazırlanması

Kitosan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen doğal bir polisakkarittir. Farklı boyutlardaki kitosan destek partikülleri presipitasyon, emülsiyon çapraz bağlama, spray kurutma, iyonotropik jelleşme, emülsiyon damlatma, ters misel metodu gibi çeşitli metotlar kullanılarak hazırlanmaktadır. Kitosan biyouyumlu bir materyal olması, toksik olmaması ve maliyetinin düşük olması nedeniyle çeşitli çalışmalarda enzim immobilizasyonu amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır [67],[96].

Çalışmamızda kitosan boncukların hazırlanmasında başlıca metot olan presipitasyon yöntemi kullanılmıştır. Kitosanın asidik pH' larda çözünme özelliğinden faydalanarak asetik asit içerisinde

kitosan solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon damla damla NaOH ve etanolden oluşan bir karışımın içerisine eklendi. Alkali pH' larda kitosan polimerleşmeye başladığı için damlacıklardan 4 mm boyutunda ve birbirleriyle eşit büyüklükte olan sert boncuklar elde edildi [68]. Çalışmamızla benzer olarak lignin peroksidaz ve mangan peroksidazın ko-immobilize edildiği bir çalışmada kitosan boncuklar nötralizasyon yöntemiyle hazırlanmıştır, farklı olarak ise boncukların presipitasyonunda etanol yerine metanol kullanılmıştır [96]. Yang ve arkadaşlarının yapmış oldukları ko-immobilizasyon çalışmasında ise çalışmamızdan farklı olarak emülsiyon/çapraz bağlama yöntemi kullanılmıştır. Emülsifikasyon aşamasında sıvı olarak hazırlanan kitosan solüsyonu yağ fazından oluşan bir ayırma ortamına damlatılmıştır ve daha sonra da bir çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit ortama eklenerek polimerleşme süreci sağlanmıştır [97].

4.3.2. Kitosan Boncukların Glutaraldehit ile Aktivasyonu

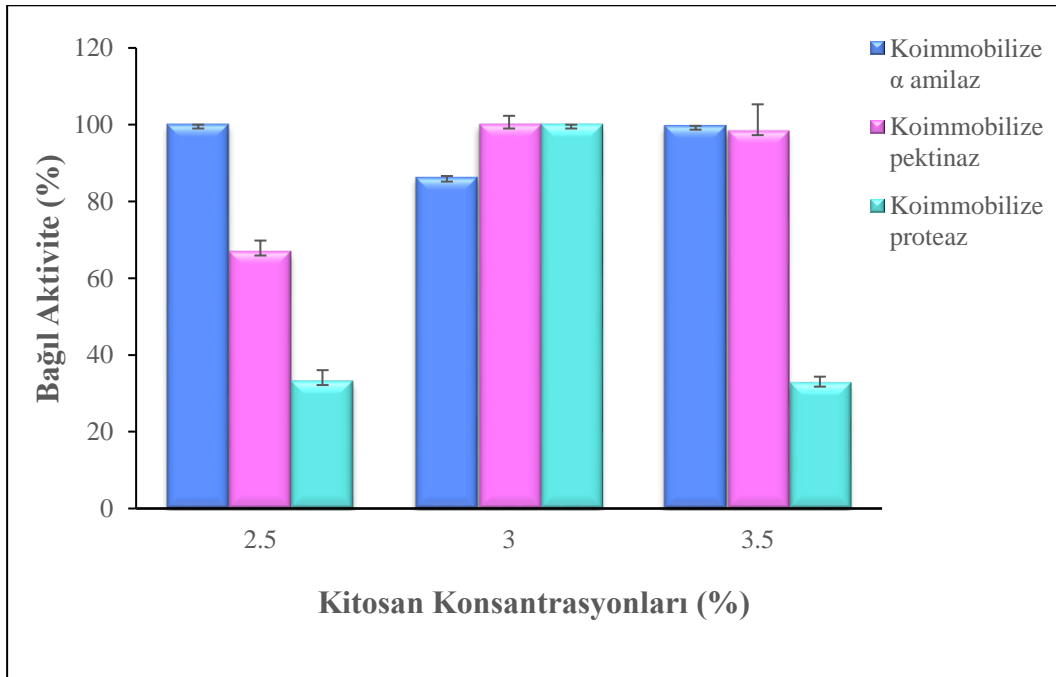
Kitosanın kimyasal modifikasyonlar sonucunda reaktif hale gelen amino ve hidroksil grupları enzim bağlayabilme kapasitesindedir. Kitosan bu aktivasyon neticesinde taşıdığı kısa uzatıcı kollar aracılığıyla enzimlerle pek çok noktadan kovalent bağlanma gerçekleştirebilecek hale gelmektedir. Bu amaçla kullanılan glutaraldehit bi fonksiyonel bir ajandır. Glutaraldehit enzimlerin özellikle amino gruplarıyla reaksiyona girmektedir, ayrıca imidazoller, fenoller ve tiyollerle de bağlanabilme özelliğindedir. Glutaraldehitin aldehit grupları hem asidik hem de nötral pH değerlerinde proteinlerle Schiff bazı denilen yapılar oluşturarak reaksiyona girmektedir. Destek materyal ile glutaraldehit arasında Schiff bazı yapısının oluşması ile boncuklarda kahverengimsi bir renk değişimi gözlenmektedir [70]. Desteğin glutaraldehit ile aktive edilmesi bağlanmak istenen enzimin geri dönüşümsüz olarak bir amino-destek bağıyla bağlanmasını sağlamaktadır [71].

Çalışmamızda kitosan boncukların pH 5.4' de glutaraldehit ile aktivasyonu gerçekleştirildi. Bu aktivasyonun ardından boncuklar kahverengi-yeşil hale geldiler ve kovalent enzim immobilizasyonu için kullanıldılar. Çalışmamızla benzer olarak Ran ve arkadaşlarının çalışmasında kitosan mikrokürelerin aktivasyonu glutaraldehit ile gerçekleştirilmiş ve ikili enzim ko-immobilizasyonu için kullanılmıştır [96]. Ancak literatürde aktive kitosan makrokürelerin üçlü enzim ko-immobilizasyonu için kullanıldığı bir başka çalışmaya rastlanmamıştır.

4.3.3. α amilaz, Pektinaz ve Proteaz Enzimlerinin Aktive Kitosan Boncuklara Ko-immobilizasyonunun Optimizasyonu

4.3.3.1 Kitosan Konsantrasyonu

Enzim immobilizasyonunun verimi boncuklardaki kitosan konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir [68]. Şekil 4.4' de görüldüğü gibi, bağlı aktivitelerin iki enzim için en yüksek olduğu konsantrasyon % 3 kitosan konsantrasyonudur. % 3 oranında kitosan konsantrasyonu ile hazırlanan boncuklarda pektinaz, α amilaz ve proteaz enzimlerinin immobilizasyon verimlerinin sırası ile % 380, % 116 ve % 40 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4). Elde edilen bu immobilizasyon verimi değerleri Na aljinat boncukta ko-immobilize proteaz, pektinaz ve α amilaz enzimleri ile karşılaştırıldığında destek materyal olarak kitosanın kullanımının daha uygun olduğu saptanmaktadır (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3). Boncukların hazırlanması sırasında kullanılan farklı kitosan konsantrasyonlarının bağlı aktivitesi üzerinde en fazla etkisinin saptandığı enzimin proteaz enzimi olduğu belirlenmiştir. Bu enzim için en iyi yükleme etkinliği değeri % 3 kitosan konsantrasyonu ile hazırlanan kitosan boncukların kullanımı sonucunda görülmektedir.



Şekil 4.4. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağlı aktivitesine farklı kitosan konsantrasyonlarının etkisi

*Üçlü enzim immobilizasyonu Bölüm 3.3.6' da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızla benzer olarak Nusratun ve arkadaşlarının yapmış oldukları lipaz enzimini kitosan boncuklara immobilize ettikleri çalışmada % 3' lük olarak hazırlanan kitosan solüsyonu kullanılmıştır [98]. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan kürelere keratinolitik metalloproteazın immobilize edildiği başka bir çalışmada ise kitosan küre üretimi için optimum kitosan konsantrasyonu % 2 olarak bulunmuştur [99]. Çalışmalarda elde edilen optimal kitosan konsantrasyonlarının değişik olmasının, kullanılan kitosanların moleküler ağırlıklarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.4. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı kitosan konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği değerleri üzerindeki etkisi

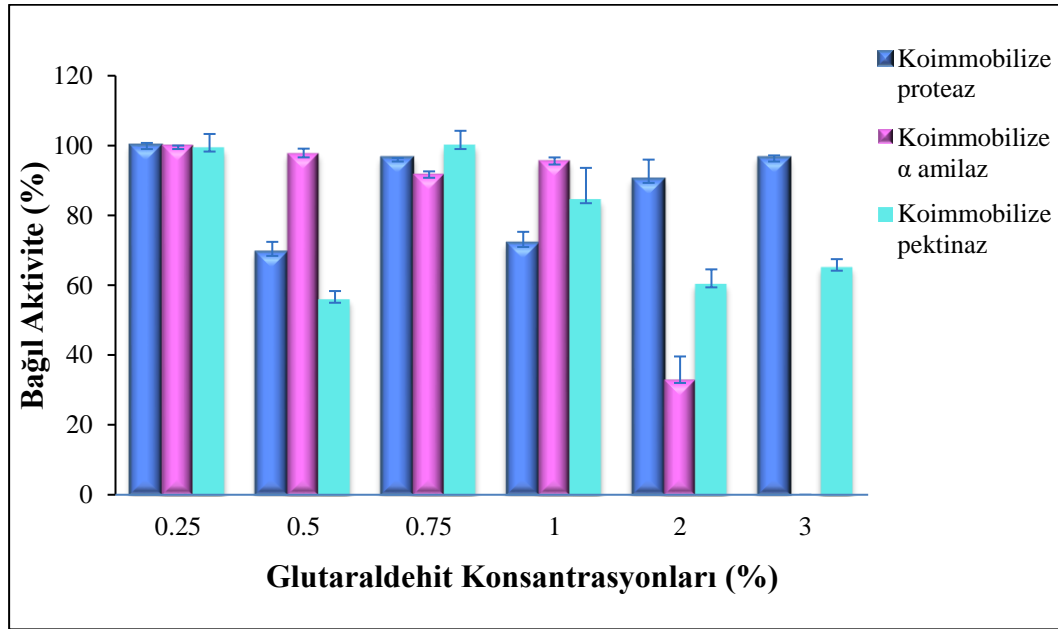
Kitosan konsantrasyonu (%)	İmmobilizasyon Verimi (%)			Yükleme Etkinliği (%)		
	Pektinaz	α amilaz	Proteaz	Pektinaz	α amilaz	Proteaz
2.5	261.57	106	16	91.96	86	44.5
3	380	116	40	96	68	81.25
3.5	384	99.79	14	91	78	57.7

*Enzimlerin immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği Bölüm 3.3' de gösterilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

Çalışmamızda % 3 kitosan konsantrasyonunda elde edilen kitosan makrokürelere oldukça sağlam yapıdadır. Bu konsantrasyonun üstündeki değerlerde hazırlanan kitosan solüsyonu çok yoğun olduğundan, altındaki değerlerde ise akışkan yapı göstermesinden dolayı damlatma sonucunda elde edilen makrokürelere şekillerinde bozukluklar görülmüştür. Aynı zamanda % 3 kitosan konsantrasyonunun altındaki ve üstündeki değerlerde yükleme etkinliğinde düşüş meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu durumun makrokürelere şekillerinde meydana gelen bozukluklar nedeniyle, enzimlerin bağlanacağı yüzey alanında meydana gelen azalmadan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.3.3.2. Glutaraldehit Konsantrasyonu

Enzim moleküllerinin amino grupları taşıyan katı destek materyallere kovalent immobilizasyonu, protein immobilizasyonlarında sıklıkla kullanılan glutaraldehit varlığında başarılı bir şekilde gerçekleşmektedir [100]. Glutaraldehit kitosanın serbest amino gruplarına bağlanır ve Schiff bazı yapısı meydana gelir. Bu yapı sayesinde glutaraldehitin serbest aldehit gruplarını kazanan kitosanın enzimle reaksiyonu kolaylaşmaktadır. Bu bağlanmadan sonra proteinlerin yüzeyindeki Lys rezidularının ϵ - amino grupları glutaraldehitin serbest aldehit gruplarına bağlanabilir hale gelmektedir [71]. Bu çalışmada % 0.25 glutaraldehit kullanımında pektinaz ve α amilaz için en yüksek aktiviteler elde edilmiştir (Şekil 4.5). Bu konsantrasyondaki immobilizasyon verimleri de pektinaz için % 310, α amilaz için % 122 ve proteaz için % 51 olarak saptanmıştır (Çizelde 4.5).



Şekil 4.5. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağlı aktivitesine farklı glutaraldehit konsantrasyonlarının etkisi

*Üçlü enzim immobilizasyonu Bölüm 3.3.6' da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Literatürdeki çalışmalara baktığımızda Altun ve Çetinus' un glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pepsin immobilize ettikleri araştırmada, çalışmamızda kullanılan glutaraldehit konsantrasyonundan daha düşük olmak üzere % 0,05' lik bir konsantrasyonun kullanıldığı görülmektedir [101]. Üreaz enziminin aktive kitosan boncuklara immobilize edildiği bir çalışmada ise optimum enzim immobilizasyonu % 1 glutaraldehit aktivasyonu sonucunda gerçekleştirilmiştir

[100]. Lignin peroksidaz ve manganaz peroksidaz enzimlerinin kitosan mikrokürelere ko-immobilize edildiği diğer bir çalışmada ise enzimlerin ikisi için de en iyi enzim aktivitesi % 0.75 glutaraldehit ile aktive edilmiş kürelerle elde edilmiştir [96].

Çalışmamızda literatürde yer alan çalışmalardan farklı sonuçlar gözlenmesinin kullanılan enzim konsantrasyonlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çalışmamıza baktığımızda glutaraldehit konsantrasyonu arttıkça enzimlerin yükleme etkinliğinde de artış meydana geldiği görülmektedir (Çizelge 4.5). Bu durumun enzim moleküllerinin bağlanması için çok sayıda aldehit gruplarının varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak enzimlerin bağlı aktivitelere bakıldığında düşük glutaraldehit konsantrasyonunda daha yüksek enzim aktivitesinin saptandığı görülmektedir (Şekil 4.5).

Çizelge 4.5. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı glutaraldehit konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği değerleri üzerindeki etkisi

Glutaraldehit konsantrasyonu (%)	İmmobilizasyon Verimi (%)			Yükleme Etkinliği (%)		
	Pektinaz	α amilaz	Proteaz	Pektinaz	α amilaz	Proteaz
0.25	310	122	51	93.75	70	66.5
0.5	170	120	36	97	90	73
0.75	304	119	51.4	96	68	81
1	259	117	36	99	68	81
2	185	27	45	97	94	82
3	200	0	51	94	82	67

*Enzimlerin immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği Bölüm 3.3' de gösterilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

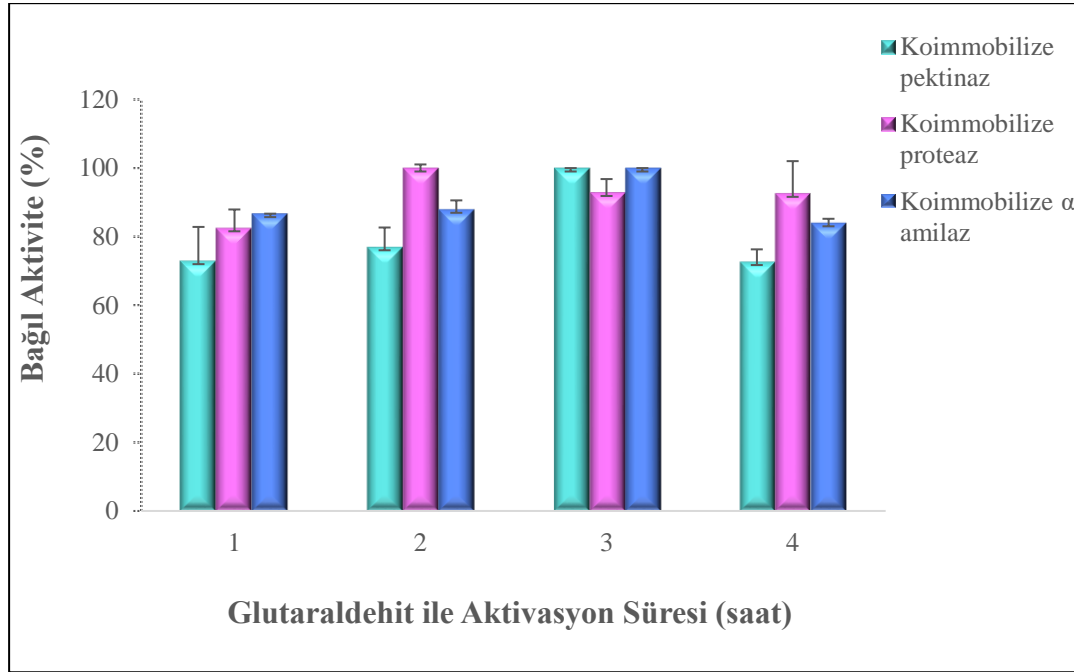
Çapraz bağlanma reaksiyonları enzimlerin konformasyonel yapısında değişimlere sebep olarak enzimin aktif merkezinde hasar oluşturabilmektedir. Bu durum da immobilizasyon veriminin düşmesine sebep olmaktadır [102].

Boncuklar üzerinde çok sayıda bulunan aldehit gruplarına enzim moleküllerinin birden çok noktadan bağlanmasının enzim aktivitesini olumsuz etkilediği düşünülmektedir [100]. Buna ek

olarak aldehit gruplarının sayısının çok fazla olması substratın enzime bağlanmasını sınırlaması bakımından da etki göstermektedir [103]. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda glutaraldehit kullanımı boncuklarda kırılğan bir yapı oluşmasına neden olmaktadır [85].

