

1. GİRİŞ

Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenleyen enzimler, protein yapıda olup ve doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler ve çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar.

Biyoteknolojik yöntemlerle üretilen ürünler ülkemizdeki önemli bir pazar alanlarından birisini oluşturmakta ve milyar dolarlar seviyesinde işlem hacmini sahip olan enzimler de bu pay içerisinde yer almaktadır. Çok sayıda endüstriyel, analitik ve klinik işlemlerde serbest enzimler substrat çözeltisi ile karıştırılır ve ürün elde edildikten sonra ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Enzim saflaştırma işlemlerinin zor koşullar altında olması ve yüksek maliyet gerektirmesinin yanında sadece bir kere kullanılabilmeleri, genellikle ilaç ve gıda endüstrisinde biyokatalizör olarak veya kimyasal analizlerde spesifik olarak kullanılan enzimler için önemli dezavantajları oluşturmaktadır. Bu nedenle, enzimlerin farklı immobilizasyon yöntemleri ile immobilize edilerek kararlılıklarının artırılması, tekrar kullanıma olanak tanınması ile üretim maliyetinin düşmesinin yanı sıra enzimatik proseslerin sürekli olarak da yapılabilmeleri bu yöntemin sunduğu önemli avantajlar arasında yer almaktadır.

Enzimlerin immobilizasyonu biyoteknoloji ve ilaç sektöründeki alanlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda, çeşitli polimerizasyon teknikleri kullanılarak farklı geometrilere sahip polimerik yapılar enzim immobilizasyon destek materyali olarak kullanılmak üzere sentezlenmektedir. Enzimlerin büyük bir kısmı, uygun destek materyalleri

üzerine, çok yüksek aktivite sağlayarak başarılı bir şekilde tutuklanabilmektedir. Bu tutuklanmış ürünler, enzim reaktörlerinin, ve biyosensörlerin tasarımında ayrıca, yapay organların yapımında da kullanılmaktadır. Tutuklu enzimlerin temel büyük ölçekli uygulama alanları, gıda (tutuklu glikoz isomerase kullanılarak yüksek fruktoz şurubu üretimi) ve eczacılık endüstrisidir (tutuklu penisilin amidaz kullanarak 6-aminopenisilanik asit üretimi)^(1,2). Tutuklu enzim bazlı biyosensörler, fermantasyon endüstrileri, çevresel izleme ve klinik teşhiste analiz için geniş bir kullanım alanına sahiptir⁽³⁻⁵⁾. Glikoz ve sukroz için biyosensörler, gıda ve fermantasyon örneği analizi için kullanılmaktadır^(4,5). Yapay organların yapımını içeren diğer potansiyel alanda, tutuklu üreaz, ekstra bedensel detoksifikasyon için kandan ürenin uzaklaştırılmasında yapay böbrek aygıtında kullanılmaktadır⁽⁶⁾.

Çok sayıda enzimin kararsız olmasından dolayı endüstriyel uygulamaları da sınırlı olmaktadır. Bu doğrultuda, biyoteknoloji uygulamalarındaki enzim çalışmalarında kovalent bağlanma, absorpsiyon veya fiziksel tutuklama gibi çok sayıda immobilizasyon yöntemi geliştirilmiştir. Tutuklama teknikleri arasında, adsorpsiyon, işlemin basit ve ucuz olması, yüksek katalitik aktivite sağlaması ve en önemlisi tutuklu enzimin inaktivasyonundan sonra, destek materyalinin tekrar tekrar kullanılabilmesi gibi nedenlerden dolayı diğer metotlara kıyasla daha yüksek bir ticari potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte adsorpsiyon da enzim ile destek arasında oluşturulan bağın genellikle çok güçlü olmaması ve adsorbe olan enzimlerin bir kısmının yıkama ve işlem

sırasında desorbe olması bu tekniğin önemli bir dezavantajını oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda kovalent bağlanma yoluyla enzim tutuklanmasının, çeşitli çevresel şartlara, sıcaklık, denaturantlar ve organik çözücülere karşı yüksek direnç kazandırdığı gösterilmiştir. Bu gelişmelerin kapsamı, enzimin doğası, destek materyalinin tipi ve tutuklama yöntemi gibi sistemin diğer koşullarına bağlı olabilmektedir⁽⁷⁻⁹⁾.

Epoksi grubu taşıyan destek materyalleri, laboratuvar uygulamalarında ve geniş ölçekli kullanımlarda enzimin çok kolay tutuklanmasına izin veren ideal malzemelerdir. Bu destek materyalleri depolama süresince kararlıdır. Epoksi grubu taşıyan destek materyalleri, ılımlı deney koşulları (pH= 7.0) altında farklı protein grupları ile (amino, tiyol, fenolik) çok kararlı kovalent bağ oluşturabilmeleri nedeni ile enzim teknolojisi uygulamalarında önemli kullanım alanına sahiptirler⁽⁹⁾.

Manyetik ayırma temeline dayanan teknolojiler, bugünün biyomateryal ve biyoteknoloji laboratuvarlarının vazgeçilmez bir bölümü haline gelmiş bulunmaktadır. Son on yıl içerisinde, enzim immobilizasyon tekniği uygulamalarında manyetik özelliğe sahip destek materyallerinin kullanıldığı manyetik ayırma tekniği, enzim saflaştırılması ve immobilizasyonu uygulamalarında geleneksel yöntemlerle kıyasla sunduğu çeşitli üstünlükler nedeni ile araştırmacıların konu üzerine ilgisi artmıştır⁽¹⁰⁾. Manyetik taşıyıcılar, laboratuvarında hazırlanabilir ya da ticari olarak temin edilebilir. Manyetik ayırma teknolojisinin hızlı ve kolay bir teknik olması, hedef molekülü çok daha az mekanik gerilime maruz bırakması konusunda önemli bir üstünlük sağlaması enzim immobilizasyon uygulamalarında hedeflenen başarının

sağlanmasında temel ilkeleri oluşturmaktadır. Bu yeni kombine yöntemle pahalı saflaştırma sistemlerine, santrifüjlere, filtrelelere ya da diğer ekipmanlara gerek olmaması, otomasyona ve mikro-ölçek gerektiren işlemlere daha kolay olarak adapte edilmeleri bu teknolojinin sunduğu diğer avantajları oluşturmaktadır. Magnetik destek malzemelerinin hazırlama yöntemine bağlı olarak partiküller dış manyetik alana karşılık olarak, süper paramagnetik gibi davranırlar, fakat manyetik alanın uzaklaştırılması sonucu hemen sistem içerisine yeniden süspansiyon olmaları büyük avantaj sağlamaktadır ve manyetik alan yokluğunda kendi aralarında etkileşim olmamaktadır^(11,12).

Invertaz, sukrozu glikoz ve fruktoza dönüştürmeyi spesifik olarak hidroliz eden etkin bir enzimdir. Hidrolize edilmiş şekerin kullanım alanları, sukroza göre mukayese edildiğinde daha az kristalize olmasından dolayı yapay bal, pasta, reçel ve bira endüstrisinde daha fazla kullanım alanı bulmaktadır. Ayrıca, invertazdan elde edilen invert şeker karışımı, asit hidrolizi ile elde edilen renkli ürün karşıtlarına göre, renksiz olduğu için önemli bir üstünlük sunmaktadır^(13,14). Sunulan çalışmanın temel hedefi, süspansiyon polimerizasyon yöntemi ile immobilizasyon destek materyali olarak magnetik mikroküreler hazırlamak ve bu magnetik mikrokürelerin yüzeyine model olarak seçilen invertaz enziminin immobilizasyonu ve optimum sistem parametrelerin belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda, yeni magnetik poli(glisidilmetakrilat-ko-metilmetakrilat), poli(GMA-ko-MMA), mikroküreleri süspansiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlendi. Katı destek materyali olarak hazırlanan bu magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelerinin yüzey modifikasyonunda glutaraldehit aktivasyon ajanı

olarak kullanıldı. Aktive edilen magnetik mikrokürelerin yüzeyine, endüstriyel bir enzim olan invertaz enzimi kovalent bağlama yöntemi ile immobilize edildi. Enzim immobilizasyonu tekniğinde destek materyali olarak kullanılmak üzere sentezlenen yeni manyetik mikrokürelerin yüzey alanı ölçümü, şişme testi, FTIR spektrumu, manyetik özelliklerinin tanımlamak için Mössbauer spektroskopisi ve ESR spektrumu alındı ve yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile karakterize edildi. İmmobilize enzimin aktifliğine etki eden sıcaklık, pH, depolama kararlılığı gibi parametrelerin etkisi kesikli sistemde incelendi ve kinetik sabitleri tayin edildi.

