

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
2013-YL-012**

**YÜKSEK FRUKTOZLU ŞURUP ÜRETİMİ İÇİN
CONCANAVALİN A BAĞLI SÜPER MAKRO
GÖZENEKLİ KRİYOJELLERE İNULİNAZ
İMMOBİLİZASYONU**

Canan ALTUNBAŞ

**Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE
AYDIN

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Canan ALTUNBAŞ tarafından hazırlanan “Yüksek Fruktozlu Şurup Üretimi İçin Concanavalin A Bağlı Süper Makro Gözenekli Kriyojellere İnulinaz İmmobilizasyonu” başlıklı tez 22.01.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	ADÜ
Üye : Doç. Dr. Sinan AKGÖL	EGE ÜNİV
Üye : Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kurallarının gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

.../.../2013

Canan ALTUNBAŞ

ÖZET

YÜKSEK FRUKTOZLU ŞURUP ÜRETİMİ İÇİN CONCAVALİN A BAĞLI SÜPER MAKRO GÖZENEKLİ KRİYOJELLERE İNULİNAZ İMMOBİLİZASYONU

Canan ALTUNBAŞ

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN

2013, 83 sayfa

Bu çalışmada *Aspergillus niger* inulinaz enziminin immobilizasyonu için Concanavalin A (Con A) bağlı poli(etilen glikol dimetakrilat) [poli(EGDMA)] kriyojelleri kullanılmıştır. Bu amaçla, monolitik kriyojel kolon, monomer olarak EGDMA ve çapraz bağlayıcı olarak N-N'-metilen bisakrilamidin radikalik kriyokopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Daha sonra Con A, glutaraldehit aktivasyonu ile poli(EGDMA) kriyojeline kovalent olarak bağlanmıştır. Kriyojellerin karakterizasyonu FTIR, SEM, EDX ve şişme çalışmalarıyla gerçekleştirilmiştir. Kriyojeller, opak, süngerimsi ve elastiktir. Poli(EGDMA) kriyojelleri oldukça yoğun gözenekli ve gözenek boyutları yaklaşık olarak 50 µm dir. Con A bağlı poli(EGDMA) kriyojelleri, sulu çözeltiden inulinaz enziminin adsorpsiyonu için kullanılmıştır. Con A bağlı poli(EGDMA) kriyojeline inulinaz adsorpsiyonu sürekli sistemde gerçekleştirilmiş ve adsorpsiyona pH, inulinaz derişimi, sıcaklık, iyonik şiddet ve akış hızının etkisi araştırılmıştır. Maksimum inulinaz adsorpsiyonu, 1.0 mg/mL inulinaz derişiminde ve pH 4.0 asetat tamponunda 27.85 mg/g kriyojel olarak hesaplanmıştır. İmmobilize inulinaz sürekli sistemde yüksek fruktozlu şurup hazırlanmasında etkili bir şekilde kullanılmıştır. İnulin, sürekli sistemde fruktoza dönüştürülmüş ve 5 dakikalık hidroliz sonunda fruktoz derişimi 0,23 mg/mL olarak bulunmuştur. Şurubun yüksek fruktoz içeriği ince tabaka kromatografisi ile gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: İnulinaz, kriyojel, Concanavalin A, fruktoz, lektin afinite kromatografisi.

ABSTRACT**IMMOBILIZATION OF INULINASE ON CONCAVALIN A ATTACHED SUPER MACROPOROUS CRYOGELS FOR PRODUCTION OF HIGH FRUCTOSE SYRUP**

Canan ALTUNBAŞ

M. Sc. Thesis, Department of Chemistr

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN

2013, 83 pages

In this study, Concanavalin A (Con A) attached poly(ethylene glycol dimethacrylate) [poly(EGDMA)] cryogels were used for immobilization of *Aspergillus niger* inulinase. For this purposes, the monolithic cryogel column was prepared by radical cryocopolymerization of EGDMA as a monomer and N,N'-methylene-bisacrylamide as a crosslinker. Then Con A was attached by covalent binding onto poly(EGDMA) cryogel via gluteraldehyde activation. Characterization of cryogels was performed by FTIR, SEM, EDX and swelling studies. Cryogels were opaque, sponge like and elastic. Poly (EGDMA) cryogels were highly porous and pore size is approximately 50 μm . Con A attached poly(EGDMA) cryogels was used in the adsorption of inulinase from aqueous solutions. Adsorption of inulinase on the Con A attached poly (EGDMA) cryogel was performed in continuous system and the effects of pH, inulinase concentration, temperature, ionic strength and flow rate on adsorption were investigated. The maximum amount of inulinase adsorption was calculated to be 27.85 mg/g cryogel at 1.0 mg/mL inulinase concentration and acetate buffer at pH 4.0. Immobilized inulinase was effectively used in continuous preparation of high fructose syrup. Inulin was converted to fructose at continuous system and the fructose concentration was found to be 0,23 mg/mL at the end of 5 minute of hydrolysis. High fructose content of the syrup was demonstrated by thin layer chromatography.

Key words: Inulinase, cryogel, Concanavalin A, fructose, lectin affinity chromatography.

ÖNSÖZ

“Yüksek fruktozlu şurup üretimi için concanavalin A bağlı süper makrogözenekli kriyojellere inulinaz immobilizasyonu” konulu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Başta çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Deniz Aktaş UYGUN’a teşekkürü borç bilirim.

Araştırmalarım süresince gerek manevi gerekse bilimsel katkılarından dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER’e, laboratuvar çalışmalarında benden yardımlarını esirgemeyen Koçarlı Meslek Yüksek Okulu Öğretim Görevlisi Doktor Murat Uygun’a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda bana her türlü koşullarda yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Rukiye YAVAŞER ve yüksek lisans öğrencisi Yusuf GÖKÇEN’e teşekkür ederim.

Son olarak her zaman karşılıksız sevgi ve desteklerini hiç eksik etmeyen aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Canan ALTUNBAŞ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. İnulinaz.....	1
1.1.2. Saflaştırılmış İnulinazların Karakterizasyonu	6
1.1.2.1. İnulinazların Molekül Kütleleri.....	6
1.1.2.2. İnulinazların Optimum pH ve Sıcaklıkları	6
1.2. <i>Aspergillus Niger</i>	7
1.2.1. <i>Aspergillus Niger</i> İnulinaz Enzimi	8
1.3. İnulinazların Uygulamaları	8
1.3.1. Fruktoz Üretimi	8
1.3.2. İnulinden Etanol Üretimi.....	9
1.3.3. İnulinden Oligofruktan Üretimi	9
1.4. Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu Üretimi	9
1.4.1. Fruktoz Metabolizması.....	10
1.5. Lektin Afinite Kromatografisi.....	11
1.5.1.Lektin Afinite Kromatografisi ile Glikoproteinlerin Ayrılmasında İzlenmesi Gereken Basamaklar	13
1.6. Seri Lektin Afinite Kromatografisi	19
1.7. Kriyojel	19
1.7.1. Kriyojellerin Hazırlanması	21
1.7.2. Kriyojellerin Genel Özellikleri.....	23
1.7.3.Kriyojellerin Kullanım Alanları	24
1.8. Enzim İmmobilizasyonu	24
1.8.1. Desteklerin Seçimi	25

1.8.2. Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri.....	27
1.8.3. Geri Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri.....	27
1.8.4. Geri Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri.....	28
1.8.4.1. Adsorpsiyon (Nonkovalent Etkileşimler).....	29
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	41
3.1. Materyal.....	41
3.2. Yöntem.....	42
3.2.1. Poli (EGDMA) Kriyojelinin Hazırlanması.....	42
3.2.2. Poli (EGDMA) Kriyojeline Con A'nın Kovalent İmmobilizasyonu.....	43
3.3. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin Karakterizasyonu.....	43
3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri.....	43
3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri.....	44
3.3.3. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi.....	44
3.3.4. Poli (EGDMA) Kriyojellerinin Şişme Analiz Ölçümleri.....	44
3.4. Con A Bağlı Kriyojellere İnulinaz Enziminin Adsorpsiyonu ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi.....	44
3.4.1. İnulinaz Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi.....	44
3.4.2. İnulinaz Adsorpsiyonuna İnulinaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi.....	45
3.4.3. İnulinaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi.....	45
3.4.4. İnulinaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi.....	45
3.4.5. İnulinaz Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisinin İncelenmesi.....	46
3.4.6. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinden İnulinazın Desorpsiyonu ve Kriyojelin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	46
3.5. İnulinaz Aktivitesi Tayini.....	46
3.5.1. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi.....	48
3.5.2. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	48
3.5.3. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi.....	48
3.5.4. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	49

3.5.5. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enzimlerinin Depo Kararlılıklarının İncelenmesi	49
3.5.6. İmmobilize İnulinaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi	49
3.6. İnulinden Yüksek Fruktozlu Şurubun Sürekli Sistemde Üretimi ve Bu Şurubun Bileşiminin İnce Tabaka Kromatografisi İle Belirlenmesi	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	51
4.1. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin Karakterizasyonu	51
4.1.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri	51
4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri	52
4.1.3. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi	53
4.1.4. Poli (EGDMA) Kriyojellerinin Şişme Analiz Ölçümleri	54
4.2. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojeline İnulinaz Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi	54
4.2.1. İnulinaz Enzimi Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi	54
4.2.2. İnulinaz Enzimi Adsorpsiyonuna Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	56
4.2.3. İnulinaz Enzimi Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	57
4.2.4. İnulinaz Enzimi Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi.....	57
4.2.5. İnulinaz Enzimi Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisinin İncelenmesi	58
4.2.6. Adsorpsiyon İzotermleri.....	59
4.2.7. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinden İnulinaz Enziminin Desorpsiyonu ve Kriyojelin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	61
4.3. İnulinaz Aktivitesi Tayini.....	62
4.3.1. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enziminin Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi	62
4.3.2. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enziminin Aktivitesine Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi	63
4.3.3. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enziminin Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	64
4.3.4. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enzimlerinin Isıl Kararlılıklarının İncelenmesi	66
4.3.5. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enzimlerinin Depo Kararlılıklarının İncelenmesi	67
4.3.6. İmmobilize İnulinaz Enziminin İşlemsel Kararlılıklarının İncelenmesi	67

4.4. İnulinden Yüksek Fruktozlu Şurubun Sürekli Sistemde Üretimi Ve Bu Şurubun Bileşiminin İnce Tabaka Kromatografisi İle Belirlenmesi	68
5. SONUÇ	70
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	83

SİMGELER DİZİNİ

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Ags-MG	Agaroz
APS	Amonyum persülfat
Con A	Concanavalin A
DNS	Dinitrosalisik asit
Dex-MA	Dekstran metakrilat
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını analizi
EGDMA	Etilenglikolidimetilakrilat
FTIR	Fourier transform infrared spektrometresi
GLUT2	Glikoz taşıyıcı 2
GLUT5	Glikoz taşıyıcı 5
HEMA-LLA-D	Hidroksi etil metakrilat- L-laktat dekstran
NIPAAM	N-izopropil akrilamid
pAAm	poli (dimetil akrilamid)
PHEMA	poli (hidroksietil metakrilat)
PEG	poli(etilen) glikol
PVA	poli(vinil) alkol
MBAAm	N-N'-tetrametilenbisakrilamid
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
YFMS	Yüksek fruktozlu mısır şurubu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İnulinin Yapısı	1
Şekil 1.2. Mikrobiyal Ekzo ve Endo İnulinaz Enzimleriyle İnulooligosakkarit ve Yüksek Fruktozlu Şurup oluşumu	3
Şekil 1.3. Concanavalin A Tetramerik Yapısı Şematik Gösterimi.....	14
Şekil 1.4. O-glikozilasyon Bağlanması	15
Şekil 1.5. Musin Tipi Lektinlerin Yapısı.....	15
Şekil 1.6. N-asetilgalaktozamin Bağlanması.....	16
Şekil 1.7. Yüksek Mannoz Tip, Üç Antenli Kompleks Tip, İki Antenli Kompleks Tip ve Hibrid Tip Lektinlerin Yapısı	17
Şekil 1.8. Makrogözenekli Kriyojellerin Oluşumunun Şematik Gösterimi	22
Şekil 1.9. Geri Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	27
Şekil 1.10. Geri Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	28
Şekil 3.1. Poli (EGDMA) kriyojelinin hazırlanması	42
Şekil 3.2. Poli (EGDMA) kriyojeline Con A'nın bağlanma adımları.....	43
Şekil 3.3. DNS metodu mekanizması.....	47
Şekil 4.1. Poli (EGDMA) Ve Poli (EGDMA) Bağlı Con A Kriyojellerinin FTIR Spektrumu	51
Şekil 4.2. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojellerinin SEM Fotoğrafları.....	53
Şekil 4.3. Con A bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin EDX Spektrumu	53
Şekil 4.4. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin Şişme Oranı	54
Şekil 4.5. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin İnulinaz Adsorpsiyonuna pH'nın Etkisi.....	55
Şekil 4.6. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin İnulinaz Adsorpsiyonuna İnulinaz Derişiminin Etkisi	56
Şekil 4.7. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin İnulinaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi.....	57
Şekil 4.8. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin İnulinaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisi	58
Şekil 4.9. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin İnulinaz Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisi	59
Şekil 4.10. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin İnulinaz Adsorpsiyonunun Langmuir Adsorpsiyon İzotermi.....	60
Şekil 4.11. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin İnulinaz Adsorpsiyonunun Freundlich İzotermi	61

Şekil 4.12. Serbest ve Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojeline İmmobilize Edilmiş İnulinaz Aktivitesine pH'ın Etkisi	63
Şekil 4.13. Serbest ve Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojeline İmmobilize Edilmiş İnulinaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	64
Şekil 4.14. Serbest İnulinaz Enzimi İçin Linewear-Burk Grafiği	65
Şekil 4.15. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojeline İmmobilize Edilmiş Enzimi İçin Linewear-Burk Grafiği	65
Şekil 4.16. Serbest Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojeline İmmobilize Edilmiş İnulinaz Aktivitesinin 65°C'de Zamana Bağlı Olarak Değişimi	66
Şekil 4.17. Serbest ve Con A Bağlı poli (EGDMA) Kriyojeline İmmobilize Edilmiş İnulinaz Enzimlerinin Depo Kararlılığı	67
Şekil 4.18. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojeline İmmobilize Edilmiş İnulinaz Enziminin İşlemsel Kararlılığı.....	68
Şekil 4.19. İmmobilize İnulinaz ile İnulinin Hidrolizinden Elde Edilen Ürünlerin İnce Tabaka Kromatografisi Analizi.....	69

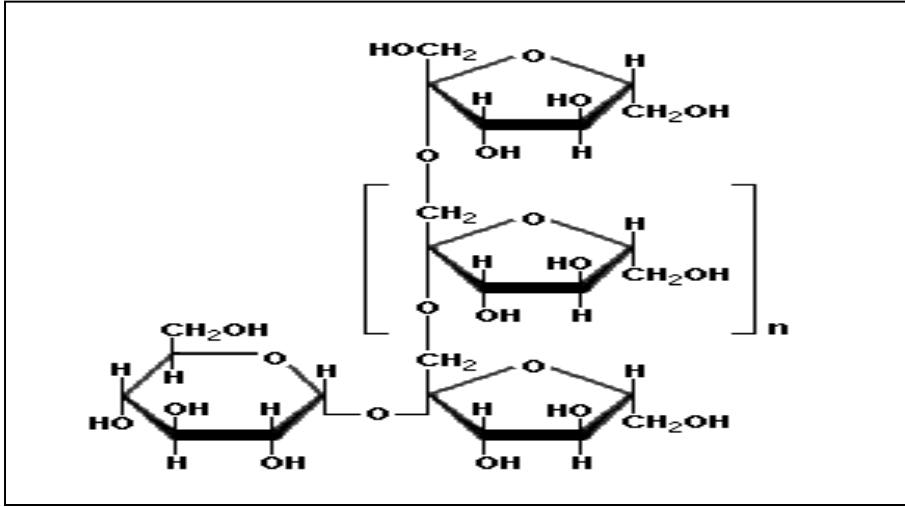
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İnulin İçeren Bazı Bitkiler.....	2
Çizelge 1.2. Mikrobiyal Kaynaklı Mikroorganizmalar ve İnulinaz Aktiviteleri.....	5
Çizelge 1.3. Sentezlenen Kriyojellere ve Uygulamalarına Genel Bir Bakış.....	20
Çizelge 1.4. Organik ve İnorganik Destekler.....	26
Çizelge 4.1. Proteinlerin ve Peptidlerin Karakteristik IR Bantlarının Şematik Gösterimi.....	52
Çizelge 4.2. Serbest ve Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojeline İmmobilize Edilmiş İnulinaz Enzimi İçin Kinetik Sabitler.....	66

1.GİRİŞ

1.1. İnulinaz

Bitkilerde nişastadan sonra en yaygın olarak bulunan polisakkaritlerden biri fruktanlardır. İnulin bir sükroz birimiyle sonlanmış β -(2-1)- D- fruktozil- fruktoz yapısı içeren bir fruktandır.



Şekil 1.1. İnulinin yapısı (Özüsağlam, 2009)

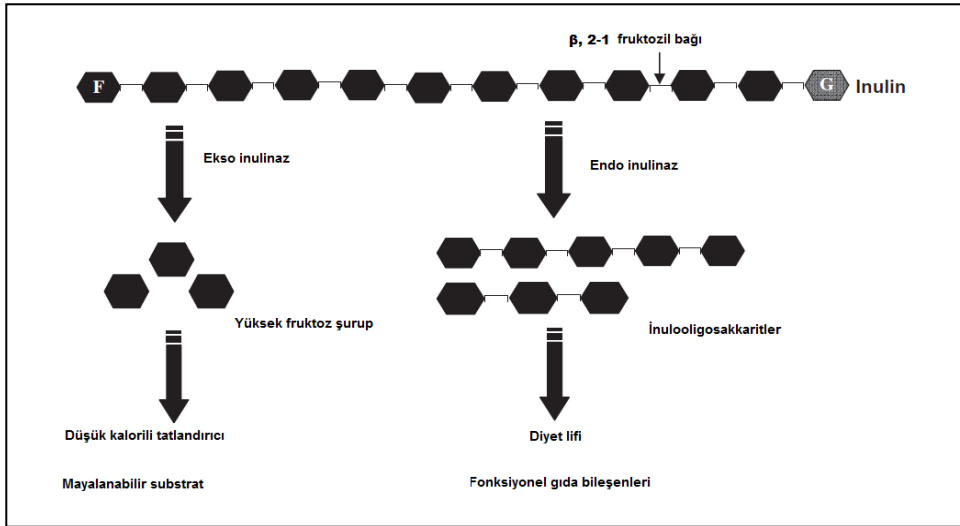
İnulin, papatyagiller ve buğdaygiller gibi birçok bitkide bulunan depo polisakkarittir. En fazla yer elması, hindiba ve yıldız çiçeğinin toprak altındaki köklerinde bulunur. Bitki orjini inulinin (MW 60000) polimerleşme derecesi 200 den küçüktür ve bitkinin türüne, hava durumuna ve yaşına göre değişiklik gösterir. İnulinin en iyi bilinen bitki kaynakları Çizelge 1.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. İnulin içeren bazı bitkiler (Van Loo vd., 1995)

Kaynak	Bitkisel kısım	İnulin içeren % taze ağırlıkları
Soğan	Balb	2-6
Yer elması	Yumru kök	14-19
Yıldız çiçeği	Yumru kök	9-12.5
Hindiba	Kök	15-20
Pırasa	Balb	3-10
Sarımsak	Balb	9-16
Enginar	Yaprakların ana kısmı	3-10
Muz	Meyve	0.3-0.7
Çavdar	Tahıl	0.5-1
Arpa	Tahıl	0.5-1.5
Karahindiba	Yapraklar	12-15
Dulavra otu	Kök	3.5-4.0
Kamas	Balb	12-22
Murneng	Kök	8-13
Yakon	Kök	3-19
Tekeşakalı çiçeği	Kök	4-11

İnulinazlar, bitkiler, bakteriler, küfler ve mayalar tarafından üretilen fruktofuranozil hidrolaz sınıfı enzimlerdendir. İnulinazlar endoinulinazlar ve

ekzoinulinazlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Ekzoinulinaz (E.C.3.8.1.80) inulinin terminal fruktoz birimlerini koparır. Endoinulinaz (E.C.3.2.1.7) inulinin inuloooligosakkaritlere parçalanmasını katalizler.



Şekil 1.2. Mikrobiyal ekzo ve endo inulinaz enzimleriyle inuloooligosakkarit ve yüksek fruktozlu şurup oluşumu (Kango vd., 2011).

Mikroorganizmalar, kolay kültüvasyonları ve yüksek verimde enzim sağlamaları nedeniyle inulinazların ticari üretimindeki en iyi kaynaktır. Yapılan çalışmalarda *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Bacillus spp*, *Clostridium spp*, *Pseudomonas spp*, *Arthrobacter spp*, *Staphylococcus spp*, *Xanthomonas spp*, *Kluyvercyces spp*, *Cryptococcus sp*, *Pichia spp*, *Sporotrichum spp* ve *Candida spp* mikroorganizmalarının yüksek düzeylerde inulinaz enzimi içerdikleri bulunmuştur. Ayrıca maya suşlarının, fungus ve bakteri suşlarından daha fazla inulinaz ürettiği rapor edilmiştir (Gong vd., 2007, Sheng vd., 2008).

İnulinaz üreten mikroorganizmalar:

Mayalar:

Deniz alglerinin yüzeyinden izole edilen *Pichia guilliermondii* suşunun, bulunduğu ortama yüksek oranda inulinaz enzimi saldığı görülmüştür (Gong vd., 2007). Güney Çin Denizinden izole edilen deniz maya suşu *C. aureus* G7a yüksek oranda inulinaz ürettiği bulunmuştur (Sheng vd., 2007).

Bir Meksika bitkisi olan agasin fermantasyonuyla oluşan ortamdan izole edilen *K.marxianus* iki suşunun ve *Kluyveromyces batis* var. *lactis*'in bir suşunun iyi birer inulinaz üreticisi olduğu rapor edilmiştir (Cruz- Guerrero vd., 2006).

Mantarlar:

İnulinotik mantar *Penicillium sp* TN-88, karbon kaynağı olarak inulin içeren ortama ekildiğinde kültür filtrasyonunda yüksek oranda endoinulinaz enzimi aktivitesi gözlenmiştir (Nakamura vd., 1997). *Aspergillus* NK-126 mantarının, hindiba kök ortamında iyi bir büyüme gösterdiği ve sıvı fermantasyon ortamında inulinaz aktivitesi görüldüğu rapor edilmiştir (Kango, 2008).

Bakteriler:

Mayaların, bakteriler ve mantarlardan daha fazla inulinaz enzimi üretebildiği rapor edilmesine rağmen *Streptomyces sp.* GNDU I bakterisi, yüksek düzeyde ekstraselüler inulinaz elde etmek amacıyla kullanılır. Ayrıca *Staphylococcus sp* bakterisinden inulinaz sentezi için katı faz fermentasyonu kullanılmıştır.

Çizelge 1.2 inulinaz üreten mikroorganizmalar ve onların inulinaz aktiviteleri hakkında bilgi vermektedir (Chi, 2009).

Çizelge 1.2. Mikrobiyal kaynaklı mikroorganizmalar ve inulinaz aktiviteleri (Chi vd., 2009)

İnulinaz	Üreticiler	Kültür çeşitleri	İnulinaz aktivitesi	Referanslar
Ekzo	<i>C. aureus</i> G7a	Sıvı kültürü	85.0 ± 1.1 U/mL	Sheng vd., 2007
Ekzo	<i>C. aureus</i> G7a	Katı-faz fermentasyonu	420.9 ± 1.3 U/g kuru substrat	Sheng vd., 2008b
Ekzo	<i>P. guilliermondii</i>	Sıvı kültürü	61.5 ± 0.4 U/mL	Gong vd., 2007
Ekzo	<i>P. guilliermondinin</i> M-30 mutanı	Sıvı kültürü	127.7 ± 0.6 U/mL	Yu vd., 2008
Ekzo	<i>P. guilliermondinin</i> M-30 mutanı	Katı-faz fermentasyonu	455.9 ± 1.2 U/g kuru substrat	Guo vd., 2008
Ekzo	<i>K. marxianus</i> (A1 ve A2)	Sıvı ortamı	32 U/mL daha az	Cruz-Guerrero vd., 2006
Ekzo	<i>K. marxianus</i> ATTC 16045	Sıvı ortamı	121 U/mL	Silva-Santisteban ve Filho, 2005
Ekzo	<i>Kluyveromyces sp.</i> Y-85	Sıvı ortamı	59.5 U/mL	Wei vd., 1998
Ekzo	<i>K. marxianus</i> YS-1	Sıvı ortamı	55.4 U/mL	Singh vd., 2007
Ekzo	<i>K. marxianus var. bulgaris</i>	Değişken kültür ortamı	107 U/mL	Kushi vd., 2007
Ekzo	<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Katı-faz fermentasyonu	391.9 U/g kuru fermantasyon posası	Bender vd., 2006
Ekzo	<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Sıvı ortamı	8.87 U/g kuru substrat	Mazuitti vd., 2006
Ekzo	<i>Kluyveromyces</i> S120	Katı-faz fermentasyonu	409.8 U/mL kuru substrat	Chen vd., 2007
Endo	<i>Penicillium sp.</i> TN-88	Sıvı ortamı	9.9 U/mL	Nakamura vd., 1997
Ekzo	<i>A. niger</i> NK-126	Sıvı ortamı	55 U/mL	Kango, 2008
Ekzo	<i>Streptomyces sp.</i> GNDU 1	Sıvı ortamı	0.552 U/mL	Gill vd., 2006
Ekzo	<i>Staphylococcus sp.</i>	Katı-faz fermentasyonu	107.6 U/g kuru fermante substrat	Selvakumar ve Pandey, 1999

1.1.2. Saflaştırılmış İnulinazların Karakterizasyonu

1.1.2.1. İnulinazların Molekül Kütleleri

Mantarlardan elde edilen inulinazların çoğunun molekül ağırlığının 50 kDa'dan fazla olduğu rapor edilmiştir (Pandey vd., 1999). Örneğin deniz mayası *C.aureus* G7a'nın hücre kültürünün süpernatantından izole edilen inulinazın molekül kütlesinin 60 kDa (Sheng vd., 2008b), *P. guilliermondii* suşundan saflaştırılan inulinazın molekül kütlesinin 50 kDa olduğu tahmin edilmektedir (Gang vd., 2008). Bununla birlikte karasal maya *K. fragilis*'den elde edilen ekstraselüler inulinazın molekül ağırlığının 250 kDa olduğu rapor edilmiştir. Bakterilerden saflaştırılan ekzoinulinazın molekül kütlesi yaklaşık olarak 54 kDa olarak tahmin edilmiştir (Tsujiimoto vd., 2003, Kwon vd., 2000). Bakterilerden elde edilen ekzoinulinazlar ile mayalardan elde edilen ekzoinulinazların neredeyse aynı molekül kütlelerine sahip olduğu görülmektedir. Mantar ve bakterilerden endoinulinazlar da saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Örneğin *Penicillium sp.* TN-88 tarafından üretilen endoinulinazın molekül kütlesi yaklaşık olarak 68 kDa (Nakamura vd., 1997) ve *Arthrobacter sp* S 37'den izole edilen endoinulinazın molekül kütlesi 75 kDa (Kang vd., 1998) olarak bulunmuştur.