4.3.3.3. Aktivasyon Süresi

Hazırlanan kitosan destek materyallerin glutaraldehit ile aktivasyon süresine bakıldığında pektinaz ve α amilaz enzimlerinin bağıl aktivitelerinin ve immobilizasyon verimlerinin en yüksek olduğu aktivasyon süresi 3 saat olarak bulundu (Çizelge 4.6). Proteaz enzimi için de bu sürede aktive edilen boncuklarla elde edilen aktivitenin 2 saatlik aktivasyondaki değerine yakın olduğu göz önünde bulundurularak çalışmaya 3 saatlik aktivasyon süresi ile devam edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağıl aktivitesine glutaraldehit ile aktivasyon sürelerinin etkisi

*Üçlü enzim immobilizasyonu Bölüm 3.3.6' da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kitosan boncuklara tek bir enzimin immobilize edildiği bir çalışmada kitosan desteğin glutaraldehit ile aktivasyonu için 0.5-4 saat arasındaki süreler incelendiğinde çalışmamızla da uyumlu olarak 3 saat aktivasyon sonrasında maksimum aktivite gözlenmiştir [85]. Boncukların

kırılğan doğaları nedeniyle uzun aktivasyon süreleri neticesinde boncuklarda kırılmalar meydana gelebilmektedir.

Çizelge 4.6. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı aktivasyon sürelerinin immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği değerleri üzerindeki etkisi

Aktivasyon Süresi (saat)	İmmobilizasyon Verimi (%)			Yükleme Etkinliği (%)		
	Pektinaz	α amilaz	Proteaz	Pektinaz	α amilaz	Proteaz
1	275	116	41	93	56	36
2	291	102	53.9	93	66	34
3	375	120	40.3	96	66	79
4	272	116	41.2	97	62	56

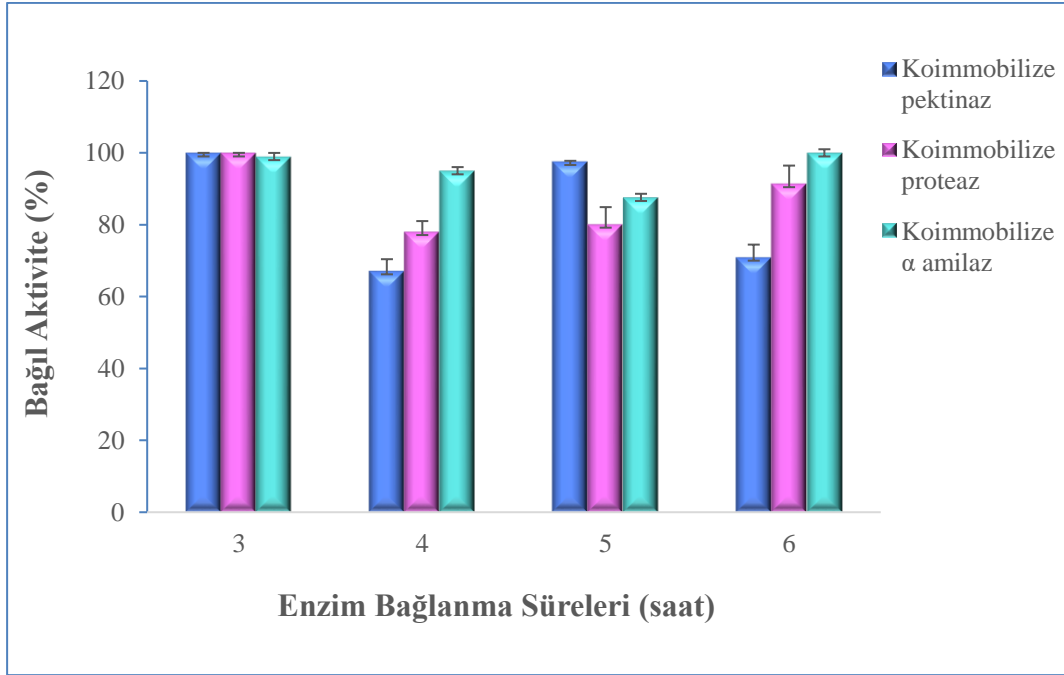
*Enzimlerin immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği Bölüm 3.3' de gösterilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

Altun ve Çetinus' un yapmış oldukları çalışmada ise kitosan boncukların glutaraldehit ile aktivasyonu 1 saatlik sürede gerçekleştirilmiştir [101]. Çalışmamızla bu çalışmaları karşılaştırdığımızda aktivasyon sürelerinin farklı olmasının kullanılan enzim konsantrasyonlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.3.3.4. İmmobilizasyon Süresi

İmmobilizasyon süresi glutaraldehitin aldehit grupları ile enzimlerin terminal amino grupları ya da yüzeyindeki lizin yan zincirlerdeki amino grupların arasında bağ oluşumu için geçen süredir [85]. Şekil 4.7 ve Çizelge 4.7' ye baktığımızda üç enzim için de bağl aktivitelerinin ve immobilizasyon verimlerinin en yüksek olduğu immobilizasyon süresi 3 saat olarak bulunmuştur.

Çetinus ve arkadaşlarının kitosan boncuklara katalaz immobilize ettikleri çalışmada immobilizasyon 5 saatte gerçekleştirilmiştir [71]. Kitosan boncuklara pepsinin immobilize edildiği diğer bir çalışmada da immobilizasyon süresi 5 saat olarak saptanmıştır [101].



Şekil 4.7. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda enzimlerin bağlı aktivitesine farklı enzim bağlanma sürelerinin etkisi

*Üçlü enzim immobilizasyonu Bölüm 3.3.6' da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.7. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklara pektinaz, proteaz ve α amilaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunda farklı immobilizasyon sürelerinin immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği değerleri üzerindeki etkisi

İmmobilizasyon Süresi (saat)	İmmobilizasyon Verimi (%)			Yükleme Etkinliği (%)		
	Pektinaz	α amilaz	Proteaz	Pektinaz	α amilaz	Proteaz
3	381	116	51,2	93	56	36
4	256	79	40	93	66	34
5	375	70	40	96	66	79
6	272	117	46,8	97	62	56

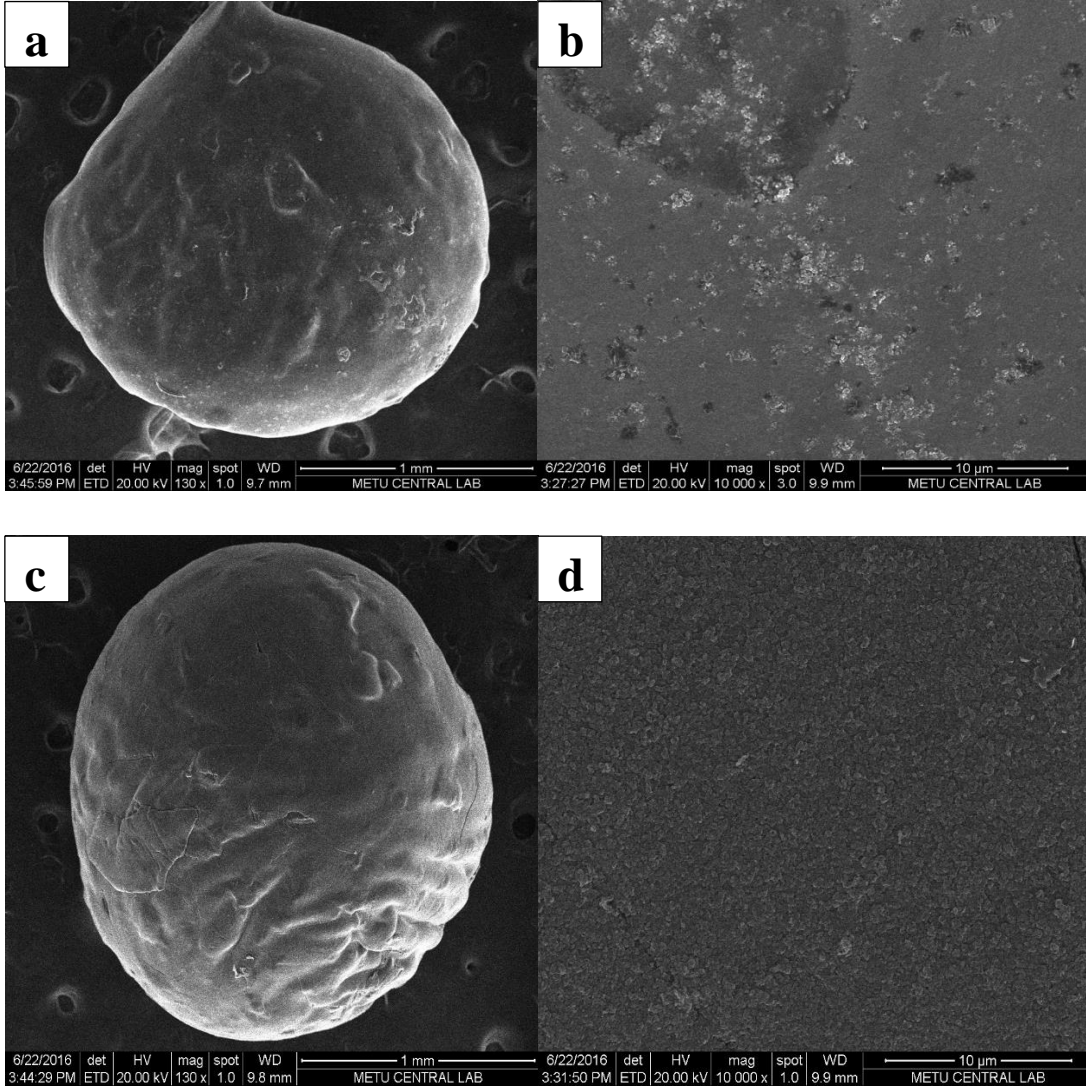
*Enzimlerin immobilizasyon verimi ve yükleme etkinliği Bölüm 3.3' de gösterilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

Bu iki çalışmada elde edilen sürelerin araştırmamız kapsamından farklı olmasının nedenlerini tartışırken, immobilizasyon için kullanılan enzimlerin çalışmamızda kullanılanlardan değişik olmasının yanısıra, konsantrasyonlarının da aynı olmadığı ayrıca yukarıdaki araştırmalarda tekli enzimlerle çalışıldığı göz önünde bulundurulmalıdır.

4.3.4. Glutaraldehit ile Aktive Edilmiş Kitosan boncukların karakterizasyonu

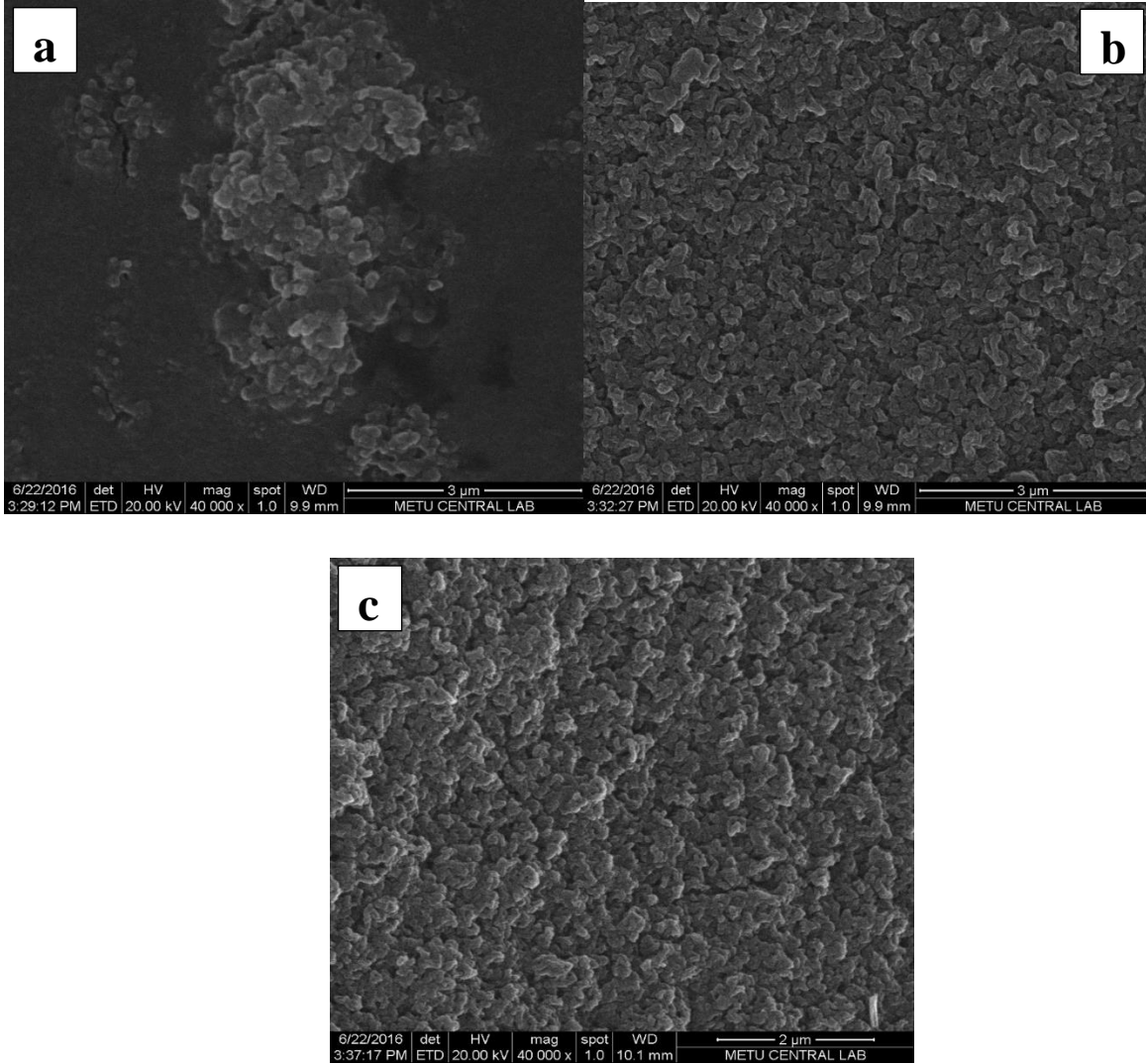
4.3.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Çalışmamızda elde edilen kitosan, glutaraldehit ile aktive kitosan ve enzim ko-immobilize kitosan boncukların morfolojileri ve yapısal olarak birbirinden farklılıkları SEM kullanılarak analiz edilmiştir. Şekil 4.8 a ve b normal kitosan boncukların, c ve d ise glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncukların 130x ve 10000x büyütmedeki şekillerini göstermektedir. Glutaraldehit ile aktive edilmiş olan kitosan boncukların yüzeyi kitosan boncuklar ile kıyaslandığında daha fazla engebeli oldukları ve bağ oluşumu nedeni ile daha yoğun porlu bir yapıya dönüştükleri görülmektedir. Boncukların yüzeylerini 40000x büyütmede incelediğimizde ise glutaraldehytle aktivasyonun yüzeydeki çıkıntıları bir miktar arttırdığı ve immobilizasyon işlemi ile ise bu artışın daha da fazlaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9) Ayrıca glutaraldehytle aktive edilen boncuklarda yüzey yapısının daha düzenli olduğu görülmektedir. Literatürde yer alan çalışmalara baktığımızda Gilani ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada araştırmamız sonuçlarına benzer olarak glutaraldehytle aktivasyonun yüzeydeki porlu yapının artmasını sağladığı görülmektedir [103]. Normal kitosan, glutaraldehytle aktive, ve enzim immobilize kitosan boncukların SEM analizinin gerçekleştirildiği bir diğer çalışmada da glutaraldehytle aktivasyonun ve enzim immobilizasyonunun kitosan boncukların yüzeyindeki porlu yapıyı arttırdığı görülmüştür [85]. Hem çalışmamızda hem de diğer çalışmalarda gözlenen bu porlu yapının, kitosan boncukların yüzeylerine bağlanan aldehit grupları sayesinde destek üzerinde oluşan uzatıcı kol yapısı nedeniyle görüldüğü düşünülmektedir. Enzim immobilizasyonu durumunda da enzimlerin destek üzerindeki kollara tutunması neticesinde porlu yapıda bir miktar daha artışın meydana geldiği görülebilmektedir.



Şekil 4.8. Elektron mikroskobu görüntüleri a) kitosan boncuk 130x büyütmede b) kitosan boncuk 10000x büyütmede c) glutaraldehit ile aktive kitosan boncuk 130x büyütmede d) glutaraldehit ile aktive kitosan boncuk 10000x büyütmede

Por boyutları önemlidir, zira porların çok küçük olması durumunda enzimlerin bağlanması zorlaşırken büyük olması durumunda da bağlandıktan sonra enzim kayıplarının meydana gelme olasılığı bulunmaktadır. Çalışmamızda ko-immobilize enzimler ile elde edilen en iyi verim değerlerinin, % 0.25 glutaraldehit konsantrasyonu ile 3 saatlik aktivasyon süreci sonucunda elde edilmiş olması nedeniyle bu koşullarda uygun por büyüklüklerinin sağlandığı düşünülmektedir.