1.1. Enzimler

Enzimler, protein yapısında olup, suda çözünen ve kimyasal reaksiyonlarda büyük bir özgünlüğe sahip olan spesifik katalizörlerdir. Enzimler endüstriyel amaçlar için büyük miktarlarda üretilmektedir. Tüm enzimlerin medikal ve endüstriyel bir önemi vardır. Ülkemizde enzimlerin kullanım alanlarını aşağıdaki gibi sıralamak mümkündür.

- Tekstil enzimleri, özellikle taşıma ve haşıl sökmek amacıyla kullanılmaktadır. Amilaz enzimi, kumaşa zarar vermeden kumaştaki nişastayı parçalamak amacı ile kullanılmaktadır. Ayrıca bu işlem sonucunda ortaya çıkan atık sular, enzimin çevreye zarar vermemesi nedeni ile çevreye daha uyumludur.
- Şarabın fermente edilmesinde, ekmeğin mayalanmasında, peynir oluşumunda çeşitli enzimler görev almaktadır.
- Temizlik enzimleri, deterjan endüstrisinde leke çıkarıcı amacı ile kullanılmaktadır.

- Deri sektöründe, özellikle derilerden kıl ve yağların ayrılmasında da enzimler kullanılmaktadır.
- Yüksek saflıkta ve daha ince üretim gerektiren enzimler kozmetik ve tıp alanında kullanılmaktadır.

1.2. Enzim Tutuklaması

Biyokatalizörler olarak da adlandırılan enzimlerin tıp alanında, farmasotik kimya alanında ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, bu katalizörlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasını ortaya çıkarmıştır. Biyokatalizörlere birçok avantaj sağlayan, immobilizasyon yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Immobilizasyon terimi, kelime olarak hareketi sınırlandırılan, durağanlaştırılan anlamında kullanılır. Immobilize edilmiş enzimlerin de gerçekten hareketleri sınırlandırılmış olmaktadır. Immobilizasyon tekniği, *i*) deaktivasyondan aktif materyal korunduğu için enzimin kararlılığını devam ettirmesi (enzimin katalitik etkisinin önemli ölçüde kararlı hale getirilmesi), *ii*) tekrar tekrar kullanımı mümkün kılması, *iii*) işletim maliyetini azaltması, *iv*) kısa işlem süresi, *v*) bu kolay ayırımın enzimin geri kazanım hızını arttırması, *vi*) ürünlerin yüksek saflıkta elde edilebilmesi ve *vii*) sürekli sistem uygulamasının gerçekleştirilebilmesi gibi nedenlerden dolayı önemli avantajlar sunmaktadır^(9,11,15). Enzim immobilizasyonunun önemli dezavantajları ise; *i*) tutuklama işlemi sırasında enzim aktivitesinde azalma yada kayıp ve *ii*) tutuklu enzimin aktif bölgesi ve reaksiyon ortamı ara yüzeyinde, substrat yada ürünün taşınmasına difüzyonel dirençten dolayı difüzyonel etkilerin ortaya çıkması olarak sıralanabilir⁽⁷⁾.

Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden dolayı, katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Son yıllarda bu tür problemlerin çözümü için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Hangi tür kaynaktan olursa olsun enzimlerin biyolojik ortamdan saflaştırılması oldukça zaman alıcı ve yüksek maliyetlidir. Katalizör olarak kullanılan bu enzimlerin reaksiyon ortamındaki ürünlerden ayrılmasının zorluğu, saflaştırma işleminin masraflı olması bu enzimlere dezavantaj kazandırmaktadır. Enzim saflaştırılması aşamasında kullanılan kimyasalların enzim üzerinde inhibitör etki göstermesi ve buna bağlı olarak enzim yapısının bozulması da çözüm bekleyen problemlerden biridir. Enzim immobilizasyonu bu yöntemlerden biridir. Bu doğrultuda, enzimler immobilizasyon işlemi ile işlemsel olarak avantajlı hale dönüştürülerek çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılabilir⁽¹⁶⁾.

İmmobilize enzimler katı faz reaktörlerinde (özellikle dolgu kolanlarda), potansiyometrik enzim elektrotları ve optik sensörler gibi enzim sensörlerinin tasarımında filmlere bağlanarak kullanılmaktadır⁽¹⁷⁾. Ayrıca immobilize ürünler, yapay organ sistemlerinin içeriğinde ya da yapay materyal yüzeyinin biyouyumluluk özelliğinin artırılmasında da kullanıldıkları bilinmektedir⁽¹⁸⁾. İmmobilize enzimlerin kullanım alanları Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Çeşitli İmmobilize Enzimler ve Uygulama Alanları

Enzim (EC kodu)	Substrat	Uygulama alanı
Glukoz oksidaz (1.1.3.4)	Glukoz	Diabet tedavisi ve gıda endüstrisi

Tirozinaz (1.14.18.1.)	Fenol, Polifenol	Besinlerde fenol bileşiklerinin tespiti
Üreaz (3.5.1.5)	Üre	Yapay böbrek, diyaliz
Katalaz (1.11.1.6)	Hidrojen peroksit	Akatalasemi
Asparajinaz (3.5.1.1)	Asparajin	Lösemi tedavisinde
Heparinaz (4.2.2.7)	Heparin	Ekstrakorporal terapi
Glukoamilaz (3.2.1.3)	Karbonhidrat	Glikojen depo hastalığı tedavisinde

Enzim immobilizasyonu tekniğinin kullanıldığı biyosensör yada kolon reaktörleri uygulamalarında immobilize enzimin performansı, tutuklanacak enzimin özellikleri, kullanılan destek materyalin türü ve immobilizasyon yöntemi olmak üzere üç temel parametrenin etkisi altında incelenmektedir.

1.2.1. İmmobilizasyon Tekniğinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

İmmobilize edilecek enzimin özelliklerini bilmek ve bu özelliklere uygun destek materyal tipi ve immobilizasyon yöntemi belirlemek başarılı bir immobilizasyon için gerekli şartlardan birisidir. Kullanılacak enzimin izoelektrik noktası, sıcaklık, iyonik şiddet ve pH gibi çevre koşullarına karşı toleransı ve üç boyutlu yapısı gibi özellikler immobilizasyon işlemi sonrasında da enzim aktivitesinin korunabilmesi için enzim hakkında bilinmesi gereken önemli verilerdir. İyonik şiddetteki değişimlere karşı duyarlı olan bir enzim, yüksek tuz gradiyentine sahip bir ortamda işleme tabii tutulursa immobilizasyon veriminin ve elde edilen enzim aktivitesinin düşük olacağını açık bir göstergesidir. Asidik bir destek materyal ile izoelektrik noktası 3.4-4.4 aralığında olan invertaz enziminin immobilizasyonu işleminde seçilen tampon

sistemi oldukça önemlidir. Örnek olarak, pH 4.5 üzerinde gerçekleştirilen immobilizasyon koşullarında invertaz enzimi negatif yüklerle taşıyacaktır ve enzim ile asidik özellikteki destek materyal arasında elektrostatik itme kuvvetleri oluşacak ve bu nedenle immobilizasyon işlemi başarısız olacaktır.

(17)

1.2.2. Destek Materyalinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Pek çok değişik doğal veya sentetik malzemeler enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Enzimlerin, katı destek materyallerine immobilizasyonu, sürekli işletim koşulları altında uzun süre kararlılığını koruması açısından önem ifade etmektedir. Immobilizasyon işleminde bağlanan enzim miktarı ve immobilizasyondan sonraki enzimin aktivitesi doğal veya sentetik kökenli taşıyıcıların yapısına bağlı olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Enzim immobilizasyon yöntemlerinde sıklıkla kullanılan destek materyallerine bazı örnekler Tablo 1.2'de sunulmuştur.