1.1.2.2. İnulinazların Optimum pH ve Sıcaklıkları

Mantar ve mayalardan saflaştırılan inulinazların optimum pH'ları 4.5-6.0 arasındadır. Aksine olarak *Bacillus polymyxa* MGL 21'in ürettiği ekzoinulinazın optimum pH'ı 7.0 olarak bulunmuştur ve bu bakterilerden elde edilen ekzoinulinazların, maya ve mantarlardan elde edilen ekzoinulinazlara göre daha yüksek optimum pH değeri gösterdiği ifade edilmiştir (Tsujiimoto vd., 2003, Kwon vd., 2000). Deniz mayası *C. aureus* G7a'dan saflaştırılan inulinazın optimum sıcaklığı 50 °C'dir ve enzim 65 °C'de oldukça kararlıdır (Sheng vd., 2008). *P. guilliermondii* suşunun ürettiği inulinaz enziminin optimum sıcaklığı 60 °C'dir ve enzim 60 °C'ye kadar çok kararlıdır (Gong vd., 2008).

Bu sonuçlar inulinazların dikkate değer bir termostabiliteye sahip olduğunu göstermektedir.

1.2. *Aspergillus niger*

A.niger, organik maddeler üzerinde aerobik koşullar altında gelişen filamentli bir fungusdur. Doğada, toprak, çöl ve çürüyen bitki materyalleri üzerinde bulunur. *A. niger*, geniş bir sıcaklık aralığında büyüyebilir (6-47 °C) ve optimum sıcaklığı göreceli olarak 35-37 °C gibi yüksek bir değerdir. Büyümeyi sınırlayan su aktivitesi diğer *Aspergillus* türleri ile karşılaştırıldığında yüksek bir değer olan 0.88'dir. Ayrıca *A.niger* 1,4-9,8 gibi geniş bir pH aralığında gelişebilir. Bu özellikler ve hava ile dağılan konidiosporların verimli üretimi bu türün, sıcak ve nemli bölgelerde daha sık olmak üzere, geniş bir yayılım göstermesini sağlar.

A.niger, biyoteknolojide kullanılan en önemli mikroorganizmalardan biridir. Onlarca yıldır ekstraselüler enzimler ve sitrik asit üretiminde kullanılmıştır. Bunlara ek olarak, *A. niger* biyotransformasyon ve atık arıtımında kullanılmaktadır. Son yirmi yıl içinde *A. niger* gıda işletmelerinde kullanılan enzimlerin üretiminde önemli bir transformasyon aracı olmuştur. Pratikteki ilk önemi 1919 yılında, üretmiş olduğu yüksek orandaki sitrik asidin endüstriyel olarak kullanılması ile gerçekleşmiştir. Ekonomik önemi daha az olmasına rağmen glukonik ve fumarik asit de *A. niger* tarafından üretilmektedir. Bunun yanında, 1960'lardan beri *A. niger* meyve işleme, pişirme, nişasta ve gıda endüstrisinde kullanılan geniş çeşitlilikteki enzimlerin kaynağı olmuştur.

Gen teknolojisi *A. niger*'in yabancı proteinlerin üretimi için kullanılmasında ve üretim işlemlerinin geliştirilmesinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Günümüzde, rekombinat *A. niger* türlerinden elde edilen birçok enzim ürünü piyasalardadır. Enzim Teknik Kurumu tarafından son zamanlarda hazırlanan bir listeye göre; α -amilaz, arabinofuranozidaz, katalaz, kimozi, glukoamilaz, glukoz oksidaz, pektin esteraz, fosofolipaz A2, inulinaz ve ksilanaz enzimleri, rekombinat *A. niger* türleri tarafından üretilmektedir.

Aspergillus niger genellikle güvenilir organizma olarak kabul edilir. İnsanlar, *A.niger* sporlarına hiçbir hastalık ortaya çıkmadan gün boyunca maruz kalabilirler. Sadece birkaç durumda, *A. niger* insan vücudunda kolonize olur. Fakat bu hastaların tümü şiddetli hastalıklarla dolu bir geçmişe sahiptir veya immunobaskılayıcı bir tedavi görmektedirler. Nadir durumlarda, kişi yoğun spor dumanına maruz kaldığında, aşırı duyarlı reaksiyonlar oluşur (Uygun, 2006).

1.2.1. *Aspergillus niger* İnulinaz Enzimi

İnulinaz üretimi ve karakterizasyonu için en yaygın kullanılan *Aspergillus spp* suşlarından biri *Aspergillus niger* (*A.niger*) dir. Compositae rhizosphere toprağından izole edilen *A. niger* suşlarının hem intraselüler hem de ekstraselüler inulinaz ürettikleri ve bunların 4.3-4.4 pH aralığında ve 55-56°C sıcaklık aralığında en yüksek aktivite sergiledikleri görülmüştür. *A. niger*'den elde edilen ve I, II ve III olarak adlandırılan üç farklı inulinaz izoformunun sırasıyla 4.5, 4.9 ve 5.2 değerlerinde izoelektrik noktaya sahip olduğu bulunmuştur. Bu inulinazların ekzo-inulinaz aktivitelerini pH 5.0 ve 62.5-65°C aralığında gösterdiklerini rapor etmişlerdir (Singh, 2006). *A. niger* suşlarından elde edilen inulinazların molekül kütlelerinin birbirinden farklılık göstermektedir. Literatürde rapor edilen 5 farklı *A.niger* inulinaz izoformunun molekül kütleleri 102.6, 97.9, 62.5, 36.5 ve 28 kDa dur. Bu izoformların en yüksek inulinaz aktivitesi 55-60 °C arasında ve pH 4.0-5.0 aralığında bulunmuştur (Singh, 2006).

1.3. İnulinazların Uygulamaları

1.3.1. Fruktoz Üretimi:

Fruktoz şurubu şeker hastalarında yararlı etkilere sahiptir ve çocuklarda demir emilimini artırır. Yüksek orandaki tatlandırma kapasitesinden dolayı obez kişilerin diyetinde kullanılır. Fruktoz kalın ve ince bağırsaklardaki *Bifidobacteria*'nın büyümesini teşvik ettiği için kolon kanserini önler (Rocha vd., 2006). Ayrıca fruktoz yağ benzeri niteliği nedeniyle diyet lifi olarak da kullanılır. Fruktoz yaygın olarak birçok gıda, farmosötik ve içecekte sükröz yerine kullanılır. Bununla birlikte fruktoz üretimi için kimyasal yaklaşım hala bazı zorluklar içermektedir (Gill vd., 2006, Pandey vd., 1999). Fruktoz aynı zamanda α -amilaz, amiloglikozidaz ve glukoz izomerazı içeren enzimatik metodlarla nişastadan elde edilebilir. En iyi yöntem mikrobiyal inulinazların kullanımı ile inulinin tek adımlı enzimatik hidrolizi ile % 95 oranında fruktozun eldesidir. Bu sebeple farklı mikroorganizmalardan elde edilen ekzo-inulinazlar, inulin ve inulin içeren materyallerden yüksek fruktoz şurubu üretimi için kullanılmaktadır (Chi vd., 2009).

1.3.2. İnulinden etanol üretimi:

Etanol, gerek yakıt gerekse benzin katkısı olarak sıvı biofuel olarak sıkça kullanılmaktadır (Sanchez ve Cardona 2008). Ayrıca etanol sentetik kimyasal için mükemmel bir ham maddedir. İnulin hidrolizleme ve inulini fermente edebilme yetenekleri olan mayaları kullanarak pahalı olmayan tarımsal ürünlerden toplanan ham inulinden doğrudan etanol üretimi fikri oldukça ilgi çekicidir (Kango ve Jain, 2011). Yer elması kökleri, etanol yakıt üretimi için oldukça iyi bir kaynaktır. *Saccharomyces cerevisiae* suşu, glukoz/fruktoz karışımından veya hidrolizlenmiş yer elması ekstraktından etanol ve fruktozun eş zamanlı üretiminde kullanılmıştır (Chi vd., 2009).

1.3.3. İnulinden Oligofruktan (inülooligosakkarit) üretimi:

Fruktooligosakkaritler, bifidogenik ve sağlık arttırıcı özellikleri nedeniyle popüler fonksiyonel gıda bileşenlerinden birini oluşturmaktadır. İnulin, endoinulinazlar ile inülotrioz ve inulotetraoz gibi inülooligosakkaritlere seçimli olarak hidrolizlenebilir (Yun vd., 1997). İnülooligosakkaritler, fonksiyonel olarak diğer oligosakkaritlere benzerdirler ve çözünür bir diyet lifi, fonksiyonel bir tatlandırıcı veya bir prebiyotik olarak kullanılabilirler. Hindiba, yer elması ve yıldız çiçeği endüstriyel uygulamalarda inulinin zengin kaynağı olarak kullanılan ürünlerdir (Kango ve Jain, 2011).

1.4. Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu Üretimi

Yüksek fruktozlu mısır şurubu genelde mısır nişastasının, kimyasal ve enzimatik hidroliz teknikleri kullanılarak sıvılaştırma, parçalama ve izomerizasyon aşamaları ile üretilmektedir. Üretimde mısır nişastasını basit şekerler olan glukoz ve fruktoza dönüştürmek için üç farklı enzim kullanılmaktadır. İlk olarak alfa amilaz enzimi vasıtasıyla uygun ortamda nişasta granülleri hidrolize edilerek dekstrin zincirlerine parçalanır. Daha sonra glukoamilaz enzimi ile dekstrin zincirleri bireysel dekstrin moleküllerine ve en son glikoz izomeraz enzimi ile fruktoza dönüştürülmektedir. Hidroliz işleminde asit de kullanılabilir. Kompleks bir damıtma ve kombine prosten sonra farklı fruktoz içerikli şuruplar elde edilmektedir. İlk olarak dekstrozun enzimler ile izomerleştirilmesi sonucunda % 42'lik fruktoz şurubu üretilmektedir. Daha sonra bu şurup fruktozu tutan kolonlardan geçirilerek % 90'lık yüksek fruktozlu şurup ve tekrar % 42'lik

şurup ile karıştırılarak % 55 fruktozlu mısır şerbeti de elde edilmektedir. Ayrıca bu şurutpan kristalizasyon işleml ile kristalize fruktoz da üretilebilmektedir. Genellikle, doğal tadın korunmasının ve orta seviyede bir tatlılığın arzu edildiği gıdalar ile konservelerde % 42'lik; alkolsüz içecekler, dondurma ve tatlılarda % 55'lik ve çok az bir tatlandırıcı ile yüksek şeker tadının istendiği gıdalarda % 90'lık fruktoz şurubu kullanılmaktadır (Karaoğlu, 2007).

1.4.1. Fruktoz Metabolizması

Fruktozun sindirimi, absorpsiyonu ve metabolizması glikozdan farklıdır. Fruktoz, glikoz taşıyıcılar (GLUT 5) ile bağırsaklardan absorbe edilmekte ve daha sonra GLUT 2 aracılığıyla kan damarlarına difüze olmaktadır. Glikozun aksine, bağırsaklardan fruktozun absorpsiyonu ATP hidrolizini gerektirmez ve sodyum absorpsiyonundan bağımsızdır. Bu da karaciğer tarafından aşırı fruktoz alımı ile sonuçlanmaktadır. Fruktoz metabolizması karaciğerde gerçekleşmektedir. İnce bağırsakta absorbe edildikten sonra karaciğere taşınan fruktoz burada fruktokinaz enzimi tarafından fosforilasyona uğratarak fruktoz-1-fosfata dönüşmektedir. Daha sonra, fruktoz-1-fosfat aldolaz B enzimi tarafından gliseraldehit ve dihidroksiasetonfosfata ayrılmakta ve bu iki molekül de gliseraldehit-3-fosfata dönüşebilmektedir. Glukokinaz tarafından glikozun fosforilasyonu karaciğerdeki glikoz metabolizmasında oran belirleyici birinci adım, fosfofruktokinaz ikinci adımdır. Fruktozdan fruktoz-1-fosfatın oluşum basamağı, hız kısıtlayıcı fosfofruktokinaz enziminden bağımsızdır. Böylece fruktoz fosfofruktokinaz üretimini inhibe etmek için sitrat ve ATP den gelen engelleyici sinyallerin olduğu kontrol noktasını pas geçmektedir. Bu farklı metabolizma, glikoza göre daha hızlı bir şekilde, fruktozu karaciğerde lipogenezis için gliserol-3-fosfat ve asetil-CoA kaynağı haline getirmektedir (Karaoğlu, 2007).

Fruktoz karaciğerde karbonhidrat metabolizmasını önemli derecede etkilemektedir. Vücuda alınan glikoza az miktarlarda fruktoz eklenmesi insanlarda karaciğerde glikojen sentezini arttırmakta ve Tip 2 diyabetli kişilerde glisemik yanıtı azaltmaktadır. Fakat yüksek fruktozlu mısır şurubu (YFMS) gibi kaynaklardan aşırı miktarda fruktoz alındığı zaman problemler çıkmaktadır. Böylece aşırı fruktoz, olumsuz sağlık etkileri olan, karaciğerde lipogenezis için hazır bir karbon kaynağı oluşturmaktadır. Hücre için glikoz girişi insülin bağımlı Glut-4 transport sistemi ileler. Oysa fruktozun hücreye girişi bağımsız bir Glut-5 insülin metabolik yolu ileler (Karaoğlu, 2007).

Glikoz alımı, leptin salınımını arttıran insülin salınımını etkilememektedir. Böylece aşırı fruktoz alımı düşük bir insülin konsantrasyonuna sebep olmakta bu da leptin seviyesinin düşük olmasına yol açmaktadır. Leptin bir anlamda iştahı kontrol eden bir doyumluk hormonudur. İnsanlarda leptin seviyesinin düşük olması kilo alma ve şişmanlık ile ilgilidir. Fruktoz bakımından durum böyleyken, kan glikoz, insülin ve leptin seviyeleri bakımından YFMŞ ve sakkaroz arasında önemli farklılıkların bulunmadığı bildirilmektedir. Çünkü % 42 ve 55'lik YFMŞ bileşim olarak sakarozla çok benzemektedir. Bu nedenle, % 100 fruktozun metabolik etkileri ile YFMŞ'un metabolik etkilerini her zaman aynı varsaymak doğru değildir (Karaoğlu,2007).

Fruktoz metabolizmasının bir diğer önemli özelliği ürik asit seviyesini yükseltme yeteneğidir. Pek çok araştırmada, özellikle yüksek kan basıncına sahip hastalarda, fruktoz tüketiminden sonra plazma ürik asit seviyesinde artış olduğu bildirilmektedir. Artan ürik asit seviyesi koroner hastalıklarda bir risk faktörün olabilmektedir. Ürik asit, fruktoz tarafından etkilenen, nükleotid metabolizmasının bir ürünüdür. Ayrıca, karbonlanmış içeceklerdeki YFMŞ, hiperürisemiya sebep olan reaktif dikarbonillerin önemli bir kaynağıdır. Dolayısıyla, son yıllarda gut hastalığındaki artışa YFMŞ içeren ürünlerin aşırı tüketilmesinin de payı olduğu söylenmektedir (Karaoğlu, 2007).

1.5. Lektin Afinite Kromatografisi

Lektin kelimesi, latince diğerleri arasından bir şeyi seçmek anlamına gelen "legere" kelimesinden türemiştir. Lektinler, karbohidrat yapılarına oldukça spesifik olarak bağlanabilen, hücreleri yapıştırma (agglütine) yeteneğine sahip karbohidrat bağlayıcı protein ailesidir.

Lektinler, farklı insan eritrosit türlerinin (A, B, 0) yüzeylerindeki spesifik reseptörlere bağlanabilme ve onları yapıştırma özelliğinden dolayı agglutininer olarak da adlandırılmaktadır.

Lektinler ilk kez 1888 yılında Peter Herman Stillmark'ın doktora tezinde tanımlanmıştır. Stillmark, Castor (keneotu) bitkisinin tohumlarından, bir lektin olan *risini* izole etmiştir. Ticari olarak en çok kullanım alanı olan Concanavalin A ise 1936 yılında Summer ve Howell adlı araştırmacılar tarafından bir fasulye türü olan *Concanavalia ensiformis*'ten saflaştırılmıştır (Yavuz, 2010).

Lektinler:

- Saldırğan organizmalara karşı savunmada,
- Azot tutucu bakteri ve bitki kökleri arasında simbiyotik ilişkide,
- Virüslerin konakçı hücreyi tanımalarında,
- Hücresel yapışmada,
- Hücresel tanımda,
- Hücre yüzeyi ve farklılaşmasında,
- Hücre yüzeyindeki şeker gruplarının analizinde,
- Membran glikokonjugatların kenetlenmesi ve yapılarının belirlenmesinde önemli roller oynarlar.

Biyolojik tanımda önemli roller oynayan hücre yüzey karbohidratlarına spesifik olarak bağlanabilme yetenekleri nedeniyle, lektinler son yıllarda:

- Kan gruplarının belirlenmesi,
- Kanser teşhisinin gelişiminin izlenmesi,
- Hücre yüzey karbohidratlarının yapısının ve dinamiğinin açıklanması,
- Glikokonjugatların saflaştırılması ve yapısal karakterizasyonu gibi birçok alanda geniş uygulama alanı bulmuştur.

Ligand olarak lektinlerin kullanıldığı afinite kromatografisi türüne lektin afinite kromatografisi denir. Prensip olarak lektin afinite kromatografisi diğer afinite kromatografisi türlerine benzemektedir (Yavuz, 2010).

Lektin afinite kromatografisi özellikle glikoproteinlerin ayrılmasında oldukça fazla kullanım alanı bulmuştur. Lektin afinite kromatografisinde öncelikle ayrılmak istenen glikoproteinin ilgi duyduğu bir ligand yani bir lektin seçilerek katı bir desteğe bağlanır (immobilize edilir). Glikoprotein karışımı lektinin immobilize olduğu destek üzerinden geçirilir. İmmobilize lektinin ilgi duyduğu spesifik şeker dizisine sahip glikoprotein, desteğe adsorplanır. Diğer glikoproteinler desteği terk ederek, kolondan uzaklaşırlar. Adsorbe edilen glikoprotein komplementer (benzer) yapıda bir şeker kullanılarak kolondan elüe edilir.

1.5.1. Lektin Afinite Kromatografisi İle Glikoproteinlerin Ayrılmasında İzlenmesi Gereken Basamaklar

- 1) Lektinin Seçimi
 - a) Lektinin bulunabilirliği
 - b) Ayrılmak istenen glikoproteindeki oligosakkarit yapısı
- 2) Lektinin Matrikse Bağlanması
- 3) Örneğin Hazırlanması ve Kolona Uygulanması
- 4) Bağlanan Glikoproteinlerin Elüsyonu olarak sıralanabilir.

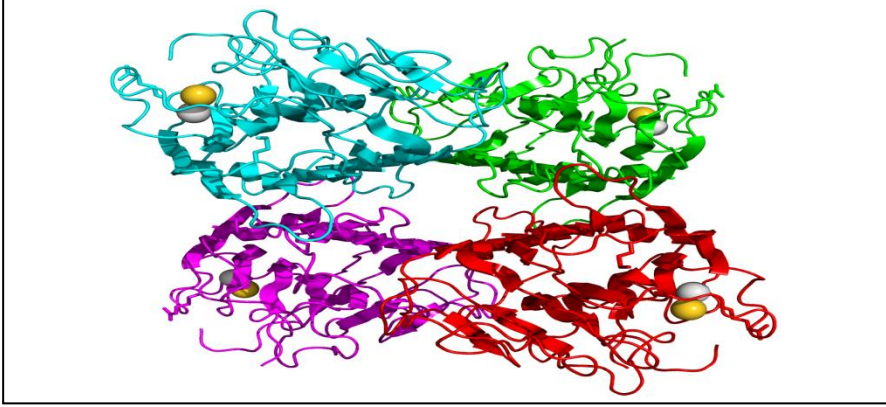
1) Lektinin Seçimi

Ligand olarak kullanılacak lektinin seçiminde iki faktör gözönünde bulundurulmalıdır:

- a) Lektinin bulunabilirliği: Kullanılacak lektinin doğal kaynaklardan hazırlanabilmesi veya ticari olarak elde edilebilmesi gerekir. Ayrıca elde edilen lektinlerin katı desteğe uygun bir şekilde immobilize edilmeleri de oldukça önemlidir. Lektin afinite kromatografisinde en çok kullanılan lektin, ticari olarak da elde edilebilen Concanavalin A'dır (Yavuz,2010).

Concanavalin A

Concanavalin A (Con A), bir fasülye türü olan *Concanavalia ensiformis*'den ekstrakte edilen bir proteindir. Con A, nötral ve alkali pH'larda 4 benzer alt birimden oluşmuş toplam molekül ağırlığı, yaklaşık 104 kDa olan bir proteindir.



Şekil 1.3. Concanavalin A'nın tetramerik yapısı (<http://www.answer.com>)

Con A'nın her alt biriminde bir Mn^{2+} ve Ca^{2+} iyonları ile karbohidrat bağlama bölgesi bulunur. Bu metal iyonları, Con A'nın uygun üç boyutlu yapıyı kazanarak karbohidratların bağlamasında görev alır. Yapılan deneysel çalışmalar Con A'nın D-mannoz ve D-glukoza spesifik olarak bağlandığını göstermiştir. Bu şekerlerin Con A ile birlikte kristalizasyonu gerçekleştirilmiş ve karbohidrat tanıma bölgeleri aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada Con A'nın bağlanma bölgesinde Asp 81, Gly 99, Asn 125, Ala 30, Phe 123 ve Glu 31 aminoasitlerinin görev aldığı ve bu amino asitlerin, mannoz ve glukoz şekerlerinin 3., 4., 5., ve 6., karbon gruplarına bağlı hidroksil gruplarındaki oksijen atomları ile hidrojen bağından oluşan bir ağ oluşturduğu görülmüştür.

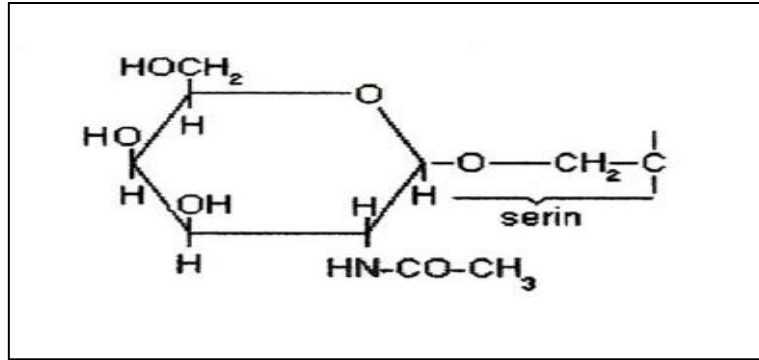
b) Ayrılmak istenen glikoproteindeki oligosakkarit yapısı:

Ayrılmak istenen glikoproteinlerdeki oligosakkarit yapıları, proteinlere iki temel bağlanma tipinden birisi ile bağlanır.

- 1-) O-glikozilasyon bağlanması
- 2-) N-glikozilasyon bağlanması

1-) O-glikozilasyon bağlanması:

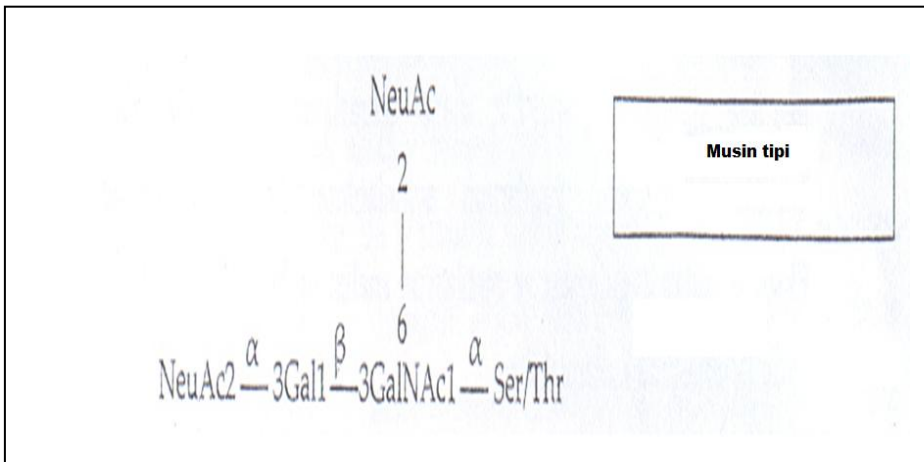
Bazı glikoproteinlerde karbohidrat grupları, N-asetil galaktozamin birimleri yardımıyla serin veya threonin aminoasitlerinin -OH gruplarının oksijeni ile proteine bağlanmıştır. Bu bağlanmaya O-glikozilasyon bağlanması denir.