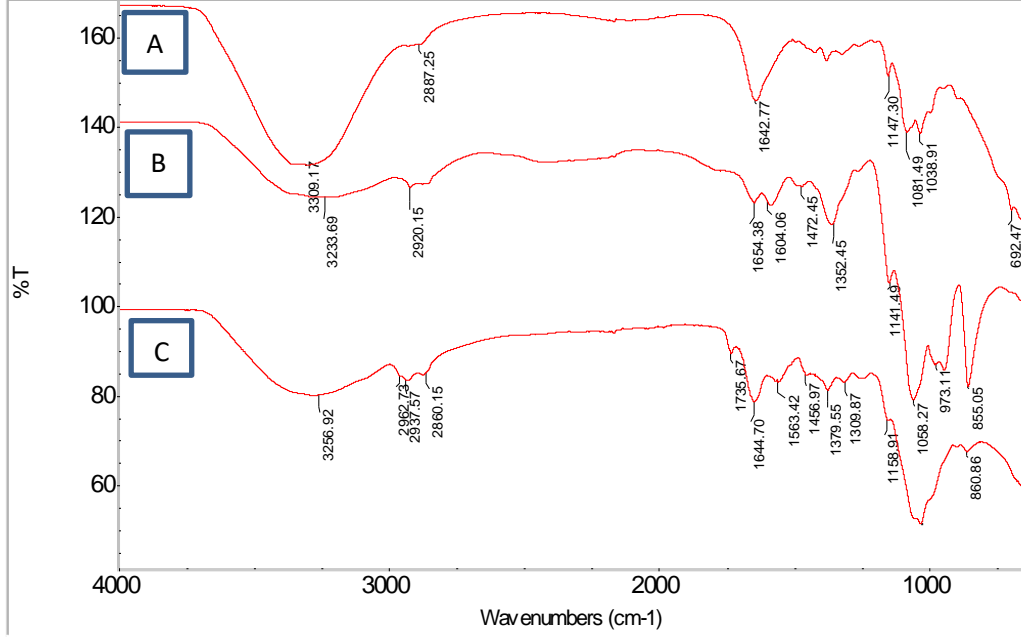


Şekil 4.9. Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri a) kitosan boncuk 40000x büyütmede b) glutaraldehit ile aktive kitosan boncuk 40000x büyütmede c) enzim immobilize kitosan boncuk 40000x büyütmede

4.3.4.2. FTIR Analizi

Kitosan boncukların glutaraldehit ile aktivasyonunu doğrulamak için normal kitosan boncuklar (A) ve glutaraldehit ile aktive boncukların (B ve C) FTIR spektrumları belirlendi. Şekil 4.10' da görüldüğü gibi B ve C bantları nisbeten benzer pikler verirken A bantının piklerinin daha farklı olduğu saptanmaktadır. Her üçünde de 900 ve 1100 cm^{-1} civarında görülen piklerin sakkarit yapının kanıtı olabileceği düşünülmektedir. Glutaraldehit ile aktive boncuklarda (B ve C) 1472 cm^{-1} civarında bir pik gözlenmiştir. Bu pikin kitosanın amino grubu ile glutaraldehitin aldehit grubu arasında Schiff bazı oluşumuyla kurulan $\text{C}=\text{N}$ bağından kaynaklandığı sanılmaktadır. Enzim

immobilize örnekte (C) diğerlerinden farklı olarak 1730 cm^{-1} civarında bir pik tespit edildi. Bu pikin enzimin amino grubu ile glutaraldehitin aldehit grubu arasındaki imin reaksiyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.10. Normal kitosan, glutaraldehit ile aktive ve enzim ko-immobilize kitosan boncuklarının FTIR analizi sonuçları

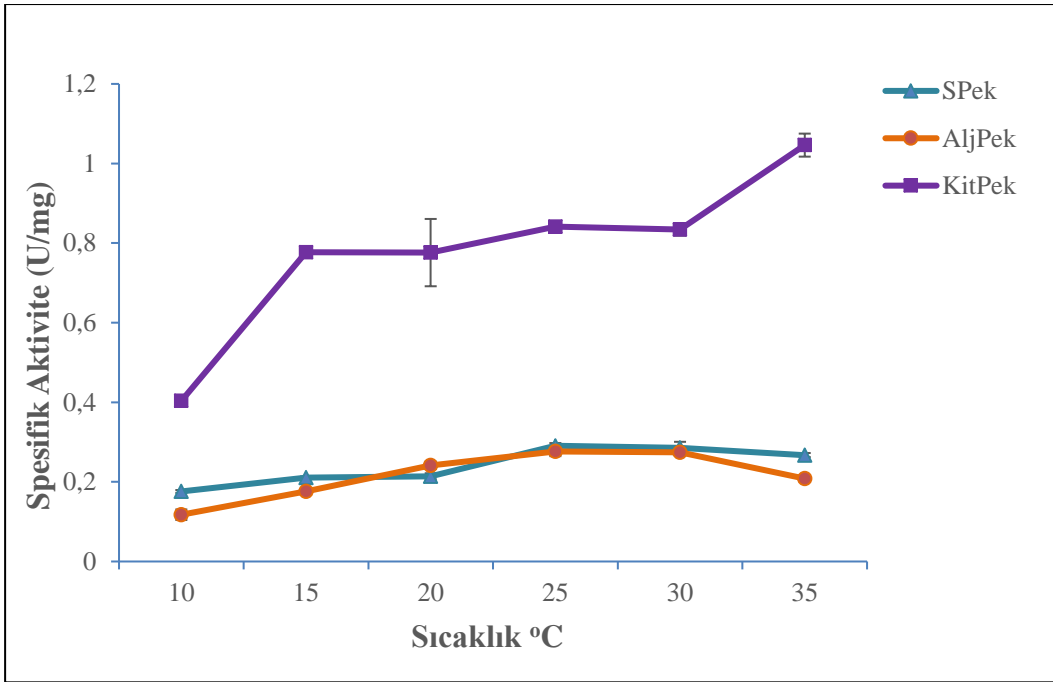
*A: Normal kitosan boncuğa ait bant B: Glutaraldehit ile aktive kitosan boncuğa ait bant C: Enzim immobilize aktive kitosan boncuğa ait bant

Altun ve arkadaşlarının çalışmasında ise 1574 cm^{-1} 'de glutaraldehit ile kitosan arasındaki çapraz bağlanmada oluşan C-N bağı oluşumundan kaynaklandığı düşünülen ve 1600 cm^{-1} ' de glutaraldehitin aldehiti ile enzimin amino grubu arasında oluşan imin reaksiyonu nedeniyle oluşan C=N bağı işaret ettiği kabul edilen iki pik gözlenmiştir [101]. Kitosan boncuklara FTIR analizinin gerçekleştirildiği farklı bir çalışmada 800-1150 cm^{-1} arasındaki bantların disakkarit yapının kanıtı olduğu, 1410 cm^{-1} 'deki bantın ise kitosan ile glutaraldehit arasında oluşan Schiff bazı bağlantısından kaynaklandığı ileri sürülmüştür [104].

4.4. Serbest ve İki Farklı Destek Materyal Kullanılarak Ko-immobilize Edilen Enzimlerin Bazı Özelliklerinin Saptanması

4.4.1. Optimum Çalışma Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest ve iki farklı destek materyal kullanılarak ko-immobilize edilen enzimlerin optimum çalışma sıcaklıklarının belirlenmesi ile ilgili olarak yapılan bu çalışmada ortak olarak serbest ve ko-immobilize proteaz, pektinaz ve α amilaz aktivitelerine sıcaklığın etkisinin araştırılması pH 7' de 0.1 M sodyum fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda giderimi gerçekleştirilmek istenen organik maddelerin içerisinde bulunduğu atıksu ortamı olarak evsel bir atıksu kullanılmıştır. Evsel atıksuların sıcaklık derecelerinin kışın hava sıcaklığından daha düşük, yazın ise daha yüksek olmadığı göz önünde bulundurularak optimum çalışma sıcaklıklarının saptanmasında 10-35°C arasındaki değerler taranmıştır [105]. Çalışmamızda serbest ve aljinatla ko-immobilize pektinazın optimum çalışma sıcaklığı 25°C olarak bulunurken kitosan boncukta ko-immobilize pektinaz için optimum sıcaklık 35°C olarak saptanmıştır (Şekil 4.11).

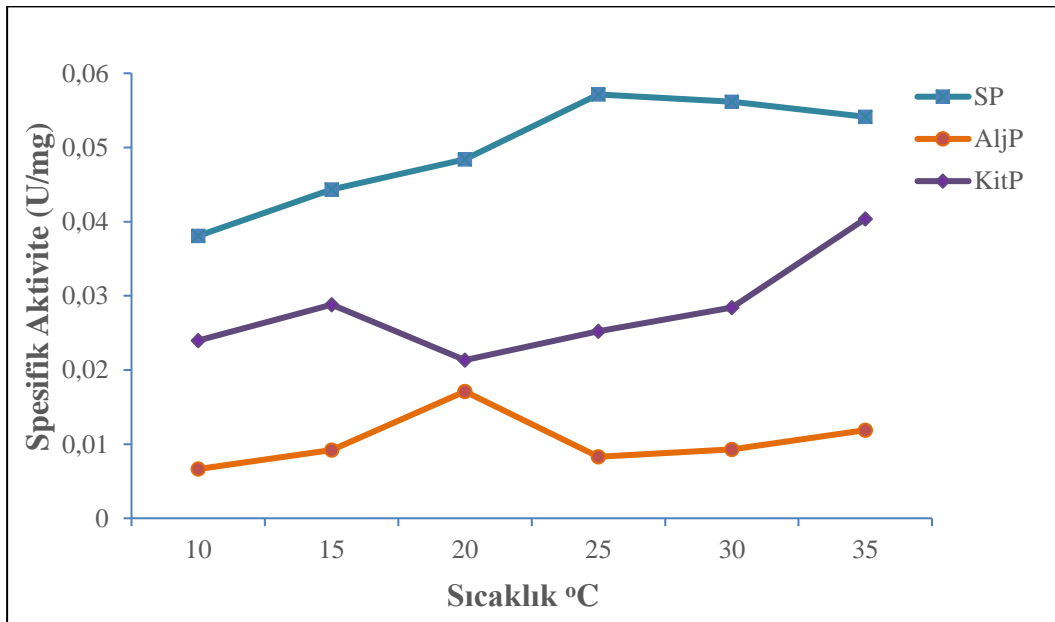


Şekil 4.11. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize pektinaz enziminin spesifik aktivitesine farklı sıcaklık değerlerinin etkisi

*SPek: Serbest pektinaz AljPek: Aljinat ile ko-immobilize pektinaz KitPek: Kitosan ile ko-immobilize pektinaz Enzim ve substrat farklı sıcaklıklarda inkübe edildi. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Kitosan boncuklara ko-immobilize edilen pektinaz enziminin spesifik aktivitesinin hem aljinata ko-immobilize edilen hem de serbest halde bulunan pektinazdan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumun glutaraldehit ile bağlanması sırasında enzim konformasyonunda meydana gelen değişim neticesinde enzimin aktif merkezine substratın daha rahat bağlanabilmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamız sonucunda serbest proteaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı 25°C, aljinatla ko-immobilize enzimin 20°C ve kitosanla ko-immobilize proteazın ise 35°C olarak saptanmıştır. Çalışmamızda proteaz enziminin spesifik aktivite değeri serbest formu için en yüksek olarak saptanırken, kitosanla ko-immobilize enzimin aktivitesinin aljinat ile ko-immobilize proteaza kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize proteaz enzimlerinin spesifik aktivitesine farklı sıcaklık değerlerinin etkisi

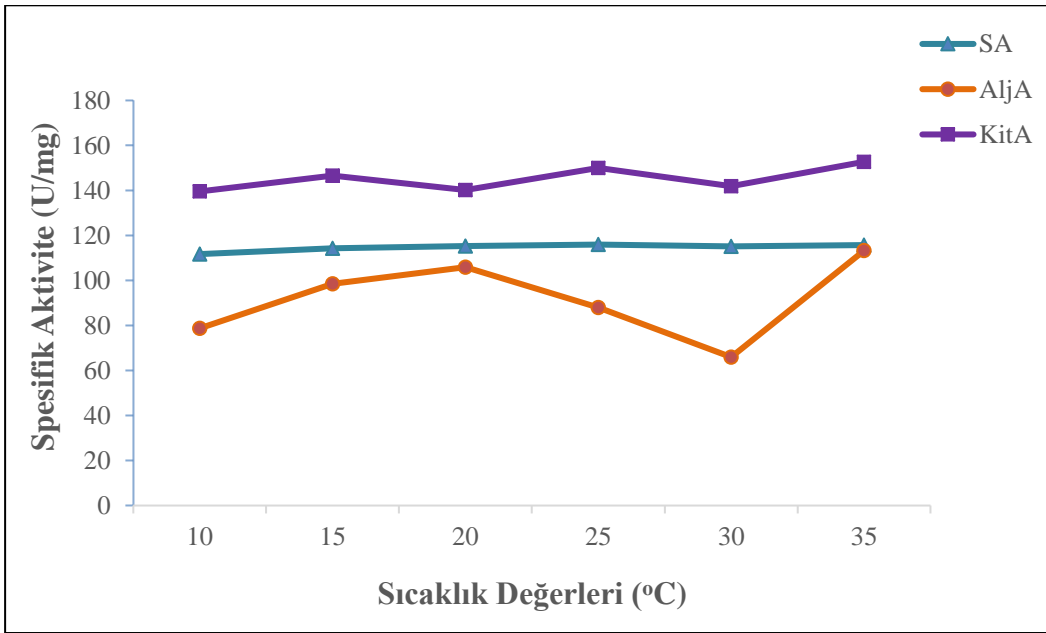
*SP: Serbest proteaz AljP: Aljinat ile ko-immobilize proteaz KitP: Kitosan ile ko-immobilize proteaz

Enzim ve substrat farklı sıcaklıklarda inkübe edildi. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Şekil 4.13' de ise serbest α amilaz için optimum sıcaklık değerinin 25°C, aljinat ve kitosanla ko-immobilize olan α amilaz enzimi için ise 35°C olarak saptandığı görülmektedir.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde serbest enzimlerin optimum sıcaklıkları 25°C, kitosanla ko-immobilize enzimlerin optimum çalışma sıcaklıkları ise 35°C olarak belirlenmiştir. Kitosan

boncuk yüzeyine kovalent ko-immobilizasyonu gerçekleştirilen her üç enzimin de optimal çalışma sıcaklıklarının serbest formlarına kıyasla 10°C daha yüksek olduğu görülmektedir. Na aljinat ile ko-immobilize enzimlerin optimal çalışma sıcaklıkları ile ilgili çalışmalar neticesinde ortak bir veriye ulaşılmamıştır. Bu nedenle optimal verilerin ortalaması alınmış ve 25°C' lik bir sıcaklık derecesinde çalışmaların gerçekleştirilmesinin uygun olacağı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). Pundir ve Chauan'ın α amilaz, proteaz, selüloz ve lipazı PVC materyallere ko-immobilize ettikleri çalışmalarında optimum sıcaklık değerleri serbest hallerine göre α amilaz ve selüloz enzimi için düşerken, proteaz ve lipaz için arttığı gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize α amilaz enzimlerinin spesifik aktivitesine farklı sıcaklık değerlerinin etkisi

*SA: Serbest α amilaz AljA: Aljinat ile ko-immobilize α amilaz KitA: Kitosan ile ko-immobilize α amilaz

Enzim ve substrat farklı sıcaklıklarda inkübe edildi. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Araştırmacılar immobilizasyon sonrasında optimum sıcaklık değerlerindeki artışın immobilizasyonda destek materyalin bariyer görevi görmesi nedeniyle katalitik sisteme dışardan gelen sıcaklığın girişinin yavaşlaması nedeniyle olabileceğini belirtmektedirler. Bu sebeple sistemin sıcaklığı ile çevre sıcaklığı arasında fark meydana gelmektedir ve sistemde optimum katalitik sıcaklığı sürdürebilmek için katalitik sistem dışarıdan biraz daha yüksek sıcaklığa ihtiyaç duymaktadır [106]. Park ve arkadaşlarının nişasta dönüştürücü enzimleri, yüzeyi modifiye

taşıyıcılara ko-immobilize ettikleri diğer bir çalışmada da serbest enzimler için optimum sıcaklık 50°C olarak tespit edilirken ko-immobilize enzimler için 60°C olarak bulunmuştur [93].

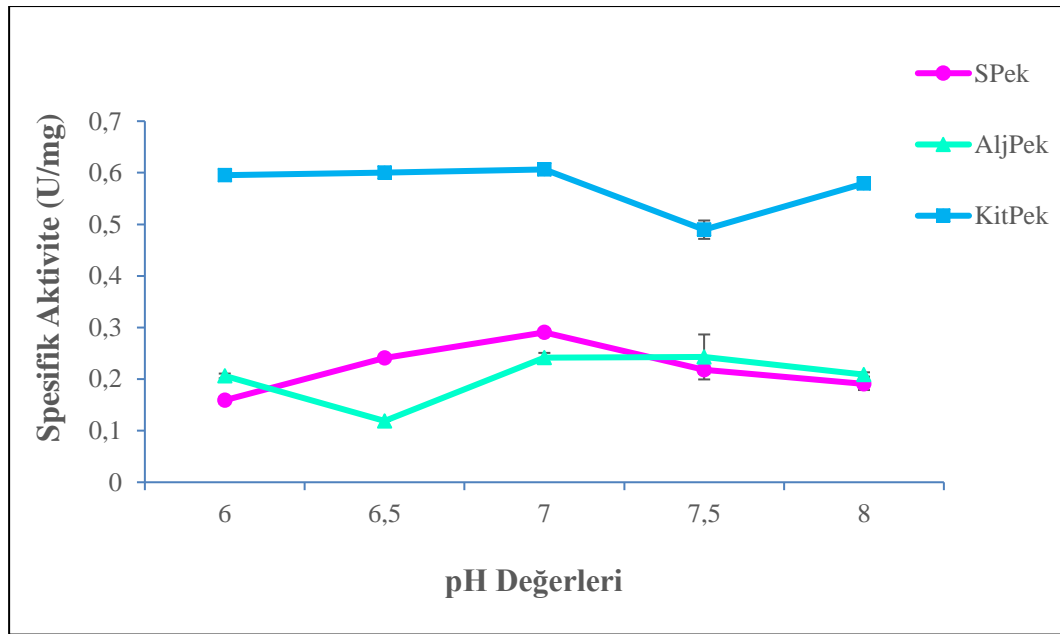
Pepsin enziminin kitosan boncuklara immobilize edildiği tekli enzim çalışmasında da immobilize enzimin optimum sıcaklık değeri serbest enziminkinden 10 °C daha yüksek olarak bulunmuştur [101]. Çalışmamızda ve literatürde yer alan diğer çalışmaları değerlendirdiğimizde, serbest enzimlerle immobilize enzimlerin çalışma sıcaklıklarında meydana gelen farkın, immobilizasyon sırasında destek materyalle kovalent bağ oluşumunun enzimlerin konformasyonel fleksibilitelerinin azalmasına neden olduğunu ileri sürebiliriz [93]. Bunun sonucunda enzimlerin yapısında meydana gelen sertleşmenin daha yüksek sıcaklıklara dayanıklı hale gelmelerini sağladığı düşünülmektedir.