Tablo 1.2. Immobilizasyonda Kullanılan Destek Materyalleri

Anorganik Polimerler	Doğal Kökenli Destekler	Sentetik Polimerler
----------------------	-------------------------	---------------------

Cam	Selüloz	Polistren Türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamid
Aleminyum Oksit	Dekstran	Naylon
Bentonit	Agaroz	Polivinilalkol
Hidroksiapatit	Karregenon	Oksiranlar
Titandioksit	Alginat	Metakrilat
Zirkonyumdioksit	Kollegen	İyondeğiştirici
Nikel Oksit	Kitin	Reçineler

İmmobilizasyon işleminde kullanılacak destek materyallerin bazı arzu edilen özelliklere sahip olması gerekmektedir. Ticari olarak mevcut destek materyallerinin bir bölümü etkileşim yüzey alanını artırmak amacıyla, biyolojik moleküllerin rahatça girebileceği geniş gözenekler içerecek şekilde ve uygun boyut dağılımına sahip olarak üretilmektedir. Destek materyalinin, mekanik dayanımı ve kolon içerisinde de hidrodinamik açıdan kullanım kolaylığının yanı sıra kimyasal ve biyolojik olarak inert olması da gerekmektedir. Destek materyali, yüzeyinde aktivasyona ve/veya enzimin bağlanmasına olanak sağlayacak hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Bunun yanında, hidrofilik ve nötral olması, sıcaklığa karşı dayanıklılık göstermesi, kimyasal ve biyolojik reaksiyonlarla karşı dirençli olması, aktivasyona veya ligand bağlamak için türevlendirilmeye olanak sağlaması beklenmektedir. Ayrıca, destek materyali yüzeyindeki yüklü veya hidrofobik gruplar ile enzim arasında meydana gelebilecek non-spesifik ilişkilerin mümkün olduğunca düşük olması da beklenmektedir. Ek olarak, destek materyali rejenerasyon esnasında organik çözücülere, deterjan ve guadinhidroklorür gibi elüentlere karşı dayanıklı olmalı, fiziksel ve

kimyasal olarak kararlılığını korumalı ve düşük işlem maliyeti ile büyük ölçekte üretime izin vermelidir.

1.2.2.1. Destek Materyali Olarak Kullanılan Sentetik ve Doğal Polimerler

Enzim saflaştırılması ve enzim immobilizasyonu tekniği uygulamalarında, doğal veya sentetik kökenli polimerler (polisakkaritler, poliakrilamitler, polivinil polimerler ve poliakrilatlar) destek materyalleri olarak kullanılmaktadır. Bu materyaller kontrol edilebilir boyut dağılımına ve gözenek çapına sahip olarak üretilebilmelidir.

Polimerler; çok sayıda molekülün kimyasal bağlarla düzenli bir şekilde bağlanarak oluşturdukları yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Polimerler “monomer” denilen birimlerin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Polimerler yapılarına göre sınıflandırılabilirler. Bir polimer tek bir monomer biriminin tekrarlanmasından oluşuyorsa buna “homopolimer” denir. Eğer polimer molekülü iki farklı monomerin birleşmesinden oluşuyorsa buna “kopolimer” denir. İster mono ister kopolimer olsun polimerler doğrusal, dallanmış yada çapraz bağlı olabilirler. Polimerler fiziksel durumlarına göre sınıflandırıldıklarında ‘amorf’, ‘kristalin’ ya da ‘yarı kristalin’ olarak adlandırılır.

Polimerler genel olarak sentetik ve doğal olarak başlıca iki grupta incelenebilirler. Sentetik polimerlerin üretiminde kullanılan endüstriyel teknikler, polimerizasyon ortamının özelliklerine bağlı olarak yığın, çözelti, süspansiyon, emülsiyon ve arayüzey polimerizasyon prosesleri olarak sınıflandırılabilirler. Doğal polimerler selüloz, kollajen, kitin, agaroz

gibi canlılar tarafından sentezlenmektedir. Sunulan tez kapsamında invertaz enziminin immobilizasyonunda kullanılmak üzere yeni manyetik mikroküreleri süspansiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlanması planlanmaktadır.

Süspansiyon polimerizasyonu ilk defa 1909 yılında Holfman ve Delbruch tarafından geliştirildi. Endüstriyel anlamda ilk olarak bu yöntemle üretilen polimer, polivinilkloroasetattır. Süspansiyon polimerizasyonu sonucu gözenekli veya gözeneksiz partiküller elde edilebilmektedir. Süspansiyon polimerizasyonunda başlatıcı dağıtma ortamı içerisinde, dağılmış halde bulunan monomer damlacıkları içinde çözünür. Dağıtma ortamı olarak genellikle su kullanılır. Ortam sürekli karıştırılarak süspansiyon sisteminin sürekliliği sağlanır. Dağıtma ortamındaki monomerlerin çözünürlüğü genelde düşüktür. Süspansiyon polimerizasyonunda, polimerizasyon boyunca damlacıkların stabil olarak ortamda kalabilmeleri ve birbirlerine yapışmalarını engellemek için stabilizörler eklenir. Sisteme uygun ısıtma programı uygulanarak, sistem başlatıcının bozunma sıcaklığına ısıtıldığında, polimerizasyon başlatıcı moleküllerinin bulunduğu monomer damlacıkların içerisinde başlatılmış olur. Polimer kürelerin boyut dağılımı; reaktörün tipi, başlatıcı derişimi, sıcaklık, kullanılan karıştırıcının hızı ve tipi, monomer fazın hacim fraksiyonu, monomer türü, kullanılan stabilizörün konsantrasyonu ve türüne bağlı olarak değişmektedir.

Geometrik olarak küre, çubuk veya membran yapıları sahip polimerik destek materyallerinin kullanılabildiği uygulamalarda, özellikle

küre yapıdaki taşıyıcı destekler sağladığı avantajlardan dolayı tercih edilir⁽¹⁹⁻²³⁾. Küre yapıda kullanılan destek materyallerin boyutu 50-400 µm aralığındadır. Kürelerin gözenek büyüklüğü, saflaştırılmak istenen hedef molekül veya immobilize edilecek büyük moleküllü ligandların bağlanmasına izin verecek boyutta olmalıdır⁽²⁾. Küre yapıdaki destek malzemelerinin kullanılması hedef moleküllerin karışımından direkt izole edilmesi ve saflaştırılmasını sağlamanın yanında, işlem zamanını da önemli ölçüde kısaltmış olur⁽²⁾.

1.2.2.2. Enzim İmmobilizasyonda Kullanılan Magnetik Destek Materyalleri

Destek materyali olarak kullanılan magnetik özellikli polimerik mikrokürelerin endüstriyel uygulamalardaki başarısı bu alana yönelik çalışmalara hız kazandırmıştır. Bu destek materyalleri, endüstriyel ve biyolojik ayırma işlemlerinde, hücre izolasyonu ve enzim immobilizasyonunda, enzim saflaştırılmasında, çeşitli kromatografi yöntemlerinde, ilaç hedefleme ve kontrollü salım sistemlerinde, immunolojik test ve tanı kitlerinde ve moleküler biyoloji alanındaki araştırmalarda kullanılmaktadır^(26, 11).

Magnetik destek materyalleri inorganik malzemeler veya bazı yapay ve doğal polimerler kullanılarak üretilebilir. İnorganik malzemeler, yüksek mekanik dirençleri, çözünmez olmaları ve çok uzun raf ömürleri nedeniyle taşıyıcı olarak idealdir. İnorganik desteklerin en büyük

dezavantajı metal iyonlarıyla kompleksleşme için işlevsel gruplarının kısıtlı olmasıdır. Organik kökenli doğal veya sentetik polimerik materyaller belirli uygulamalara cevap vermek üzere istenen şekilde sentezlenebilmelerini sağlayan çok çeşitli yüzey işlevsel gruplar içermeleri ve gözenekli veya gözeneksiz olarak hazırlanabilmeleri nedeni ile manyetik destek materyali olarak kullanımları tercih edilmektedir ⁽⁶⁾. Polivinilbutiral, polietilen glikol, polivinil alkol, poliakrilamid, polimetilmetakrilat ve aljinat, değişik uygulamalarda kullanılan tipik polimer kökenli taşıyıcılara örnek olarak verilebilir^(7,8).

Santrifüjleme, çöktürme, karıştırma veya yüksek basınç uygulamaları biyokimyasal işlemlerde özellikle immobilizasyon sistemlerinde ve ayrıştırma ve/veya saflaştırma işlemlerinde sıklıkla kullanılan ve genellikle kimyasal işlem sırasında yer alan biyomoleküllerin yapılarının bozulmasına veya aktivitelerinin kaybolmasına neden olan başlıca etmenler olarak sayılabilirler. Son yıllarda üzerinde yoğun araştırmalar yapılan manyetik taşıyıcı teknolojisi yukarıda anlatılan olumsuzlukların aşılması için önemli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir.