Şekil 1.4. O-glikozilasyon bağlanması (<http://veteriner.fusabil.org>)

Serin veya threonine bağlı şeker zincirleri tipik olarak musinlerde bulunur.

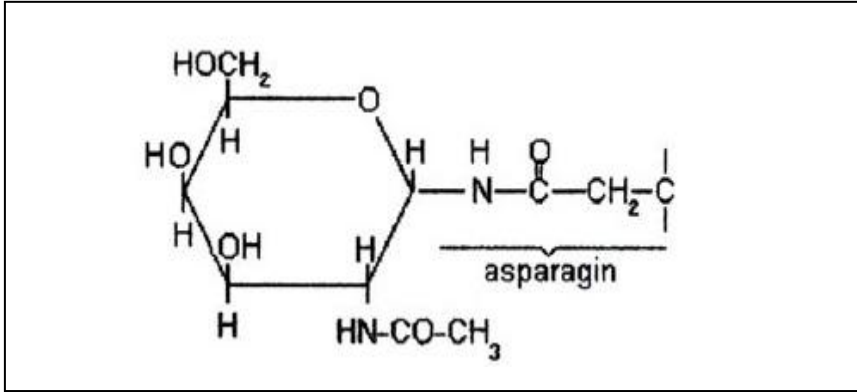
Lektinlerin galaktoz şeker özgülüğüne sahip olan tipleri, musin tipi zincirlere bağlanırlar.



Şekil 1.5. Musin tipi lektin yapısı (Yavuz, 2010)

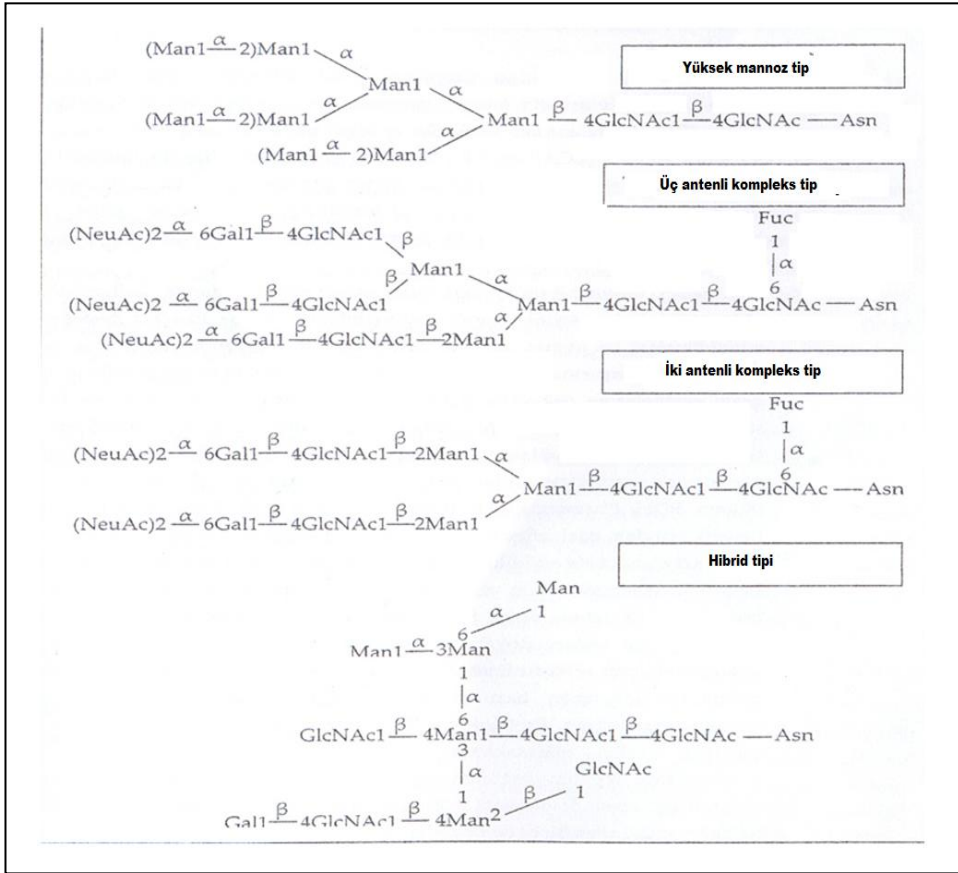
2-) N- glikozilasyon bağlanması:

Bazı glikoproteinlerde karbohidrat grupları, N-asetilgalaktozamin birimleri yardımıyla proteine asparajin aminoasidinin amid grubunun azotu ile bağlanmıştır. Bu bağlanmaya N-glikozilasyon bağlanması denir.



Şekil 1.6. N-glikolizasyon bağlanması (<http://veteriner.fusabil.org>)

N- glikolizasyon bağlanmasına katılan oligosakkarit yapıları, yapının bileşimine ve karmaşıklığına göre yüksek mannoz tipi, kompleks tip (iki antenli ve üç antenli tip) ve hibrid tip olmak üzere farklı isimlerle adlandırılabilir. Sıkça kullanılan lektinler azot' a bağlı şeker zincirlerine bağlanırlar.



Şekil 1.7. Yüksek mannoz tip, üç antenli kompleks tip, iki antenli kompleks tip ve hibrid tip lektinlerin yapısı (Yavuz, 2010)

Lektin seçiminde, ayrılmak istenen glikoprotein yapısı hakkında (taşıdığı oligosakkarit yapısı) herhangi bir bilgi bilinmiyorsa bir seri lektinin taranması gerekir. Bu amaçla farklı şeker özgüllüklerine sahip lektinler kullanılarak glikoproteindeki mevcut oligosakkarit tipi hakkında ipucu elde edilebilir.

2. Lektinin matrikse bağlanması:

Lektinlerin matrikse bağlanmasında oldukça farklı yöntemler kullanılır. En çok kullanılan yöntem -OH grubu taşıyan bir matrikse, lektinlerin CNBr aktivasyonu ile bağlanmasıdır. Bağlanma aktive edilmiş desteğin imidokarbonat grubu ile lektinin amino grubu arasında gerçekleşir. Bu bağlanma sırasında lektinin

karbohidrat bağlama bölgesini korumak için ortama uygun bir şekerin ilavesi gerekir.

3. Örneğin hazırlanması ve kolona uygulanması:

Lektin afinite kromatografisi ile ayrılmak istenen glikoproteinler suda çözünen ve membrana bağlı glikoproteinler olabilir.

a) Suda çözünen glikoprotein örnekleri, fizyolojik tamponlarda (6,8-7,5) hazırlanır. Çoğunlukla tamponlara lektinlerin gereksinim duydukları metal iyonlarının tuzları ilave edilir.

b) Membrana bağlı glikoproteinlerin sulu çözeltilerde çözünürlüğü düşüktür. Membran proteinlerini çözünürleştirmek için bazı ajanlar kullanılır. En önemli ajanlar deterjanlardır.

Örnekler yukarıda bahsedildiği gibi hazırlandıktan sonra uygun tamponla dengelenmiş kolona uygulanır. İmmobilize lektine ilgisi olan glikoproteinler kolonda tutulurken, bağlanmayan veya zayıf bağlanan proteinler tamponla yıkanarak uzaklaştırılır.

4. Bağlanan glikoproteinlerin elüsyonu:

Bağlanan glikoproteinlerin elüsyonu için farklı yöntemler kullanılabilir.

Bunlar:

- 1) Genellikle bağlanan glikoproteinler, lektinin afinite gösterdiği şeker veya analogu ile elüe edilir. Örneğin ConA' ya bağlanan glikoproteinler genellikle α -D-metil mannozidin bir tampon içerisinde kolona verilmesiyle elüe edilirler.
- 2) Glikoproteinlerin, lektinlere bağlanmasında hidrofobik etkileşimler oldukça önemlidir. Bu etkileşimleri azaltan etilen glikol gibi ajanların spesifik şekerlerle birlikte kolona verilmesi kullanılabilir diğer elüsyon yöntemlerindedir.

- 3) Kolonun pH'ının değiştirilmesiyle glikoproteinin elüe edilmesi de kullanılan diğer bir yöntemdir. Bu yöntem ilgilenilen glikoproteinin pH kararlığı bilinmediğinden uygun olmayabilir.

1.6. Seri Lektin Afinite Kromatografisi

Farklı glikoproteinleri içeren karışımlardaki glikoproteinlerin ayrılmasında, lektin afinite kromatografisinin bir uygulaması olan seri lektin afinite kromatografisi kullanılır.

Bu yöntemde bir lektinin immobilize edildiği kolona örnek verilir. Kolondan çıkan örnek, hemen ardından ikinci bir lektinin immobilize edildiği kolona uygulanır. Bu işlemin ardarda farklı lektinlerle tekrarlanması durumunda bu yöntem seri lektin afinite kromatografisi adını alır (Yavuz, 2010).

1.7. Kriyojel

Biyoteknolojide önemli potansiyele sahip yeni tip polimerik jellerin birisi de kriyojellerdir. Donma koşullarında meydana gelen jelleşme ürünleri kriyojeller (Yunancada donma veya buz anlamındadır) olarak isimlendirilir. Kriyojeller yoğun gözenekli polimerik materyaller olup jel oluşturan herhangi öncüllerden ve çeşitli morfolojilerde ve gözeneklilikte sentezlenebilir. Kriyotropik jelleşme (veya kriyoyapılaşma) jelleşme kabiliyetine sahip sistemin kriyojenik uygulamasının (dondurma, donma durumunda belirli bir süre depolama ve çözme) bir sonucu olarak meydana gelen spesifik bir jel oluşturma tipidir. Kriyojelleşmenin başlıca özelliği çözgenin kristallenmesidir (Dainiak vd., 2007). Kriyojeller ilk olarak yaklaşık 40 yıl önce rapor edilmiştir (Lozinsky vd., 2002) ve kriyojellerin polimerik jellerden oldukça farklı özellikleri dikkatleri üzerine çekmiştir (Lozinsky vd., 2003, Uygun, 2012).

Kriyojeller buz kristallerinin erimeden sonra içten bağlı sürekli gözenekleri oluşturan ve porojen olarak davrandığı yarı donmuş sulu ortamda sentezlenirler. Büyük içten bağlı gözenekler ve yüksek elastikiyet kriyojellerin temel karakteridir. Geleneksel jellerin (çözgenin polimer yapısına bağlı olduğu homo fazlı sistemler) tersine kriyojeller çözgenin (su) hem gözeneklerde hem de polimer yapısında bulunduğu hetero fazlı sistemlerdir. Jel öncüllerinin ve kullanılan kimyasal reaksiyona bağlı olarak kriyojelin mikro ve makro gözenekli yapısı değişebilir.

Sünger benzeri morfolojiye sahip kriyojellere örnek olarak poliakrilamid (pAAm), poli (dimetil akrilamid) (pDMAA), poli (hidroksietil metakrilat) (pHEMA), polietilen glikol (PEG), dekstran metakrilat ve polivinil alkol (PVA) verilebilir.

Bu kriyojeller monolitik çubuk, disk ve tabaka şeklinde sentezlenebilir (Plieva vd., 2007, Uygun, 2012).

Çizelge 1.3. Sentezlenen kriyojellere ve uygulamalarına genel bir bakış

Monomer/polimer öncüller	Gösterim	Gözenek boyutu (μm)	Morfoloji	Kullanım alanı
Akrilamid	pAAm	1-200	Süngerimsi ve elastik	Kromatografi ve hücre kültür desteği
Akrilamid	Aşı-pAAm	1-100	Süngerimsi ve elastik	Kromatografi
Dimetilakrilamid	PDMAA	1-120	Süngerimsi ve elastik	Kromatografi ve hücre kültür desteği
Polivinil alkol	m-PVA	1-80	Süngerimsi ve elastik	Kromatografide monolitik destek ve biyobozunmayan hücre kültü desteği
Polivinil alkol	b-PVA	0.1-1	Elastik	Mekanik tutuklama ile hücre immobilizasyonu ve enzimlerin kimyasal immobilizasyonu
Hidroksietil metakrilat	HEMA	1-200	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültür desteği

Çizelge 1.3'ün devamı

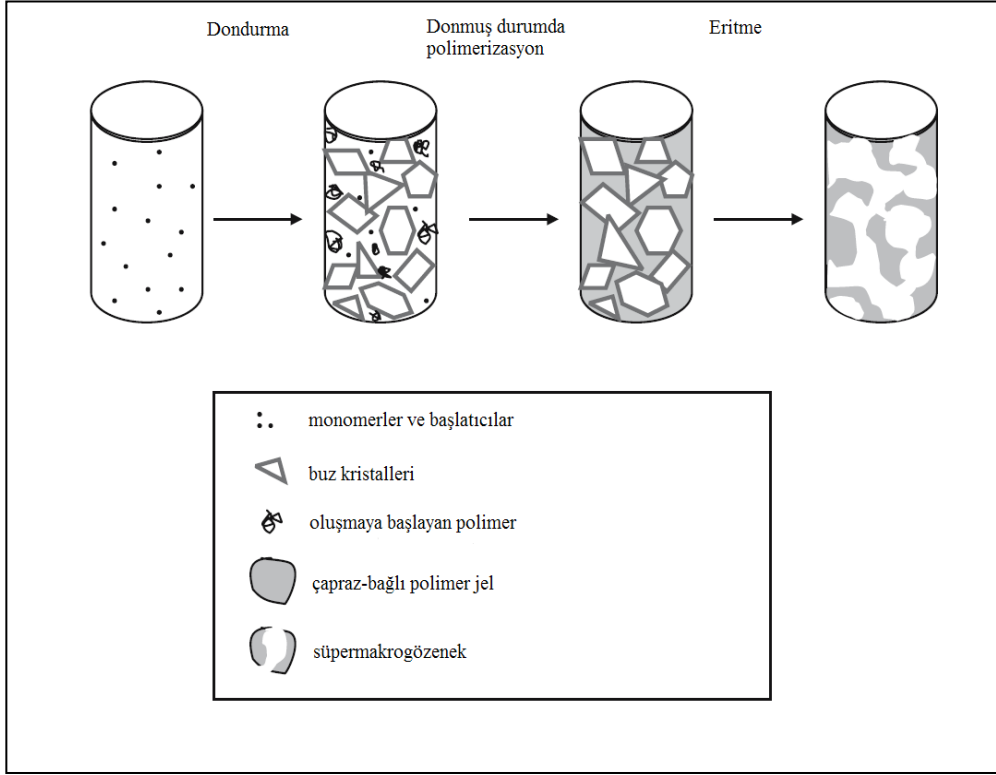
Dekstran metakrilat	Dex-MA	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre desteği	kültür
Hidroksietil metakrilat-L-laktat	HEMA-LLA-D	1-100	Süngerimsi ve elastik	Biyobozunur hücre desteği	kültür
Dekstran					
Agaroz	Ags-MG		Süngerimsi ve elastik	Hücre desteği	kültür
Polietilen glikol	PEG	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre desteği	kültür
N-izopropil akrilamid	NIPAAM	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre desteği	kültür

(Kaynak: Plieva vd., 2007).

1.7.1. Kriyojellerin Hazırlanması

Kriyojellerin gözenek yapısı donma sıcaklığı, çözünen monomerlerin derişimi ve başlatıcı sistemin (amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametiletilediamin) bileşimi ile kontrol edilebilir (Plieva vd., 2007, Uygun, 2012).

Kimyasal reaksiyon (kriyojelleşme) hızının ve çözgen kristalizasyon hızının uygun şekilde kontrol edilmesi ile istenilen özelliklerde kriyojeller sentezlenebilir. Tipik olarak kriyojeller, büyüyen buz kristallerin porojen olarak ve erimeden sonra içten bağlı gözenekler için kalıp olarak davrandığı -10 ile -20 °C aralığındaki düşük sıcaklıklardaki sulu çözeltilerde hazırlanır. Reaksiyon karışımı donuyorken, donmuş monolitik blok iki temel bölümü içerir: buz kristalleri ve donmayan sıvı mikrofaz olarak adlandırılan donmamış bölge. Kimyasal reaksiyon bu donmayan sıvı mikrofazda gerçekleşir. Reaktif içermeyen çözgen kristalleri donma sırasında büyür ve sürekli bir donmuş iskelet sistemi oluşuncaya kadar diğer kristaller ile kaynaşır. Kimyasal reaksiyonun tamamlanmasından sonra erime ile sürekli makro gözenekli kanallara sahip bir sistem meydana gelmiş olur (Şekil 1.8.) (Dainiak vd., 2007, Uygun, 2012).



Şekil 1.8. Makrogözenekli kriyojellerin oluşumunun şematik gösterimi (Dainiak vd., 2007).

Kriyojel üretimi aşağıdaki gibi kısaca özetlenebilir:

1. Kriyotropik jeller donan örnek içerisinde var olan donmamış mikrofazda meydana gelir.
2. Kriyojeller temelde makrogözeneklidir ve genelde sünger benzeri materyallerdir.
3. Donma noktası üzerindeki sıcaklıklardaki geleneksel jelleşme ile karşılaştırıldığında kriyotropik jelleşme için gerekli polimer derişimi donmamış sıvı mikrofazdaki jel öncüllerinin kriyoderişmesi nedeniyle azalmıştır.
4. Genelde ılımlı donmuş örneklerdeki kriyojelleşme donma üzerindeki sıcaklıklardaki geleneksel jelleşmeden daha hızlı ilerlemektedir.
5. Kriyojelleşmenin sıcaklık bağımlılığı, jelleşmeyi kolaylaştıran faktörler (kriyoderişme) ile yavaşlatan faktörler (düşük sıcaklık, donmamış sıvı

mikrofazdaki vizkosite) arasındaki yarışmadan dolayı genelde bir optimuma sahiptir.

6. Kriyojelin özellikleri kriyojelleşme sıcaklığı, örneğin donma durumunda bekleme zamanı, donma/erime oranı, çözgenin doğası ve çözünen ve çözünmeyen katkılar ile değiştirilebilir (Lozinsky vd., 2002, Uygun, 2012).

1.7.2. Kriyojellerin Genel Özellikleri

Kriyotropik jelleşme sonucu diğer jeller ile karşılaştırıldığında çok farklı morfolojilerde polimerik materyaller meydana gelir. Kriyojeller herhangi kimyasal tipte olabilir – kovalent, iyonik veya kovalent olmayan. Açıktır ki, sadece sıcaklık-başlatıcılı (termotropik) öncüller kriyojel hazırlanmasında kullanılamazlar.

Çözgen bağlı polimerik materyallerin dondurulup-kurutulması ile kriyojellere benzer makro ve mikro yapılara sahip materyallerin oluşumu sağlanabilir. Çözgen donmasını takip eden çözgen kristallerinin (sulu sistemler durumunda buz) süblimleşmesi polimerik materyallerde içten bağlı gözenek sistemlerini oluşturur. Bununla birlikte, donmayan sıvı mikrofazda jel oluşumu gözlenmez. Donarak kurutulmuş materyaller sadece filmler, tabaka ve küçük boncuklar gibi ince objeler halinde üretilebilir. Buna karşılık, kriyojeller blok, silindir, tüp, granül, disk gibi herhangi istenilen şekilde üretilebilir. Dahası, kriyojellerin üretimi donarak kurutulmuş materyallerden düşük basınç altında çözgenin uzaklaştırılmasına gerek olmadığı için daha kolaydır (Lozinsky vd., 2003, Uygun, 2012).

Büyük ve yoğun içten bağlı gözeneklerin varlığından dolayı, kriyojeller gözenekli yapısı bozulmadan kurutulabilir. Kurutma kriyojelin depolanmasını kolaylaştırdığından dolayı bu hidrofilik materyallerin en önemli özelliklerinden birisidir. Düşük ve yüksek molekül kütleli öncüllerden hazırlanan kriyojeller hızlı tekrar-şişme kinetikleri ile karakterize edilirler ve kuru örnekler sulu ortama bırakıldıklarında birkaç dakika içinde tekrar orijinal boyutuna şişerler. Büyük ve yoğun içten bağlı makrogözeneklerin varlığından dolayı kriyojeller çok düşük akış dirençlerine sahiptir (Dainiak vd., 2007, Uygun, 2012).

Biyoyırma açısından polimerik kriyojellerin en çekici özelliği donan çözgen tarafından oluşturulan makrogözenekler ve makrogözeneklerin duvarlarını oluşturan polimer makromolekülleri arasındaki mikrogözeneklerdir. Kriyojeldeki makrogözenekler sünger benzeri morfolojiye sahip olmasının yanında aynı zamanda gözenekler birbirleri ile içten bağlıdır. Donan çözeltinin kristalleri diğer kristallerin köşeleri ile karşılaşınca kadar büyüdüklerinden dolayı kriyojellerde bu gözenek morfolojisi oluşur.

Makrogözenek boyu kriyojenik sisteme bağlı olarak birkaç yüz mikrometre kadar büyük olabilir. Donma sıcaklığını düşürmek küçük çözgen kristali sayısını artırır ve böylece gözenekler küçülür. Dahası, düşük sıcaklıklarda donmayan sıvı hacmi azalır ve bu sebeple küçük hacminden dolayı donmayan jel öncüllerinin kriyoderişmesi daha fazla olacağından gözenek duvarları incelir fakat oluşan polimer daha yoğundur (Lozinsky vd., 2002, Uygun, 2012).

1.7.3. Kriyojellerin Kullanım Alanları

Kriyojellerin uygulamaları onların gözenekli yapısı ve operasyonel kararlılığı ile belirlenir (Plieva vd., 2007). Günümüzde, polimerik jeller kromatografik materyal, moleküllerin ve hücrelerin immobilizasyonu için taşıyıcı, elektroforez ve immunodifüzyon için matriks ve katı kültür ortamı için jel destek olarak biyoteknolojinin çok farklı uygulamalarında kullanıma sahiptir (Lozinsky vd., 2003). Temel uygulama alanları: immobilize hücreler ve enzimler ile biyokataliz, hedefin saflaştırılması için biyoyırma, hücre organellerinin, virüslerin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin kromatografisi ve memeli hücre kültürü için üç boyutlu matriks olarak biyomedikal uygulamalardır (Plieva vd., 2007, Uygun 2012).

1.8. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon (tutuklama), enzimlerin katalitik aktivitelerini kaybetmeden sürekli ve defalarca kullanımlarını sağlamak üzere, fiziksel veya kimyasal olarak bir destek materyali üzerine tutturulması olarak tanımlanır.

Endüstriyel ve analitik proseslerin çoğu, sulu ortamda gerçekleşir. Bu proseslerde enzimler, substrat çözeltisi ile karıştırılır ve ortamda ürün elde edildikten sonra enzimler ekonomik olarak geri kazanılmazlar. Ayrıca sürekli üretim proseslerinde serbest enzimler kullanılmazlar. Enzimlerin sadece bir kere

kullanılmaları ve pahalı olmaları nedeniyle, bu proseslerin maliyetleri oldukça yüksektir. Bu nedenle enzimler suda çözünmeyen bir desteğe immobilize edilerek hem defalarca kullanılabilmekte hem de sürekli proseslere uygulanabilmektedir. Böylece, önemli miktarda kazanç elde edilmektedir. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstride kullanılmaktadır.

Genel olarak immobilizasyon uygulamaları enzim sistemleri dışında, uygun destek materyallerine ilaç, protein, mikroorganizma, bitki ve hayvan hücreleri, biyosensör ve biyoreaktör uygulamaları ve kontrolü ilaç salınım sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tarihte ilk enzim immobilizasyonu 1916 yılında Nelson ve Griftin tarafından adsorpsiyon yöntemiyle yapılmıştır. Nelson ve Griftin sakkoruzu hidroliz etmek için maya invertazını mangal kömürüne adsorbe etmişlerdir. İmmobilize enzim sistemlerinin pratik olarak ilk kullanımı ise Grobhofer ve Scheilth (1954) tarafından yapılmıştır. Araştırmalarında; karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz enzimlerinin poliaminostiren reçinesine kovalent bağlanma ile immobilize etmişler ve bu immobilize enzim türevlerinin kinetik parametrelerini incelemişlerdir. Daha sonra da immobilizasyon çalışmaları dünyanın her tarafında yaygınlaşmış ve çeşitli enzimler değişik amaçlarla immobilize edilmiştir (Yamak, 2007).

1.8.1. Desteklerin Seçimi

Matrikslerin özellikleri, immobilize enzim sisteminin performansının belirlenmesinde başlıca önem taşır. İdeal destek özellikleri başlıca fiziksel dayanıklılık, hidrofilitate, inertlik, kolay türevlendirilebilme, biyoyumluluk, mikrobiyal atağa karşı dayanıklılık ve düşük maliyetle elde edilebilirliktir.