Bunlara ek olarak çalışmamızda Şekil 4.11 ve Şekil 4.13' de görüldüğü gibi pektinaz ve α amilaz enzimlerinin kitosan ile ko-immobilize edildiğinde serbest enzim ve Na aljinatla ko-immobilize hallerinden daha yüksek aktivite tespit edilmiştir. Pektinaz enziminde Na aljinat ile ko-immobilize enzim aktivitesiyle enzimin serbest hali arasında fark bulunmazken α amilaz enzimi Na aljinat boncuklar içerisinde tutuklandığında aktivitesinde bir miktar azalma meydana gelmiştir. Proteaz enziminde ise diğerlerinden farklı olarak her iki materyalle de immobilizasyon enzimin aktivitesinde bir miktar düşüşe sebep olmaktadır. Ancak enzimlerin kitosan boncukların yüzeyine kovalent ko-immobilizasyonu ile Na aljinat boncuk içerisinde tutuklayarak ko-immobilizasyonu karşılaştırıldığında kovalent ko-immobilizasyonda daha yüksek spesifik aktivite değerleri kaydedilmiştir (Şekil 4.12). Enzimlerin immobilize olduklarında aktivitelerini kaybetmeleri enzimlerin denatürasyonundan kaynaklanabilmektedir ya da substratı büyük olan moleküllerde özellikle tutuklama metoduyla immobilizasyon gerçekleştirildiğinde substratın enzime ulaşamaması da nedenler arasında söylenebilmektedir. Aynı zamanda enzimlerin katı desteklere immobilizasyonu ikincil yapılarında değişime neden olabilmektedir. Enzim α helikal yapısını kaybederken β tabaka yapısı kazanmaktadır. Enzimin özelliklerinde meydana gelen başkalaşım bu yapısal değişikliklerden kaynaklanabilmektedir [107]. Çalışmamızla benzer olarak tek bir enzimin glioksil agarozla immobilize edildiği bir çalışmada immobilize enzimin aktivitesi serbest enzimden daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu durumun enzimle destek arasındaki kovalent bağlanmanın enzimin sertliğini arttırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [108]. Çalışmamızda da immobilize enzimin serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterdiği durumlar kovalent immobilizasyon gerçekleştirildiğinde görülmektedir. (Şekil 4.11 ve Şekil 4.13). Pektinaz ve α

amilaz enzimlerinin aktiviteleri bakımından çalışmamız ve literatürde yer alan araştırmalar değerlendirildiğinde, serbest enzimlere göre avantajlı özelliklere sahip olan immobilize enzimlerin immobilize olduklarında aktivitelerinde de artışın meydana gelmesinin elde edilmiş önemli bir veri olduğu söylenebilir.

4.4.2. Optimum Çalışma pH' larının Belirlenmesi

Çalışmamızda giderimi gerçekleştirilmek istenen organik maddelerin içerisinde bulunduğu atıksu ortamı olarak evsel bir atıksu kullanılması planlanmıştır. Evsel atıksu pH' sının 7-8 arasında olması göz önünde bulundurularak optimum çalışma pH' larının saptanmasında 6-8 arasındaki pH değerleri taranmıştır [109]. Serbest ve ko-immobilize pektinaz, proteaz ve α amilazın aktivitesine farklı pH değerlerinin etkilerinin araştırılması 0.1 M sodyum fosfat tamponunda serbest enzimler ve aljinat ile ko-immobilize enzimler için 25°C' de, kitosan ile ko-immobilize enzimler için 35°C' de gerçekleştirildi. Şekil 4.14' de görüldüğü gibi hem serbest pektinaz için hem de iki farklı materyalle ko-immobilize pektinaz için optimum çalışma pH' sı 7 olarak saptanmıştır.

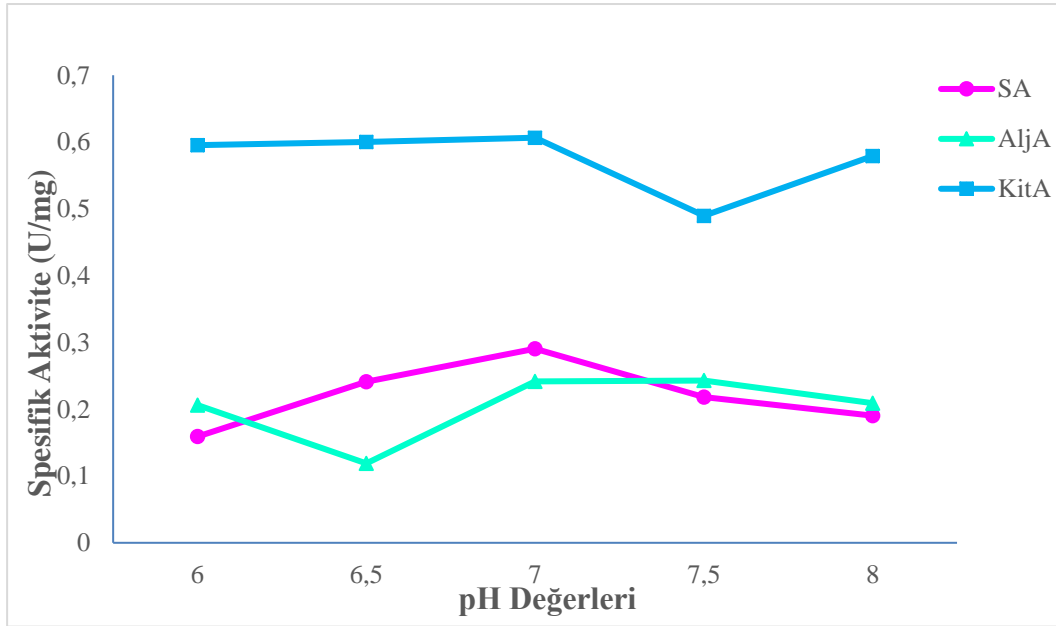


Şekil 4.14. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize pektinaz enzimlerinin spesifik aktivitesine farklı pH değerlerinin etkisi

*SPek: Serbest pektinaz AljPek: Aljinat ile ko-immobilize pektinaz KitPek: Kitosan ile ko-immobilize pektinaz

Enzim ve substrat 25°C' de inkübe edildi. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

α amilaz enzimine baktığımızda enzimin hem serbest hali hem de ko-immobilize hali için optimum pH değerinin 7 olduğu görüldü (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize α amilaz enzimlerinin spesifik aktivitesine farklı pH değerlerinin etkisi

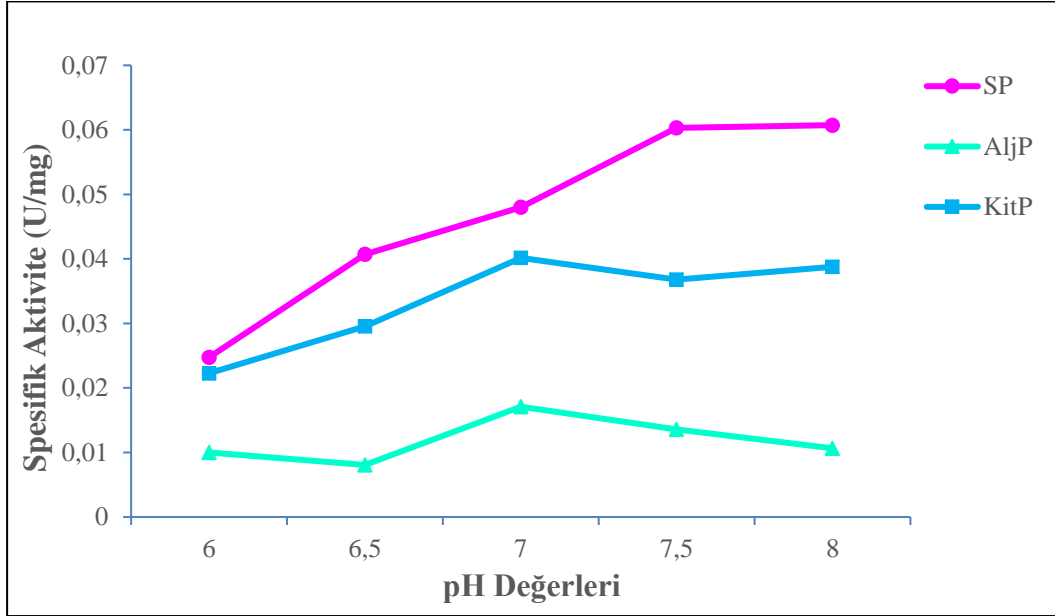
*SA: Serbest α amilaz AljA: Aljinat ile ko-immobilize α amilaz KitA: Kitosan ile ko-immobilize α amilaz

Enzim ve substrat 25°C’ de inkübe edildi. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2’ de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Proteaz enziminde ise serbest enzim için optimum pH değeri 7,5-8 olarak bulunurken ko-immobilize proteazın pH değeri 7 olarak bulundu (Şekil 4.16). Çalışmamızla benzer olarak CO₂’ in metanole dönüştürülmesi için protamin kaplı titanyum destek materyale ko-immobilize 3 dehidrogenazın kullanıldığı bir çalışmada enzimlerin hem serbest halleri hem de ko-immobilize halleri için optimum pH değeri 7 olarak bulunmuştur [110]. Çalışmamızdan farklı olarak Pundir ve Chauhan’ ın 4 farklı enzimi plastik bir kova ile fırçaya kovalent bağlı olarak ko-immobilize ettikleri çalışmalarında immobilizasyondan sonra enzimlerin optimum pH’ sında, immobilizasyon sırasında enzim yüzeyindeki NH₂ gruplarının kaybedilmesi nedeniyle mikroçevrede meydana gelen H⁺ konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak bir miktar artış meydana gelmiştir [106].

Demir ve arkadaşlarının α amilaz enzimini glutaraldehit ile aktive kalsiyum karbonat nanopartiküllerine kovalent olarak immobilize ettikleri çalışmada, çalışmamızla benzer olarak immobilizasyondan sonra enzimin optimum pH’ sında bir değişiklik meydana gelmemiştir [111].

Anyonik destek materyaller optimum pH' yı alkali yöne doğru değiştirirken katyonik olanlar asidik yöne yönlendirirler. Kitosan boncuklar ise nötral pH' da her hangi bir yük taşımazlar [101]. Bu sayede serbest enzimler ile immobilize enzimlerin optimum pH değerlerinde bir değişim gözlenmemiştir.



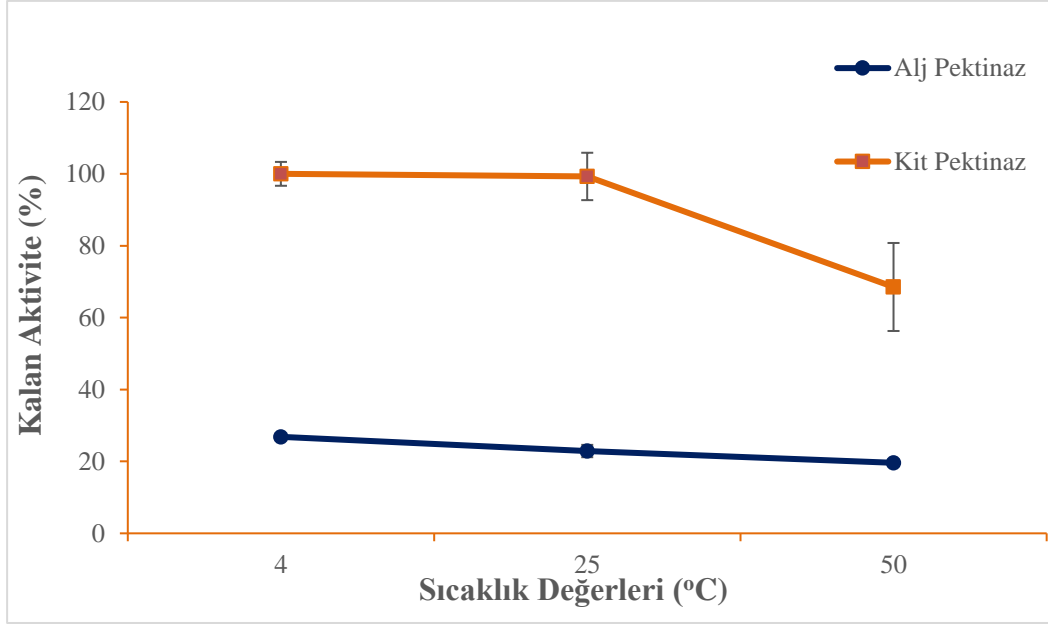
Şekil 4.16. Serbest, aljinat ile ko-immobilize ve kitosan ile ko-immobilize proteaz enzimlerinin spesifik aktivitesine farklı pH değerlerinin etkisi

*SA: Serbest proteaz AljA: Aljinat ile ko-immobilize proteaz KitA: Kitosan ile ko-immobilize proteaz

Enzim ve substrat 25°C' de inkübe edildi. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

4.4.3. Termal Kararlılıklarının Saptanması

Enzimlerin genellikle katı desteklere immobilize edilmelerinin en temel nedeni termal ve operasyon stabiliteilerinin artmasını sağlamaktır [101]. Çalışmamızda enzimlerin termal stabiliteilerini ölçmek amacıyla enzimler pH 7' de sodyum fosfat tamponunda (0,1 M) 4, 25 ve 50°C' lerde 2 saat tutuldu, ardından enzim aktiviteleri tayin edildi. Kitosana ko-immobilize pektinazın aktivitesi 25°C' de sabit kalırken 50°C' de aktivitesinin % 68' ini korumuştur. Na aljinata ko-immobilize halinde ise tüm sıcaklık değerlerinde aktivitesi sabit kalmıştır ancak aktivitesi kitosanda ko-immobilize haline göre oldukça düşük bulunmuştur (Şekil 4.17).



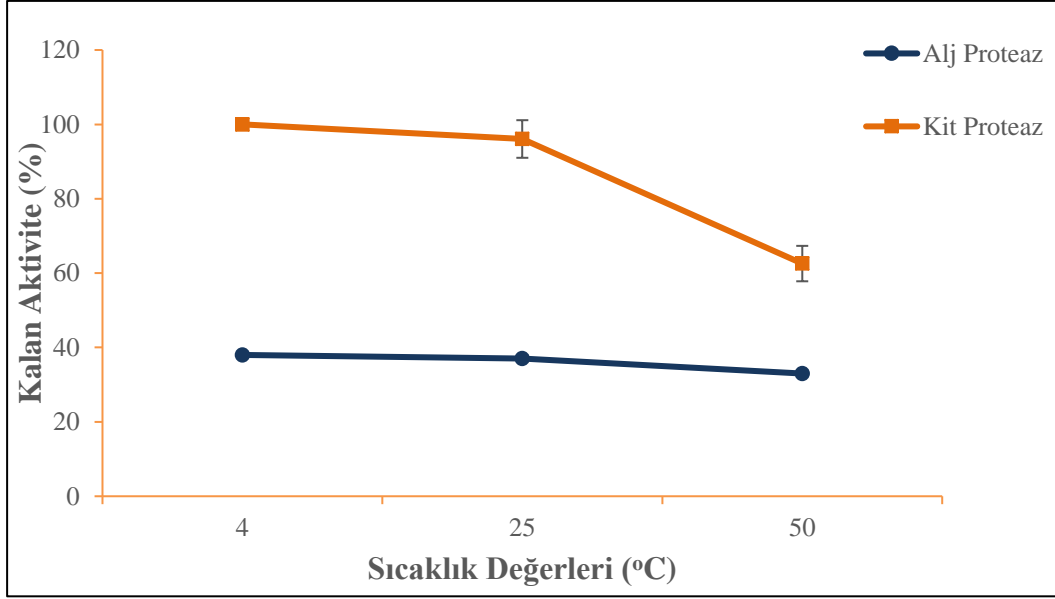
Şekil 4.17. Na aljinat ve kitosana ko-immobilize pektinaz enziminin farklı sıcaklık değerlerinde tutulduklarında kalan aktiviteleri

*Alj Pektinaz: Aljinat ile ko-immobilize pektinaz Kit Pektinaz: Kitosan ile ko-immobilize pektinaz

Enzim 4, 25 ve 50°C'lerde 2 saat tutuldu. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Kitosana ko-immobilize haldeki proteazın 25°C' deki kalan aktivitesi % 96 iken 50°C' deki kalan aktivite değeri % 62.5' dur. Aktivite olarak değerlendirdiğimizde kitosan materyalde ko-immobilize proteazın aktivitesi daha yüksek bulunurken sıcaklık stabilitesi değerlendirildiğinde sahip olduğu aktiviteyi Na aljinatın daha kararlı bir şekilde koruduğu görülmektedir. Bu iki enzim için sıcaklık stabilitesi bakımından değerlendirildiğinde Na aljinata ko-immobilize enzimlerin sıcaklık stabilitesi daha yüksek olarak görüldü (Şekil 4.18).

Çalışmamızda proteaz ve pektinaz enzimleri için elde ettiğimiz sonuçlar ile benzer olarak Toscano ve arkadaşlarının 4 farklı polimer destek materyali karşılaştırdıkları çalışmalarında da termal kararlılık, aljinat ile immobilize enzim için kitosana immobilize halinden daha yüksek bulunmuştur [112]. Oysa 25°C' de Na aljinat ile ko-immobilize α amilaz aktivitesinin tamamının korunduğu, kitosana ko-immobilize halinde ise % 6' lık bir aktivite kaybının meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.18. Na aljinat ve kitosana ko-immobilize proteaz enziminin farklı sıcaklık değerlerinde tutulduklarında kalan aktiviteleri

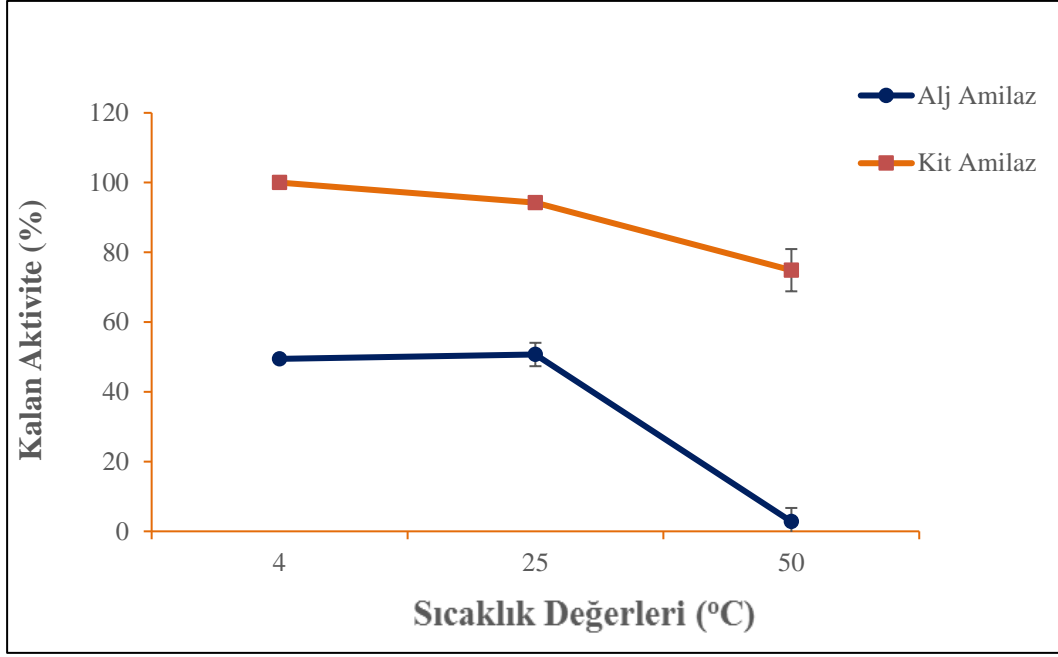
*Alj Proteaz: Aljinat ile ko-immobilize proteaz Kit Proteaz: Kitosan ile ko-immobilize proteaz

Enzimler 4, 25 ve 50°C'lerde 2 saat tutuldu. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Şekil 4.19' da görüldüğü gibi 50°C' de kitosana ko-immobilize α amilaz aktivitesinde % 36' lık bir kayıp söz konusu olurken Na aljinat ile ko-immobilize α amilaz enziminde kayıp % 100 olarak saptanmaktadır. Termal stabilite en iyi olarak kitosan ile ko-immobilize α amilazda korunmuştur. Bu sonucumuza benzer olarak Vaillant ve arkadaşlarının endoselülaz ve pektin liyazı naylon ve kitine ko-immobilize ettikleri çalışmalarında ko-immobilize enzimler 50°C' de 30 dk tutulduklarında aktivitelerinin yalnızca % 30' unu kaybettikleri saptanmıştır [113].