Magnetik küreler manyetik anizotropik özellikten dolayı rotasyonel ve vibrasyonel hareket sergilemektedirler. Manyetik kürelerle çalışılan sistemlerde bu hareketler sonucunda enzim-küre sistemi çevresinde dış difüzyon kısıtlamasına neden olan ürün tabakasının oluşumu önlenmektedir. Sistemde manyetik alanda yapılan değişimler ile enzim tutuklanmış manyetik küreler vibrasyonel hareket ile çözelti de hareket etmektedir. Bu yolla, oluşan

ürün tabakası ve substrat tabakası yer değiştirmektedir. Böylece enzim tutuklanmış manyetik küreler ile substrat etkileşimi kolaylaşmaktadır. Enzim immobilizasyonu işleminde ve/veya enzim saflaştırılması işleminde kullanılan taşıyıcı magnetik küreler, magnetik özelliği nedeni ile dışarıdan magnetik alan yaratılarak kolayca magnetize edilebilmekte ve ayırıştırma için gerekli süre sonunda yeniden süspansiyon edilmektedirler. Ayrıca, enzim saflaştırılması işleminde taşıyıcı desteklerin magnetik özelliklerinden dolayı (muamele edilen örnekte bulunan, kontamine edici moleküllerin ve partiküllerin yoğunluğunun diyamagnetik özelliğe sahiptir) örnekten görece olarak kolay ve seçici olarak uzaklaştırılabilmesi magnetik taşıyıcıların kullanıldığı ayırma tekniğinin üstünlüğünü oluşturmaktadır.

Enzim immobilizasyonu işlemlerinde magnetik tekniğin sunduğu bir diğer avantaj ise, sürekli sistem işleminin gerçekleştirebileceği magnetik olarak stabilize akışkan yatakların (MSFB) kullanılabilirliğidir. MSFB'nin kullanımı, özellikle biyolojik ürünlerinin geniş ölçekli saflaştırılması için, paketlenmiş yatak yada akışkan yatak gibi geleneksel kolon işlemine önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Magnetik stabilizasyon, katı partiküllerin karıştırılmaksızın paketlenmiş bir yatağı genişletebileceğinden yüksek kolon verimliliği, minimum basınç düşmesi ve tıkanmanın sorununun ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır^(27,28).

Enzimlerin magnetik desteklere tutuklanması, diğer geleneksel metotlara kıyasla, enzim molekülünü işletim koşulları altında daha az bir mekanik gerilime maruz bırakma konusunda bir üstünlük sağlamaktadır. Bu yeni yöntemle pahalı sıvı kromatografi sistemlerine, santrifüjlere,

filtrelere yada diğer ekipmanlara gerek olmaması sistemin sağladığı başlıca ekonomik avantajlardır. İlave olarak, magnetik alan varlığında çalıştırılan tutuklu enzimler, otomasyona ve mikro-ölçek gerektiren işlemlere daha kolay olarak adapte edilmektedirler.

1.2.2.3 Destek materyali olarak kullanılan akrilat kökenli polimerler

İmmobilizasyon sisteminde kullanılacak polimerik destek materyalleri, çeşitli kompozisyonlarda kolayca üretilebilirler ve yapıya istenilen fonksiyonel gruplar dahil edilerek biyomoleküllerin immobilizasyonu için modifiye edilebilirler. Akrilat ve akrilik asit kökenli polimerler uzun ömürlü sentetik polimerlerdir. Bu grupta yer alan poli(metilmetakrilat), p(MMA), biyouyumlu sentetik bir polimer olmasından dolayı biyomedikal ve biyoteknolojik alanda çok sayıda uygulama alanı bulmaktadır. Ayrıca, akrilik ve metakrilik kökenli polimerler yapay damar, kontak lens, ilaç salınım sistemleri gibi uygulama alanlarına sahiptir. Bu tür materyallerin uzun süreli biyolojik uyumluluğu ve fonksiyonelliği canlı dokulardaki in vivo etkileşimleri ile kontrol edilmektedir. Bu materyal mekanik olarak güçlü olmasından dolayı, enzim immobilizasyonu ve protein saflaştırılmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Metakrilik asit iyonize olabilen bir monomer olarak bilinir ve bu nedenden dolayı polimeri pH'a karşı duyarlıdır. Epoksi grubu taşıyan glisidil metakrilat (GMA) komonomerinin kullanıldığı akrilat kopolimerler, enzim immobilizasyonunda, taşıyıcı materyaller ailesi olarak, özellikle çok yönlüdür, çok çeşitli özelliklerde hazırlanabilir. Epoksi grubu taşıyan destek materyalleri, enzim ve proteinlerin laboratuvar ve endüstriyel ölçekte immobilizasyonu için elverişlidir. Aktivasyon işlemine olanak tanıyan bu

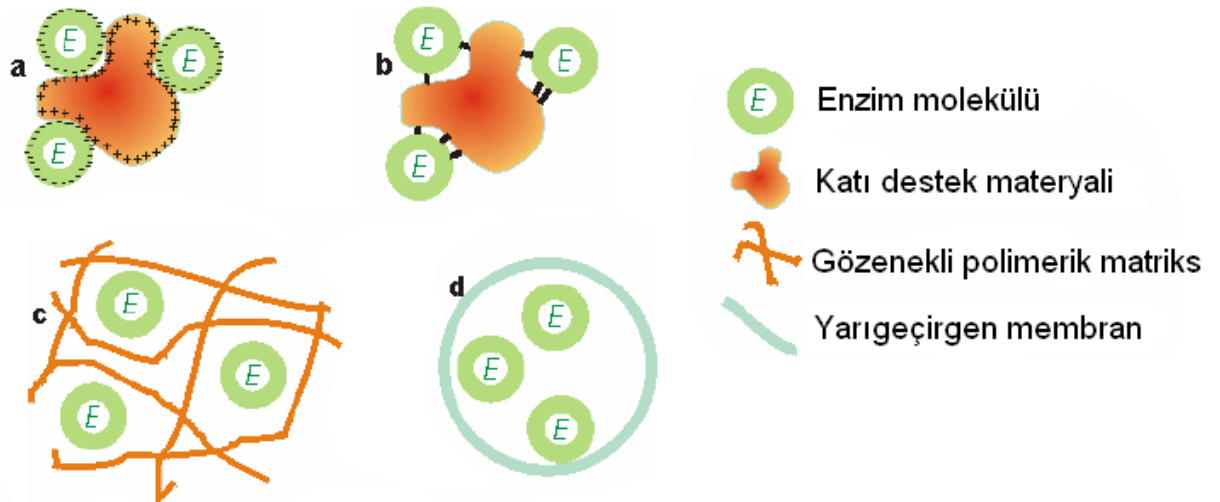
materyaller, depolama esnasında ve çözelti ortamında kararlıdır ve farklı protein grupları ile (amino, tiyol, fenolik türler) kararlı O-C ve N-C kovalent bağları oluştururlar. Bu özelliklerinden dolayı, küre formunda hazırlanan epoksi grubu taşıyan destek materyalleri yüksek mekanik kararlılığa sahip olmaları nedeni ile 1.0-12.0 gibi geniş pH aralığında biyomedikal ve biyoteknoloji alanındaki çeşitli uygulamalarda etkili ve güvenli olarak kullanılmaktadır^(16,29). Bu doğrultuda tez kapsamındaki çalışmalarımızda, akrilik kopolimer metil metakrilat, (MMA), ve glisidil metakrilat, (GMA), komonomerlerinden sentezlenerek invertaz enziminin immobilizasyonunda epoksi grubu taşıyan immobilizasyon destek materyali olarak hazırlandı.

Arıca ve arkadaşları, α -amilaz enziminin immobilizasyonu için süspansiyon polimerizasyon yöntemi ile çapraz bağlı ve bağırsız poli(2-hidroksietil metakrilat) mikrokürelerini sentezlemiş ve bu mikrokürelerinin alkol gruplarını epiklohidrin ile aktive ederek α -amilaz enzimi mikroküreler üzerine kovalent bağlı olarak immobilize etmişlerdir⁽¹⁶⁾. Wada ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada, tirozinaz enzimini magnetit (Fe_3O_4) üzerine tutuklamışlar ve enzimin dayanıklılığını artırdığını ve immobilize enzimdeki aktivite kaybının aynı koşullarda %5 olduğunu bildirmişlerdir⁽³⁰⁾. Pieters ve arkadaşları, magnetik mikropartikül üzerine glutaraldehid aktivasyonu ile glukoamilaz enzimini kovalent bağlanmış ve iki hafta süre işletim sonucunda aktivitesinin sadece %4'ünü kaybettiğini bildirmişlerdir⁽³¹⁾. Bayramoğlu ve arkadaşları, magnetik küreler üzerine β -galaktosidazı kovalent olarak immobilize etmişler ve sürekli sistemde laktoz hidrolizini araştırmışlardır⁽²⁶⁾. Bahar ve Çelebi, magnetik poli(stiren) partiküllerine

glukoamilaz enzimini immobilize ederek karakterizasyonunun tamamlamışlardır⁽³²⁾. Arıca ve arkadaşları, pHEMA/EGDMA mikroküreleri aktive ederek glukoamilaz enzimini immobilize etmişler ve dolgulu yatak reaktör uygulamasında test etmişlerdir⁽³³⁾.