Destekler kimyasal bileşimlerine göre organik ve inorganik olarak sınıflandırılabilirler. Organik destekler doğal ve sentetik polimerler olarak iki kısımda incelenebilirler (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. Organik ve inorganik destekler

Organik
Doğal polimerler Polisakkaritler, selüloz, dekstranlar, agar, agaroz, kitin, alginat Proteinler, kollajen, albumin Karbon
Sentetik polimerler
Polistiren
Diğer polimerler: Poliakrilat polimetakrilatlar, poliakrilamid, poliamidler, vinil ve allil-polimerler
İnorganik
Doğal polimerler: Bentonit, silika
İşlenmiş Materyaller: Cam (gözeneksiz ve kontrollü gözenekli), metaller, kontrollü gözenekli metal oksitler

Matrikslerin fiziksel özellikleri (ortalama tanecik çapı, şişme davranışı, mekanik gücü ve basınç davranışı) immobilize sistemlerin performansı için temel önem taşır ve teknik koşullar (karıştırmalı tank, akışkan ve sabit yataklar) altında kullanılacak reaktör tipini belirlerler. Özellikle gözenek parametreleri ve tanecik büyüklüğü toplam yüzey alanını belirler. Özellikle gözenek parametreleri ve tanecik büyüklüğü toplam yüzey alanını belirler; bu sebeple enzimlerin bağlanma kapasitesini önemli bir şekilde etkiler. Gözeneksiz destekler az miktarda difüzyonel sınırlamalar gösterir fakat düşük yükleme kapasitesine sahiptirler. Daha fazla geniş yüzey alanı daha fazla enzimin yüklenmesine izin verdiği için gözenekli destekler genellikle tercih edilir ve bu şekilde immobilize edilmiş enzim çevre etkilerinden daha fazla korunur. Gözenekli desteklerin, kapasite ve akış özelliklerini optimize etmek için kontrollü gözenek dağılımına sahip olması gerekir. İnorganik taşıyıcıların birçok avantajına rağmen (fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal parçalanmaya karşı yüksek dayanıklılık gibi), endüstriyel

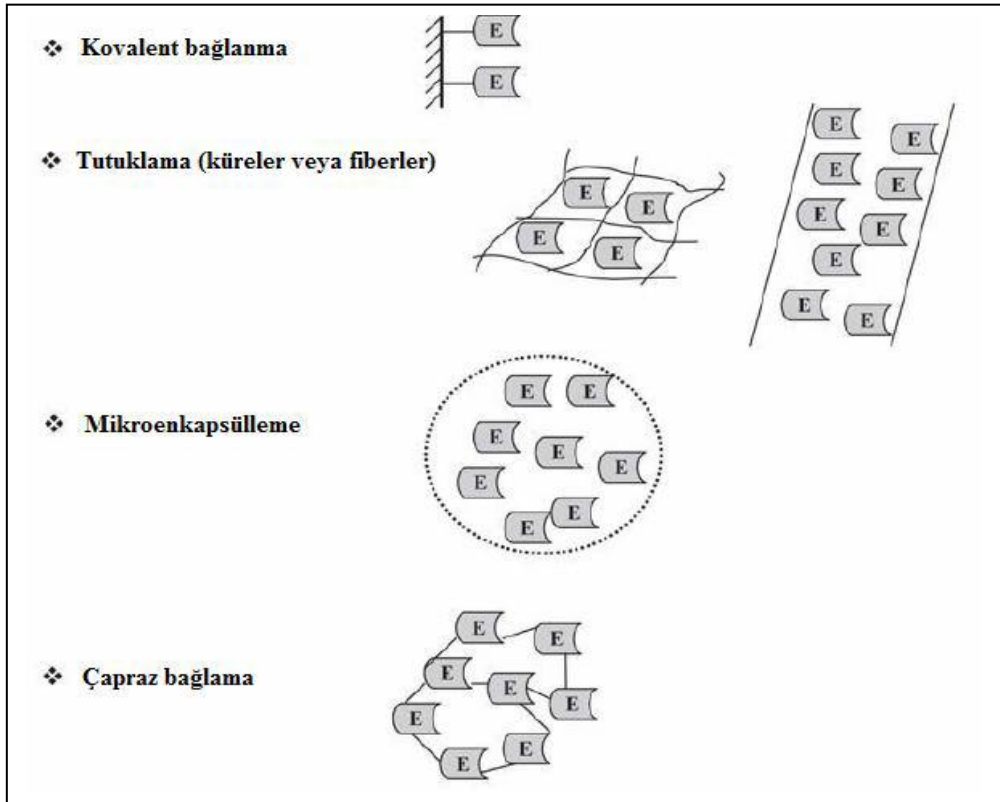
uygulamaların çoğu organik matrikslerde gerçekleştirilir (Brena ve Batista-Viera,2006, Uygun, 2008).

1.8.2. Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu yöntemleri geri dönüşümsüz ve geri dönüşümlü olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir.

1.8.3. Geri Dönüşümsüz Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri

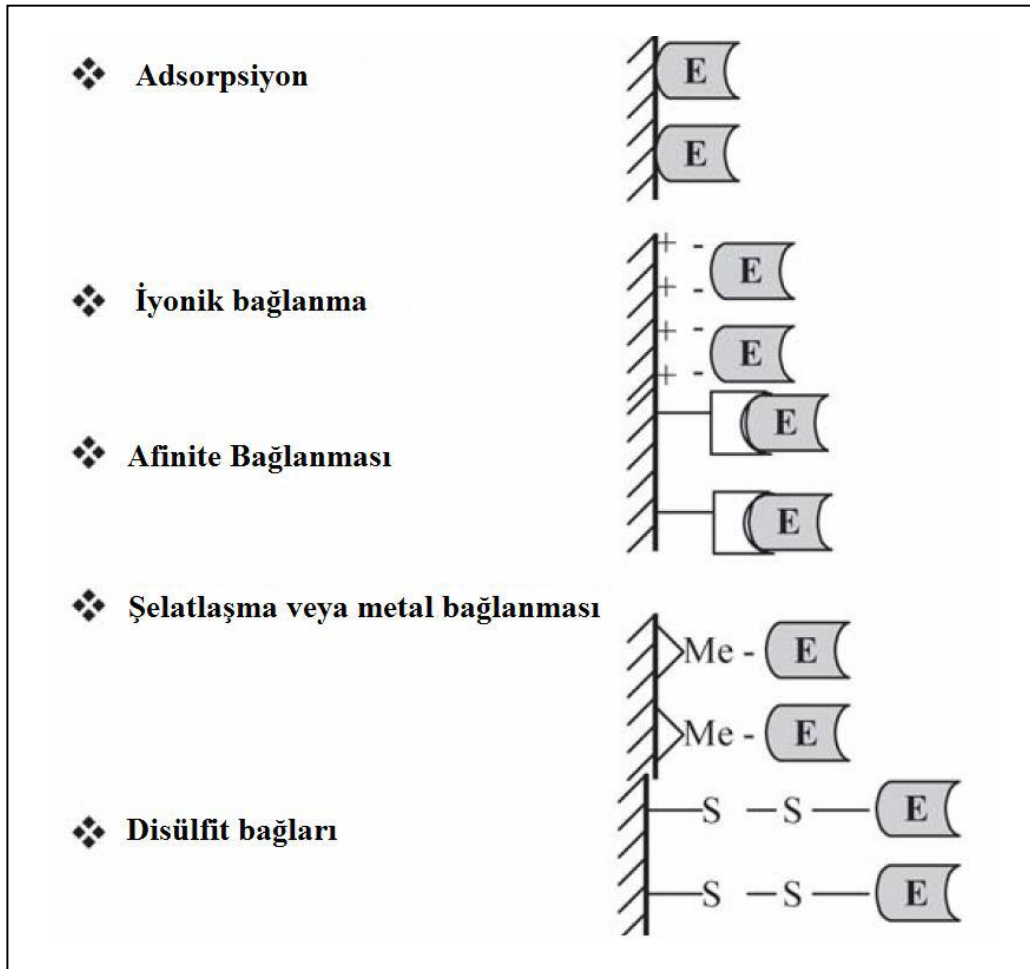
Geri dönüşümsüz immobilizasyon kavramı, bir biyokatalizörün bir desteğe bağlandıktan sonra enzimin veya desteğin biyolojik aktivitesini kaybetmeden ayrılmayacağı anlamına gelir. Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonunun en yaygın işlemleri kovalent bağlama, tutuklanma (entrapment), mikrokapsülleme ve çapraz bağlamadır. Bu yöntemlerin şematik gösterimi Şekil 1.9'daki gibidir.



Şekil 1.9 Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyon yöntemleri (Brena ve Batista-Viera, 2006).

1.8.4. Geri Dönüşümlü Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri

Enzim-substrat bağlanmasının özelliği nedeniyle geri dönüşümlü immobilize enzimler ılımlı koşullar altında destekten ayrılabilir (Şekil 1.10). Enzim immobilizasyonunda geri dönüşümlü metotların kullanımı ekonomik sebepler nedeniyle önemlidir; çünkü destek yeniden kullanılabilir ve taze enzimle yüklenebilir. Gerçekten de desteğin maliyeti, immobilize katalizörlerin tamamının maliyetinde genellikle temel faktördür. Enzimlerin geri dönüşümlü immobilizasyonu, kararsız enzimlerin immobilizasyonu ve biyoanalitik sistemlerdeki uygulamalar için oldukça önemlidir. Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yöntemleri aşağıdaki alt başlıklarda incelenebilir.



Şekil 1.10. Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yöntemleri (Brena ve Batista-Viera, 2006)

1.8.4.1. Adsorpsiyon (Nonkovalent Etkileşimler)

a) Nonspesifik Adsorpsiyon

En basit immobilizasyon metodu, fiziksel adsorpsiyona veya iyonik bağlanmaya dayanan nonspesifik adsorpsiyondur. Fiziksel adsorpsiyonda enzimler hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri veya hidrofobik etkileşimlerle matrikse bağlanırlar buna karşılık iyonik bağlanmada enzimler tuz bağları vasıtasıyla bağlıdır. Nonkovalent immobilizasyonla ilgili kuvvetlerin şiddeti, etkileşimin gücünü belirleyen koşulların (pH, iyonik şiddet, sıcaklık veya çözünenin polaritesi) değiştirilmesiyle değişebilir. Adsorpsiyonla immobilizasyon ılımlı, gerçekleştirilmesi kolay bir işlemdir ve genellikle enzim katalitik aktivitesini korur. Böylesi metotlar ekonomik olarak çekicidirler fakat etkileşim göreceli olarak zayıfladığında matriksten enzimin sızması gibi problemler oluşabilir (Brena ve Batista-Viera, 2006, Uygun, 2008).

b) İyonik Bağlanma İle Adsorpsiyon

Enzimlerin geri dönüşümlü immobilizasyonunda bilinen bir yaklaşım protein-ligand etkileşimlerini kromatografide kullanılan prensiplere dayandırmaktır. Örneğin enzimlerin geri dönüşümlü immobilizasyonundaki kromatografik prensiplerin ilk uygulamalarından biri iyon değiştiricilerin kullanılması olmuştur. Bu metot basit ve geri dönüşümlüdür fakat genelde enzimin hem güçlü bağlandığı hem de tamamen aktif olduğu koşulları bulmak zordur. Yakın bir geçmişte, immobilize polimer iyonik ligandların kullanımı protein-matriks ilişkilerinin ayarlanmasına izin vermiş ve böylelikle türevin özelliklerinin optimizasyonu mümkün olmuştur. Çok sayıda patent, çok çeşitli enzimleri veya tam hücreleri bağlamak için polietileniminin kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, substrat veya ürünlerin kendileri yüklü olduklarında yüksek yük içeren desteklerin kullanılması, dağılma ve difüzyon olayları nedeniyle kinetiğin bozulması sonucu, problem yaratabilir. Bunun sonucunda, optimum pH ve pH stabilitesi gibi enzim özellikleri değişebilir. Bu durum bir problem gibi görülse de, uygulamaya bağlı olarak, belli bir enzimin optimum koşullarının daha alkali veya daha asidik koşullara kaydırılması yararlı olabilir (Brena ve Batista-Viera, 2006, Uygun, 2008).

c) Hidrofobik Adsorpsiyon

Hidrofobik adsorpsiyon, enzimler üzerindeki hidrofobik bölgeler veya alanlar ile taşıyıcı üzerindeki hidrofobik kısımlar arasındaki etkileşimlere dayanır. Enzimlerin hidrofobik adsorpsiyonu için kullanılan taşıyıcılar genellikle hazır olan taşıyıcıların türevlendirilmesiyle hazırlanır. Örneğin selüloz, agaroz küreler, sepharoz gibi doğal polimerler bu amaçla kullanılabilir. Alternatif olarak silika gibi inorganik taşıyıcılar ya da Eupergit C ve poli(vinil alkol) küreleri gibi sentetik taşıyıcılar da enzim immobilizasyonu için hidrofobik adsorbanları hazırlamakta kullanılabilir. Hidrofobik fonksiyonel grup, genellikle hazır alınan taşıyıcılara kovalent bağlanır. Bununla birlikte nadiren hidrofobik bileşik taşıyıcı üzerine basitçe kaplanabilir. Taşıyıcıların adsorpsiyon kapasitesi taşıyıcı yapısı, fonksiyonel grubun bağlanma derecesi, fonksiyonel grubun bağlanma özellikleri, aktivatörlerin veya inhibitörlerin varlığı, proteinin doğası ve etkileşimin olduğu ortam gibi faktörlere bağlıdır. Ayrıca hidrofobik etkileşimlerle adsorplanan enzimlerin aktiviteleri, enzim yüklemesi, taşıyıcının hidrofobisitesi, substratın büyüklüğü, hidrofobik uçların uzunluğu, difüzyonel kısıtlamalar ve bağlanma yoğunluğu faktörlerine bağlıdır. İmmobilize enzimlerin kararlılığı, hidrofobik adsorpsiyonla artabilir, azalabilir veya değişmeyebilir (Cao, 2005, Uygun, 2008).

d) Biyospesifik Adsorpsiyon

Biyospesifik adsorpsiyon enzim ve taşıyıcının özel fonksiyonel grupları arasındaki etkileşimlere dayanır. Bu teknoloji başlangıçta adsorpsiyonun geri dönüşümlülüğü ve seçiciliği nedeniyle enzimlerin ayrılması ve saflaştırılması için tasarlanmıştır. İmmobilize Con A gibi biyoafinite adsorbanları üzerine immobilize edilmiş enzimler, muhtemelen düzenli yönlenmiş immobilizasyon (bölge spesifik immobilizasyon) nedeniyle olağanüstü yüksek aktiviteye sahiptirler. Depolama ve işlemsel stabilite ile termal stabilite, immobilize biyo ligandlar ile enzimin komplementer etkileşimi nedeniyle genellikle artmaktadır. İmmobilize substratlar, substrat analogları veya inhibitörler yaygın olarak enzimleri saflaştırmak için kullanılırken taşıyıcıya bağlı substratlar, substrat analogları veya inhibitörler üzerine immobilize edilmiş enzimler nadiren biyokatalizör olarak kullanılırlar. Bunun sebebi taşıyıcı ile enzimin zayıf etkileşimleridir (Cao, 2005, Uygun, 2008).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lektinler, bir karbonhidrat veya karbonhidrat grubuna yüksek afinitesi olan glikoproteinler veya proteinlerdir. İmmobilize lektinler spesifik karbonhidrat yapıları içeren glikokonjugatları, serbest glikanları, glikopeptidleri, polisakkaritleri, çözünür hücre bileşenlerini ve hücreleri ayırmak ve izole etmek için kullanılan en güçlü araçlardandır. Ligand olarak lektinlerin kullanıldığı afinite kromatografisi türüne Lektin Afinite Kromatografisi denir ve literatürde bu kromatografi ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Miranda vd. (2002), bayır turpu ve soya fasülyesi peroksidaz enzimlerinin Con A-Agaroz matriksine adsorpsiyonu ve elüsyonu işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Adsorpsiyon kapasitesi üzerine pH, iyonik şiddet ve Ca^{+2}/Mg^{+2} derişiminin etkisini araştırmışlar ve ayırışma sabitlerini adsorpsiyon izotermelerini kullanarak belirlemişlerdir. Dinamik kapasitesi üzerine akış hızı ve peroksidaz derişiminin etkisini incelemişlerdir. Elüsyon işlemleri için NaCl ve α -D-metil mannopiranozid derişimlerini optimize etmişlerdir.

Bakalova vd. (2003), CNBr ile aktive edilmiş Sepharoz 6MB'ye *soya ve Dolichos biflorus* fasülyelerinin lektinlerini kovalent olarak bağlanmışlardır ve bu afinite kolonlarına lösemik T hücreleri ve normal lenfositlerin bir karışımı eklendiğinde lösemik T hücrelerinin kolonda kaldığı, normal lenfositlerin ise yapıları bozulmadan kolondan ayrıldığını gözlemişlerdir.

Bereli vd. (2004), sulu çözelti ve insan immunoglobulin G (IgG)'nin affinite kromatografisiyle saflaştırılması için poli (2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) kürelerine konkanavalin A (ConA)'yı immobilize etmişlerdir. PHEMA desteğini süspansiyon polimerizasyon yöntemiyle hazırlamışlar ve biyo ligand olan Con A'yı PHEMA küreleri üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. PHEMA/ConA küreleri üzerine IgG'nin maksimum adsorpsiyonunun pH 6.0'da gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. İnsan plazmasından adsorplanan IgG'nin miktarını % 82.5 saflıkta 69,4 mg/g olarak belirlemişlerdir.

Fraguas vd. (2004), 1-siyano-4-(dimetilamino)-piridinyum tetrafloroborat ile aktive edilmiş Sepharoz üzerine Con A'yı immobilize ederek bir destek materyali hazırlamışlardır. Bu destek materyalini kullanarak bayır turpu köklerinden peroksidaz enzimini hızlı ve yüksek saflıkta elde etmişlerdir.

Yavuz vd. (2004), Con A bağı PHEMA kürelerini, sulu çözeltiden maya invertaz enziminin spesifik adsorpsiyonu için kullanmışlardır. PHEMA kürelerini süspanسیون polimerizasyonu ile hazırlamışlardır ve bu kürelerin boyutlarının 150-200µm çapında olduğunu rapor etmişlerdir. Con A bağı PHEMA kürelerinin invertaz yükleme kabiliyeti 107 mg/g olarak bulunmuştur. Ayrıca immobilize invertazın aktivitesine sıcaklığın etkisi araştırılmış ve immobilize invertazın kinetik sabitlerini belirlenmiştir.

Bucur vd. (2005), glikoprotein enzimi ve Con A arasındaki afiniteye dayalı görüntü baskılı elektrotların yüzeyine asetilkolin esteraz enzimini immobilize etmek için yeni bir metod geliştirmişlerdir. Bu araştırmacılar çalışma elektrodunun yüzeyini 7,7,8,8-tetrasianoquinodimetan (TCNQ), c heptilanin aracısı ile grafit içeren Nafyon tabakasını modifiye etmişlerdir.

Babac vd. (2006), Con A immobilize edilmiş poli (akrilamid- allil glisidil eter) [poli(AAm-AGE)] monolitik kriyojele, sulu çözeltilerden ve insan plazmasından immunoglobulin G (IgG) bağlanmasını gerçekleştirmişler ve insan plazmasından adsorplanan IgG miktarını 25,6 mg/g olarak bulmuşlardır.

Aniulyete vd. (2006), granosel olarak adlandırılan makro gözenekli selüloz bazlı bir destek materyali hazırlamışlar ve bu destek materyaline Concanavalin A ve buğday tohumu lektinini (WGA) immobilize etmişlerdir. Bu desteğe immobilize edilmiş her iki lektin yapısının da, glikoproteinlere yüksek oranda ilgi gösterdiğini görmüşlerdir.

Opitz vd. (2007), Madin Darby köpek böbrek hücrelerinde, İnfluenza A virüsünü üretmişler ve bu virüsün hücre zarında bulunan iki glikoproteininin (hemagglutinin ve neuraminidaz) oligosakkaritlerini ligand olarak kullanarak bu virüsün bulunduğu ortamdan saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir.

Qui vd. (2007), insan serumundan glikoproteinlerin tanımlanması için yeni bir metod geliştirmişlerdir. Öncelikle glikoproteinleri Con A içeren lektin afinite kolonunda ayırmışlar daha sonra da triptik olarak parçalamışlardır. Asidik peptitleri güçlü bir anyon değişim kolonuyla ayırmışlar ve kolondan sökülen peptidlerden histidin içerenleri Cu-IMAC ile ayırmışlardır.

Yavuz vd. (2009), miyeloma hücrelerinin adsorpsiyonu için ligand taşımayan PHEMA küreleri ile Con A taşıyan PHEMA kürelerini kullanmışlardır. Ligand taşımayan PHEMA kürelerinin adsorpsiyon kapasitesinin çok düşük iken Con A taşıyan PHEMA küreleri kullanıldığında adsorpsiyonun 20 kat arttığı görmüşlerdir.

Akkaya vd. (2009), tek boyutlu ve manyetik poli (glisidil metakrilat) kürelerini hazırlayıp bu kürelere Con A'yı immobilize etmişlerdir. Daha sonra bu kürelerin sulu çözeltilerden maya invertaz enziminin adsorpsiyonunda kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Yapılan deneylerde maksimum invertaz adsorpsiyonu 111 mg/g olarak bulmuşlardır.

Haider ve Husain (2009), *Aspergillus oryzae* β -galaktozidaz enziminin Con A bağlı kalsiyum aljinat-nişasta kürelerine immobilize etmişlerdir. Immobilize β -galaktozidazın optimum sıcaklığını 60°C ve serbest β -galaktozidazinkinden 10°C daha yüksek olarak bulmuşlardır. Ayrıca immobilize β -galaktozidazın ısı, üre, MgCl₂ ve CaCl₂'e karşı daha yüksek stabilite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Ansari ve Husain (2010), *Aspergillus oryzae*'den elde edilen β -galaktozidaz enzimini Con A bağlı selüloz yüzeyi üzerine immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin optimum sıcaklığının 50°C'den 60°C'ye kadar arttığını gözlemişlerdir. Optimum pH'nı 4.6 olarak rapor etmişlerdir. Immobilize enzimin serbest enzime göre ısı kararlılığının daha yüksek olduğunu da bulmuşlardır.

Luo vd. (2011), *Toksoplazma gondii*'nin glikoproteinlerini tanımlamak için glikoproteinleri, seri lektin afinite kromatografisini kullanılarak ayırmışlardır. Seri Lektin Afinite Kromatografisi ile ayrılan glikoproteinleri, SDS-PAGE kullanarak ayırmışlar ve LC-MS/MS analiziyle tanımlamışlardır. Ayrıca lektin etiketleme ve PCR çalışmaları ile *Toksoplazma gondii*'nin glikoproteomunu çıkarmışlardır. Bu proteinlerin glikozillenmesinin fonksiyonunu anlama çalışmalarıyla; ilaç tedavisini geliştirmek için kullanılan mekanizmaların aydınlatılması ve aynı zamanda yararlı aşı adayları olarak geliştirilebilecek glikoproteinlerin tanımlanması için kullanılabileceğini açıklamışlardır.

Uygun vd. (2012), Con A bağlı süpermakrogözenekli poli (etilen glikol dimetilakrilat) [poli (EGDMA)] monolitik kriyojel kolonuna invertaz enzimini immobilize etmişlerdir. Biyo ligand olan Con A'nın poli (EGDMA) kriyojeline

kovalent olarak bağlanmasını glutaraldehit aktivasyonu ile gerçekleştirmişler ve tekrarlayan adsorpsiyon ve desorpsiyon koşullarında sulu çözelti içerisindeki invertaz enziminin maksimum adsorpsiyonunu pH 5.0 asetat tamponunda, 55.45 mg/g polimer olarak bulmuşlardır. Ayrıca, 10 döngüden sonra invertazın adsorpsiyon kapasitesinde önemli derecede bir kayıp olmadığını açıklamışlardır.

Kriyojeller, düşük veya yüksek molekül kütleli öncüllerin kriyojenik uygulamasının bir sonucu olarak oluşurlar. Kriyojellerin makrogözenekli yapıları ve işlemsel kararlılıkları onların, biyoteknolojinin farklı uygulama alanlarında kullanım bulmalarına olanak sağlamıştır. Aşağıda kriyojellerin kullanıldığı çalışmalara örnekler verilmiştir.

Doretti vd. (2000), asetilkolinin belirlenmesi için bir biyoenzimatik sensörü poli (vinil alkol) kriyojel membranında asetilkolinesteraz ve poli (etilen glikol) ile modifiye edilmiş kolin oksidazın fiziksel koimmobilizasyonu ile hazırlamışlardır. Bu enzim ile modifiye edilmiş polimer enzimatik olarak gelişen hidrojen peroksidin elektrokimyasal belirlenmesine dayanan amperometrik bir sensör oluşturmak için platin elektrot uygulanmıştır. Ayrıca bu sensörün analitik özellikleri tanımlanmıştır.

Kumar vd. (2003), kromatografik olarak insan periferik kan lenfositlerinin spesifik olarak fraksiyonlanması ve ayrılması için süpermakrogözenekli, monolitik kriyojel afinite desteğini hazırlamışlardır. Bu afinite desteği, yeni bir hücre ayırma stratejisini tasarlamak için kullanılmıştır. Bu strateji yüzeyi üzerinde Ig G antikorlarını taşıyan hücreler ile *Staphylococcus aureus*'dan elde edilen protein A'nın etkileşimine dayanmaktadır.

Szczesna- Antczak vd. (2004), canlı *Bacillus subtilis* hücrelerini PVA-kriyojel kürelerine tutuklamış ve tekrarlı batch işleminde ekstraselüler proteazların (subtilisin ve metalloproteinaz) eldesi için kullanmışlardır. Kullanılan, kriyojellerin difüzyon özelliğini ve işlemsel kararlılığını değerlendirmişlerdir.

Daniak vd (2006), hücrelerin ayrılması için kriyojel monolit kolonlarının kullanımını araştırmışlardır. Bu amaçla kolonlara Con A'yı immobilize etmişler ve bu kolonları *Saccharomyces cerevisiae* ve *Escherichia coli* hücrelerinin bir karışımının kromatografik rezolüsyonu için kullanmışlardır. Bu afinite kriyojel

kolonları ile hücrelerin etkili bir şekilde kromatografik olarak ayrılabilceğini rapor etmişlerdir.