Araştırmacılara göre çok noktadan bağlanmanın meydana gelmediği immobilizasyon metodlarında termal stabilite de her zaman bir artış meydana gelmeyebilmektedir. İmmobilize enzimin termal stabilitesinde belirgin bir artış ancak enzimin destek materyale çok noktadan bağlanmasıyla gerçekleşen immobilizasyonlarda beklenmelidir.

Çok noktadan kovalent immobilizasyonun gerçekleşmesi için aynı enzim molekülünün çeşitli rezidüleri ile desteğin aktif grupları arasında etkileşimin meydana gelmesi gerekmektedir [114].



Şekil 4.19. Na aljinat ve kitosana ko-immobilize α amilaz enziminin farklı sıcaklık değerlerinde tutulduklarında kalan aktiviteleri

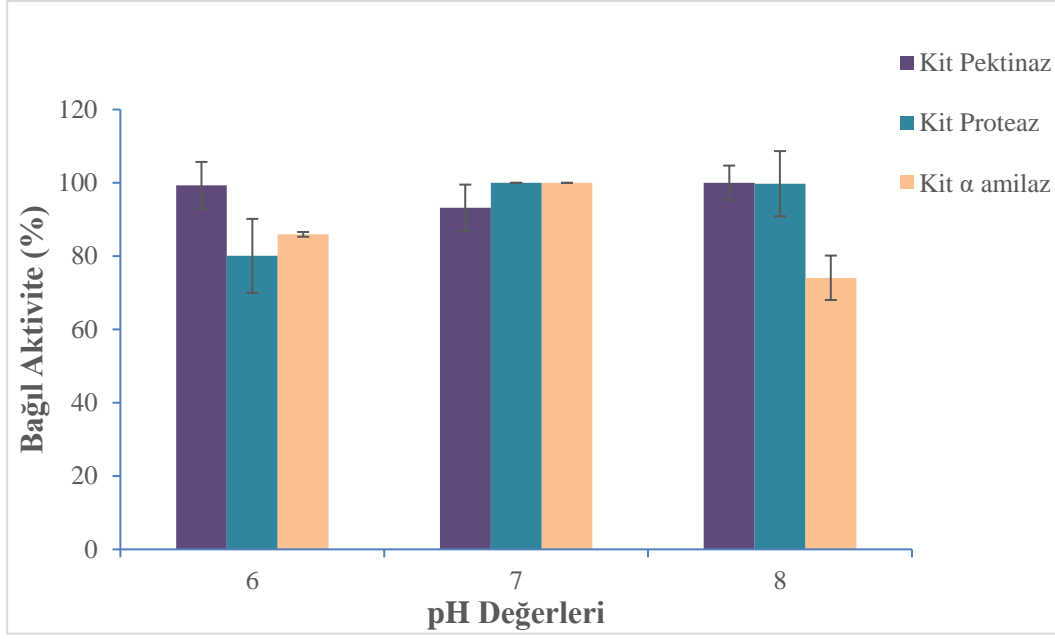
*Alj Amilaz: Aljinat ile ko-immobilize α amilaz Kit Amilaz: Kitosana ile ko-immobilize α amilaz

Enzimler 4, 25 ve 50°C'lerde 2 saat tutuldu. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Bir diğer görüşe göre ise kitosana yüzeye kovalent olarak immobilize edilmesi enzimin konformasyonel değişimini azaltabilmektedir. Bu da termal stabilitenin artmasını sağlamaktadır [103].

4.4.4. pH Kararlılıklarının Saptanması

Enzim ko-immobilize Na aljinat boncuklar 20 saat süreyle pH 6 ve pH 8 fosfat tamponunda (0.1 M) tutulduklarında boncuklarda deformasyon meydana gelmiştir. Bu nedenle enzim aktivitesi tayini yapılamamıştır. Öte yandan kitosana gerçekleştirilen ko-immobilizasyon sonucunda her iki pH değerinde de %70' in üzerinde bağlı aktivite saptanmıştır (Şekil 4.20). Glutaraldehit ile çapraz bağlanma kitosana boncuğun sertliğini ve dayanıklılığını artırıcı bir etkiye sebep olmaktadır [67]. Bu nedenle farklı pH değerlerinde tutulduklarında boncukların zarar görmemesinin glutaraldehit kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.20. Kitosana ko-immobilize α amilaz, proteaz ve pektinaz enzimlerinin farklı pH' larda bekletildiklerinde bağlı aktiviteleri

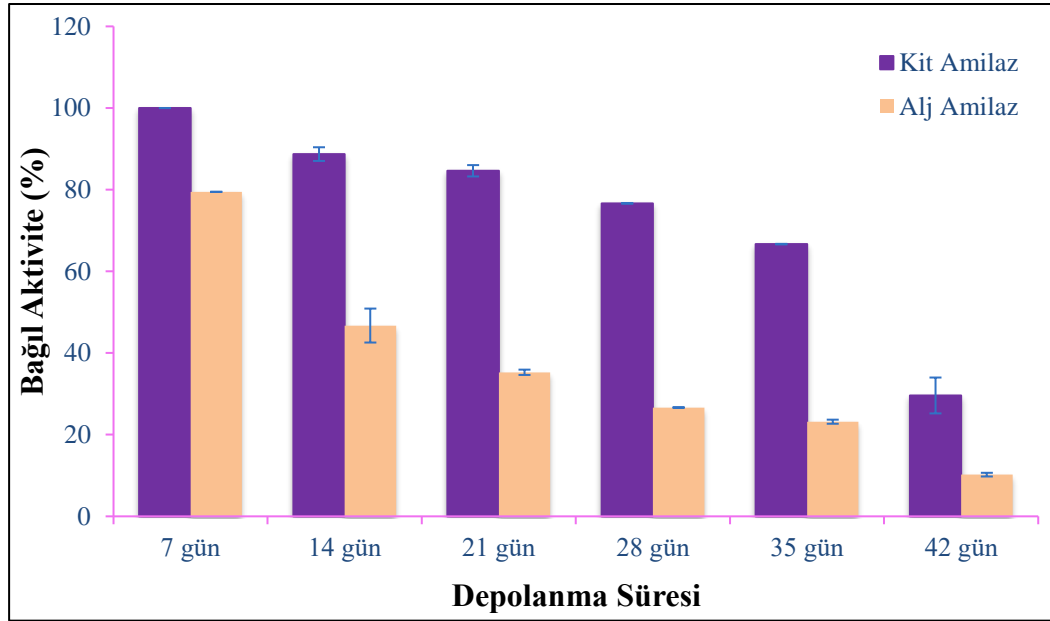
*Kit Pektinaz: Kitosan ile ko-immobilize pektinaz Kit Proteaz: Kitosan ile ko-immobilize proteaz Kit α amilaz: Kitosan ile ko-immobilize α amilaz

Enzimler pH 6,7 ve 8' de 20 saat tutuldu. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

4.4.5. Depolama Kararlılıklarının Saptanması

İmmobilize enzimler tekrar kullanılabilmeleri ve uzun süreler boyunca saklanabilmeleri nedeniyle serbest enzimlerden daha verimli ve ekonomiktir [103]. Depolama stabilitesi enzim performansını etkileyen en önemli parametrelerden biridir [102]. Çalışmamızda iki farklı destek materyale ko-immobilize haldeki enzimlerin 4 ve 25°C derecelerde 42 günlük süreçteki depolanabilirlikleri araştırılmıştır. Ko-immobilize enzimlerde 42 gün sonunda düşük enzim aktiviteleri gözleendiği için yarı süresi olan 21. gündeki aktiviteleri bakımında birbirleriyle kıyaslandılar. Kitosana ko-immobilize enzimlerin depolanmaları neticesinde enzim aktivitesinde bir miktar kayıp meydana gelmiştir. Aktivite kaybı 4 ve 25°C' de depolanan ko-immobilize α amilaz enzimi için sırasıyla % 16 ve 18, ko-immobilize proteaz için %16 ve 21, ko-immobilize pektinaz için ise % 43 ve 29 olarak saptanmıştır (Şekil 4.21-4.26). Na aljinata ko-immobilize enzimler yukardaki sıcaklık dereceleri ve sürede depolanmalarının ardından, enzim aktivitesi bakımından değerlendirildiğinde ise aktivite kaybının α amilaz için % 65 ve 58 olduğu saptanmış, ancak proteaz enzimi için kaybın her iki sıcaklıkta da % 92, pektinaz için ise % 76 olarak gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.21-

4.26). Bu veriler neticesinde kitosana ko-immobilizasyon işleminin üç enzim için de depolanma stabilitesini arttırdığını söyleyebiliriz.



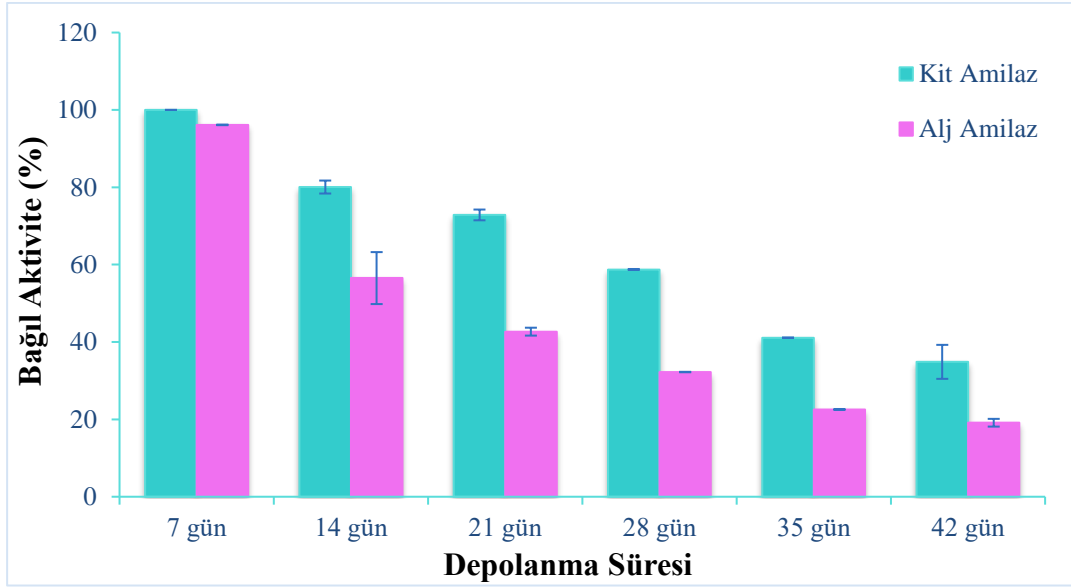
Şekil 4.21. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize α amilaz enziminin +4°C’ deki depolanma sürelerine göre bağlı aktiviteleri

*Kit Amilaz: Kitosan ile ko-immobilize α amilaz Alj Amilaz: Aljinat ile ko-immobilize α amilaz

Enzimler 4 ve 25°C’ de 42 gün saklandı. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2’ de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Altun ve arkadaşlarının pepsini kitosan boncuklara immobilize ettikleri çalışmalarında ilk 30 günde enzimde aktivite kaybı görülmemiş, daha sonra depolanma süresinin artışıyla azalma meydana gelmiştir [101]. Domuz pankreas enziminin kitosan boncuklara immobilize edildiği diğer bir çalışmada ise kitosan boncuklar ile glutaraldehit ile aktive kitosan boncukların stabiliteyi karşılaştırılmıştır. Glutaraldehit ile aktive kitosan boncukların depolanma stabilitelerinin kitosan boncuklardan daha iyi olduğu belirlenmiştir.

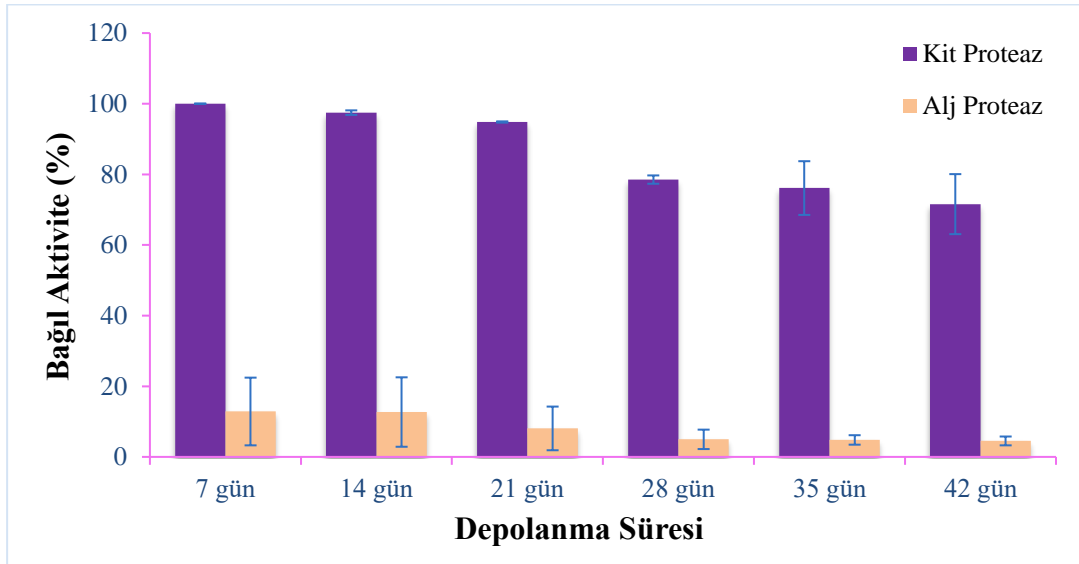
Serbest enzimlerdeki aktivite kaybı zamana bağlı doğal bir süreç olarak ifade edilmektedir, immobilizasyon ile bu durum önemli oranda engellenebilmektedir [71]. Destek materyal ve immobilizasyon metoduna bağlı olarak immobilize enzimlerin raf ömrü artmaktadır. Bu durum enzimin aktif merkezindeki konformasyonel değişimlere öncülük eden 3 boyutlu yapısındaki modifikasyonlarla açıklanabilmektedir [103]



Şekil 4.22. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize α amilaz enziminin 25°C’ deki depolanma sürelerine göre bağıl aktiviteleri

*Kit Amilaz: Kitosan ile ko-immobilize α amilaz Alj Amilaz: Aljinat ile ko-immobilize α amilaz

Enzimler 4 ve 25°C’ de 42 gün saklandı. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2’ de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

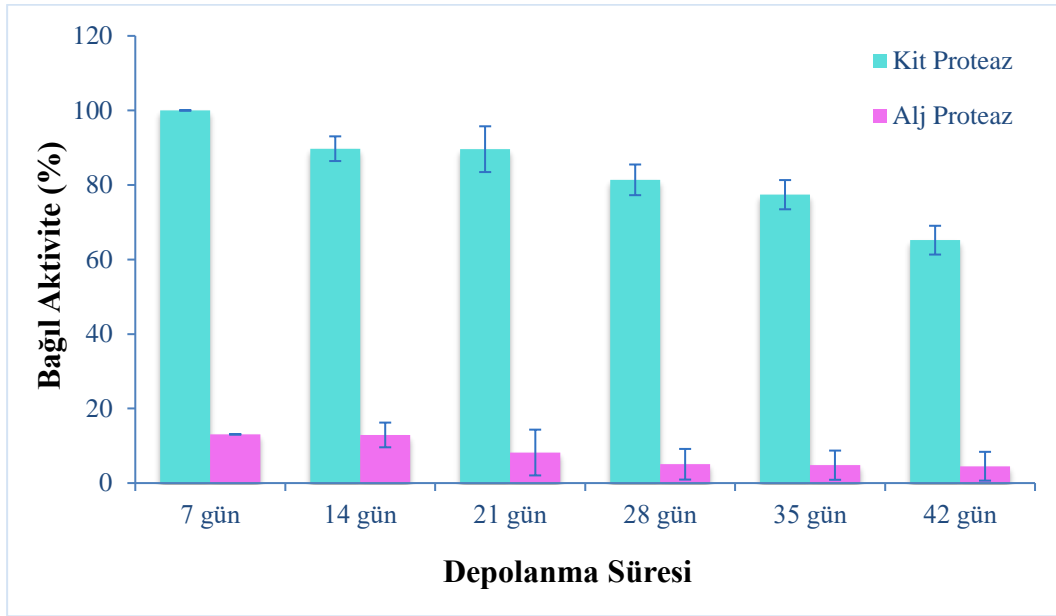


Şekil 4.23. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize proteaz enziminin +4°C’ deki depolanma sürelerine göre bağıl aktiviteleri

*Kit Proteaz: Kitosan ile ko-immobilize proteaz Alj Proteaz: Aljinat ile ko-immobilize proteaz

Enzimler 4 ve 25°C’ de 42 gün saklandı. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2’ de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Bu fark özellikle proteaz enziminde daha fazla gözler önüne serilmiştir. Glutaraldehit ile aktive kitosan boncuklarla üç enzimin depolanmasında elde edilen bu depolanma sürelerinin yaptığımız ko-immobilize enzim tasarımının kullanılabilirliği bakımından oldukça önemli bir sonuç olduğu düşünülmektedir. Singh ve arkadaşlarının nohut α galaktozidazını kitosan ve amberlit olmak üzere iki farklı materyale immobilize ettikleri çalışmalarında kitosana immobilize edildiğinde $+4^{\circ}\text{C}$ ' de aktivitesinin % 54' ü korunurken amberlite immobilize edildiğinde kalan aktivite % 32 olarak saptanmıştır. 25°C ' de ise aktivitelerinde bir miktar daha düşme meydana gelmiştir [85]. Eupergit C' ye immobilize dekstranaz ve dekstransükraz enzimlerinin Na aljinat boncuk, kapsül ve ipliklerde ko-immobilize edildikleri diğer bir çalışmada depolanma stabilitesinin kapsülde ko-immobilize edilen enzimler için daha yüksek oldukları tespit edilmiştir.