1.2.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim, protein ve vb. gibi biyolojik moleküllerin immobilizasyonunda kullanılmak üzere çok sayıda destek materyali ve enzim tutuklama teknikleri geliştirilmiştir. Enzim tutuklanması için kullanılan yöntemlerin ve desteklerin, enzim aktivitesi üzerine olumsuz etki göstermediklerinin bilinmesi gerekmektedir. Enzim ve destek arasındaki moleküler etkileşimlere dayanan fiziksel yöntem ve kovalent bağ oluşumuna dayanan kimyasal yöntemleri içeren enzim immobilizasyonunu yöntemlerini; a) absorpsiyon b) kovalent bağlanma c) matriks içi tutuklama ve d) çapraz bağlama teknikleri olarak sınıflandırılabilir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Enzim immobilizasyonu tekniklerinin şematik gösterimi

İmmobilizasyon yöntemlerine bağlı olarak, immobilize enzimin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişiklikler olması beklenmektedir. Enzimlerin immobilizasyon sonucu kararlılıklarının önemli derecede arttığı çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. İmmobilize enzim ile substrat etkileşimini sırasında, enzimin bağlı olduğu destek materyalden kaynaklanan sterik engelleme nedeni ile enzim aktivitesinde azalmalar olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. İmmobilize enzimler çeşitli fiziksel şartlara karşı serbest enzime göre daha çok dayanıklıdır ve enzimin aktifliği uzun süre korunur.

1.2.3.1. Adsorpsiyon Yöntemi

Enzim immobilizasyon teknikleri arasında yer alan adsorpsiyon yöntemi; işlemin basit ve ucuz olması, yüksek katalitik aktivite sağlaması ve en önemlisi tutuklu enzimin inaktivasyonundan sonra destek materyalinin tekrar tekrar kullanılabilmesine olanak sunması gibi nedenlerden dolayı diğer metotlardan daha yüksek bir ticari potansiyele sahiptir. Yöntem; yüzeyi aktif, suda çözünmeyen bir taşıyıcı destek materyalinin enzim çözeltisiyle karıştırılması ve enzim fazlasının yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin, taşıyıcıya bağlanmasında van der Waals, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları etkilidir. İmmobilizasyonda etkili olan bu bağlar, zayıf bağlar olmasından dolayı, immobilize enzim, işlemler esnasında destek materyallerinden uzaklaşabilir.

Bu durum, absorpsiyon ile immobilizasyon yöntemine dezavantaj kazandırır. Prensip olarak bir proteinin aktif yüzeylerde absorpsiyonu tersinir bir işlem olabilir. Tutuklama teknikleri arasında, Literatürde geri dönüşümlü enzim tutuklaması ile ilgili birkaç metot rapor edilmiştir^(19,20). Bununla birlikte adsorpsiyon genellikle çok güçlü değildir ve adsorbe olan enzimlerin bir kısmı yıkama ve işlem sırasında desorbe olur. Bu sebepten dolayı adsorpsiyon yoluyla geri dönüşümlü enzim tutuklanması, enzim ve destek materyali arasında çok güçlü hidrofobik ya da iyonik etkileşim gerektirir⁽²¹⁾. Örneğin, polietilenimin kaplı Sepabead destek materyalleri invertaz ve β -galaktosidaz'ın tersinir immobilizasyonunda kullanılmıştır⁽²²⁾. Arıca ve Bayramoğlu ise çalışmalarında glikoz oksidazın, polietilenimin aşılı poli(hidroksietilmetakrilat-ko-glisidil metakrilat) membranları üzerine tersinir immobilizasyonunda adsorpsiyon yöntemini başarı ile kullanabilmişlerdir⁽²³⁾.

1.2.3.2. Kovalent Bağlanma Yöntemi

Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için sıkça kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiliye geçmesini engeller. Kovalent bağlanma genelde enzimin yapısının ve fonksiyonel grupların bilindiği durumlarda kullanılır.

İki basamakla gerçekleşen bu yöntemde, ilk olarak katı destek materyallerinin aktive edilmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda, destek materyali amino, karboksil v.s. gibi fonksiyonel gruplar taşımalıdır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak glutaraldehit, karbodiimid, epiklorhidrin v.s. gibi çeşitli aktifleyici ajanlar kullanılarak immobilizasyon işleminin birinci basamağını oluşturan yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş olur. İkinci aşamada ise enzimin modifiye edilen destek materyaline kovalent bağlanması işlemi gerçekleştirilir.

Kovalent bağlanma yoluyla enzim tutuklanmasının, çeşitli durumlarda, sıcaklık, denatürantlar ve organik çözücülere karşı yüksek direnç kazandırdığı gösterilmiştir. Bu gelişmelerin kapsamı, enzimin doğası, destek materyalinin tipi ve tutuklama yöntemi gibi sistemin diğer koşullarına bağlı olmaktadır. Bu yöntemin sunduğu en önemli avantaj, enzim ve destek arasında oluşan bağın güçlü olmasından dolayı enzimin yapıdan sızmasının güç oluşudur. Kovalent bağlanmada kullanılan yöntemlerin pahalı ve karmaşık olması, zor deney koşulları altında enzim yapısının bozulması yada enzimin aktif bölgesinin maskelenmesi bu yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır⁽⁷⁻⁹⁾.

1.2.3.3. Matriks İçi Tutuklama Yöntemi

Bu yöntem, polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzim tutuklanması esasına dayanır. Bu yarı geçirgen membran, enzimin dışarı çıkmasını engellerken, substrat ve reaksiyon sonucu oluşan ürünün serbestçe giriş çıkışını sağlar.

Enzimlerin mikrokapsüllenenek matriks içi tutuklama gerçekleştirilebilmesi için iki farklı yöntem uygulanır. Bu yöntemlerden ilki faz ayrımı yöntemidir. Yöntemde, enzim ve mikrokapsülü oluşturan çözelti damlalar halinde çöktürücüye eklenir. İkinci yöntem olan ara yüzey polimerizasyonunda ise enzimin sulu çözeltisi, suyla karışmayan organik çözeltilerde emülsiyeye edilir ve bu ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikrodamlarının etrafında membran oluşturur. Böylece, mikrokapsüllenen enzimin hacminde ve yüzeyinde artış gözlenir.

1.2.3.4. Çapraz Bağlanma Yöntemi

Küçük moleküllü iki veya çoklu fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlar. Yöntemde, molekül içi bağların yanı sıra moleküller arası bağ türleri de söz konusudur. Enzimleri immobilize etmek için tek bir işlemde iki veya çok fonksiyonel maddelerin kullanılması bu yöntemde büyük bir avantaj kazandırmaktadır. Enzimin yapıdan sızması da oldukça güçtür. Yöntemin uygulanması esnasında oluşan kontrol zorluğu, enzim aktivitesinde ve aktif merkezinde meydana gelebilecek değişimler yöntemde dezavantaj olarak yansımaktadır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, klorformat ve karbonildiimidazol, metal iyonları ve epiklorohidridir.

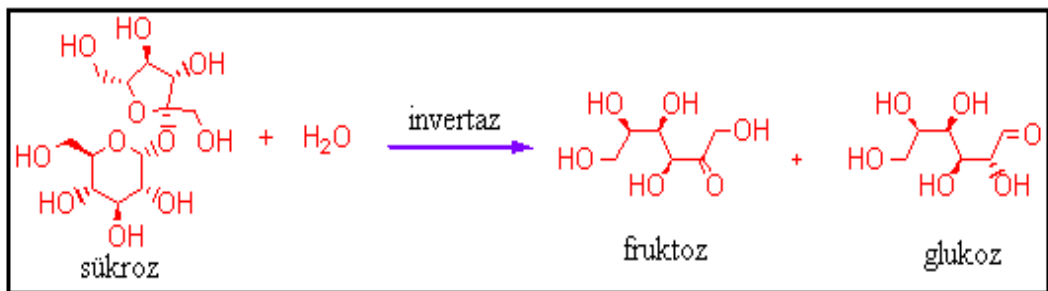
Enzimler bu yöntemle kullanıldığı çapraz bağlı polimer ile de immobilize edilebilirler. Bu yöntemde polimer zincirleri arasında çapraz bağ oluşturulur. Bunun için çapraz bağlayıcı ajanlar (metilenbisakrilamid v.b.) kullanılmaktadır. Enzim polimerizasyon çözeltisine aktarılır ve polimerizasyon sırasında oluşan bağlar arasında enzim sabitlenir. Polimerizasyon sisteminin

yüksek sıcaklık ve/veya U.V. gibi ışımaya türleri enzim yapısında bozunmalara neden olabilir. Ayrıca oluşan çapraz bağlı polimer içinde enzim ile substratın etkileşimi oldukça zordur.