Yun vd. (2007), adenozin trifosfatın (ATP)'nin tek adımda izolasyonu için süpermakrogözenekli anyon değişim kriyojel desteği sentezlemişlerdir. ATP biyolojik ve teropotik olanlarda yaygın olarak kullanılan yüksek enerjili bir bileşiktir. ATP, endüstriyel skalada mikrobiyal hücrelerdeki adenozin monofosfatın fosforilasyonu ile üretilen ve mikrobiyal fermantasyon sıvısından izolasyonu oldukça zor bir işlemdir. Bu çalışmada süpermakrogözenekli kriyojel yapıları kullanılarak anyon değişim kromatografisi ile *Saccharomyces cerevisiae* fermantasyon sıvısından ATP doğrudan tek adımlı bir işlemle izole edilmiştir.

Alkan vd. (2009), süpermakrogözenekli PHEMA kriyojellerini sentezlemişler ve bu kriyojellere siyanojen bromür aktivasyonu ile protein A'yı kovalent olarak bağlamışlardır. Daha sonra bu protein A bağlı kriyojel yapılarını sulu çözeltiden ve insan plazmasından IgG adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Hazırlanan kriyojel yapılarının IgG saflaştırması için oldukça iyi seçiciliğe sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Aslıyüce vd. (2010), iyon baskılanmış poli (hidroksietil metakrilat- N-metakriyolil-(L)-sistein metil ester) kriyojellerini sentezlemişler ve bu kriyojel yapısını beta Talesemi hastalarının kanından in vitro olarak Fe^{3+} uzaklaştırılmasında kullanmışlardır.

Luding vd. (2011), sülfö fonksiyonel grupları ile aşılınmış süpermakrogözenekli kriyojelleri kullanarak tavuk yumurtası akından lizozim ayırımı için etkili bir katyon değişim kromatografisi metodunu geliştirmişlerdir. Kromatografik işlem tek bir adımda ve ardışık elüsyonda gerçekleştirilmiştir. Lizozimin saflığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir.

Srivastava vd. (2012), poliakrilamid kriyojel üzerine fenil boronat içeren polimerin aşı polimerizasyonunu, yüzey başlatıcı serbest radikal polimerizasyonu ile gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırmacılar aşılınmış kriyojelleri karakterize ederek maya hücrelerinin ayrılması için kullanmışlardır.

Stanescu vd: (2012), *Trametes pubescens* lakkaz enziminin immobilizasyonu için geniş gözenekli PVA kriyojellerini hazırlamışlardır. Lakkaz enzimi kriyojel yapılarına kovalent olarak immobilize edilmiş ve immobilizasyon verimi 5.2

mg/g kriyojel olarak bulunmuştur. İmmobilize lakkazın uygulaması olarak polifenollerin oksidasyon kinetikleri incelenmiştir. Ayrıca immobilize lakkaz elma suyu fenolik bileşiklerinin oksidasyonu için kullanmışlardır.

Uygun vd (2012), poli (HEMA) monolit kriyojelini sentezlemişler ve bu kriyojel yapılarına Reactive Green 5 boyasını kovalent olarak bağlamışlardır. Boya bağlı kriyojel yapılarının karakterizasyonunu gerçekleştirerek papain adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Ayrıca boya bağlı kriyojel yapıları ile *Carica papaya* lateksinden papain enzimini saflaştırmışlar ve enzimin saflığını SDS- PAGE ile göstermişlerdir.

İnulinazlar, endüstride kullanılan en önemli enzimlerden biridir. β -fruktan fruktanohidrolazlardan olan bu enzim, inulini hidrolizleyerek hem gıda hem de farmositik endüstrilerinde önemli bileşenler olan fruktoz ve fruktooligosakkaritlerin üretilmesinde görev alır. İnulinaz immobilizasyonu ile ilgili literatürde yapılmış birçok çalışma mevcuttur.

Silva ve Santana (2000), iyon değişim kolonlarına inulinaz enziminin (Fruktozyme L) adsorpsiyonunu araştırmışlardır. Katyon değiştirici reçine olarak CM- Sepharoz CL-6B'yi, anyon değiştirici reçine olarak Accell Plus QMA'yı kullanmışlardır. Bu adsorpsiyon desteklerinin kullanılmasıyla elde edilen adsorpsiyon izotermelerinin Langmuir tipi olduğunu belirlemişlerdir. Accell Plus QMA desteği ile gerçekleştirilen adsorpsiyon-elüsyon işlemlerinde inulinaz enziminin aktivite verimini % 70 olarak bulmuşlardır.

Catana vd. (2005), ticari olarak satılan inulinaz enzimini çeşitli desteklere immobilize ederek sükröz hidrolizi için kullanmışlardır. İmmobilizasyon işlemini kalsiyum aljinat ve aljinat-silikat sol-jel ile gerçekleştirmişlerdir. En iyi sonuçlar, inulinaz enziminin kalsiyum aljinat kürelere tutuklanması ile elde edilmiştir. Kalsiyum aljinata tutuklanan inulinaz enzimi pH 4.0' de ve 50-60 °C aralığında en yüksek aktiviteyi göstermiştir. İmmobilize inulinazın sükröz substratı için K_m değerini 184mM olarak hesaplamışlardır.

Gill vd. (2006), *Aspergillus fumigatus*'dan kısmi olarak saflaştırılmış ekstraselüler termostabil inulinaz enzimini çeşitli desteklere immobilize etmişlerdir. Destek materyali olarak kitin, kazein, Con A bağlı silika küreler, QAE-Sephadex ve DEAE-Sephaceli kullanmışlardır. Farklı desteklere

immobilize edilen enzimlerin optimum pH, sıcaklık ve K_m değerleri araştırılmıştır. İmmobilize enzimlerin işlemsel kullanım ömürleri incelendiğinde Con A bağlı silika kürelerin kararlılığının daha yüksek olduğu görülmüştür.

Catana vd. (2007), ticari adı Fruktozyme L olan *Aspergillus niger* inulinaz enzimini Amberlit desteği üzerine immobilize etmişler ve inulin hidrolizi için kullanmışlardır. Serbest ve immobilize inulinazın inulin hidrolizi için aktivasyon enerjilerini hesaplamışlardır. İmmobilize enzim kullanıldığında biyotransformasyonun aktivasyon enerjisinin düştüğünü gözlemişlerdir. İlâveten immobilize inulinazın, % 5'lik inulin çözeltisinin hidrolizi için defalarca kullanılabilirdiğini rapor etmişlerdir.

Singh vd. (2007), *Kluyveromyces marxianus* YS-1'den ekstraselüler ekzo-inulinaz enzimini etanol çöktürmesi ve Sephadex G100'ün kullanıldığı jel filtrasyon kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırmışlar ve Dualite A568 üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin optimum sıcaklık, pH değerlerini ve kinetik sabitlerini belirlemişlerdir. Ayrıca immobilize inulinazın, inulinden yüksek fruktozlu şurup eldesinde başarı ile kullanılabildiğini göstermişlerdir.

Singh vd. (2008), *Kluyveromyces marxianus* YS-1'den 23.5 kat saflaştırılan inulinaz enzimini Dualite 568 üzerine kovalent olarak immobilize ederek bir dolgulu kolon reaktörü hazırlamışlardır. Bu reaktörün işlemsel kararlılığının oldukça yüksek (72 gün) olduğunu gözlemişler ve sürekli sistemde yüksek fruktozlu şurup üretimi için etkili olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Paula vd. (2008), *Kluyveromyces marxianus* var bulgaris hücre kültüründen elde edilen inulinaz enzimini jelatin desteğine immobilize etmişler ve inulinaz aktivitesi bakımından immobilizasyon verimini % 82,60 olarak bulmuşlardır. Serbest ve immobilize inulinazın optimum pH, optimum sıcaklık değerleri ve kinetik sabitlerini belirlemişlerdir. İmmobilize inulinazın işlemsel kararlılığını, dolgulu kolon reaktörde 33 gün boyunca incelemişler ve bu süre sonunda sükröz dönüşümünün % 58,12 olduğunu rapor etmişlerdir.

Cattorini vd. (2009), *Aspergillus niger*'den elde edilen ticari inulinazı Lentikat® sıvısının kullanımıyla hazırlanan polivinil alkol mercek tanecikleri ve yarı küresel şekilli kapsüllere immobilize etmişler ve inulin hidrolizi için bu iki immobilizasyon işlemini karşılaştırmışlardır. Yarı küresel şekilli kapsüllerin ard

arda 20 kez kullanıldığında son ürününde yalnızca % 20'lik azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Elnashar vd. (2009), *Penicillium chrysogenum* P36'dan ekstrakte edilen inulinaz enzimini, aşılansmış aljinat kürelere kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Aşılama işleminin basit, immobilizasyon etkinliğinin ve enzim yükleme kapasitesinin yüksek olduğunu dolayısıyla bu immobilizasyon işleminin endüstriye önemli katkılar sağlayacağını bildirmişlerdir.

Kovela vd. (2009), AV-16-GS makrogözenekli anyon değişim reçinesine fiziksel ve kimyasal yöntemleri kullanarak inulinaz enzimini immobilize etmişlerdir. Çalışılan metodlarla taşıyıcıya enzimin bağlanması optimum sıcaklığı daha yüksek değerlere kaydırmış ve optimum pH eğrisinde bir genişlemeye sebep olmuştur.

Danial vd. (2010), tek adımlı ve iki adımlı yöntemlerle hazırlanan aşılansmış alginat kürelere *Penicillium funiculosum*'dan ekstrakte edilen inulinaz enzimini immobilize etmişlerdir. Tek adımlı yöntemin enzim yükleme kapasitesini daha yüksek bulmuşlar ve bu yöntemle endüstriyel skalada yüksek fruktozlu şurup üretiminin mümkün olacağını rapor etmişlerdir.

Santa vd. (2011), ticari inulinazı kserojel matriksi içine sol jel metodu ile tutuklamışlar ve immobilize inulinazı, inulinin hidrolitik parçalanması için kullanmışlardır. Onlar immobilizasyon ile genişlemiş sıcaklık ve pH aktivite profili elde etmişlerdir. Ayrıca sol jele immobilize edilen inulinaz ile inulin substratı kullanılarak yüksek fruktozlu şurup elde edilebileceğini rapor etmişlerdir.

Nguyen vd. (2011), *Aspergillus niger* endoinulinaz enzimini % 66 verimle kitin üzerine immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik sabitlerini belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar inulin ve yer elması suyunda inulo-oligosakkaritlerin sürekli sistemde üretimi için immobilize inulinazı kullanmışlardır. Bu sistemi kullanarak yüksek içerikte inulo-oligosakkaritlerin elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Coghetto vd. (2012), *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 inulinaz enziminin immobilizasyonu için inorganik bir taşıyıcı olarak montmorilloniti kullanmışlardır. Bu araştırmacılar sükroz ve inulin substratlarını kullanarak enzimin

optimum pH, optimum sıcaklık değerleri ve immobilize enzimin kinetik sabitlerini belirlemişlerdir.

Richetti vd. (2012), *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 inulinaz enzimini, aktivite edilmiş kömür kullanarak modifiye edilmiş aljinat kürelere immobilize etmişlerdir. Aljinatı modifiye ederek yapılan bu immobilizasyon işleminin immobilizasyon verimini, enzimin stabilitesini ve kürelerin stabilitesini arttığını bildirmişlerdir.

Gabriela vd. (2012), püskürtmeli kurutma teknolojisini kullanarak katı hal fermentasyonu ile elde edilen inulinaz enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. İmmobilizasyon ajanları olarak maltodekstrin ve arabik gam kullanmışlardır. İmmobilize inulinazın, diğer mikroorganizmlardan elde edilen inulinazlara göre daha iyi sıcaklık stabilitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Silva vd. (2012), ticari *Aspergillus niger* inulinaz enzimini polireten köpük üzerine immobilize etmişler ve enzimin aktivitesini değerlendirmişlerdir. Sükroz ve inulin substratlarının kullanılmasıyla 1008 saatin sonunda immobilize inulinazın başlangıç aktivitesini sırasıyla % 49.7 ve % 49.4 koruduğunu rapor etmişlerdir.

Literatürde bir kriyojel matriksi kullanılarak *Aspergillus niger* inulinaz enziminin immobilizasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın bir ilk olduğu düşünülmektedir.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Deneylerde Longer Pump BT100-1L 4 geçişli peristaltik pompa, Hanna (pH 211) pH metre, Hereaus (Function Line) etüv, Shimadzu (UV-1601) spektrofotometre, IKA (MS2) vorteks, VWR (1180S) sirkülatörlü su banyosu, Vestel (White FR 540) buzdolabı, Ohaus-Pioneer (PA214C) 0,0001 g duyarlılıkta terazi, IKA®C-MAG HS7 sıcaklık ayarlı karıştırıcı, Brand (Transferpette) otomatik pipetler, GFL (2001/4) saf su cihazı, milipore (Simplicity UV, 18,2 mΩ cm) ultra saf su cihazı, TLC tankı (eni 25 cm, boyu 50 cm) Sigma (Steinheim, Almanya) kullanıldı.

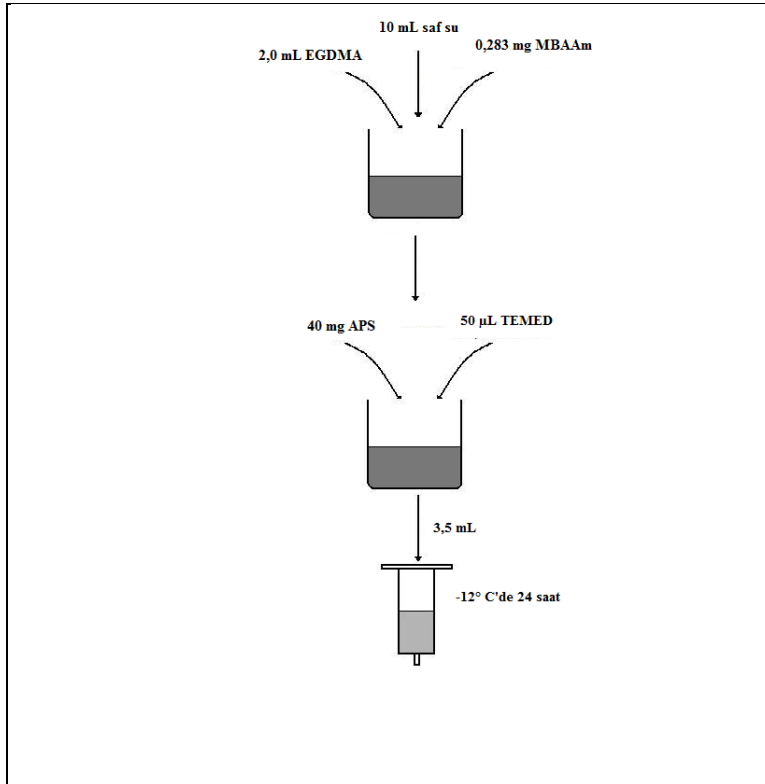
Aspergillus niger'den saflaştırılmış ticari inulinaz [endo inulinaz (E.C.3.2.1.7) ve ekzo inulinaz (E.C.3.1.7.80)], inulin (yıldız çiçeği kökünden), Concanavalin A (Con A), etilenglikodimetilakrilat (EGDMA), N,N'-metilenbisakrilamid (MBAAm), amonyumpersülfat (APS), N,N,N',N'-tetraetilmetileniamin (TEMED), amonyak, metil α -D-mannopiranozid, hidroklorik asit, kalsiyum klorür, n-bütanol, etanol, sülfirik asit, dinitrosalisilik asit, ornisol Sigma (Steinheim, Almanya)'dan; sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, MnCl₂, NaOH, sodyum asetat Riedel-de Haën (Seelze, Almanya)'dan; fruktoz, NaCl, potasyum dihidrojen fosfat, potasyum hidrojen fosfat, asetik asit Carlo Erba (Rodana, İtalya)' dan, sodyum azit, glutaraldehit MERCK (Dramstadt, Almanya)'dan; sodyum potasyum tartarat Fluka (Buchs, İsviçre)' den, ince tabaka (Macherey- Nagel, Almanya)'dan temin edildi.

Sentezlenen polimerin karakterizasyonunu gerçekleştirmek için ADÜ Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000, USA), İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde bulunan Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Philips XL-30S FEG, Almedo, The Netherlands), İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezinde bulunan Enerji Dağılımlı X-ışını Analiz cihazı (LEO, EVO 40, Carl Zeis NTS, Peabody, MA, USA) kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Poli (EGDMA) Kriyojelinin Hazırlanması

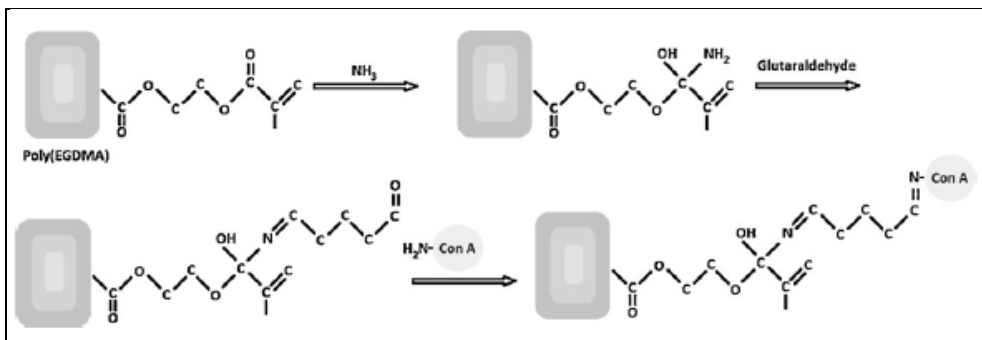
Poli (EGDMA) monolitik kriyojeli, serbest radikal polimerizasyon tekniği kullanılarak sentezlendi. Poli (EGDMA) monolitik kriyojelinin hazırlanması için 2,0 mL etilenglikoldimetilakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcısı 10 mL saf suda çözülerek 0,283 mg metilenbisakrilamid (MBAAm) içeren çözeltiliye ilave edildi. Daha sonra bu karışıma başlatıcı olarak 40 mg amonyum persülfat (APS) eklenip 3 dakika buz banyosunda bekletildi. Üçüncü dakikadan sonra reaksiyonun hızlandırılması için 50 μ L tetrametiletilediamin (TEMED) eklenip 1 dakika karıştırıldı. Hazırlanan polimerizasyon çözeltisi plastik bir şırıngaya (hacim: 5 mL, iç çapı: 0,8 cm) alındı ve ağzı parafilm ile kapatıldı. -12°C 'de 24 saat dondurulduktan sonra oda sıcaklığına getirilip 200 mL saf su ile yıkanarak % 0,02 sodyum azit içeren (0,1M) pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi içerisinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.



Şekil 3.1. Poli(EGDMA) kriyojelinin hazırlanması

3.2.2. Poli (EGDMA) Kriyojeline Con A'nın Kovalent İmmobilizasyonu

Poli (EGDMA) kriyojeline Con A'nın kovalent immobilizasyonu, sürekli sistemde gerçekleştirildi. Bu amaçla kriyojelin karbonil gruplarının aminlenmesi için %25'lik (w/w) sulu amonyak çözeltisi 75°C'de 5 saat süreyle peristaltik pompadan geçirildi. Aminlenen kriyojel, süpernatanın pH'ı 7,0 oluncaya kadar yıkandı. Aminlenmiş poli (EGDMA) kriyojeline Con A'nın bağlanması için 20 mL glutaraldehit çözeltisi (% 5 v/v; pH 7,0 fosfat tamponunda) 6 saat boyunca peristaltik pompa yardımıyla kriyojelden geçirildi ve fazlasının uzaklaştırılması için yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra 0,02 M pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 2,0 mg/mL derişimindeki 5,0 mL Con A çözeltisi kriyojelden 2 saat boyunca geçirildi ve Con A'nın bağlanma miktarı spektrofotometrik olarak 280 nm de absorbansın azalması ile hesaplandı. Poli (EGDMA) kriyojeline Con A'nın bağlanma adımları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.2. Poli (EGDMA) kriyojeline Con A'nın bağlanma adımları (Uygun vd., 2012)

3.3. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin Karakterizasyonu

3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri

Poli (EGDMA) kriyojeli ve Con A bağlı poli (EGMA) kriyojelerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000, USA) kullanılarak elde edildi. Örnekler (0,1 g) KBr ile homojen olarak karıştırılarak pelet haline getirildi ve FTIR spektrumu çekildi.

3.3.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

Sentezlenen polimerik kriyojellerin yapısı yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelendi. Toz halindeki polimerin SEM ölçümlerinde Phillips XL-30S FEG (Almelo, The Netherlands) marka taramalı elektron mikroskobu kullanıldı.

3.3.3. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi

Sentezlenen Con A bağlı kriyojellerin içeriği SEM’nda X-ışını analizi (EDX) cihazı (LEO, EVO 40, Carl Zeiss NTS, Peabody,MA, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3.4. Poli (EGDMA) Kriyojellerinin Şişme Analiz Ölçümleri

Sentezlenen poli (EGDMA) kriyojelinin şişme derecesinin tayini için kriyojeller 24 saat boyunca 60°C’ de kurutuldu. Kurumuş kriyojeller tartılıp, saf su içerisinde bekletildi (25°C’de) ve belirli zaman aralıkları ile absorplanan su miktarları ölçülüp kriyojelin şişme karakteri incelendi. Kriyojelin şişme derecesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Şişme derecesi} = [(m_{\text{şişmiş polimer}} - m_{\text{kuru polimer}}) / m_{\text{kuru polimer}}] \quad \text{Eşitlik 3.1}$$

3.4. Con A Bağlı Kriyojellere İnulinaz Enziminin Adsorpsiyonu Ve Desorpsiyon Koşullarının İncelenmesi

Con A bağlı kriyojele inulinaz enziminin adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları sürekli sistemde gerçekleştirildi. Kriyojel yapıları uygun tampon çözeltileriyle dengelendikten sonra 5 mL inulinaz çözeltisi 2 saat boyunca peristaltik pompa yardımıyla kolondan geçirilip, inulinaz adsorpsiyonuna pH’ın, inulinaz derişiminin, sıcaklığın, iyonik şiddetin ve akış hızının etkisi incelendi.

Polimerik kriyojel yapılarının tekrar kullanılabilirliğini araştırmak için, inulinaz enziminin adsorpsiyonu ve ardından desorpsiyon işlemleri gerçekleştirildi.

3.4.1. İnulinaz Adsorpsiyonuna pH’ın Etkisinin İncelenmesi

İnulinaz adsorpsiyonuna pH’ın etkisinin incelenmesi için farklı pH çözeltilerinde (pH 3,0-5,0 asetat tamponu; pH 6,0-8,0 fosfat tamponu; pH 9,0 karbonat

tamponu; 0,1 M) derişimi 0,5 mg/mL olan 6'şar mL inulinaz enzimi çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 1,0 mL alınıp 280 nm de absorbansları okundu. Geriye kalan 5,0 mL'ik çözeltiler sürekli sistemde bir peristaltik pompa yardımıyla kriyojelden 2 saat süreyle geçirildi. 2 saatin sonunda kolondan geçirilen çözeltilerin 280 nm'de absorbansları okundu. pH değerlerine karşı adsorplanan inulinaz miktarları grafiğe geçirildi ve polimerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi gösterdiği pH değeri saptandı. Aynı işlemler, Con A içermeyen kriyojel yapıları için de gerçekleştirilerek elde edilen sonuçlar değerlendirildi.

3.4.2. İnulinaz Adsorpsiyonuna İnulinaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

İnulinaz adsorpsiyonuna inulinaz başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi için 25°C'de 6'şar mL'lik pH 4,0 asetat tamponu ile 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg/mL derişimlerinde inulinaz çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.4.1' de anlatıldığı gibi her bir derişim örneği için adsorpsiyon işlemleri gerçekleştirildi ve adsorplanan inulinaz miktarları hesaplandı. İnulinaz adsorpsiyon derişimine karşı, adsorplanan inulinaz miktarı grafiği çizildi ve polimerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi bulundu. Aynı işlemler, Con A içermeyen kriyojel için de gerçekleştirilerek adsorpsiyon kapasiteleri hesaplandı. Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeli için inulinaz derişimine karşı adsorplanan inulinaz miktarı verilerinden yararlanarak adsorpsiyon izotermleri (Langmuir ve Freundlich) çizildi ve değerlendirildi.

3.4.3. İnulinaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi

İnulinaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi için 4; 15; 25; 45; 55; 65°C'deki sıcaklıklarda enzim adsorpsiyonu deneyleri gerçekleştirildi. Bu amaçla 6'şar mL'lik pH 4,0 asetat tamponu ile inulinaz çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi her bir sıcaklıkta adsorpsiyon gerçekleştirildi. Sıcaklık değerlerine karşı adsorplanan inulinaz miktarları grafiğe geçirildi ve değerlendirildi.

3.4.4. İnulinaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi

İnulinaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi için derişimleri 0; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 M olan NaCl çözeltileri ile enzim adsorpsiyonu deneyleri

gerçekleştirildi Bu amaçla pH 4,0 asetat tamponunda hazırlanan 0,5 mg/mL derişimindeki inulinaz çözeltilerine farklı miktarlarda NaCl ilave edildi ve Bölüm 3.4.1' de anlatıldığı gibi adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirildi. İyonik şiddet değerlerine karşı adsorplanan inulinaz miktarları grafiğe geçirildi.

3.4.5. İnulinaz Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisinin İncelenmesi

Akış hızının inulinaz bağlanması üzerine etkisinin incelenmesi için akış hızı 0,1-4,0 mL/dak aralığında değiştirildi. Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirildi. Akış hızı değerlerine karşı adsorplanan inulinaz miktarları grafiğe geçirildi.