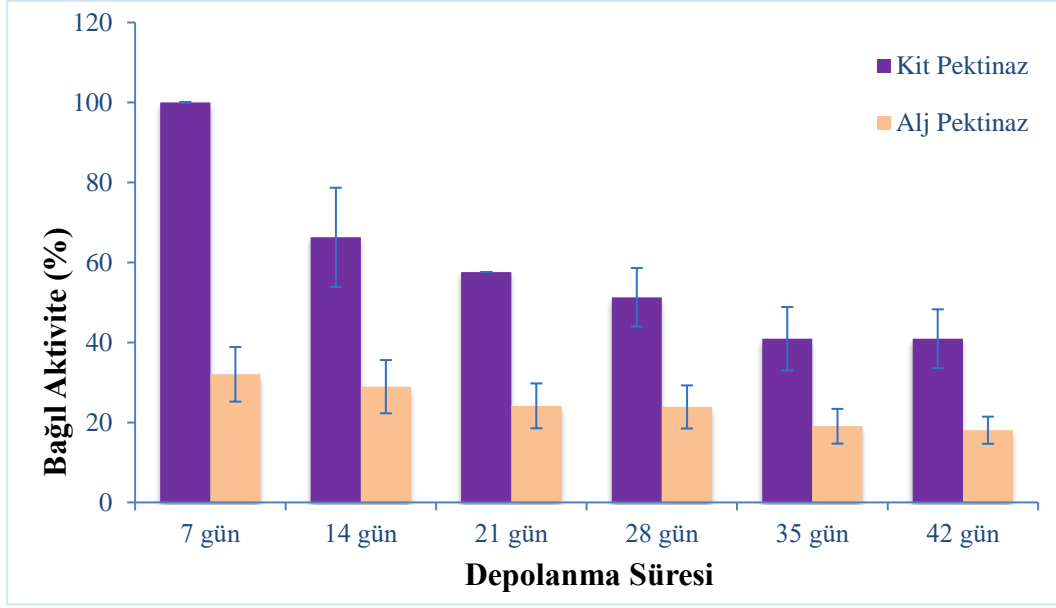


Şekil 4.24. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize proteaz enziminin 25°C ' deki depolanma sürelerine göre bağıl aktiviteleri

*Kit Proteaz: Kitosan ile ko-immobilize proteaz Alj Proteaz: Aljinat ile ko-immobilize proteaz

Enzimler 4°C ve 25°C ' de 42 gün saklandı. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

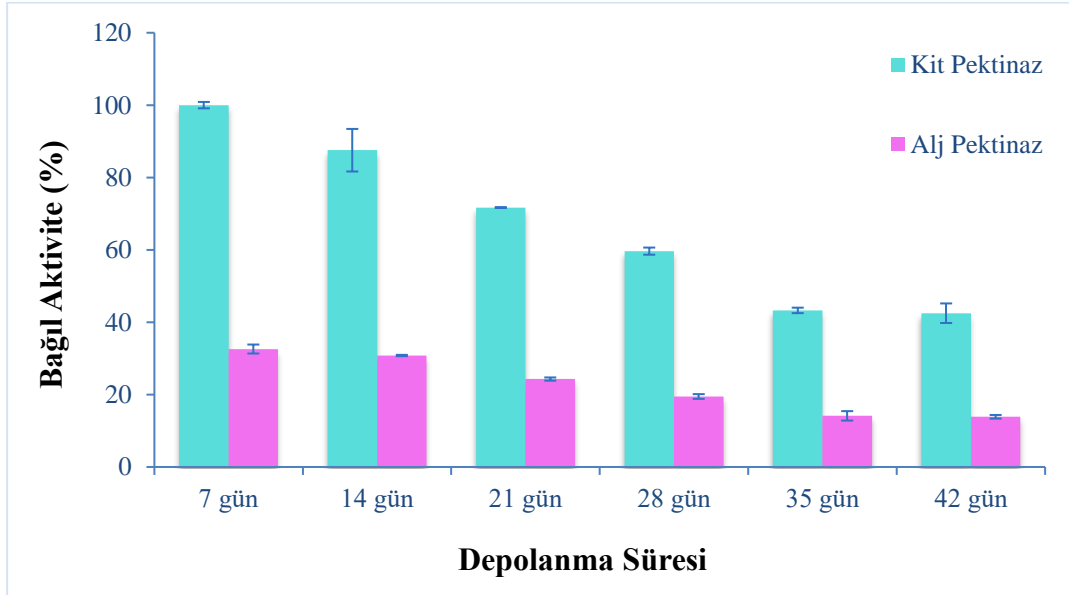
4 farklı hidrofilik polimerden elde edilen hidrojellerin destek materyal olarak kullanıldıkları bir çalışmada ise çalışmamızla benzer olarak materyallere göre depolanma stabilitesi karşılaştırıldığında kitosana immobilize edildiğindeki depolama stabilitesi aljinatla immobilize halinden yüksek bulunmuştur [112].



Şekil 4.25. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize pektinaz enziminin +4°C’ deki depolanma sürelerine göre bağlı aktiviteleri

*Kit Pektinaz: Kitosan ile ko-immobilize pektinaz Alj Pektinaz: Aljinat ile ko-immobilize pektinaz

Enzimler 4 ve 25°C’ de 42 gün saklandı. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2’ de anlatıldığı şekilde tayin edildi.



Şekil 4.26. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize pektinaz enziminin 25°C’ deki depolanma sürelerine göre bağlı aktiviteleri

*Kit Pektinaz: Kitosan ile ko-immobilize pektinaz Alj Pektinaz: Aljinat ile ko-immobilize pektinaz

Enzimler 4 ve 25°C’ de 42 gün saklandı. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2’ de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Çalışmamızdan farklı olarak fosfolipaz ve kolin oksidaz enzimlerinin ko-immobilize edilerek lesitin tayininde kullanıldığı bir çalışmada enzimler iki hafta depolandığında enzimlerin aktivitesinde yüksek oranda düşüş meydana gelmiştir [115].

Serbest dekstranaz ve dekstran sükröz Na aljinat kapsüle ko-immobilize edildiğinde ise 11 gün +4°C’ de depolandıklarında başlangıç aktivitesinin yalnız % 35’ ini korudukları saptanmıştır [92]. Çalışmamızda kitosan materyale ko-immobilizasyonla elde edilen depolanma süreleri Na aljinat boncuklardakinden oldukça yüksek bulunmuştur.

4.4.6. Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Saptanması

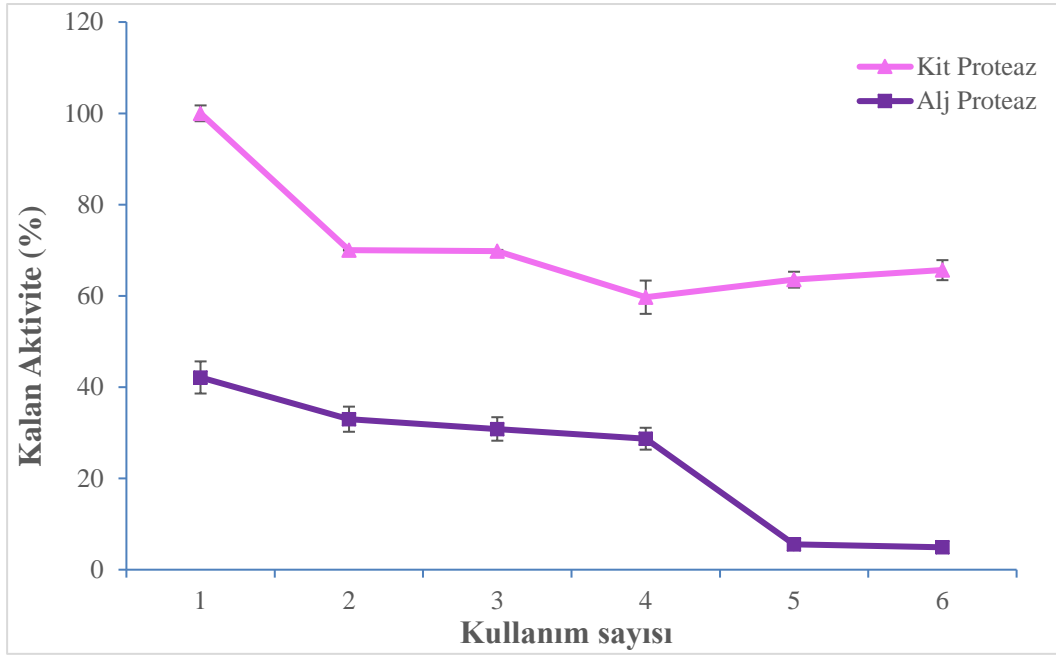
Serbest enzimler sadece bir kez kullanılabilirken immobilize enzimlerin tekrar kullanımı mümkün olmaktadır [71]. Biyoteknolojik açıdan bir katalizörün tekrar kullanılabilirliği onun ekonomik değerini belirlediği için önemlidir [17]. Proteaz enzimi için tekrar kullanım kararlılıklarını değerlendirdiğimiz de kitosana ko-immobilize proteazın 3 kullanım sonunda aktivitesinin % 69’ unu, Na aljinata ko-immobilize proteazın ise % 30’ unu koruduğu tespit edildi. 6 kullanımın ardından ise kitosana ko-immobilize proteazın aktivitesinin % 65’ini koruduğu görüldü. Aljinata ko-immobilize proteaz enzimi ise 6 kullanım sonucunda aktivitesinin tamamına yakını kaybetmiştir (Şekil 4.27).

Kitosana ve Na aljinata ko-immobilize α amilaz enzimine baktığımızda başlangıç aktivite değerleri kitosan için daha yüksek iken 3 kullanım sonucunda aktivitelerini sırasıyla % 72 ve % 68 oranında korumakta oldukları, 6 kullanım sonucunda ise bu korunmanın % 34 ve % 48’ e düştüğü görülmektedir. Bir başka ifadeyle kitosana immobilizasyon tekrar kullanım kararlılıklarını düşürmektedir (Şekil 4.28).

Pektinaz enziminde ise hem kitosana hem de Na aljinata ko-immobilize halinde kalan aktivite miktarlarının birbirine çok yakın oldukları görüldü. 3 kullanım sonucunda kitosana ko-immobilize pektinazın aktivitesini % 76 koruduğu Na aljinata ko-immobilize halinin ise % 36 koruduğu belirlendi. Ancak başlangıç aktivitesi daha yüksek olan kitosana ko-immobilize pektinazda her kullanım sonucunda düşüş gözlenirken Na aljinata ko-immobilize halinde sadece % 7’ lik bir aktivite kaybı yaşanmıştır (Şekil 4.29).

Çalışmada pektinaz ve α amilaz enzimleri için Na aljinatla ko-immobilizasyon, tekrarlanabilme özelliği bakımından avantajlı olarak görülse de gerek başlangıç aktiviteleri gerekse depolama

kararlılıkları kitosana ko-immobilize halinden daha düşük olması nedeniyle çalışmaya kitosana ko-immobilize enzimlerle devam edilmiştir.



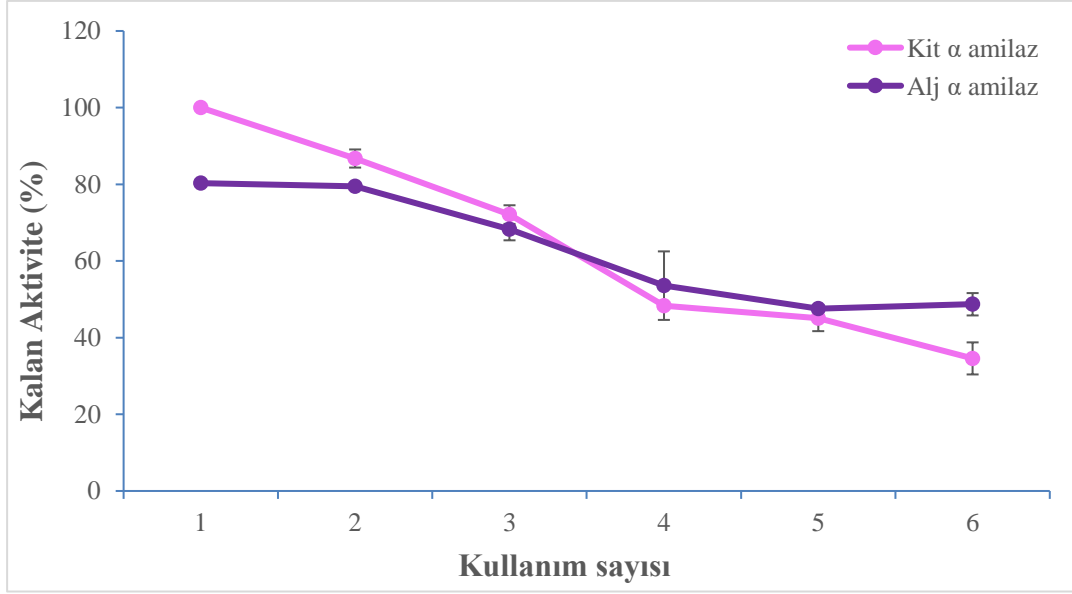
Şekil 4.27. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize proteaz enziminin tekrar kullanım sayısına göre bağıl aktiviteleri

*Kit Proteaz: Kitosan ile ko-immobilize proteaz Alj Proteaz: Aljinat ile ko-immobilize proteaz

Enzimler 6 kez tekrarlayan reaksiyonlarda kullanıldılar. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Bunun yanısıra 6 kullanım sonucunda proteaz enziminin aktivitesi kitosana ko-immobilize halde korunurken Na aljinat materyalde tamamen aktivite kaybı tespit edilmiştir.

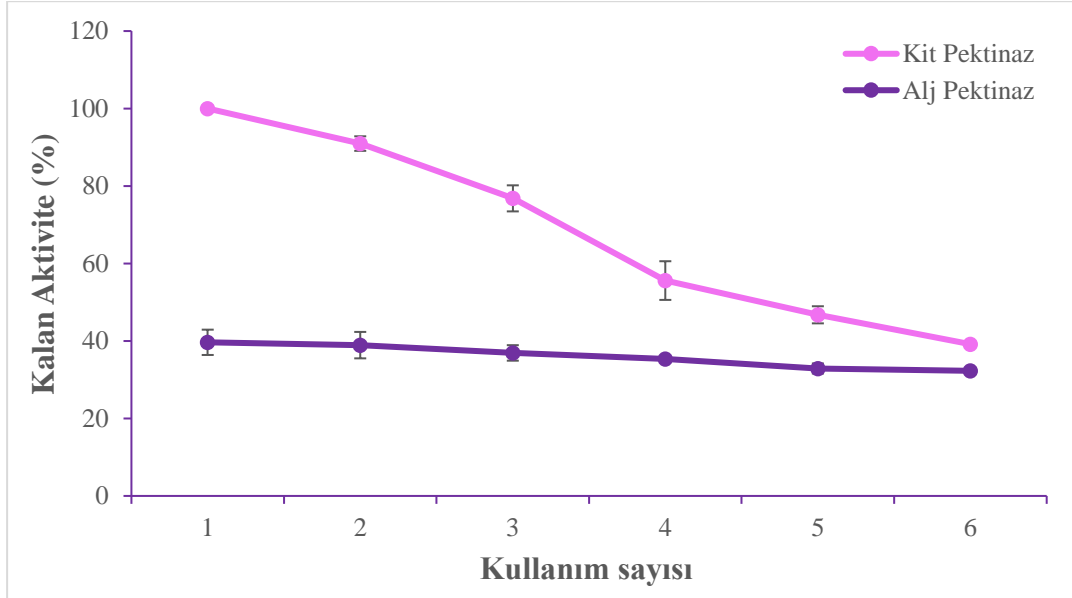
Çalışmamızla benzer olarak Altun ve arkadaşlarının pepsin enzimini kitosan boncuklara immobilize ettikleri çalışmalarında 3 kullanım sonucunda enzimin aktivitesinin % 95' ini koruduğu ancak sonraki kullanımlarda aşamalı olarak düştüğü saptanmıştır. Ancak bu düşüşe rağmen serbest enzime kıyasla immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlik özelliğinin bir avantaj olduğu düşünülmektedir [101]. Kitosan boncuklara lipaz enziminin immobilize edildiği bir çalışmada ise boncukların glutaraldehit ile muamele edilmesinin enzimin tekrar kullanılabilirliğini arttırdığı tespit edilmiştir [103]. Damasio ve arkadaşlarının gliksil agaroz fungal endo ksilanaz ve arabinofuronidaz enzimlerini ko-immobilize ettikleri çalışmalarında 6 kez kullanımı neticesinde kalan aktivite % 45 olarak bulunmuştur [116].



Şekil 4.28. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize α amilaz enziminin tekrar kullanım sayısına göre bağıl aktiviteleri

*Kit α amilaz: Kitosan ile ko-immobilize α amilaz Alj α amilaz: Aljinat ile ko-immobilize α amilaz

Enzimler 6 kez tekrarlayan reaksiyonlarda kullanıldılar. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.



Şekil 4.29. Na aljinata ve kitosana ko-immobilize pektinaz enziminin tekrar kullanım sayısına göre bağıl aktiviteleri

*Kit Pektinaz: Kitosan ile ko-immobilize pektinaz Alj Pektinaz: Aljinat ile ko-immobilize pektinaz

Enzimler 6 kez tekrarlayan reaksiyonlarda kullanıldılar. Enzim aktiviteleri Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Kağıt üretim endüstrisi atıksuyunun ko-immobilize enzimlerle arıtımının gerçekleştirildiği bir çalışmada makroporlu rezin üzerine ko-immobilize edilen pektinaz ve lipaz enzimlerinin tekrarlayan 4 kullanım sonucunda sırasıyla aktivitelerinin % 90 ve % 85 civarında korunduğu belirlenmiştir [117].

Çalışmamızda üç enzimin bir arada immobilize edildiği enzim sisteminin, tekrarlayan reaksiyonlarda aktivitesinin % 50' sinden fazlasını koruyarak çalışabiliyor olmasının önemli bir bulgu olduğu düşünülmektedir.