1.3. İvertaz Enziminin Kullanım Alanları

İvertaz bilinen en eski enzimlerden biridir. Bu nedenle invertazın yapısı ve kinetiği hakkında oldukça fazla bilgi mevcuttur ⁽³⁴⁾. Mayadan elde edilen invertazın en ilginç özelliklerinden birisi heterojen olmasıdır. Mayada invertaz sentezinde 6 farklı gen görev almaktadır. Bu farklı genler birbirine benzer fakat birbirinin tamamen aynısı olmayan farklı invertaz yapılarının üretilmesine neden olmaktadır.

İvertaz sükrozu, glukoz ve fruktoza hidroliz eden bir enzimdir (Şekil 1.2). Sistematik ismi beta-fruktofuranozidaz (EC3.2.1.26) olan invertaz, beta-fructofuranoside kalıntılarının indirgen olmayan terminal bölgelerinin hidrolizinden sorumludur.



Şekil 1.2. İvertazın katalizlediği reaksiyon

Glukoz ve fruktozdan oluşan bu karışım düşük kristallenme özelliğine sahiptir ve yüksek konsantrasyonlarda da sükroza kıyasla kristallenme

özelliği oldukça azdır. Gıda sektöründe bu ürünlerin kullanımı ile gıdaların raf ömürlerinde uzamalar sağlanmaktadır.

Gıda endüstrisinde yapay bal, krema, reçel ve sıvı şeker üretiminde immobilize invertaz yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca çok sayıda hazır gıdada süzkroz yerine invertazın katalizlediği reaksiyon sonucunda oluşan fruktoz ürünü tercih edilmektedir. Çünkü fruktozun tatlandırma gücü daha yüksek ve kullanıldığı besin maddesi içinde kristallenmesi güçtür. Bu nedenle gıda endüstrisinde ürün kalitesinin arttırılabilmesi için süzkroz yerine fruktoz tercih edilmektedir. Ayrıca invertaz reaksiyonu ile süzkrozdan eşit miktarda glukoz ve fruktoz içeren karışım (invert şeker) oluşmaktadır. İvert şekerin endüstriyel uygulamalarda işlenmesi daha kolay ve tatlandırma gücü süzkroza kıyasla daha yüksektir. Ayrıca invert şeker kullanıldığında, ürünün uzun süreli saklama periyodu süresince taze yumuşak kaldığı görülmüştür. Bu nedenle invertaz enzimi ihtiyacı gıda endüstrisinde gün geçtikçe artmaktadır^(35,36).

Sağlık ve de lezzet açısından gıda endüstrisinde kullanılan invertazın yüksek derecede saf olması gerekmektedir. Bu nedenle, enzimin üretimi için gereken işlem maliyeti artmaktadır. Karbonhidrat kaynağı olarak süzkroz kullanan mikroorganizmalardan invertaz enzimi saflaştırılmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces carlsbergensis* maya hücrelerinden invertaz yüksek miktarda saflaştırılabilmektedir. Saflaştırma işleminde besi ortamından ve dış ortamdaki gelebilecek kontaminasyonlar enzim saflığını önemli derecede etkilemektedir. Hücre içi invertaz 135.000 Dalton, hücre dışı invertaz ise 270.000 Dalton moleküler ağırlığa sahiptir.

Literatürde invertazın immobilizasyonu için farklı yapıda destek materyalleri kullanılmıştır. İvertaz enziminin polietilen, polianilin, jelatin, karbonhidrat kalıntıları, polielektrotlar, selüloz küreler gibi materyallere immobilize edilmesi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır⁽³⁷⁾. Ahmad ve arkadaşları⁽¹⁸⁾, lektin destek materyalini; Chen ve arkadaşları⁽³⁸⁾, poli(anilin-akrilik asit) filmlerini; Tümtürk ve arkadaşları⁽³⁹⁾, asit-ko-alkilpoliamin granüllerini; Arslan ve arkadaşları⁽⁴⁰⁾, akrilamid/maleik asit silindirik yapıları; Emregül ve arkadaşları⁽⁴⁴⁾, karboksimetilselüloz-gelatin materyallerini invertaz immobilizasyonunda kullanmışlardır.

İvertaz enzimi karboksilik grupları bakımından zengin asidik bir enzimdir. İvertaz immobilizasyonunda kullanılacak destek materyalin bazı özellikte olmasının invertaz ve destek materyal arasındaki etkileşimi arttırabileceği ve enzimin polimerik yapıdan sızmasını önleyeceğini rapor edilmiştir⁽⁴²⁾.

İvertaz immobilizasyonu ile geliştirilen biyosensör sistemler çeşitli alanlarda kullanılabilir. İvertaz temelli biyosensörler ile ağır metal iyonlarının tayini ve saptanması mümkündür. Bu sensör sistemi, civa (Hg) ve bakır (Cu) gibi metallerin invertaz enzimine bağlanması ve enzimi inhibe etmesi esasına dayanmaktadır. Ayrıca invertaz biyosensörü gıda endüstrisinde sükröz konsantrasyonunun tayininde, yoğun süt ürünlerinde tatlandırma işlemlerinde de kullanılmaktadır⁽⁴³⁾.

Arıca ve arkadaşları, UV başlatıcılı fotopolimerizasyon yöntemiyle hazırladıkları poli(2-hidroksietil metakrilat) (pHEMA) membranlarına, uzatma kolu (hekzametilendiamin vb.) takarak, invertaz enzimini immobilize

etmişlerdir⁽²⁴⁾. Bayramoğlu ve arkadaşları 2-Hidroksietil metakrilat ve glisidil metakrilat kompozit reaktif film üzerine invertazın kovalent tutuklanmasını araştırmışlar ve s¼rekli sistem uygulamalarını gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, immobilize invertazın aktivitesini, serbest eşleneğine g¼re aktivitelerinin %85'e kadar çıktığını ve oldukça kararlı olduğunu belirtmişlerdir. 168 saat reaksiyon işlemi sonunda tutuklu invertaz kaybının yaklaşık olarak %8 olduğunu ifade etmişlerdir (inver-HEMA)⁽²⁹⁾. Arıca ve Bayramoğlu, epoksi grubu içeren poli(glisidil metakrilat-kometilmetakrilat), poli(GMA-MMA), k¼releri s¼spansiyon polimerizasyonu y¼ntemi ile hazırlamışlar ve k¼relerin y¼zeyini polietilenimin ile aşılayarak adsorpsiyon yoluyla invertaz immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanılmıştır. Kesikli sistemde k¼relerinin maksimum invertaz tutuklama kapasitesi 52 mg/g olarak tespit edilmiş ve immobilize invertazın bağıl aktivitesinin serbest eşleniğine g¼re daha geniş pH ve sıcaklık aralığında olduğu rapor edilmiştir⁽²³⁾. Akg¼l ve arkadaşları, hazırlamış oldukları polivinilalkol (PVAL) mikrok¼relerinin hidroksil gruplarının aktivasyonu için 1,1'-Carbonildiimidazol (CDI) kullanarak, invertaz enzimini kovalent bağlama y¼ntemiyle immobilize etmişlerdir. İmmobilize invertazın aktivitesini %74 olarak bulmuşlardır⁽²⁹⁾.

Worsfold ve arkadaşları, invertazı y¼ksek verimle Con A-agaroz y¼zerine immobilize etmişlerdir. Bu immobilize enzim sisteminin K_m değeri, serbest invertazın K_m değerine yakın bulunmuştur⁽¹⁷⁾. Ayrıca immobilize enzim sisteminin optimum aktivite g¼sterdiđi pH aralığı genişlemiş ve 65 C'deki stabilitesinin arttığı belirtilmiştir. Bagal ve arkadaşları, agaroz-guar

zamlı kompozit materyalini invertaz immobilizasyonunda kullanmışlardır ve %91 oranında immobilizasyon kapasitesine ulaştıklarını rapor etmişlerdir⁽⁴²⁾. Delgado ve arkadaşları, nylon-6 mikrokürelere invertazın kovalent bağlanma yoluyla immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin optimum pH'sını 5.5, V_{max} değerini serbest invertaz için $1.37 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ve immobilize invertaz için $1.06 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir. Ayrıca immobilize invertazın 50°C 'de termal kararlılığının %25 arttığını rapor etmişlerdir⁽⁴³⁾. Emregül ve arkadaşları, poliakrilamid-jelatin taşıyıcı matriksleri kullanarak invertaz immobilizasyonu çalışmışlardır. Immobilizasyon sonrası tutuklanmış invertazın K_m değerinin serbest enzime kıyasla daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca immobilize invertaz enzimini 2 ay süreyle herhangi bir aktivite kaybı olmaksızın kullanabildiklerini belirtmişlerdir⁽⁴⁴⁾.