3.4.6. Con A Bağlı Poli (EGDMA) kriyojelden İnulinazın Desorpsiyonu ve Kriyojelin Tekrar Kullanılabilirliğini İncelenmesi

Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması için inulinaz enziminin adsorpsiyonu ardından desorpsiyonu işlemleri gerçekleştirildi. Desorpsiyon ajanı olarak, 0,5 M metil α -D-mannopiranozid kullanıldı. Kriyojele bağlı enzimi sökmek için kriyojelden 5,0 mL metil manopiranozid çözeltisi ile 1 saat boyunca geçirildi. 280 nm'de okunan absorbans değerlerinden ve Eşitlik 3.1'den yararlanarak inulinaz enzimi için % desorpsiyon oranı hesaplandı.

$$\% \text{ desorpsiyon} = \frac{[\text{desorpsiyon ortamına salınan inulinaz miktarı (mg)}]}{\text{adsorplanan inulinaz miktarı (mg)}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

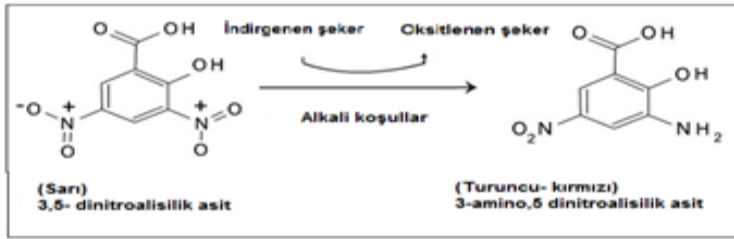
Daha sonra kriyojel sırasıyla Tris-HCl tamponu (0,5 M, pH 8,5), pH 4.5 asetat tamponu ve saf su ile 30 dk yıkandı. Kriyojele bağlı bulunan Con A'nın aktivitesini gösterebilmesi için 1'er saat sırasıyla derişimleri 1,0 mM CaCl₂, 1,0 mM MnCl₂ ve 1,0 mM NaCl çözeltileri kriyojelden geçirilerek kolon dengelendi.

3.5. İnulinaz Aktivitesi Tayini

İnulinaz aktivitesi tayininin temeli, substrat olarak inulin kullanılarak reaksiyon sonucunda açığa çıkan invert şekerin miktarının dinitrosalisilik asit (DNS) metoduyla belirlenmesine dayanmaktadır (Summer,1924).

DNS (dinitro salisilik asit) metodunun esası indirgen şekerlerdeki serbest karbonil gruplarının (C=O) varlığını tespit etmektir. Glukozdaki fonksiyonel

aldehit grubu ile fruktozun fonksiyonel keton gruplarının oksidasyonu aynı alkali koşullar altında 3,5-dinitrosalisilik asitin, 3-amino-5-dinitrosalisilik asite indirgenmesini içermektedir (Şekil 3.2). İndirgenen dinitroaminosalisilik asit boyar maddesinin konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 540 nm'de absorbansın ölçülmesiyle belirlenmektedir.



Şekil.3.3. DNS metodu mekanizması

Serbest inulinaz aktivitesi için örnek tüpüne 0,5 mL inulinaz enzimi (derişimi 0,5 mg/mL) ve 5 mL inulin çözeltisi (pH 4,0 asetat tamponunda ve % 2'lik) kör tüpüne ise 0,5 mL saf su ve 5 mL inulin çözeltisi (pH 4,0 asetat tamponunda ve %2'lik) ilave edilip 3 dakika bekletildi. Daha sonra tüplere 2N derişimindeki 1,0 mL dinitrosalisilik asit eklenip 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Tüpler oda sıcaklığında soğutulduktan sonra üzerlerine 10 mL saf su eklenip 540 nm'de absorbansları okundu. Fruktoz ile hazırlanan standart grafikten yararlanarak serbestlenen fruktozun μmol cinsinden derişimi bulundu. Bir ünite inulinaz, standart koşullarda dakikada 1 μmol indirgen şekeri salan enzim miktarı olarak tanımlandı.

İmmobilize inulinaz aktivitesi için, inulinaz immobilize edilmiş kriyojel kolonundan 5 mL inulin çözeltisi (pH 4,0 asetat tamponunda ve % 2'lik) 3 dakika boyunca geçirildi ve bu çözeltiden 0,5 mL alınıp yukarıda anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri gerçekleştirildi.

Serbest ve immobilize inulinazın aktivitesine pH'ın, sıcaklığın ve substrat derişiminin etkisi incelendi. İlaveten serbest ve immobilize inulinazın ısıl ve depo kararlılıkları ve immobilize inulinazın işlemsel kararlılığı belirlendi.

3.5.1. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize inulinaz aktivitesine pH'ın etkisinin incelenmesi için serbest ve immobilize inulinaz kullanılarak farklı pH değerlerinde (pH 3,0-5,0 asetat tamponu; pH 6,0-8,0 fosfat tamponu; pH 9,0 karbonat tamponu derişimleri 0,2 M) aktivite ölçümleri Bölüm 3.5' de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize inulinaz için aktivite değerleri hesaplandı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek % aktivite değerleri bulundu. pH değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize inulinaz için optimum pH değerleri belirlendi.

3.5.2. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize inulinaz aktivitesine sıcaklığın etkisinin incelenmesi için farklı sıcaklık değerlerinde (4; 15; 25; 45; 55; 65 °C) Bölüm 3.5'de anlatıldığı gibi aktivite ölçümleri yapıldı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek % aktivite değerleri bulundu. Sıcaklık değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize inulinaz için optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

3.5.3. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize inulinaz aktivitesine substrat derişiminin etkisinin incelenmesi için pH 4,0 asetat tamponunda (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,5; 10,0 mol/L) inulin çözeltileri hazırlanarak serbest ve immobilize inulinaz enziminin aktivite ölçümleri yapıldı. Bunun için örnek tüpüne 0,5 mL inulinaz enzimi ve 5 mL inulin çözeltisi, kör tüpüne ise 0,5 mL inulinaz enzimi ve 5 mL pH 4,0 asetat tamponu ilave edilip 3 dakika bekletildi. Daha sonra tüplere 2N derişimindeki 1,0 mL dinitrosalisilik asit eklenip 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Tüpler oda sıcaklığında soğutulduktan sonra üzerlerine 10 mL saf su eklenip 540 nm'de absorbansları okundu. Serbest ve immobilize inulinaz enzimler için hız değerleri hesaplanarak Lineweaver- Burk grafikleri çizildi. Bu grafikten yararlanarak serbest ve immobilize inulinaz için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.5.4. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize inulinazın ısıl kararlılığının incelenmesi için 65°C sıcaklıkta aktivite ölçümleri yapıldı. Serbest ve immobilize inulinaz su banyosunda 240 dakika tutuldu ve belirli aralıklarla aktivite ölçümleri Bölüm 3.5' de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize inulinaz için 65°C sıcaklığında zamana karşı % aktivite değerleri grafiğe geçirildi.

3.5.5. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enzimlerinin Depo Kararlılıklarının İncelenmesi

Serbest ve immobilize inulinazın depo kararlılığının incelenmesi için belli aralıklarla 45 gün boyunca aktivite ölçümleri yapıldı. Bu süre içinde serbest ve immobilize inulinaz buzdolabında +4°C'de saklandı. Serbest ve immobilize inulinaz için aktivite ölçümlerinden zamana karşı % aktivite grafikleri çizildi.

3.5.6. İmmobilize İnulinaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi

İmmobilize inulinazın işlemsel kararlılığının incelenmesi için immobilize enzim ile ard arda 10 kez aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir aktivite ölçümünden sonra immobilize inulinaz pH 4,0 asetat tamponu ile yıkandı ve tekrar aktivite ölçümü için kullanıldı. İmmobilize inulinaz enzimi için döngü sayısına karşı % aktivite değerleri grafiğe geçirildi.

3.6. İnülinin Yüksek Fruktozlu Şurubun Sürekli Sistemde Üretimi ve Bu Şurubun Bileşiminin İnce Tabaka Kromatografisi İle Belirlenmesi

İnulinin enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin analizini belirlemek için ince tabaka kromatografisi kullanıldı.

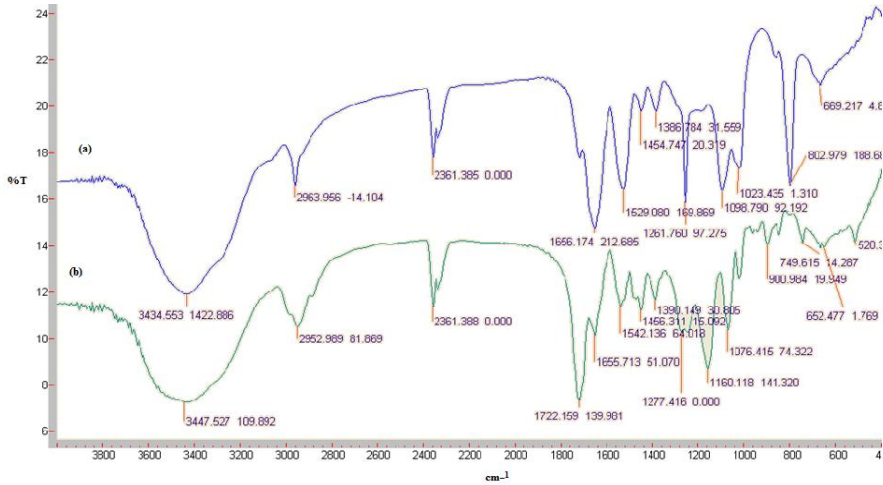
İnce tabaka plaklarının (Alugram® Sil G/UV₂₅₄ 0,2mm, 5x10 cm, Germany) alt kısmından 0,5 cm'lik bir boşluk olacak şekilde çizgi çizildi. Sonra glukoz (1mg/mL), fruktoz (1mg/mL), ve hidroliz edilmiş inulin çözeltisi örneklerinden 10 µL alınarak birer santim aralıklarla plaklara uygulandı ve havada kurutuldu. Hareketli faz için n- bütanol: etanol: su (5: 3: 2) karışımı hazırlandı. İnce tabaka kromatografi tankına (eni:25 cm, boyu 50 cm) (Sigma, Germany) bu karışımdan

15 mL eklendikten sonra kurutulan plaklar tanka yerleştirildi, örneklerin yürütülmesi sağlandı. Yürütme işleminden sonra plaklar havada kurutuldu. Boyama işlemi için sülfirik asit: metanol (1:9) karışımında hazırlanmış % 0,2'lik ornisol kullanıldı. Sonra plaklar üzerine boya çözeltisi püskürtölüp 100°C'lik etüvde 10 dk tutularak renk değişimi gözlemlendi.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin Karakterizasyonu

4.1.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri



Şekil 4.1. (a) Poli(EGDMA), (b) Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojellerin

FTIR spektrumu

Şekil 4.1’de poli (EGDMA) ve Con A bağlı poli (EGDMA) FTIR spektrumları gözlenmektedir. Poli (EGDMA) ve Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelleri yaklaşık 3500 cm^{-1} de $-\text{OH}$ gruplarının gerilme titreşimlerine sahiptir. Con A bir proteindir ve poli (EGDMA)’ya bağlanması ile karakteristik protein IR bantlarının görülmesi beklenmektedir. Çizelge 4.1’de protein ve peptidlerin karakteristik IR bantlarının bir listesi verilmiştir (Kong ve Yu, 2007).

Çizelge 4.1. Proteinlerin ve peptidlerin karakteristik IR bantlarının şematik

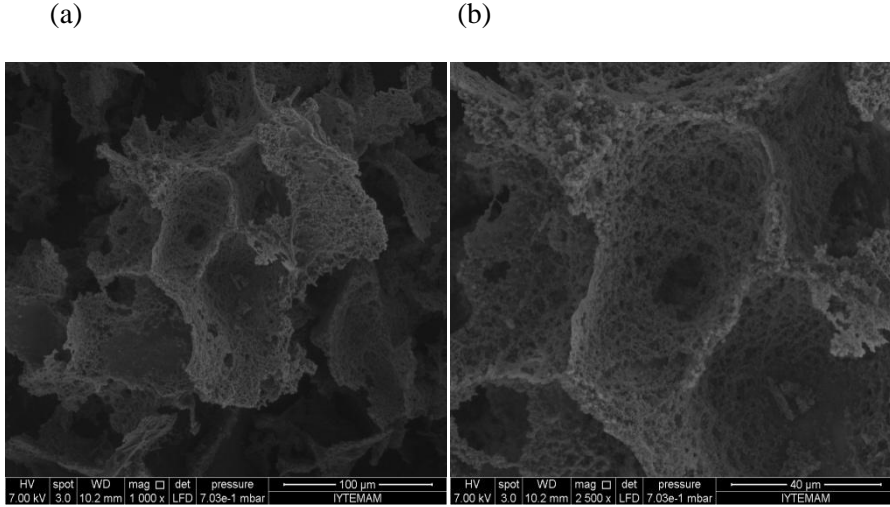
Gösterimi (Kong ve Yu, 2007)

Adlandırma	Yaklaşık frekans (cm ⁻¹)	Açıklama
Amid A	3300	NH gerilme
Amid B	3100	NH gerilme
Amid I	1600-1690	C=O gerilme
Amid II	1480-1575	CN gerilme, NH bükülme
Amid III	1229-1301	CN gerilme, NH bükülme
Amid IV	625-767	OCN bükülme
Amid V	640-800	Düzlem dışı NH bükülme
Amid VI	537-606	Düzlem dışı C=O bükülme
Amid VII	200	İskelet bükülmesi

Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeli için elde edilen FTIR spektrumunda 1656 cm⁻¹ ve 1542 cm⁻¹'de elde edilen bantlar Con A'dan gelen amid I ve amid II bağlarından kaynaklanmaktadır.

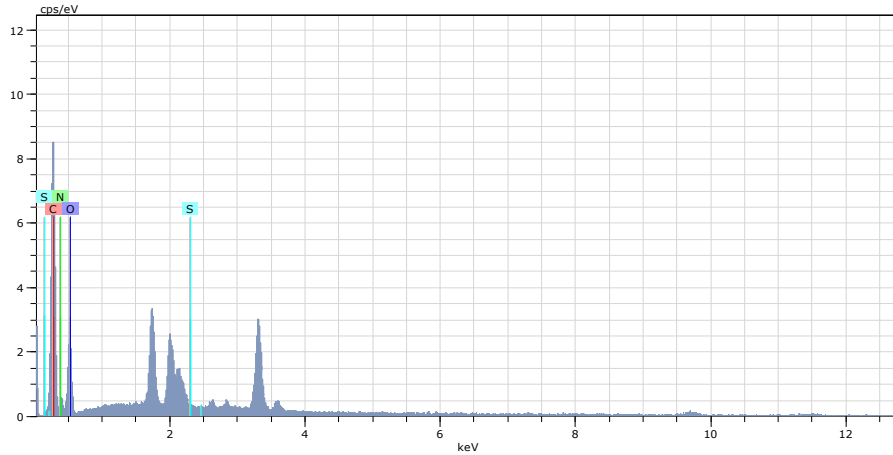
4.1.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

Şekil 4.2'de Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin SEM fotoğrafları görülmektedir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi sentezlenen kriyojeller oldukça gözenekli olup gözenek çapları yaklaşık 50-100 µm'dir. Gözenekler birbirlerine bağlı olup, gözenek duvarları incedir. Elde edilen SEM fotoğraflarından kriyojeller üzerinde makrogözeneklerin yoğun olarak bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.2. Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojellerinin SEM fotoğrafları (a ve b)

4.1.3. EDX (Enerji Dağılımlı X- ışını) Analizi



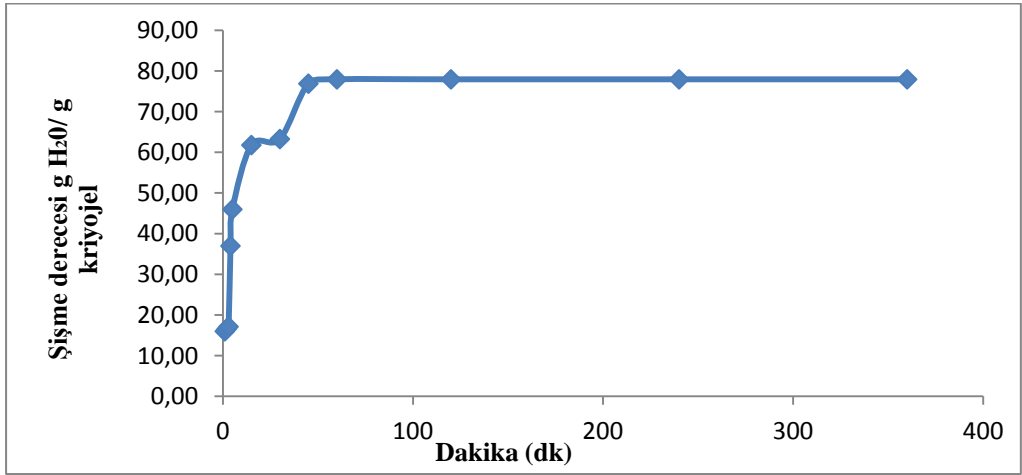
Şekil 4.3. Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin EDX spektrumu

Sentezlenen poli (EGDMA) kriyojeline Con A, glutaraldehit aktivasyonu ile kovalent olarak bağlanmıştır. Kriyojele bağlanan Con A miktarı spektrofotometrik olarak 280 nm’de absorbans azalması ile belirlenmiş ve 37,97 mg/g kriyojel olarak hesaplanmıştır. Ayrıca Con A bağlanmasının bir göstergesi olarak SEM’nda EDX analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen spektrum Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Con A taşımayan poli (EGDMA) kriyojelinin kimyasal

yapısında N ve S atomları bulunmamaktadır. Kriyojel yapısına Con A'nın katıldığı N ve S atomlarının varlığı ile gösterilmiştir.

4.1.4. Şişme Analiz Ölçümleri

Sentezlenen Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelleri süngerimsi, opak ve elastiktir. Sıkıldıklarında gözeneklerindeki suyu kolayca bırakabilirler. Kriyojeller sulu ortama bırakıldıklarında hızlı bir şekilde su alarak şişerler ve denge şişme derecesine ulaşırlar. Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin zamana bağlı şişme oranları Şekil 4.4' de gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin şişme derecesi 77,95 g H₂O /g kriyojel olarak bulunmuştur. Yüksek su tutma kapasitesi kriyojelin hidrofilik karakterinin bir göstergesidir. Ayrıca yüksek şişme derecesine sahip kriyojellerin aynı zamanda yüksek makrogözenekliliğe sahip olduğu da bilinmektedir.



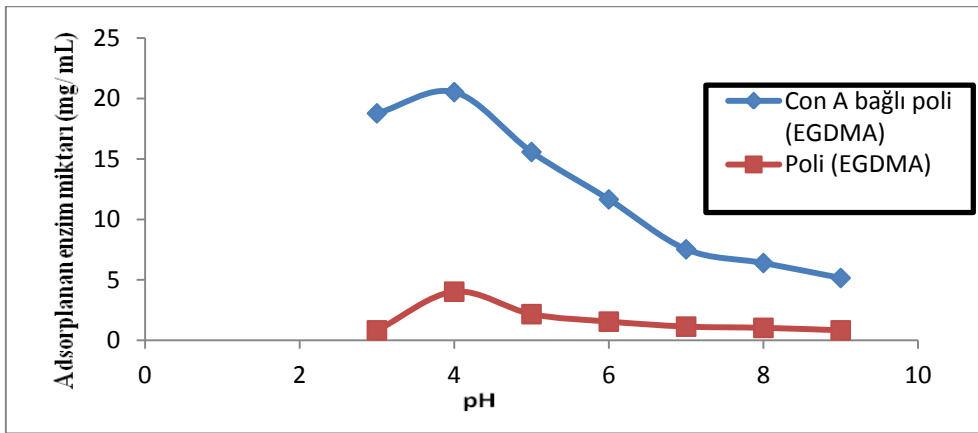
Şekil. 4.4. Con A Bağlı Poli (EGDMA) kriyojelinin şişme oranı Sıcaklık: 25°C.

4.2. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojeline İnulinaz Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi

4.2.1 İnulinaz Enzimi Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeline inulinaz adsorpsiyonuna pH'ın etkisi pH 3.0-9.0 aralığında incelenmiştir. Adsorpsiyona pH'ın etkisi Şekil 4.5' de gösterilmiştir. Maksimum inulinaz adsorpsiyonu pH 4.0'de görülmüştür. Literatürde *Aspergillus niger* inulinaz enzimlerinin izoelektrik noktalarının pH 4.0-5.4 aralığında ve ligand olarak kullanılan Con A'nın izoelektrik noktasının

pH 4.5-5.5 aralığında olduğu rapor edilmiştir (Singh ve Gill, 2006, Sumner ve Howell, 1936). Proteinlerin izoelektrik noktalarında net yükü sıfırdır ve genellikle maksimum protein adsorpsiyonu onların izoelektrik noktalarında gözlenir. Şekil 4.5’ de görüldüğü gibi pH 4.0’de Con A bağı poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyonu 20 mg/g iken, Con A taşımayan poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyonu 4 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Bu sonuç ligand olarak kullanılan Con A’nın inulinaz enzimi ile spesifik olarak etkileştiğini göstermektedir. Bu spesifik etkileşmeye inulinaz enziminin karbonhidrat grupları katkıda bulunabilir.

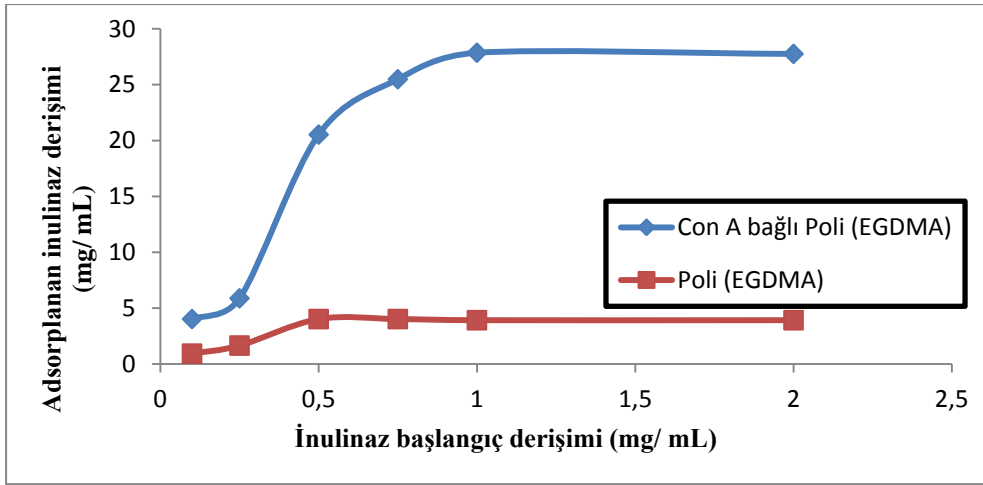


Şekil 4. 5. Con A bağı poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyonuna pH’ın etkisi. Başlangıç inulinaz derişimi: 0,5 mg/mL; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25°C

4.2.2. İnulinaz Enzimi Adsorpsiyonuna İnulinaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.6 poli (EGDMA) ve Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojellerine inulinaz adsorpsiyonuna inulinaz başlangıç derişiminin etkisini göstermektedir. Adsorpsiyon kapasitesi inulinaz derişimine bağılı olarak artmış ve 1 mg/mL inulinaz derişiminde bir plato değerine ulaşmıştır. Bu sonuç inulinaz glikoproteinin karbonhidrat grupları ile Con A'nın sakkarit bağlama bölgeleri arasındaki spesifik etkileşimi göstermektedir. Maksimum inulinaz adsorpsiyonu 1 mg/mL inulinaz derişiminde 27,85 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Bu inulinaz derişimindeki non-spesifik adsorpsiyon ise oldukça düşük bir değer olarak bulunmuştur (3,92 mg/g polimer).