Literatürdeki çalışmalara baktığımızda ko-immobilizasyon için çeşitli destek materyallerin kullanımının söz konusu olduğu görülmektedir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Literatürde yer alan bazı ko-immobilizasyon çalışmaları

Enzimler	Destek materyal	Ko-immobilizasyon metodu	Referans
Format dehidrogenaz Formaldehit dehidrogenaz Alkol dehidrogenaz	Protamin kaplı titanyum	Enkapsülasyon	[110]
Glukoz oksidaz Katalaz	Kalsiyum aljinat jel	Enkapsülasyon	[91]
Pektin liyaz Endoselülaz	Kitin ve naylon	Kovalent bağlanma	[113]
Endoksilanaz α - L arabinofuronozidaz	Gliokslil agaroz	Kovalent bağlanma	[116]
Pektinaz Lipaz	Kitosanla kaplı makroporlu rezin	Kovalent bağlanma	[117]
α Glukozidaz Piranoz oksidaz	Kitosan Karbon nanotüp	Kovalent bağlanma	[118]
α amilaz Proteaz Pektinaz	Na aljinat boncuk	Tutuklama	Bu çalışma
α amilaz Proteaz Pektinaz	Aktive kitosan boncuk	Kovalent bağlanma	Bu çalışma

Çalışmamızdaki tüm bulgular neticesinde glutaraldehit ile aktive kitosanın enzim ko-immobilizasyonu için uygun bir destek materyal olduğunu söyleyebiliriz.

4.4.7. Atıksuda Ko-immobilize Enzimlerle Ön Arıtım

Enzimler atık yönetimindeki kullanımları sayesinde temiz çevrenin korunmasına yardımcı olmaktadır. Günümüzde enzimlerle yapılan araştırmalar ve uygulamalar, enzimlerin biyoremediyasyon çalışmalarındaki başarılı kullanımları nedeniyle giderek artmaktadır. Çevre uygulamalarında enzimlerin kullanımlarının çeşitli yararları vardır. Sert koşullar ve sert kimyasallar ya da ekstrem koşullar yerine ılımlı koşullarda fonksiyoneldirler, yüksek spesifiteye sahiptirler, istenmeyen yan ürünlerin oluşumu söz konusu değildir. Enzimler biyolojik materyallerin olduğu atıkların arıtımında kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak enzimler biyoyıkılabilir özelliktedir [8]. Çalışmada evsel atıksu ön arıtımında kullanılmak üzere ko-immobilize enzimlerin elde edilmesi hedeflenmiştir. Farklı iki materyale proteaz, pektinaz ve α amilaz enzimleri ko-immobilize edilmiştir. Çalışmanın atıksu ön arıtımı kısmında, enzim ko-immobilize Na aljinat ve kitosan boncuklar karşılaştırıldığında immobilizasyon verimleri, pH ve sıcaklık kararlılıkları ve depolanabilme kararlılıkları daha yüksek olan kitosan boncuklar kullanıldı. Hem laboratuvarda hazırlanan sentetik bir evsel atıksu hem de Biyosis firmasından temin edilen gerçek bir evsel atıksu numunesi kullanılarak çalışmalar gerçekleştirildi. Ayrıca hazırlanan enzim ko-immobilize kitosan boncukların tuzlu sudaki etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla deniz suyu içerisine atık madde olarak nişasta, pektin ve kazeinden çalışmada kullanılan miktarlarda eklendi. Çizelge 4.9' da ön arıtım sonuçları yer almaktadır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde hazırlanan ko-immobilize enzim sisteminin atıksular içerisinde çalıştığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda α amilaz ve proteaz enzimleri için en yüksek yıkım yüzdeleri deniz suyunda hazırlanan atıksu ortamında saptanmıştır. Bu duruma deniz suyu içerisinde bulunan bir iyonun enzimlerin aktivitesi üzerinde arttırıcı bir etki göstererek neden olduğu düşünülmektedir. Literatürde yer alan proteolitik enzim aktivitesini arttıran etkenlerin araştırıldığı bir çalışmada, Ca^{+2} ve Fe^{+2} iyonlarının proteaz enzimini önemli derecede aktive ettiği belirlenmiştir [119]. Benzer olarak Ghorbel ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya baktığımızda Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} gibi iki değerlikli iyonların proteaz aktivitesini arttırıcı etkisi olduğu görülmektedir [120].

Çizelge 4.9. Kitosan boncuklara ko-immobilize α amilaz, proteaz ve pektinaz enzimlerinin 3 farklı atıksu ortamındaki giderim miktarları (%) ya da yıkım sonucu oluşan ürün miktarları (mg)

	Sentetik Eysel Atıksu	Eysel Atıksu	Tuzlu Atıksu
α amilaz	% 49.26	% 46.85	%75.68
Proteaz	% 43.47	% 41.05	%78.76
Pektinaz	0.266 mg	0.437 mg	0

*Giderim çalışmaları Bölüm 3.6' da anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Penicillium sp' den izole edilen proteaz enzimiyle gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Na^{+2} ve Ca^{+2} varlığında enzim aktivitesinde yükselme görülmüştür [121]. Ca^{+2} deniz suyu içerisinde bulunan temel iyonların başında gelmektedir [122]. Ca^{+2} iyonlarının proteaz aktivitesini artırıcı etki göstermesi nedeniyle proteazın deniz suyundaki giderim oranının yüksek olmasının Ca^{+2} iyonlarının varlığı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Amilaz enzimleri genellikle aktiviteleri, stabilite ve yapısal bütünlüklerinin korunması için Ca^{+2} iyonlarına ihtiyaç duyan metalloenzim yapısındadırlar [123],[124]. Bu nedenle çalışmamızda α amilaz aktivitesinde meydana gelen artışın da deniz suyu içerisinde bulunan Ca^{+2} iyonlarından kaynaklanabileceği görüşü üzerinde durulmaktadır.

Pektinaz enzimi tuzlu atıksu ortamında inhibe olurken en iyi sonuç gerçek evsel atıksu için saptandı. Gashe ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada Mg^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} ve Na^{+} iyonlarının pektinaz üzerinde inhibitör etkiye sebep olduğu belirlenmiştir [125]. Deniz suyunda da NaCl miktarının yüksek olması nedeniyle bu ortamda pektinaz enziminin Na^{+} iyonlarının etkisiyle inhibe olabileceği düşünülmektedir. α amilaz ve proteaz enzimlerinin sentetik evsel atıksu ve gerçek evsel atıksudaki yıkım yüzdelerine baktığımızda her iki değer birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir.

Literatürde çalışmamızla benzer olarak çeşitli atıksu arıtım süreçlerinde immobilize enzimlerin kullanıldığı çalışmalar yer almaktadır. Wada ve arkadaşlarının çalışmasında, katyon değiştirici bir rezine immobilize edilmiş olan tirozinaz enziminin fenol gideriminde serbest haldeki enzimden daha başarılı olduğu saptanmıştır [23]. Tekstil endüstrisi atıksularında yer alan antrakinin ve azo boyalarının renk giderimi amacıyla immobilize ve serbest peroksidaz enziminin kullanıldığı bir

çalışmada immobilize enzimin sıcaklık stabilitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak enzim kovalent bağlanma metoduyla immobilize edildiği için enzim aktivitesinde bir miktar düşüş meydana geldiği görülmüştür [19]. İmmobilize lakkaz enziminin atıksulardaki renk gideriminde kullanıldığı bir başka çalışmada da, reaktif tekstil boyalarının dekolarizasyonunda immobilize haldeki enzimin yüksek etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir [25].

Literatürde yer alan çalışmalara baktığımızda biyoremediyasyon amacıyla ko-immobilize enzimlerden yararlanılan ancak birkaç çalışmaya rastlanmıştır. Bir çalışmada farklı fenollerini içeren atıksu ortamından fenollerin uzaklaştırılmasında ko-immobilize edilen lakkaz ve tirozinaz enzimleri kullanılmıştır [17]. Liu ve arkadaşlarının yapmış oldukları diğer bir çalışmada ise kağıt üretim endüstrisine ait beyaz atık suyun arıtımı kitosan ile kaplı makroporlu rezine ko-immobilize edilen pektinaz ve lipaz enzimleri ile gerçekleştirilmiştir [117].

Çalışmamız kapsamında proteaz, pektinaz ve α amilaz enzimlerinin ilk kez ko-immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İki farklı destek materyalin ve farklı immobilizasyon metodlarının ko-immobilizasyona etkisi araştırılmış ve ko-immobilizasyonun verimini etkilediği saptanmıştır. Glutaraldehit ile aktive kitosan boncuklara immobilize enzimlerin, atıksu arıtımı amacıyla kullanıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Enzimlerin kovalent bağlanma metoduyla desteğe bağlandıklarındaki depolanabilirlik ve tekrarlanabilirlik kararlılıkları tutuklama metoduyla ko-immobilizasyonlarına göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Kitosana ko-immobilize enzimlerle yapılan atıksu ön arıtımı çalışmaları neticesinde elde edilen ko-immobilize enzim sisteminin ön arıtım amacıyla kullanılabilirliği de saptanmıştır.

5.YORUM

Yeryüzündeki yaşam kalitesi çevrenin genel kalitesine ayrılmaz bir şekilde bağlıdır. İçinde yaşadığımız çevre ile ilgili farkındalığımızdaki artış çevre temizliğinde alternatif teknolojilerin geliştirilmesi gerekliliğini de beraberinde getiriyor. Günümüzde kirlilikle ilgili iki temel problem vardır. Bunlar sürekli üretilen büyük miktardaki atığın ortadan kaldırılması ve toprakta, çöp alanlarında ve su sistemlerinde biriken toksik bileşiklerin uzaklaştırılmasıdır. Biyoteknoloji bu sorunlarla başa çıkmak için en gerekli araçtır. Çünkü çevreyi anlamak, yönetmek, korumak ve eski haline getirmek, kirleticileri zararsız ürünlere dönüştürmek, yenilenebilir kaynaklardan biyobozunur malzemeler üretmek, üretim ve bertaraf işlemlerini çevresel olarak güvenli hale getirmek konusunda yeni yaklaşımlar sağlayabilmektedir. Bunların başında doğadaki sürdürülebilirliğin sağlanması için zararlı atık maddelerin arıtımı ve çevre kirliliğinin önüne geçilmesi amacıyla canlı organizmaların ya da onların ürettikleri enzimlerin kullanımı gelmektedir. Ancak mikroorganizmaların atık arıtımında kullanımlarını sınırlayan bazı etkenler bulunmaktadır. Özellikle mikroorganizmaların çevrelerinde meydana gelen pH, sıcaklık ve tuzluluk değişimlerine duyarlı olmaları ve toksik ya da inhibitörük madde varlığında üremelerinin sınırlanması söz konusudur. Aynı zamanda mikroorganizmaların gelişimleri için makro ve mikro nütrientlere ihtiyaçları vardır. Arıtım süreçlerinin ardından ortamdan mikroorganizmaların uzaklaştırılması da sorun haline gelebilmektedir. Ayrıca biyolojik sistemlerin kullanımı ile atıksuların deşarj edilebilecek kadar temizlenmesi de mümkün olmamaktadır. Son yıllarda enzimlerin biyoremediyasyon işlemlerindeki başarısı nedeniyle enzimler ile ilgili araştırma ve çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Özellikle enzimler üzerinde bir takım modifikasyonlar yapılarak enzimlerin pH kararlılıklarının genişletilmesi, termostabiliteilerinin, depolama sürelerinin ve tekrar kullanılabilirliklerinin arttırılmasıyla enzimlerin endüstriyel ve atık arıtım işlemlerinde kullanımlarının yaygınlaştırılması hedeflenmektedir [8],[126]. Literatürde enzimlerin kullanıldığı atık arıtım işlemleriyle ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu bağlamda çalışmamızın atıksu arıtım işlemlerinde enzimlerin kullanımı hakkında geniş bilgi içeriğiyle yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Bu çalışma üç farklı enzimin tek bir destek materyale bağlanması için Na aljinat ve kitosan olmak üzere iki farklı destek materyalin kullanılması ve bu materyallerin özelliklerinin karşılaştırılması bakımından oldukça önemlidir. Literatürde bu iki materyalin enzim ko-immobilizasyonundaki etkinliklerinin karşılaştırılmasına dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda tutuklama ve kovalent immobilizasyon olmak üzere iki farklı metot karşılaştırılarak üç enzimin bir arada immobilizasyonunun gerçekleştirildiği boncuklar elde edildi. Bu boncuklarda ko-immobilize enzimlerin termal, pH, depolanabilme ve tekrarlanabilme stabiliteleri gibi bazı özellikleri incelendi. Kullanılan enzimlerin özelliklerinin, enzimler glutaraldehitte aktive edilen kitosan boncuklara kovalent olarak ko-immobilize edildiklerinde daha iyi durumda oldukları belirlendi. Daha önce proteaz, pektinaz ve α amilaz enzimlerinin bir arada immobilize edildiği başka bir çalışmayla karşılaşılmamıştır. Ayrıca glutaraldehitte aktive edilmiş kitosan boncukların ko-immobilizasyon amacıyla kullanıldığı başka bir çalışma da saptanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız ko-immobilizasyon konusunda sahip olduğu ilkler neticesinde bundan sonra yapılacak ko-immobilizasyon çalışmaları için yol gösterici olacaktır. Çalışmada kullanılan enzimler değiştirilerek evsel ya da endüstriyel olmak üzere farklı atıkların da ön arıtımı ile ilgili çalışmaların yapılabilmesi söz konusudur. Çalışmada kullanılan enzimler model enzim olarak seçilmişlerdir yerlerine farklı enzimler konularak çeşitli amaçlar için kullanılacak ko-immobilize enzimlerin tasarlanabilmesi yeni araştırma konularına da ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Jern, N.W., *Industrial Wastewater Treatment*, World Scientific Publishing Company, Singapore, 164, **2006**.
- [2] Uluçam, G., *Tunca Nehrinde Kimyasal Kirliliğinin Araştırılması ve Sonuçta Ortaya Çıkacak Kimyasal Kirliliğin Giderilmesi için Uygulanacak Arıtma Metodunun İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **1997**.
- [3] Günerken, E., *Modüler Tip Endüstriyel Atıksu Biyoreaktörü Tasarımı*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2011**.
- [4] Doğan, M., Saylak, M., *Su Kimyası*, Erciyes Üniversitesi Yayınları No:120, Kayseri, **2000**.
- [5] Tan, A., *Atık Sularda Bazı Kirlilik Parametrelerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2006**.
- [6] Demarche, P., Junghanns, C., Nair, R. R., Agathos, S. N., Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship, *Biotechnology Advances*, 30, 5, 933-953, **2012**.
- [7] Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J., Ballesteros, A., Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, *Trends in Biotechnology*, 24, 6, **2006**.
- [8] Ahuja, S. K., Ferreira, G. M., Moreira, A. R., Utilization of enzymes for environmental applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 24, 2-3, 125-154, **2004**.
- [9] Özçömlekçi, E., *Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2006**.
- [10] Aitken, M.D., Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles, *Chemical Engineering Journal*, 52, 49-58, **1993**.
- [11] Munnecke, D.M., Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides, a possible pesticide disposal method, *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 7-13, **1976**.
- [12] Shen, S.K., Dowd, P.F., Detoxifying enzymes and insect symbionts, *Journal of Chemical Education*, 69, 796-799, **1992**.
- [13] Karim, Z., Husain, Q., Removal of anthracene from model wastewater by immobilized

- peroxidase from *Momordica charantia* in batch process as well as in a continuous spiral-bed reactor, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66, 302-310, **2010**.
- [14] Al-Ansari, M.M., Steevensz, A., Al-Aasm, N., Taylor, K.E., Bewtra, J.K., Biswas, N., Soybean peroxidase-catalyzed removal of phenylenediamines and benzenediols from water, *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 253-260, **2009**.
- [15] Karim, Z., Husain, Q., Redox-mediated oxidation and removal of aromatic amines from polluted water by partially purified bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63, 587-593, **2009**.
- [16] Cho, S.H., Lee, H.J., Moon, S.H., Integrated electroenzymatic and electrochemical treatment of petrochemical wastewater using a pilot scale membraneless system, *Process Biochemistry*, 43,1371-1376, **2008**.
- [17] Krastanov, A., Removal of phenols from mixtures by coimmobilised laccase/tyrosinase and polyclar adsorption, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 383-388, **2000**.
- [18] Faraco, V., Pezzella, C., Miele, A., Giardina, P., Sannia, G., Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes, *Biodegradation*, 20, 209-220, **2009**.
- [19] Celebi, M., Kaya, M.A., Altikatoglu, M., Yildirim, H., Enzymatic decolorization of anthraquinone and diazo dyes using horseradish peroxidase enzyme immobilized onto various polysulfone supports, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 716-730, **2013**.
- [20] Kohyama, E., Yoshimura, A., Aoshima, D., Yoshida, T., Kawamoto, H., Nagasawa, T., Convenient treatment of acetonitrile-containing wastes using the tandem combination of nitrile hydratase and amidase-producing microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 600-606, **2006**.
- [21] Battistel, E., Bernardi, A., Maestri, P., Enzymatic decontamination of aqueous polymer emulsions containing acrylonitrile, *Biotechnology Letters*, 19, 131-134, **1997**.
- [22] Godfrey, T., West, S., *Industrial Enzymology*, 2nd Ed., MacMillan Press Ltd., London, **1996**.

- [23] Wada, S., Ichikawa, H., Tatsumi, K., Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase, *Biotechnology and Bioengineering*, 42(7), 854-858, **1993**.
- [24] Ferrer, I., Dezotti, M., Durán, N., Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidase and horseradish peroxidase, *Biotechnology Letters*, 13, 577-582, **1991**.
- [25] Peralta-Zamora, P., Pereira, C.M., Tiburtius, E.R.L., Moraes, S.G., Rosa, M.A., Minussi, R.C., Duran, N., Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase, *Applied Catalysis B: Environmental*, 42(2), 131-144, **2003**.
- [26] Sundarram, A., Murthy, T. P. K., α -amylase production and applications : a review, *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2, 4, 166-175, **2014**.
- [27] Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R., Advances in microbial amylases, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31,135-152, **2000**.
- [28] Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochemistry*, 38 (11), 1599-1616, **2003**.
- [29] Nigam, P.S., Microbial enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications, *Biomolecules*, 3, 597-611, **2013**.
- [30] Shoemaker, S., The use of enzymes for waste management in food industry, *In 'Biotechnology in food processing'*, (eds: Harlander, S.K., Labuza, T.P.), Naves Publications, Park Ridge, NJ, 259-267, **1986**.
- [31] Burgess, J. E., Pletschke, B. I., Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment : A mini-review, *WaterSA*, 34, 3, 343-350, **2008**.
- [32] Sharma, N., Rathore, M., Sharma, M., Microbial pectinase: sources, characterization and applications, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12, 1, 45-60, **2013**.
- [33] Hoondal, G., Tiwari, R., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q., Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review," *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 4-5, 409-418, **2002**.
- [34] Kashyap, D., Applications of pectinases in teh commercial sector: a review., *Bioresource Technology*, 77, 215-227, **2001**.