Gomez ve arkadaşları, sodyum aljinat kaplı kitin destek materyaline invertazın immobilizasyonu ile iyonik şiddet ve sıcaklığa karşı serbest enzime kıyasla dört kat daha dirençli hale geldiğini rapor etmişlerdir⁽⁴⁵⁾. Bora ve arkadaşları, selüloz membranlarını fotoaktivasyon yöntemi ile modifiye etmişlerdir ve invertaz immobilizasyonu için kullanmışlardır. Immobilizasyon sonrası invertaz K_m ve V_{max} değerleri serbest invertaza kıyasla artmıştır ve K_m 45.12 mM , V_{max} 362.31 U mg^{-1} olarak bulmuşlardır⁽⁴⁶⁾.

Gürsel ve arkadaşları, N-pyrrolyl uçlu polidimetilsiloksan/polipirol matrikse elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi ile invertaz ve glukoz oksidaz enzimleri immobilizasyonunu çalışmışlardır. Her iki enzimin immobilizasyon sonrasında, serbest enzim yapılarına kıyasla V_{max}

değerlerinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir⁽⁴⁷⁾. Işık ve arkadaşları, poli 2-metilbütül-2-(3-tienil) asetat/polipirol kopolimer materyale elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi ile invertaz immobilizasyonunu sağlamışlardır. Immobilizasyon sonrasında enzimin K_m değerinde azalma ve 60 günlük depolama sonrasında immobilize invertaz aktivitesinde sadece %7'lik bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir⁽⁴⁸⁾. Prodanovic ve arkadaşları ise sepiolit desteğine adsorpsiyon yolu ile invertaz immobilizasyonu gerçekleştirmişlerdir ve immobilize invertazın yüksek tuz konsantrasyonlarında gerçekleştirilen yıkama işlemlerine karşı dirençli olduğunu ve 60 C°'de yarılanma ömrünün serbest invertaza kıyasla 8 kat daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir⁽⁴⁹⁾.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kimyasal Maddeler

İnvertaz (β -fruktofuranosidaz, EC 3.2.1.26, Grade VII ekmek mayası), glikoz oksidaz (GOD, EC 1.1.3.4, *Aspergillus niger* Tip II), sığır serum albümin (BSA), o-dianisidin dihidroklorid, sukroz ve glikoz Sigma Chem'den elde edildi. Başlatıcı olarak kullanılan α, α' azobisisobutirilonitril (AIBN), polivinil alkol (PVA), ve toluen Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, ABD) firmasından temin edildi ve alındığı gibi kullanıldı. Glisidil metakrilat, metil metakrilat Merck AG (Darmstadt, Almanya), etilenglikoldimetakrilat ise Aldrich Chemical Company (USA) firmasından alındı ve monomerler hidrokinon varlığında azaltılmış basınç altında distile edildi ve kullanılıncaya kadar 4° C'de saklandı. Diğer tüm

kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

Çalışmamızın her aşamasında kullanılan su, Barnstead (Dubuque, IA, USA) ROpure LP marka ters ozmoz, Barnstead D3804 NANOpure organik/kolloid uzaklaştırıcı yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) üniteleri ve iyon-değişimi dolgulu yatak kolonundan oluşan ultra-saf su sisteminden elde edildi.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) Destek Materyalinin Sentezi

Bu çalışmada, süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile çapraz bağlayıcı (etilenglikol dimetakriat, EGDMA) varlığında, glisidilmetakrilat (GMA) ve metilmetakrilat (MMA) komonomerleri kullanılarak invertaz enzimi immobilizasyonunda kullanılmak üzere magnetik özellik kazandırılmış küre yapıda poli(glisidilmetakrilat-ko-metilmetakrilat), poli(GMA-ko-MMA), mikroküreleri magnetik özellik taşıyan yeni bir destek materyali olarak hazırlandı. Poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelerinin sentezi ve magnetizasyonu iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada, demir içeren poli(GMA-MMA) küreleri, Fe^{+3} iyonları varlığında süspansiyon polimerizasyonu yoluyla monomerlerinden hazırlandı. Bu amaç doğrultusunda, glisidilmetakrilat (7.5 ml) ve metilmetakrilat (7.5 ml) komonomerleri α - α' -azobisisobutirilonitril başlatıcısı (0.2 g) varlığında çapraz bağlayıcı olarak etilenglikoldimetakrilat

(7.5 ml) monomerleri, polimerizasyon işleminden önce, NaOH-NaCl çözeltisi kullanılarak ekstrakte edilerek monomer içindeki inhibitör uzaklaştırıldı ve ekstrakt içinde kalabilecek muhtemel su molekülleri ise CaCl₂ kullanılarak uzaklaştırıldı. Komonomer karışımının ve stabilizatör olarak da, polivinil alkol (PVA), çözeltisinin (20 cm³, %5.0 w/v) kullanıldığı polimerizasyon sistemini içeren reaktör sıcaklığı 65 °C olan su banyosuna yerleştirildi. Dağıtıcı ortam olarak toluen (20 ml) ve su, elektrolit olarak FeCl₃ (0.1 M, 400 ml) çözeltisi kullanıldı. Polimerizasyon işlemi, 250 rpm karıştırma hızında 70 °C'de 2.0 saat ve 80 °C'de 1.0 saat mekanik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak gerçekleştirildi.

İkinci aşamada ise poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelerin yapısında demir oksit kristali oluşumu için Fe⁺² iyonları içeren NH₃·H₂O sulu çözeltisinde klasik termal çöktürme reaksiyonu gerçekleştirildi. Ko-presipitasyon işlemi için süzülen poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelerin 100 ml distile su içerisinde FeSO₄ (5 g) çözeltisinin bulunduğu reaktöre aktarıldı. Mekanik karıştırıcı ile sürekli karıştırılan reaktör, azot atmosferi altında 2 saat içerisinde oda sıcaklığından 90 °C sıcaklığa kadar çıkan sistem koşullarında geri soğutucu altında damla damla NH₃·H₂O amonyak (50ml, %25 v/v) eklenirken reflüks edilmesi sağlandı. Termal çöktürme reaksiyonu süresince, manyetik kürelerin epoksi grupları, ortamdaki amonyağın varlığından dolayı, amonolizis reaksiyonu yoluyla amino gruplarına dönüştürülmüş oldu⁽²³⁾. Ko-presipitasyon yöntemi ile magnetizasyon işleminin tamamlanması işlemi takiben, Bühner hunisi ile süzülen magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikroküreleri, reaksiyon ortamından ayrıldı, 3 saat etanol çözeltisi (70%; 250 ml) ile yıkandı ve daha sonra sırası

ile distile su, sitrik asit, nitrik asit, NaCl çözeltisi ve su ile yıkandı. Magnetik mikroküreler süzöldü ve 30-35°C'de vakum etövide kurutuldu.

2.2.2. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) Mikrokürelerin Karakterizasyonu

- Vakum etövönde kurutulan magnetik mikroküreler moleköler elek ile elenerek boy ve boyut dağılımı belirlendi ve polimerizasyon verimi hesaplandı.
- Magnetik mikrokürelerin yüzey alanı, BET (Brunauer-Emmett-Teller) metodu kullanılarak yüzey analizi cihazı ile ölçöldü.
- Magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelerin ko-presipitasyon işleminde amin grubuna dönöşmeden kalan erişilebilir epoksi grubu içeriğı literatürde verilen piridin-HCl yöntemi ile tayin edildi.⁽²⁶⁾ Bu amaçla, 0.5 g mikroküre piridin-HCl çözeltisi (50 ml) ile 20 dakika geri soğotucu altında etkileştirildi. Reaksiyon sonunda örnök ayarlı NaOH çözeltisi (0.1 M) ile titre edildi.
- Mikrokürelerinin şişme oranı, distile su içerisinde gravimetrik yöntem kullanılarak tayin edildi.
- Mikrokürelerin yoğunluğu piknometre yardımıyla, mikroküreler için çözöcü olmayan bir sıvı (n-Dekan) kullanılarak belirlendi.
- 75-150 µm boyut dağılımına sahip magnetik mikroküreleri, azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı ve kürelerin elektron mikrografları JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

- Magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelere ait FTIR spektrumu, FTIR spektrometre (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde edildi. 0.1 g kuru küre ve 0.1 g KBr karıştırılarak tablet haline getirildikten sonra spektrumu alındı.