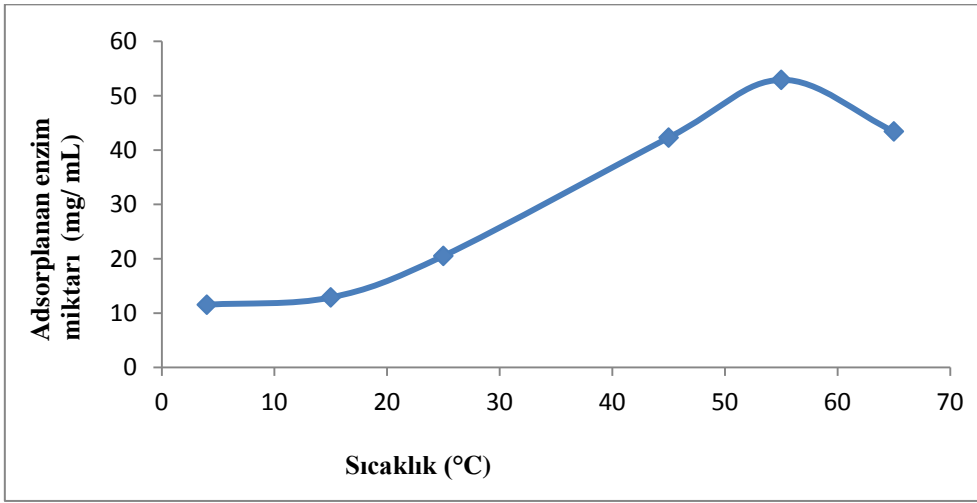
Kovaleva vd. (2009), tarafından yapılan bir çalışmada inulinaz adsorpsiyonu gerçekleştirilmiş ve adsorpsiyon kapasitesi 9 mg/ g taşıyıcı olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6. Con A bağılı poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyonuna inulinaz derişiminin etkisi. pH: 4,0; inkübasyon süresi 2 saat; sıcaklık: 25°C

4.2.3. İnulinaz Enzimi Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

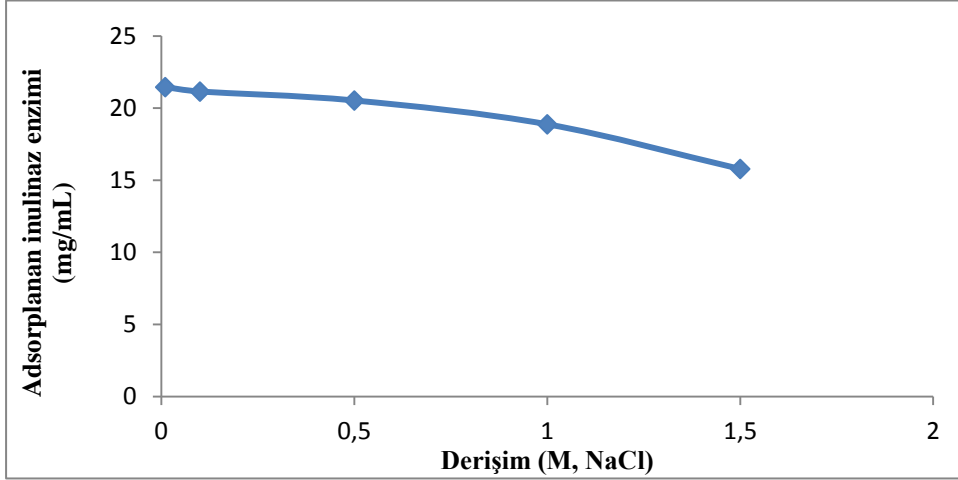
Şekil 4.7, Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeline inulinaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini göstermektedir. Sıcaklığın 55°C'e çıkmasıyla gram kriyojel başına adsorplanan inulinaz miktarı 52,92 mg/g'a kadar artmıştır. Sıcaklığa bağlı olarak adsorpsiyon görülen bu artış proteinin konformasyonunda meydana gelen değişikliğe bağlı olarak ligand ve inulinaz enzimi arasındaki spesifik etkileşimlerin artmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.7. Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Başlangıç inulinaz derişimi: 0,5 mg/mL; pH: 4,0; inkübasyon süresi: 2 saat

4.2.4. İnulinaz Enzimi Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi

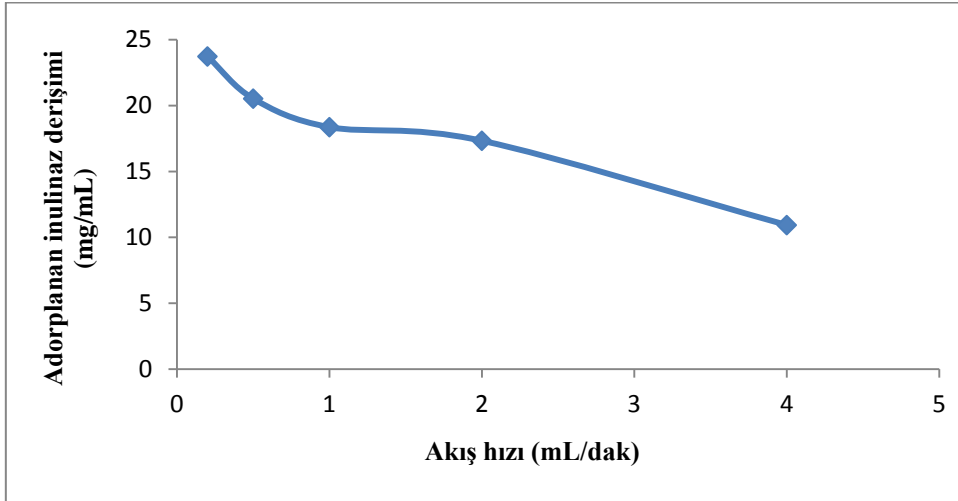
İnulinaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi farklı derişimlerde NaCl çözeltileri kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.8, iyonik şiddetin artışına bağlı olarak Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyon kapasitesinin azaldığını göstermektedir. İyonik şiddet artışına bağlı olarak adsorpsiyon kapasitesinde görülen bu azalma, Con A bağlı poli (EGDMA) ve inulinaz molekülleri arasındaki itici elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanabilir. Adsorpsiyon ortamındaki tuz derişimi arttırıldığında immobilize Con A molekülleri arasındaki hidrofobik etkileşimler baskın hale gelir ve inulinaz enzimi ile etkileşecek Con A molekülü sayısı azalır (Berele, 2005).



Şekil 4.8. Con A bağı poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Başlangıç inulinaz derişimi: 0,5 mg/mL; pH: 4,0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25°C

4.2.5. İnulinaz Enzimi Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisinin İncelenmesi

Akış hızının inulinaz adsorpsiyonuna etkisi şekil 4.9'da görülmektedir. Kromatografik akış hızının 0,5 mL/dak'dan 4 mL/dak'ya arttırılması ile adsorpsiyon kapasitesi 20,53 mg /g polimer kriyojelden 10,93 mg/g polimer kriyojele düşmüştür. Yüksek akış hızlarında inulinaz enziminin kriyojel ile etkileşme süresinin kısılması ve uygun pozisyonda etkileşme olasılığının azalması nedeniyle adsorpsiyon kapasitesi azalmış olabilir (Babac vd., 2006).



Şekil 4.9. Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyonuna akış hızının etkisi

4.2.6. Adsorpsiyon izotermeleri

Adsorpsiyon izotermeleri Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeli üzerine inulinaz adsorpsiyonunun özelliklerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Langmuir izoterm modeli, eşit ulaşılabilir adsorpsiyon bölgeleri, tek tabakalı yüzey kaplama ve adsorplanan türler arasında etkileşim olmaması gibi homojenite varsayımı temeline dayanmaktadır (Mohann vd., 2006, Uygun, 2008). Bu model aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

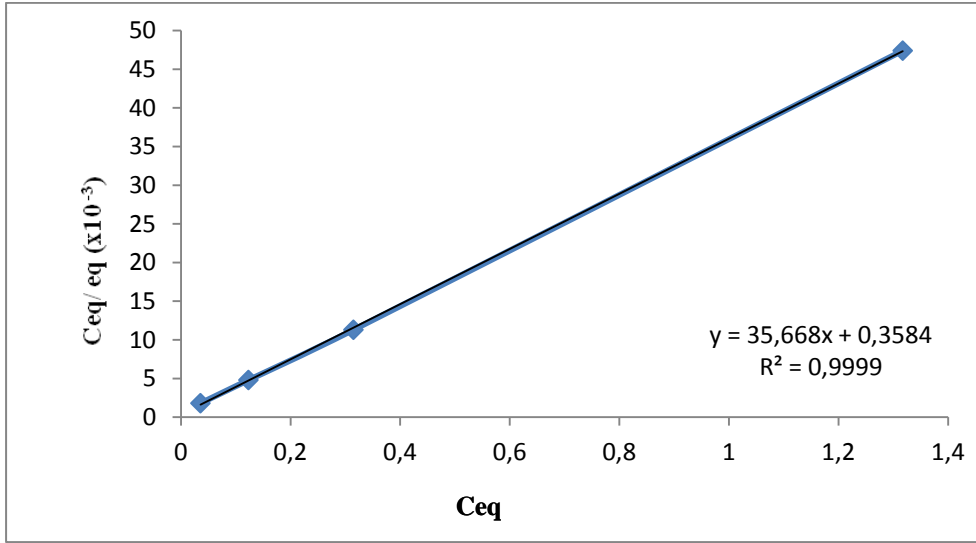
$$q_{eq} = q_{max} \cdot b \cdot C_{eq} / (1 + b \cdot C_{eq}) \quad \text{Eşitlik:4.1}$$

Burada q_{eq} , denge anında adsorbana bağlı inulinaz derişimi (mg/g); C_{eq} , çözeltideki denge inulinaz derişimi (mg/mL); b , Langmuir sabiti (mg/mL, adsorpsiyon serbest enerjisi veya net entalpi ile ilgili bir sabittir) ve q_{max} , maksimum inulinaz adsorpsiyon kapasitesidir (mg/g). Bu eşitlik aşağıdaki gibi linerleştirilebilir:

$$C_{eq}/q_{eq} = 1/q_{max} \cdot b + C_{eq}/q_{max} \quad \text{Eşitlik: 4.2}$$

C_{eq} 'a karşı C_{eq}/q_{eq} grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun kesimi $1/q_{max} \cdot b$ 'yi, eğimi $1/q_{max}$ 'ı verir.

Şekil 4.10'ta Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi görülmektedir. Grafiğin eğimi ve kesiminden maksimum inulinaz adsorpsiyon kapasitesi (q_{max}) 28,01 mg/g, Langmuir sabiti (b) 0,011 mg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10. Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi. pH:4,0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25°C

Freundlich izoterm modeli, genellikle heterojen adsorpsiyon sistemlerine uygulanır. Adsorplanan maddenin miktarı, tüm bölgelerdeki adsorpsiyonun toplamıdır. Freundlich izotermi geri dönüşümlü adsorpsiyonu tanımlar ve tek tabakanın oluşumu ile sınırlanabilir (Proctor ve Toro-Vazquez, 1996, Uygun, 2008).

$$q_{eq} = K_f \cdot (C_{eq})^{1/n}$$

Eşitlik:4.3

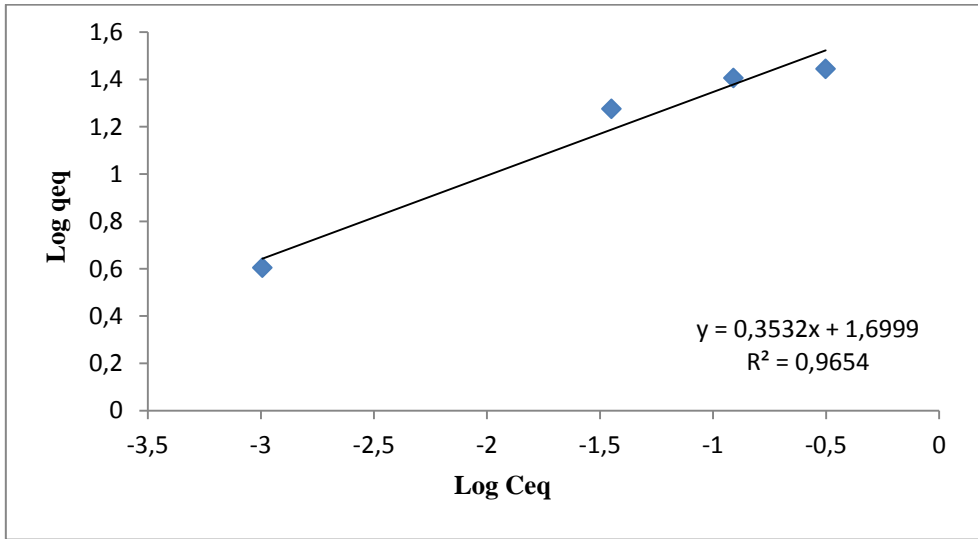
Burada q_{eq} , denge anında adsorpsiyonun birim kütlesi başına adsorplanan inulinaz miktarı (mg/g); C_{eq} , çözeltideki inulinaz denge derişimi (mg/mL); K_f , adsorbanın bağıl adsorpsiyon kapasitesi sabiti (mg/g); $1/n$, adsorpsiyon şiddeti sabitidir. Bu eşitlik aşağıdaki gibi linerleştirilebilir:

$$\log q_{eq} = \log K_f + 1/n \cdot \log C_{eq}$$

Eşitlik:4.4

$\log C_{eq}$ 'e karşı $\log q_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun eğimi $1/n$ 'i, kesimi $\log K_f$ 'yi verir (Uygun,2008).

Şekil 4.11'de Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermi görülmektedir. Grafiğin eğiminden $1/n$ değeri 2,83 ve kesiminden ise K_f değeri 1,66 mg/g olarak bulunmuştur. $1/n$ değerinin 1'den büyük olması adsorpsiyonun istemli olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.11. Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinin inulinaz adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermi. pH: 4,0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık:25°C

Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'deki adsorpsiyon izotermi grafiklerinin korelasyon katsayıları (0,9999; 0,9654) karşılaştırıldığında deneysel verilerin langmuir izotermine uygunluğu görülmektedir.

4.2.7. Con A Bağlı Poli (EGDMA) Kriyojelinin İnulinaz Enziminin Desorpsiyonu ve Kriyojelin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Bir destek materyalinin en önemli özelliklerinden biri tekrar kullanılabilir olmasıdır. Bu çalışmada sentezlenen desteğin tekrar kullanılabilirliğini araştırmak için inulinaz enziminin Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeline

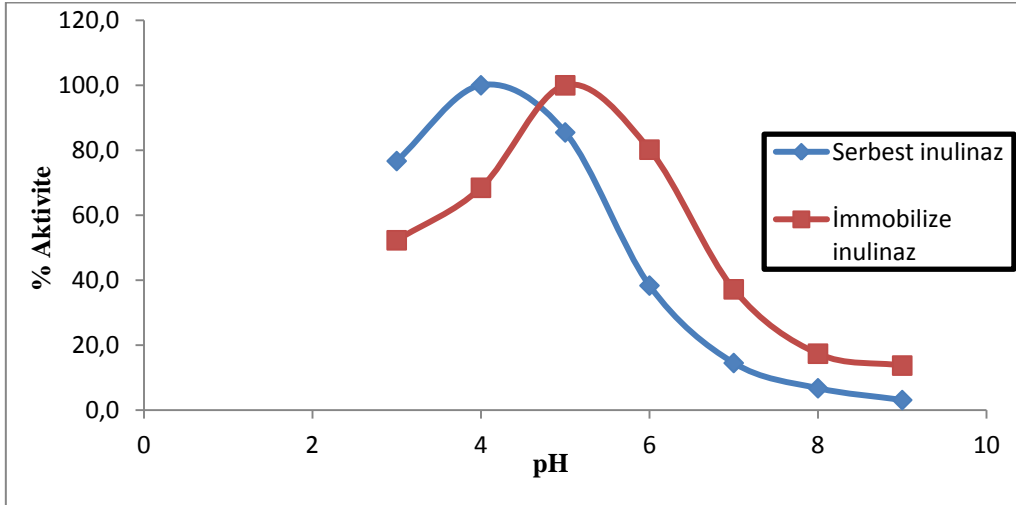
adsorpsiyon ve ardından desorpsiyonu işlemleri gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon ajanı olarak 0,5 M α -D-mannopiranozid kullanılması ile desorpsiyon oranı % 90,86 olarak bulunmuştur. İlâveten aynı kriyojel materyalinin 50 kez kullanılması ile adsorpsiyon kapasitesine önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

4.3. İnulinaz Aktivitesi Ölçümü

4.3.1. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enziminin Aktivitesine pH Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize inulinaz aktivitesine pH'ın etkisi pH 3,0-9,0 aralığında incelenmiştir. Aktivite ölçümleri inulin substratı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada serbest enzimin optimum pH'ı 4,0, immobilize enzimin optimum pH'ı 5,0 olarak bulunmuştur. İmmobilize enzimin serbest enzime göre daha kararlı yapı gösterdiği yani belirtilen pH değerlerinde daha yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Cattorini vd. (2009), tarafından yapılan bir çalışmada *Aspergillus niger* inulinaz enzimi çeşitli desteklere immobilize edilmiş ve serbest ve immobilize inulinaz için optimum pH 4,5 olarak bulunmuştur.

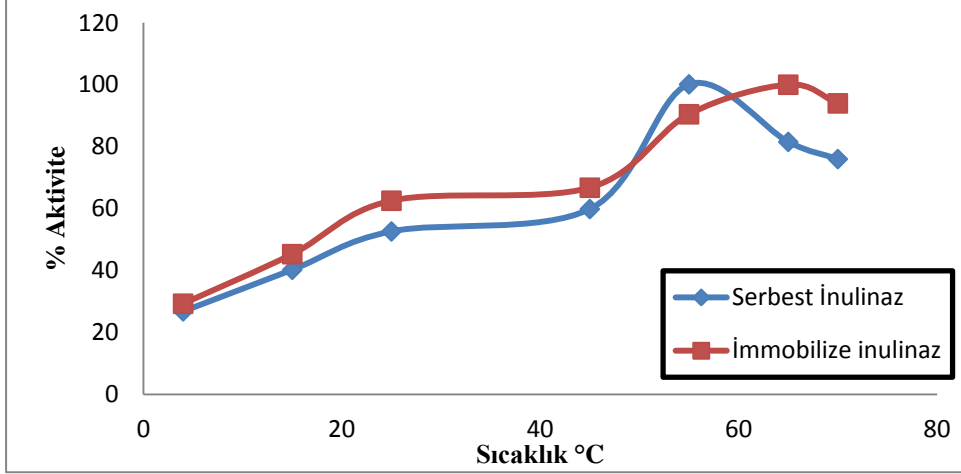


Şekil 4.12. Serbest ve Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeline immobilize edilmiş inulinaz aktivitesine pH'ın etkisi

4.3.2. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize inulinaz enzimlerinin aktivitesi 4-65°C arasında 6 farklı sıcaklıkta incelenmiş ve gösterilmiştir. Elde edilen grafiklerden serbest enzim için optimum sıcaklık 55°C iken, immobilize enzim için 65°C olarak bulunmuştur. Bu durum immobilize enzimin daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabileceğini ve endüstriyel değerinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

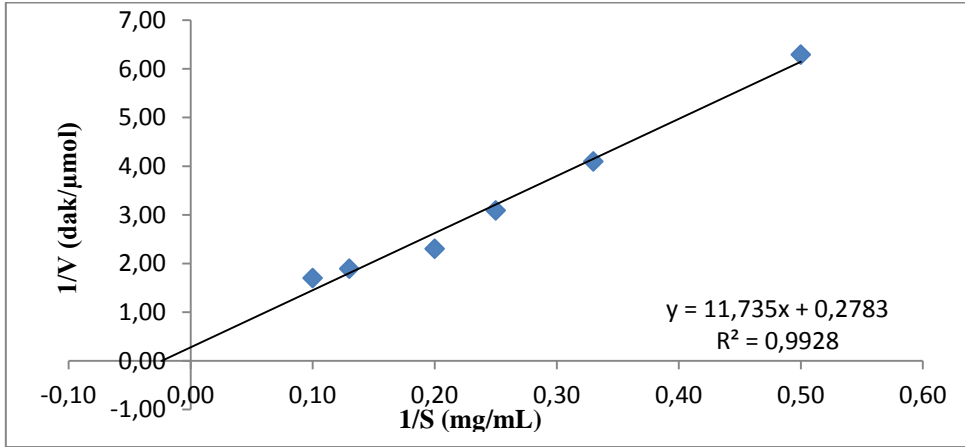
Santa vd. (2011) tarafından yapılan bir *A. niger* inulinaz enzimi immobilizasyonu çalışmasında serbest ve immobilize inulinaz için otimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur.



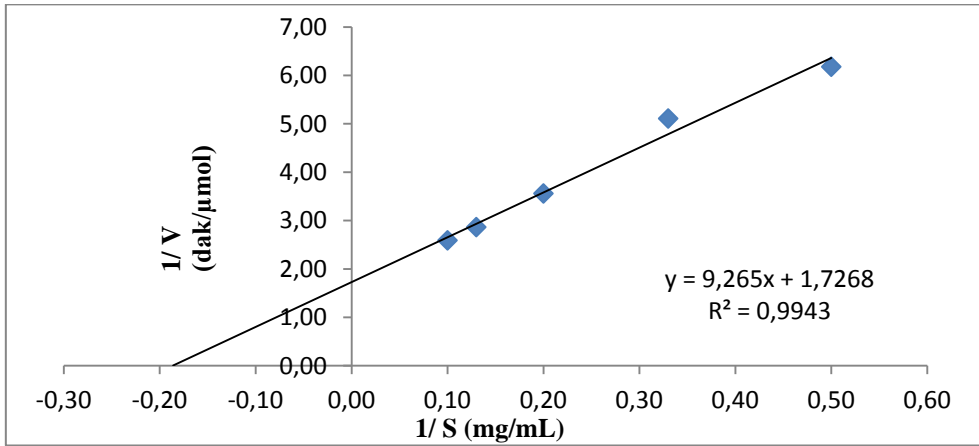
Şekil 4.13. Serbest ve Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeline immobilize edilmiş inulinaz aktivitesine sıcaklığın etkisi

4.3.3. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Enzim katalizinde bir enzimin kinetik parametrelerini belirlemek o enzimin etkinliğinin ifadesi açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmada serbest ve immobilize inulinaz enzimlerinin kinetik sabitleri olan Michaelis sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) inulin substratı kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.14'de ve Şekil 4.15'de serbest ve immobilize inulinaz enzimleri için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri, Çizelge 4.1' de ise bu grafikler kullanılarak tespit edilen kinetik sabitler görülmektedir.



Şekil 4.14. Serbest inulinaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.15. Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeline immobilize edilmiş inulinaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

Yapılan bu çalışmada serbest ve immobilize inulinaz için K_m değerleri sırasıyla 41,7 mg/ mL ve 5,38 mg/ mL olarak bulunmuştur. Santa vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada serbest ve immobilize inulinazın K_m değerleri 40 g/ L ve 91 g/L olarak bulunmuştur.

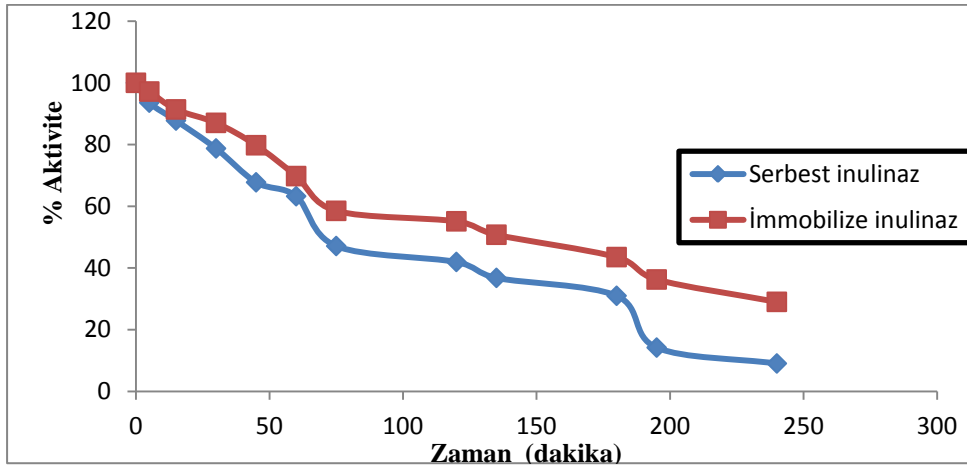
Çizelge 4.2. Serbest ve Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeline immobilize edilmiş inulinaz enzimi için kinetik sabitler

Enzim	K_m (mg/mL)	V_{max} (μ mol/dak)	k_{cat} (dak^{-1})
Serbest inulinaz	41,7	3,59	1919
İmmobilize inulinaz	5,38	0,58	310

Bir enzimin immobilizasyonla davranışını tahmin etmede k_{cat} değeri (turnover sayısı), V_{max} ve K_m değerlerinden daha yararlıdır. Bu çalışmada elde edilen k_{cat} değerleri serbest ve immobilize inulinaz için incelendiğinde serbest inulinaz enziminin k_{cat} değeri 1919 dak^{-1} iken immobilize inulinaz enziminin k_{cat} değeri 310 dak^{-1} olarak hesaplanmıştır. k_{cat} değerindeki bu düşüş, enzimin birim zamanda ürüne çevirdiği molekül sayısında azalma olduğunu göstermektedir. Bu durum immobilize enzimler için genellikle beklenen bir durumdur.

4.3.4. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enzimlerinin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

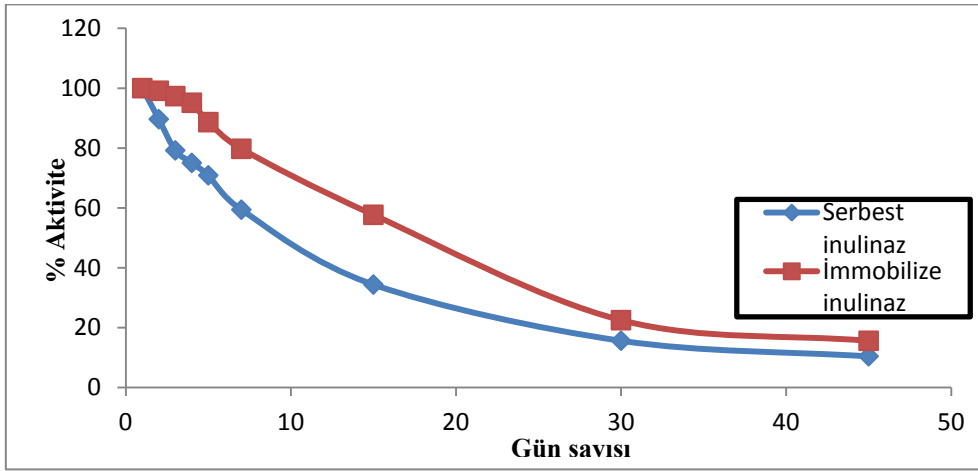
Serbest ve immobilize inulinazın kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 4.16'da görülmektedir. 65°C ' de 240 dakika boyunca ısıyla muamele edildikten sonra serbest inulinaz başlangıç aktivitesinin % 9,03'ünü korurken, immobilize inulinaz % 29'unu korumuştur. İmmobilize inulinazın yüksek sıcaklıklarda sergilediği kararlılık onun endüstriyel açıdan önemini arttırmaktadır.