- [35] Lara-Márquez, A., Zavala-Páramo, M. G., López-Romero, E., Camacho, H. C., Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi, *Biotechnological Letters*, 33, 5, 859-868, **2011**.
- [36] Tanabe, H., Yoshihara, Y., Tamura, K., Kobayashi, Y., Akamatsu, T., Pretreatment of pectic wastewater from orange canning process by an alkalophilic *Bacillus sp.*, *Journal of Fermentation Technology*, 65, 243-246, **1987**.
- [37] Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Adinarayana, K., A review on microbial alkaline proteases, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 61, 9, 690-704, **2002**.
- [38] Özkan, E., *Fungal kaynaklı proteaz üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, **2010**.
- [39] Karigar, C. S., Rao, S. S., Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review, *Enzyme Research*, 2011, 1, 1-11, **2011**.
- [40] Ruggaber, T., Talley, J. W., Enhancing bioremediation with enzymatic processes : A review, *Practise Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management*, 2, 73-85, **2006**.
- [41] Parmar, N., Singh, A., Ward, O. P., Enzyme treatment to reduce solids and improve settling of sewage sludge, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26, 383-386, **2001**.
- [42] Nisha, S., Karthick, S. A., Gobi, N., A Review on methods, application and properties of immobilized enzyme, *Chemical Science Review and Letters*, 1, 3, 148-155, **2012**.
- [43] Costa, S. A., Azevedo, H. S., Reis, R. L., Enzyme immobilization in biodegradable polymers for biomedical applications, *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (eds:Reis, R. L., Roman, J. S.), CRC Press, USA, 301-323, **2004**.
- [44] Edet, E., Ntekpe, M., Omereji, S., Current trend in enzyme immobilization : A review, *International Journal of Modern Biochemistry*, 2, 1, 31-49, **2013**.
- [45] Emese, B., *Immobilization of β -D-galaktosidase on nanostructured carriers and characterization of the obtained biocatalysts*, Doctor of Philosophy Thesis, University of Pannonia Research institute of chemical and process engineering, **2012**.

- [46] Datta, S., Christena, L. R., Rajaram, Y. R. S., Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech*, 3, 1-9, **2012**.
- [47] Zucca, P., Sanjust, E., Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms, *Molecules*, 19, 9, 14139-14194, **2014**.
- [48] “research-lines @ www.franciscopouloulab.eu.” .
- [49] Sheldon, R. A., Van Pelt, S., Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chemical Society Reviews*, 42, 42, 6223-6235, **2013**.
- [50] Sheldon, R. A., Enzyme immobilization: The quest for optimum performance, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349, 1289-1307, **2007**.
- [51] Zhang, D. H., Yuwen, L. X., Peng, L. J., Parameters affecting the performance of immobilized enzyme, *Journal of Chemistry*, 2013, 1–7, **2013**.
- [52] Jochems, P., Satyawali, Y., Diels, L., Dejonghe, W., Enzyme immobilization on/in polymeric membranes: status, challenges and perspectives in biocatalytic membrane reactors (BMRs), *Green Chemistry*, 13, 7, 1609, **2011**.
- [53] Elnashar, M. M. M., Mostafa, H., Morsy, N. A., Awad, G. E. A., Biocatalysts: isolation, identification, and immobilization of thermally stable lipase onto three novel biopolymeric supports, *Industrial & Engineering Chemical Research*, 52, 42, 14760-14767, **2013**.
- [54] Zia, K. M., Zia, F., Zuber, M., Rehman, S., Ahmad, M. N., Alginate based polyurethanes: A review of recent advances and perspective,” *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 377-387, **2015**.
- [55] Bilal, M., Asgher, M., Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase, *BMC Biotechnology*, 15, 111, **2015**.
- [56] Stolarzewicz, I., Białecka-Florjańczyk, E., Majewska, E., Krzyczkowska, J., Immobilization of yeast on polymeric supports, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 25, 135-144, **2011**.
- [57] Hung, C. P., Lo, H. F., Hsu, W. H., Chen, S. C., Lin, L. L., Immobilization of *Escherichia coli* novablue γ -glutamyltranspeptidase in Ca-alginate-k-carrageenan beads, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150, 157-170, **2008**.

- [58] Nussinovitch, A., Physical properties of beads and their estimation, Polymer macro and micro gel beads fundamentals and applications, Springer, New York, **2010**.
- [59] Albarghouthi, M., Fara, D. A., Saleem, M., El-Thaher, T., Matalaka, K., Badwan, A., Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads, *International Journal of Pharmaceutics*, 206, 23-34, **2000**.
- [60] Guzik, U., Hupert-kocurek, K., Marchlewicz, A., Wojciesz, D. Enhancement of biodegradation potential of catechol 1, 2-dioxygenase through its immobilization in calcium alginate gel, *Electronic Journal of Biotechnology*, 1–7, **2014**.
- [61] alginate_hydrogels @ people.clarkson.edu. (Kasım 2016)
- [62] Girigowda, K., Mulimani, V.H., Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soymilk by κ -carrageenan- entrapped α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 437-442, **2006**.
- [63] Abdulla, R., Ravindra, P., Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and κ -carrageenan hybrid matrix, *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44, 545-551, **2013**.
- [64] Desai, P. D., Dave, A. M., Devi, S., Entrapment of lipase into κ -carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31, 143-150, **2004**.
- [65] Elnashar, M. M., Awad, G. E., Hassan, M. E., Mohy Eldin, M. S., Haroun, B. M., El-Diwany, A. I., Optimal immobilization of beta-galactosidase onto kappa-carrageenan gel beads using response surface methodology and its applications,” *Scientific World Journal*, 2014, 571682, **2014**.
- [66] 5978386-Besin-kimyasi-besinlerdeki-karbohidratlar-giris @ docplayer.biz.tr. (Kasım, **2016**)
- [67] Biro, E., Nemeth, A. S., Sisak, C., Feczko, T., Gyenis, J., Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 1240–1246, **2008**.
- [68] Kamburov, M., Lalov, I. Preparation of chitosan beads for trypsin immobilization,

- Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26, 156–163, **2014**.
- [69] Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., Waldron, K. C., Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Biotechniques*, 37, 790-802, **2004**.
- [70] Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R., Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization, *RSC Advances*, 4, 1583, **2014**.
- [71] Akkuş Çetinus, Ş., Öztop, H. N., Saraydin, D., Immobilization of catalase onto chitosan and cibacron blue F3GA attached chitosan beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 447-454, **2007**.
- [72] Elnashar, M. M., Low-cost foods and drugs using immobilized enzymes on biopolymers, *Biopolymers*, Scilyo, Croatia, 1-9, **2010**.
- [73] Danial, E. N., Elnashar, M. M. M., Awad, G. E. A., Immobilized inulinase on grafted alginate beads prepared by the one-step and the two-steps methods, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49, 3120-3125, **2010**.
- [74] Betancor, L., Luckarift, H., Co-immobilized coupled enzyme systems in biotechnology., *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*., vol. 27, no. May 2013, pp. 95–114, 2010.
- [75] Jia, F., Narasimhan, B., Mallapragada, S., Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: A review, *Biotechnology and Bioengineering*, 111, 209-222, **2014**.
- [76] Jia, F., *Design of novel nano-carriers for multi-enzyme co-localization*, Doctor of Philosophy Theses, Iowa State University, Iowa, **2013**.
- [77] Z. Xiao, R. Storms, and A. Tsang, “Corrigendum to ““ A quantitative starch – iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities,””” *Anal. Biochem.*, vol. 362, no. MAY 2006, pp. 146–148, 2006.
- [78] Miller, L.G., Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars, *Analytical Chemistry*, 31,426-428, **1959**.

- [79] Kunitz, M., Crystalline soyabean trypsin inhibitor II: general properties, *Journal of General Physiology*, 30, 291–310, **1947**.
- [80] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Forr, A.C., Rondall, R.J., Protein measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biology and Chemistry*, 193, 265-275, **1951**.
- [81] Hayrettin, T., A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 37, 148-153, **2005**.
- [82] Ortega, N., Peres-Mateos, M., Pilar, M. C., Busto, M. D., Neutrase immobilisation on alginate-glutaraldehyde beads by covalent attachment, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 109-115, **2009**.
- [83] Pal, A., Khanum, F., Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme, *Process Biochemistry*, 46, 1315-1322, **2011**.
- [84] Elnashar, M. M. M., Danial, E. N., Awad, G. E. A., Novel carrier of grafted alginate for covalent immobilization of inulinase, 48, 9781-9785, **2009**.
- [85] Singh, A. N., Singh, S., Suthar, N., Dubey, V. K., Glutaraldehyde-activated chitosan matrix for immobilization of a novel cysteine protease, procerain B, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 59, 6256-6262, **2011**.
- [86] İdil, N., *Prostat kanserine özgül glikoproteinlerin tanımlanması için lektin afinite sorbentlerin hazırlanması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.
- [87] Antoniadis, A., Poullos, I., Nikolakaki, E., Mantzavinos, D., Sonochemical disinfection of municipal wastewater, *Journal of Hazardous Materials*, 146, 492-495, **2007**.
- [88] Kruger, N. J., The bradford method for protein quantitation, *The Protein Protocols Handbook*, (eds: Walker, J. M.), Humana Press Inc, Totowa, 15-21, **2002**.
- [89] Gangadharan, D., Madhavan Nampoothiri, K., Sivaramakrishnan, S., Pandey, A., “Immobilized bacterial α -amylase for effective hydrolysis of raw and soluble starch,” *Food Research International*, 42, 436-442, **2009**.
- [90] Jadhav, S. B., Singhal, R. S., Pullulan-complexed α -amylase and glucosidase in alginate beads: Enhanced entrapment and stability, *Carbohydrate Polymers*, 105, 49-56, **2014**.

- [91] Blandino, A., Macias, M., Cantero, D., Calcium alginate gel as encapsulation matrix for coimmobilised enzyme systems, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 110, 53-60, **2003**.
- [92] Ölçer Z., Tanriseven, A., Co-immobilization of dextransucrase and dextransucrase in alginate, *Process Biochemistry*, 45, 1645-1651, **2010**.
- [93] Park, D., Haam, S., Jang, K., Ahn, I. S., Kim, W. S., Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: Properties and application to starch hydrolysis, *Process Biochemistry*, 40, 53-61, **2005**.
- [94] Ertan, F., Yagar, H., Balkan, B., Optimization of alpha-amylase immobilization in calcium alginate beads, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 37, 195-204, **2007**.
- [95] Viet, T. Q., Minh, N. P., Thi, D., Dao, A., Immobilization of cellulase enzyme in calcium alginate gel and its immobilized stability, *American Journal of Research Communication*, 1, 254-267, **2013**.
- [96] Ran, Y. H., Che, Z. F., Chen, W. Q., Co-immobilized lignin peroxidase and manganese peroxidase from coriolus versicolor capable of decolorizing molasses waste water, *Applied Mechanics and Materials*, 138-139, 1067-1071, **2011**.
- [97] Yang, K., Xu, N. S., Su, W. W., Co-immobilized enzymes in magnetic chitosan beads for improved hydrolysis of macromolecular substrates under a time-varying magnetic field," *Journal of Biotechnology*, 148, 119-127, **2010**.
- [98] Nusratun, M., hasrul, A. S., Sureena, A., Aini, N., Ruwaida, A. R., Shalyda, M. S., Immobilisation of lipase from *Candida rugosa* on chitosan beads for transesterification reaction, *Journal of Applied Sciences*, 21, 2701-2704, **2010**.
- [99] Silveira, S. T., Gemelli, S., Segalin, J., Brandelli, A., Immobilization of keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. strain kr6 on glutaraldehyde-activated chitosan, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 818-825, **2012**.
- [100] Chen, J. P., Chiu, S. H., Preparation and characterization of urease immobilized onto porous chitosan beads for urea hydrolysis, *Bioprocess Engineering*, 21, 323-330, **1999**.
- [101] Altun, G. D., Cetinus, S. A., Immobilization of pepsin on chitosan beads, *Food Chemistry*,

- 100, 964-971, **2007**.
- [102] Zheng, F., Cui, B., Wu, X., Meng, G., Liu, H., Si, J., Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 110, 69-78, **2016**.
- [103] Gilani, S. L., Najafpour, G. D., Moghadamnia, A., Kamaruddin, A. H., Stability of immobilized porcine pancreas lipase on mesoporous chitosan beads: A comparative study, *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 133, 144-153, **2016**.
- [104] Silvana, T., Gemelli, S., Segalin, J., Brandelli, A., Immobilization of keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp . strain kr6 on glutaraldehyde-activated chitosan, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 818-825, **2012**.
- [105] Ahsan, S., Arifur, M., Satoshi, R., Katsumata, H., Suzuki, T., Ohta, K., Effect of temperature on wastewater treatment with natural and waste materials, *Clean Technologies and Environmental Policy*, 7, 198-202, **2005**.
- [106] Pundir, C. S., Chauhan, N., Coimmobilization of detergent enzymes onto a plastic bucket and brush for their application in cloth washing, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51, 3556-3563, **2012**.
- [107] Guzik, U., Hupert-kocurek, K., Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases, *Molecules*, 19, 8995-9018, **2014**.
- [108] Guzik, U., Hupert-kocurek, K., Krysiak, M., N, D. W., Degradation potential of protocatechuate 3, 4-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels and on glyoxyl agarose, *Biomed Researche International*, 138768, **2014**.
- [109] Erdoğan, A. O., Zengin, G. E., Orhon, D., Türkiye'de evsel atıksu oluşum miktarları ve karakterizasyonu, *İTÜ dergisi*, 216, 57-69, **2007**.
- [110] Sun, Q., Jiang, Y., Jiang, Z., Zhang, L., Sun, X., Li, J., Green and efficient conversion of CO₂ to methanol by biomimetic coimmobilization of three dehydrogenases in protamine-templated titania, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48, 4210-4215, **2009**.

- [111] Kahraman, M. V., α -amylase immobilization on functionalized nano CaCO₃ by covalent attachment, *Starch*, 64, 3-9, **2012**.
- [112] Toscano, L., Montero, G., Stoytcheva, M., Cervantes, L., Gochev, V., Comparison of the performances of four hydrophilic polymers as supports for lipase immobilisation, *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 28, 52-60, **2014**.
- [113] Vaillant, F., Millan, A., Millan, P., Dornier, M., Decloux, M., Reynes, M., Co-immobilized pectinlyase and endocellulase on chitin and nylon supports, *Process Biochemistry*, 35, 989-996, **2000**.
- [114] Manrich, A., Komesu, A., Adriano, W. S., Tardioli, P. W., Immobilization and stabilization of xylanase by multipoint covalent attachment on agarose and on chitosan supports, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161, 455-467, **2010**.
- [115] Kotsira, V. P., Clonis, Y. D., Colorimetric assay for lecithin using two co-immobilized enzymes and an indicator dye conjugate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3389-3394, **1998**.
- [116] Damasio, A. R. L., Pessela, B. C., Silva, T. M., Guimaraes, L. H. S., Jorge, J. A., Guisan, J. M., Polizeli, M. L. T. M., Co-immobilization of fungal endo-xylanase and a -L-arabinofuranosidase in glyoxyl agarose for improved hydrolysis of arabinoxylan, *The Journal of Biochemistry*, 1-6, **2013**.
- [117] Liu, K., Zhao, G., He, B., Chen, L., Huang, L., Bioresource Technology Immobilization of pectinase and lipase on macroporous resin coated with chitosan for treatment of whitewater from papermaking, *Bioresource Technology*, 123, 616-619, **2012**.
- [118] Odaci, D., Telefoncu, A., Timur, S., Maltose biosensing based on co-immobilization of α -glucosidase and pyranose oxidase," *Bioelectrochemistry*, 79, 108-113, **2010**.
- [119] Kim, Y., Bae, J., Oh, B., Lee, W. H., Choi, J., Enhancement of proteolytic enzyme activity excreted from *Bacillus stearothermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process, *Bioresource Technology*, 82, 157-164, **2002**.
- [120] Ghorbel, B., Sellami-kamoun, A., Nasri, M., Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 513-518, **2003**.
- [121] Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N., Soccol, C. R., Characterization and

- stability of proteases from *Penicillium sp* . produced by solid-state fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 246-251, **2003**.
- [122] composition-seawater @ www.lenntech.com.(Kasım, 2016).
- [123] Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., Osman, G., Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6, *Process Biochemistry*, 38, 1397-1403, **2003**.
- [124] Klee, C. B., Vanaman, T. C., Calmodulin, *Advances in Protein Chemistry*, 35, 213-321, **1982**.
- [125] Moyo, S., Gashe, B. A., Collison, E. K., Mpuchane, S., Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology, *International Journal of Food Microbiology*, 85, 87-100, **2003**.
- [126] Nicell, J. A., Environmental applications of enzymes, *Interdisciplinary Environmental Review*, 3, 1, **2001**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Sinem DİKEN GÜR

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Evli

E-posta : sinemdkn@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı Beytepe/Çankaya ANKARA

Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- YDS 73.75

İş Deneyimi

2008 - ... : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara.

Deneyim Alanları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından bütçesi 20698,26 TL olan FHD-2015-6396 no' lu proje ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

DİKEN GÜR S., İdil N., Aksöz N., “Ko-immobilize Enzim İmmobilizasyonu için Kalsiyum Aljinatlı Matrikslerin Hazırlanması”, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya, 18-19 Aralık 2015.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 06/12/2016

Tez Başlığı / Konusu: ATIKSU ÖN ARITIMI İÇİN KO-İMMOBİLİZE ENZİM TASARIMI

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç ve e) Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 87 sayfalık kısmına ilişkin, 06/12/2016 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Sinem DİKEN GÜR

Öğrenci No: N10144609

Anabilim Dalı: BİYOLOJİ

Programı: BİYOTEKNOLOJİ

Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

06.12.2016

S. Diken

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

(Unvan, Ad Soyad, İmza)