Şekil 4.16. Serbest ve Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeline immobilize edilmiş inulinaz aktivitesinin 65°C’ de zamana bağlı olarak değişimi

4.3.5. Serbest ve İmmobilize İnulinaz Enzimlerinin Depo Kararlılığının İncelenmesi

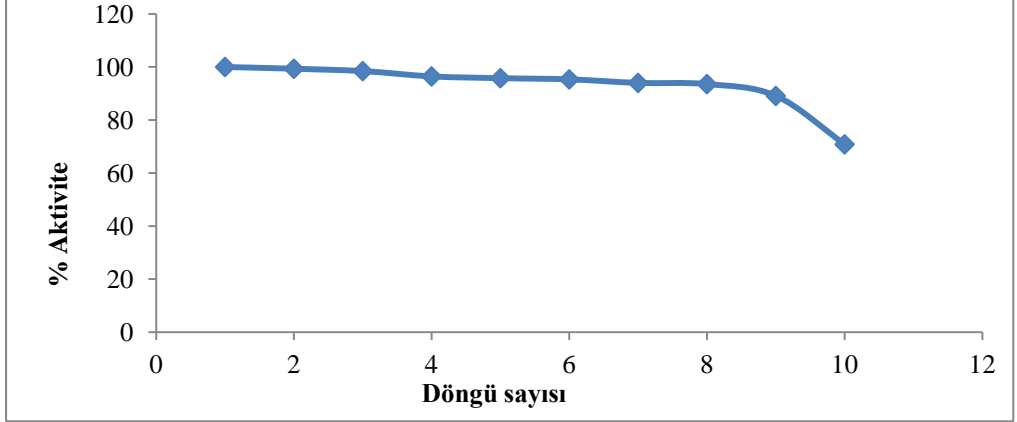
Serbest ve immobilize inulinaz enzimleri 4°C’de 45 gün boyunca saklanmış ve aktivite ölçümleri yapılarak depo kararlılıkları incelenmiştir. Serbest inulinaz enzimi 15. günün sonunda aktivitesinin % 34’ünü korurken immobilize inulinaz % 57’sini korumuştur (Şekil 4.17). Bu sonuç immobilize inulinazın serbest inulinaza göre daha iyi depo kararlılığına sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.17. Serbest ve Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeline immobilize edilmiş inulinaz enzimlerinin depo kararlılığı. Sıcaklık 4°C

4.3.6. İmmobilize İnulinaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi

İmmobilize enzimlerin işlemsel kararlılığı, seçilen taşıyıcının ya da metodun etkinliğini değerlendirmede oldukça önemlidir. Bu çalışmada immobilize inulinaz enziminin 25°C’de ard arda aktivite ölçümü yapılarak işlemsel kararlılığı incelenmiştir. İmmobilize enzim 8 döngüden sonra aktivitesinin 94’ünü ve 10 döngüden sonra aktivitesinin % 70’ni korumuştur (Şekil 4.18).

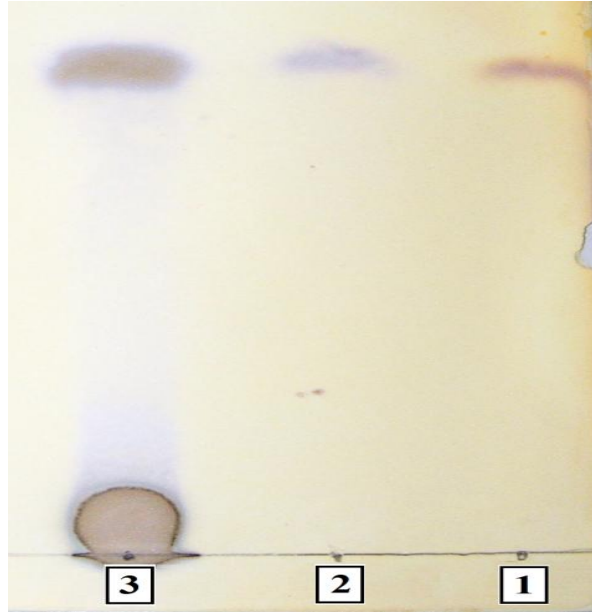


Şekil 4.18. Con A bağlı poli(EGDMA) kriyojeline immobilize edilmiş inulinaz enziminin işlemsel kararlılığı

4.4. İnülininden Yüksek Fruktozlu Şurubun Sürekli Sistemde Üretimi Ve Bu Şurubun Bileşiminin İnce Tabaka Kromatografisi İle Belirlenmesi

Sürekli sistemlerdeki olası substrat ve/veya ürün inhibisyonlarının üstesinden gelmede, sürekli sistem bir alternatiftir. İnulinaz immobilize edilmiş Con A bağlı kriyojellerin kullanılabilirliğinin bir ölçüsü olarak hazırlanan bu kriyojellerden 25 °C'de % 2'lik 5 mL inulin çözeltisi 5 dakika boyunca geçirilerek açığa çıkan fuktoz birimlerinin varlığı kalitatif olarak ince tabaka kromatografisi ile gösterildi (Şekil 4.19). Standart olarak glukoz ve fruktoz çözeltileri kullanıldı. İmmobilize inulinazın kullanılmasıyla parçalanmış inulin hidrolizi sonucunda açığa çıkan fruktoz moleküllerinin miktarı daha önce bahsedildiği şekilde DNS metodu ile belirlendi ve 5 dakika hidroliz sonucu açığa çıkan fruktoz miktarı 0,23 mg/mL olarak bulundu.

Gill vd. (2006), tarafından yapılan bir çalışmada Con A bağlı silika kürelere inulinaz enzimi immobilize edilmiş ve inulin hidrolizi için kullanılmıştır. Elde edilen ürün (fuktoz) miktarı 3,4 g/ L/ saat olarak bulunmuştur.



Şekil 4.19. İmmobilize inulinaz ile inulinin hidrolizinden elde edilen ürünlerin ince tabaka kromatografisi analizi. 1: glukoz standardı; 2:fruktoz standardı; 3: inulinin hidrolizi ile elde edilen ürün

Singh vd (2007), tarafından yapılan bir inulinaz immobilizasyonu çalışmasında inulinin 4 saat hidrolizi sonucunda serbestlenen fruktoz miktarı 39,2 g/L olarak bulunmuştur.

SONUÇ

- ❖ Bu çalışmada, süper makro gözenekli kriyojel yapıları, monomer olarak EGDMA ve çapraz bağlayıcı olarak MBAAM kullanılarak radikal kriyopolimerizasyonu ile sentezlenmiş ve bu kriyojele glutaraldehit aktivasyonu ile Con A kovalent olarak bağlanmıştır.
- ❖ Sentezlenen kriyojellerin süngerimsi, opak ve elastik olduğu bulunmuştur. Kurutulmuş kriyojellerin sulu ortama konulduklarında hızlı bir şekilde şiştiği görülmüş ve denge şişme derecesi 77, 95 g H₂O/g kriyojel olarak hesaplanmıştır.
- ❖ FTIR ve EDX analizleri ile Con A'nın poli (EGDMA) kriyojelinin yapısına katıldığı görülmüştür. Kriyojel yapılarına bağlanan Con A miktarı spektrofotometrik olarak 37,97 mg /g kriyojel olarak hesaplanmıştır.
- ❖ SEM analizleri ile sentezlenen kriyojel yapılarının oldukça gözenekli ve gözenek çaplarının yaklaşık 50 µm olduğu bulunmuştur.
- ❖ Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeline maksimum inulinaz adsorpsiyonu 1,0 mg/mL inulinaz derişiminde ve pH 4,0 asetat tamponunda 27,85 mg/g olarak bulunmuştur.
- ❖ Poli (EGDMA) kriyojeline non-spesifik inulinaz adsorpsiyonu 3,92 mg/g olarak bulunmuştur.
- ❖ Sıcaklığın 25 °C'den 55 °C'ye artması ile Con A bağlı kriyojellere adsorplanan inulinaz miktarı 52,92 mg/g'a kadar artmıştır.
- ❖ İyonik şiddetin artmasıyla Con A bağlı kriyojellerin inulinaz adsorpsiyon kapasitesi azalmaya başlamıştır.
- ❖ Kromatografik akış hızınının 0,5 mL/dak'dan 4 mL/dak'ya arttırılması ile Con A bağlı kriyojellerin inulinaz adsorpsiyon kapasitesi azalmıştır.
- ❖ Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojeline inulinaz adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermi (Langmuir ve Freundlich) incelendiğinde, Langmuir adsorpsiyon izotermi bu lektin afinite adsorpsiyonu sistemine uygun olduğu görülmüştür.
- ❖ Con A bağlı poli (EGDMA) kriyojelinden inulinaz enziminin desorpsiyonu, desorpsiyon ajanı olarak 0,5 M'lık α-D-mannopiranozid kullanılarak araştırılmıştır. Desorpsiyon oranı % 90,86 olarak bulunmuş ve 50 adsorpsiyon- desorpsiyon adımından sonra adsorplanan inulinaz miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir.

- ❖ Serbest ve immobilize inulinaz aktivitesine pH'nin etkisi pH 3,0-9,0 aralığında incelenmiştir. Serbest inulinazın optimum pH'ı 4,0, immobilize inulinazın optimum pH'ı 5,0 olarak bulunmuştur.
- ❖ Serbest ve immobilize inulinaz aktivitesine sıcaklığın etkisi 4-65°C aralığında incelenmiştir. Serbest inulinazın optimum sıcaklığı 55°C, immobilize inulinazın ise optimum sıcaklığı 65°C olarak belirlenmiştir.
- ❖ Serbest ve immobilize inulinazın kinetik sabitlerinden olan V_{max} değerleri sırasıyla 3,59 $\mu\text{mol/dak}$ ve 0,58 $\mu\text{mol/dak}$, K_m değerleri ise sırasıyla 41,7 mg/mL ve 5,38 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Ayrıca serbest ve immobilize inulinaz için k_{cat} değerleri sırasıyla 1919 dak^{-1} ve 310 dak^{-1} olarak bulunmuştur.
- ❖ Serbest ve immobilize inulinazın ısıl kararlılığı 65°C'de incelenmiş ve immobilize inulinazın ısıl kararlılığının daha yüksek olduğu görülmüştür.
- ❖ Serbest ve immobilize inulinazın depo kararlılıkları incelendiğinde 15. günün sonunda serbest inulinazın başlangıç aktivitesinin %34'ünü koruduğu, immobilize inulinazın ise başlangıç aktivitesinin %57'sini koruduğu bulunmuştur.
- ❖ İmmobilize inulinazın işlemsel kararlılığı incelendiğinde aynı immobilize enzim ard arda 10 kez kullanıldığında aktivitesinde sadece %30'luk bir kayıp görülmüştür.
- ❖ Con A bağlı kriyojellere immobilize edilmiş inulinaz sistemi kullanılarak sürekli sistemde inulin hidrolizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen yüksek fruktoz içeriği ince tabaka kromatografisi ile gösterilmiştir. Elde edilen fruktoz miktarı ise 5 dakika hidroliz sonucu 0,23 mg/mL olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu sonuçlar bu tezde hazırlanan Con A bağlı kriyojel yapılarının, inulin hidrolizi ile yüksek fruktozlu şurup eldesinde başarılı bir şekilde kullanılabilirdiğini göstermektedir. Hazırlanan bu sürekli sistem endüstriyel bakımdan oldukça değerlidir ve geniş skalalı işlemlere kolayca uygulanabilir.

KAYNAKLAR

- Akkaya, H., Uzun, L., Altıntaş, E.B., Candan, F., 2009. Concanavalin a immobilized monosize poly (glycidyl Methacrylate) beads for use in yeast invertase adsorption. **Journal of Macromolecular Science**, 46: 232-239.
- Alkan, H., Bereli, N., Baysal, Z., Denizli, A., 2009. Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly (hydroxyethyl methacrylate) cryogel. **Biochemical Engineering Journal**, 45: 201-280.
- Aniulyte, J., Liesiene, J., Niemeyer, B., 2006. Evaluation of cellulose-based biospecific adsorbents as a stationary phase for lectin affinity chromatography. **Journal of Chromatography**, 831: 24-30.
- Ansari, A.S., Husain, Q., 2010. Lactose hydrolysis by β galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode. **Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic**, 63: 68-74.
- Antczak- Szczesna, M., Antczak, T., Bielecki, S., 2004. Stability of extracellular proteinase productivity by *Bacillus subtilis* cells immobilized in PVA-cryogel. **Enzyme and Microbial Technology**, 34: 168-176.
- Aslyüce, S., Bereli, N., Uzun, L., Onur, M.A., Say, R., Denizli, A., 2010. Ion-imprinted supermacroporous cryogel, for in vitro removal of iron out of human plasma with beta thalassemia. **Separation and Purification Technology**, 73: 243-249.
- Babac, C., Yavuz, H., Galaev, Y.I., 2006. Binding of antibodies to concanavalin A- modified monolithic cryogel. **Reactive and Functional Polymers**, 66:1263-1271.
- Bakalova, R., Ohba, H., 2003. Purification of normal lymphocytes from leukemic T-cells by lectin- affinity adsorbents- correlation with lectin-cell binding. **Cancer Letters**, 192:59-65.
- Bereli, N., Akgöl, S., Yavuz, H., Denizli, A., 2005. Antibody purification by concanavalin a affinity chromatography. **Journal of Applied Polymer Science**, 97: 1202-1208.

- Bucur, B., Danet, A.F., Marty, Jean-Louis.,2005. Cholinesterase immobilisation on the surface of screen-printed electrodes based on concanavalin A affinity. **Analytica Chimica Acta**,530: 1-6.
- Brena, B.M. and Batista- Viera, F. 2006. Immobilization of enzymes. In: Immobilization of Enzymes and Cells Guisan, J.M. (eds). Humana Pres Inc., pp. 15-30, Totowa, New Jersey.
- Catana, R., Ferreira, B.S., Cabral, J.M.S., Fernandes, P.,2005. Immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis. **Food Chemistry**, 91:517-520.
- Catana, R., Eloy, M., Rocha, J.R., Ferreira, B.S., Cabral, J.M.S., Fernandes, P., 2007. Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, 101: 260-266.
- Cattorini, S., Marques, M.P.C., Carvalho, F., Chheub, V., Cabral, J.M.S., Fernandes, P., 2009. Lentikat®- based biocatalysts: Effective tools for inulin hydrolysis. **Chem Biochemist Engineering Q**, 23: 429-434.
- Cao, L. 2005. Carrier-Bound Immobilized Enzymes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Chi, Z., Chi, Zhe., Zhang, T., Liu, Guanglei., 2009. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. **Apply Microbiol Biotechnology**, 82: 211-220.
- Coghetto, C. C., Scherer, R.P., Silva, F.M., Golunski, S., Pergher, S.B.C., Oliveira, D., Oliveira, J.V., Treichel, H., 2012. Natural montmorillonite as support for the immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 1: 284-289.
- Cruz-Guerrero, A.E., Olvera, J.L., Garcia-Garibay, M., Gomez-Ruiz, L., 2006. Inulinase-hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. Isolated from aguamiel and pulque. **World Journal Microbiol Biotechnology**, 22: 115-117

- Dainiak, M.B., Galaev, I.Y., Kumar, A., Plieva, F.M., Mattiasson, B., 2007. Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 106: 101-127.
- Daniak, M.B., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2006. Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells. **Journal of Chromatography A**, 1123: 145-150.
- Doretto, L., Ferrara, D., Lora, Silvano., Schiavon, Franco., Veronese, F.M., 2000. Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly (ethylene glycol)-modified choline oxidase in apoly (vinyl alcohol) cryogel membrane. **Enzyme and Microbial Technology**, 27: 279-285.
- Elnashar, M. M. M., Danial, E.N., Awad, G.E.A., 2009. Novel carrier of grafted alginate for covalent immobilization of inulinase. **Industrial Engineering Chemical Research**, 48: 9781-9785.
- Fraguas, L.F., Viera-Batista, F., Carlsson, Jan., 2004. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbents and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots. **Journal of Chromatography**, 803: 237-241.
- Gill, K.P., Manhas, R.K., Singh, P., 2006. Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Food Engineering**, 76: 369-375.
- Gong, F., Sheng, J., Chi, Z., Li, J., 2007. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 34: 179-185.
- Gong, F., Chi, Z.M., Sheng, J., Li, J., Wang, X.H., 2008. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase. **Biotechnology and Bioengineering**, 101: 533-539.

Haider, H., Husain Q., 2009. Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate- starch hybrid beads for hydrolysis of lactose from whey/milk. **International Dairy Journal**, 19: 172-177.

[http:// www. answer.com](http://www.answer.com)

[http:// veterinerfusabil.org](http://veterinerfusabil.org)

Kang, SI., Chang, YJ., Oh, SJ., Kim, SI., 1998. Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. **Biotechnology Letters**, 20:983-986.

Kango, N., Jain, S.C., 2011. Production and properties of microbial inulinases: Recent advances. **Food Biotechnology**, 25: 165-212.

Kango, N., 2008. Production of inulinase using tap roots of dandelion by *Aspergillus niger*. **Journal Food Engineering**, 85: 473-478.

Karaoğlu, M.M. 2008. Yüksek fruktozlu mısır şurubu. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Erzurum. **Gıda Mühendisliği Dergisi**, 33.

Kumar, A., Plieva, F.M., Galeav, I.Y., Mattiasson, B., 2003. Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. **Journal of Immunological Methods**, 283: 185-194.

Kovaleva, T.A., Holyavka, M.G., Bogdanova, S.S., 2009. Inulinase immobilization on macroporus anion-exchange resins by different methods. **Biophysic and Biochemistry**, 148: 49-52.

Kong, J., Yu, S., 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 39: 549-559.

Kwon, YM., Kim, HY., Choi, YJ., 2000. Cloning and characterization of *Pseudomonas mucidoleus* exoinulinase. **Journal Microbiol Biotechnology**, 10(2): 238:243.

- Luo, Q., Upadhyaya, R., Zhang, H., Aliste-Madrid, C., Nieves, E., Kim, K., Angeletti, R.H., Weiss, L.M., 2011. Analysis of glycoproteome of *Toxoplasma gondii* using lectin affinity chromatography and tandem mass spectrometry. **Institut Pasteur**, 13: 1199-1210.
- Luding, Y., Shaochuan, S., Junxian, Y., Kejian, Y., 2011. Isolation of Lysozyme from Chicken Egg White Using Polyacrylamide-based Cation- Exchange Cryogel. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 19(5): 876-880.
- Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B. 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. **TRENDS in Biotechnology**, 21: 445-451.
- Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2002. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, 10: 163-188.
- Miranda, M.V., Magri, M.L. Cañizo, N., Cascone, O., 2002. Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concanavalin A-Agrose. **Process Biochemistry**, 38: 537-543.
- Mohann, D., Pittman, C.U. Jr. and Steele, P.H., 2006. Single, binary and multicomponent adsorption of copper and cadmium from aqueous solutions on Kraft lignin-a biosorbent. **Journal of Colloid and Interface Science**, 297: 489- 504.
- Nakamura, T., Shirata, A., Matsuda, S., Matsuo, T., Suiko, M., Ohta, K., 1997. Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose. **Journal Fermentation Bioengineering**, 84: 313-318.
- Nguyen, D.Q., Szabó-Rezessy, J.M., Czukor, B., Hoschke, Á., 2011. Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase. **Process Biochemistry**, 46: 298-303.
- Opitz, L., Salaklang, J., Büttner, H., Reichl, Udo., Wolff, M.W., 2007. Lectin-affinity chromatography for downstream processing of MDCK cell culture derived human influenza A viruses. **Vaccine**, 25: 939-947.

- Özusağlam, A.M. 2009. İnulinaz enziminin önemi. **Anadolu Üniveristesi Bilim ve Teknoloji Dergisi**, 2: 327-334.
- Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2007. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. **Journal of Separation Science**, 30: 1657-1671.
- Paula, C.F., Cazetta, M.L., Monti, R., Contiero, J., 2008. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaris*. **Food Chemistry**, 111: 691-695.
- Pandey, A., Soccol, CR., Selvakumar, P. Soccol. VT., Krieger, N.J.D., 1999. Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications. **Apply Biochemistry Biotechnology**, 81: 35-52.
- Proctor, A. Toro-Vaquez, I.F. 1996. The Freundlich isotherm in studying adsorption in oil processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 73: 1627-1633.
- Qui, R., Zhang, X., Regnier, E.F., 2007. A method for the identification of glycoproteins from human serum by a combination of lectin affinity chromatography along with anion Exchange and Cu-IMAC selection of tryptic peptides. **Journal of Chromatography**, 845: 143-150.
- Richetti, A., Munarette, B.C., Lerin, L.A., Batistella, L., Oliveira, J.V., Dallago, R.M., Astolfi, V., Luccio, M.D., Mazutti, A.M., De Oliveira, D., Treichel, H., 2012. Immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using modified sodium alginate beads. **Bioprocess Biosyst Engineeing**, 35: 383-388.
- Rocha, JR., Catana, R., Ferreira, BS., Cabral, JMS., Fernandes, P., 2006. Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, 95: 77-82.

- Sanchez, O.J., Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresearch Technology**, 99: 520-5295.
- Santa, M., Gonçala, L., Bernardino, M.S.A., Magalhães., Mendes, V., Marques, M.P.C., Fonseca, L.P., Fernandes, P., 2011. From inulin to fructose syrup using sol-gel Immobilized inulinase. **Apply Biochemical Biotechnology**, 165: 1-12.
- Sheng, J., Chi, ZM.,J. Gao., LM, Gong, F., 2007. Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase. **Processing Biochemical**, 42:805-811.
- Sheng, J., Chi, ZM.,J. Gao., LM, Gong, F.,2008a.Use of response surface methodology for optimizing process parameters for high inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a in solid-state fermentation and hydrolysis of inulin. **Bioprocess Biocatalyst Engineering**,doi: 10.1007 s00449-008-0252-2
- Silva, M.F., Rigo, Diane., Mossi, Vinícius, M., Dallago, R.M., Henrick, P., Kuhn, G.D., Rosa, C.D., Oliveira, D., Oliveira, J.V., Treichel, H., 2012. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. **Food and Bioproducts Processing**.
- Silva, F.-R.C. Santana, C.C., 2000. Adsorption of inulinases in ion-exchange columns. **Apply Biochemistry and Biotechnology**, 84-86.
- Singh, R.S., Dhaliwal, R., 2008. Development of a stable continuous flow immobilized enzyme reactor for the hydrolysis of inulin. **Journal Industrial Microbiol Biotechnology**, 35: 777-782.
- Singh, P. Gill, K.P., 2006. Production of Inulinases: Recent Advances. **Food technology. Biotechnology**, 44:151-162.

- Singh, R.S., Dhaliwal, R., Puri, M., 2007. Production of high fructose syrup from *Asparagus inulin* using immobilized exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1. **Journal Industrial Microbiol Biotechnology**, 34: 649-655.
- Summer, J.B Howell, S.F, 1936. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, 32:2-3
- Summer, J.B, 1924. Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urines. **Journal of Biological Chemistry**.
- Sheng, J. Chi. ZM., Gong, F. Li.J., 2008(b). Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. **Apply Biochemistry Biotechnology**, 144: 111-121.
- Srivastava, A., Shakya, A.K., Kumar, A., 2012. Boronate affinity chromatography of cells and biomacromolecules using cryogel matrices. **Enzyme and Microbial Technology**, 51: 373-381.
- Stanescu, M.D., Gavrilas, S., Ludwig, R., 2012. Preparation of immobilized *Trametes pubescens* laccase on a cryogel- type polymeric carrier and application of biocatalyst to apple juice phenolic compounds oxidation. **Europe Food Resarch Technology**, 234: 655-662.
- Tsujimoto, Y., Watanabe, A., Nakano, K., Watanabe, K., Matsui, H., Tsuji, K., Tsukihara, T., Suzuki, Y., 2003. Gene cloning, expression and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289. **Apply Microbiol Biotechnology**, 62: 180-185.
- Uygun, M., Uygun, D.A., Özçalışkan, E., Akgöl, S., Denizli, A., 2012. Concanavalin A immobilized poly (Ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. **Journal of Chromatography B**, 887-888: 73-78.

- Uygun, D.A. 2008. Protein Saflaştırılması İçin Magnetik Nano Yapıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.
- Uygun, M., 2006. *Aspergillus niger* ATTC 9642'nin Alginat Küreleri Üzerine İmmobilizasyonu ve Bazı Tekstil Boyaları ile Zeytin Karasuyunun Renk Gideriminde Kullanılmasının Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Uygun, M., 2012. Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojellerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.
- Uygun, D.A., Akduman, B., Uygun, M., 2012. Purification of Papain Using Reactive Green Attached Supermacroporous Monolithic Cryogel. **Apply Biochemical Biotechnology**, 167: 552-563.
- Yamak, Ö., 2007. Poli (Akrilamit)-Sodyum Aljinat, Poli (Akrilamit-N-İzopropilakrilamit)-Sodyum Aljinat, Poli (Akrilamit-N-İzopropilakrilamit) Hidrojellerine Lakkaz İmmobilizasyonu. Gazi Üniveritesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.
- Yavuz, H. 2010. Yaz Okulu Protein kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler. Atatürk Üniversitesi, 2007. Erzurum.
- Yun, JW., Kim, DH., UHm, TB., Song, SK., 1997. Production of high content inulo-oligosaccharides from inulin by a purified endoinulinase. **Biotechnology Letters**, 19: 935- 938.
- Yun, J., Shen, S., Chen, F., Yao, K., 2007. One-step isolation of adenosine triphosphate from crude fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* by anion-exchange chromatography using supermacroporous cryogel. **Journal of Chromatography B**, 860: 57-62.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Canan ALTUNBAŞ

Doğum Yeri ve Tarihi: ANKARA/1986

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniveristesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya
Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- a) **Makaleler**
-SCI
-Diğer

- b) **Bildiriler**

Altunbaş, C., Uygun, D.A., Akgöl, S., Denizli, A. Lizozim adsorpsiyonu için boya ligand afinite nanoyapıları.25. Uluslar arası Katılımlı Ulusal Kimya Kongresi, 27.06- 02.07 2011, Erzurum.

-Uluslar arası

- c) **Katıldığı projeler**

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : -

İLETİŞİM

e-POSTA Adresi :cannan_86@hotmail.com

Tarih : 28.12.2012