2.2.3. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) Mikrokürelere İnvertz İmmobilizasyonu

2.2.3.1. Mikrokürelere Glutaraldehit ile Aktivasyonu

Magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelere (~ 5.0 g), fosfat tamponu içerisinde (50 mM, pH 7.4) dengeye getirildi ve reaktörde aynı tampon sisteminde hazırlanan glutaraldehit çözeltisi (% 0.5 v/v, 50 ml) içerisine aktarıldı ve oda sıcaklığında 12 saat magnetik karıştırıcıda karıştırılarak inkübasyonu sağlandı. Aktivasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra mikrokürelere sırası ile distile su, asetik asit çözeltisi (100 mM, 100 ml) ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7.0) ile yıkanarak glutaraldehitin fazlası uzaklaştırıldı. Glutaraldehit çözeltisinin başlangıç ve aktivasyon sonundaki adsorbansları ölçülerek magnetik mikrokürelere bağlanan glutaraldehit miktarı tayin edildi.

2.2.3.2. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) Mikrokürelere İnvertz İmmobilizasyonu

Çalışmanın bu kısmında sentezlenip aktive edilen magnetik poli(GMA-MMA) mikrokürelere invertaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi. Glutaraldehit aktivasyonu yapılan magnetik mikrokürelere (~5.0 g) 2 saat fosfat tamponunda (50 mM, pH 7.0) dengeye getirildi ve invertaz enzimi (50 ml, 2.0 mg ml⁻¹) içeren ortama transfer edildi. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelere invertazın kovalent bağlanma yöntemi ile immobilizasyonu 4 °C ortam sıcaklığında 20 saat süresince inkübe edilerek gerçekleştirildi. Bu periyot sonunda magnetik mikrokürelere, reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı ve 1.0 M NaCl ve sonra fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.0) ile yıkandı.

2.2.3.2.1. Magnetik Mikrokürelere İmmobilize Edilen İvertaz Miktarı

İvertaz immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanılan magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelere üzerine tutuklanan invertaz miktarı, Bradford yöntemi ile Coomassie Brilliant Blue kullanılarak, immobilizasyon ortamındaki başlangıç ve bakiye protein konsantrasyonu ölçülerek tayin edildi⁽²²⁾. Bilinen albümin (BSA) konsantrasyonu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi, enzim ve yıkama çözeltisindeki protein miktarının hesaplanmasında kullanıldı.

2.2.3.3. Serbest ve İmmobilize İvertazın Aktivite Tayinleri

Serbest ve immobilize invertaz preparasyonlarının aktiviteleri, birim zaman başına invertazın katalizlediği hidroliz reaksiyonu sonucu, serbest kalan glikoz miktarı ölçülerek tayin edildi.

Serbest enzimin aktivitesinin tayininde, reaksiyon ortamı asetat tamponu (2.5 ml, 50 mM, pH= 5.0) ve sükroz (0.1 ml, 300 mM) ile oluşturuldu. Ön inkübasyon periyodunun ardından (35 °C'de 5 dak), aktivite enzim çözeltisinin (10 mg ml⁻¹ invertaz çözeltisinden 0.1 ml) eklenmesiyle başlatıldı ve inkübasyon 5 dakika boyunca devam ettirildi. Enzimatik reaksiyonu sonlandırmak için, reaksiyon ortamı, kaynayan su banyosu ortamına yerleştirilerek 5 dakikalık inkübasyon sağlandı.

Aynı aktivite ortamı, immobilize enzimin aktivite tayininde kullanıldı. Enzimatik reaksiyon aktivite ortamına 0.1 g invertaz enzimi tutuklu magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelerin transferi ile başlatıldı ve 35 °C'de çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirildi. 10 dakika sonra, enzim tutuklu magnetik mikrokürelerin reaksiyon karışımından uzaklaştırılması ile, reaksiyon sonlandırıldı.

Serbest ve immobilize eşleniklerinin sukroz hidroliz performansı, yukarıda verilen enzimatik reaksiyon ve Bayramoğlu ve arkadaşlarının daha önceden çalışmalarında tanımlanan metoda göre, ortamın glikoz içeriği ölçülerek tayin edildi⁽²⁹⁾. Aktivite karışımı, fosfat tamponu (100 ml, 0.1 M, pH= 7.0) içerisinde sodyum-potasyum tartarat (25 mg), sodyum hidroksit (1.6 g) ve dinitrosalisilaldehit, DNSA, (1.0 g) içerir. Aktivite karışım örneği (2.5 ml) ve enzimatik olarak hidroliz edilen örnek karıştırılarak su banyosunda, 30 dakika süresince 35 °C sıcaklıkta inkübe edildi. Bu işlemin ardından sülfirik asit (1.5 ml, %30) eklendi ve adsorbans, 530 nm'de UV/Vis Spektrofotometre (Shidmadzu, Model 1601, Tokyo, Japonya) ile ölçüldü.

2.2.3.4. İmmobilize İvertazın Aktivitesine Sistem Parametrelerinin Etkisi

Serbest ve tutuklu invertazın aktiviteleri, sırasıyla mmol glikoz dak⁻¹ mg⁻¹ enzim ve mmol glikoz dak⁻¹ mg⁻¹ enzim-küre olarak belirtildi. Serbest ve immobilize enzim aktivitesinin pH ve sıcaklık profillerini tayin etmek için, pH 3.0-8.0 aralığında ve sıcaklık 20-75 °C aralığında kesikli sistemde çalışıldı. pH, sıcaklık ve depolamaya bağlı sonuçlar, kullanımda tekrar edildi ve her bir setin en yüksek değeri, %100 aktivite değeri olarak kabul edildi. Diğer değerler buna göre hesaplanarak % aktivite olarak ifade edilerek normalize edilmiş yapıda sunuldu.

2.2.3.5. Kinetik Sabitlerin Tayin Edilmesi

Serbest enzimin K_m ve V_{max} değerleri 35 °C'de sukroz (30-300 mM) içeren asetat tamponunda (50mM, pH= 5.0), reaksiyonun başlangıç hızı ölçülerek tayin edildi. İmmobilize invertazın kinetik parametreleri, farklı sukroz konsantrasyonları (30-300 mM) içeren asetat tamponunda (50mM, pH= 5.0), kesikli sistemde belirlendi. K_m ve V_{max} değerleri 15 dak sonra elde edilen verilerden hesaplandı.

2.2.3.6. Serbest ve İmmobilize Enzimin Isısal Kararlılığı

Serbest ve tutuklu enzimin ısıl kararlılığı, 2 saat asetat tamponunda (50 mM, pH= 5.0) iki farklı sıcaklığa (60 ve 70 °C) maruz bırakılan enzimin kalan aktivitesi ölçülerek belirlendi. Her 15 dakika zaman aralığından sonra, 0.1 g enzim-küreleri uzaklaştırıldı ve yukarıda tanımlandığı gibi enzimatik aktivite tayini gerçekleştirildi. Birinci dereceden inaktivasyon hız sabitleri, k_i aşağıdaki denklemlerden hesaplandı:

$$-(dA_o/dt) = k_i A_o$$

$$\ln A_t = \ln A_o - k_i t$$

A_o başlangıç aktivite, A_t t zaman sonraki aktivite değerini ifade eder.

2.2.3.7. Depolama Kararlılığı

Bu deney, asetat tamponunda (50 mM, pH= 5.0) 4 °C'de 56 gün depolama süresinden sonra serbest ve immobilize invertazın kararlılığını tespit etmek için gerçekleştirildi. Kalan aktiviteler yukarıda verilen deneysel koşullar altında bir kesikli sistem işlem modunda belirlendi ve serbest ve immobilize enzimin aktivitesi, başlangıç aktivitesine göre kalan aktivitesinin bir yüzdesi olarak ifade edildi.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Genomik sonrası çağda, magnetik ayırma ve izolasyon temeline dayanan teknolojiler, bugünün biyomateryal ve biyoteknoloji laboratuvarlarının vazgeçilmez bir bölümü haline gelmiş bulunmaktadır. Magnetik taşıyıcılar ve adsorbentler, laboratuvarda hazırlanabilir ya da ticari olarak temin edilebilir. Manyetik taşıyıcılar, genellikle partikül formunda, çeşitli sentetik polimerlerden, biyopolimerlerden, gözenekli camdan, ya da yüzeyi modifiye edilmiş magnetik gibi, inorganik magnetik materyallere dayanan magnetik partiküllerden hazırlanmış olarak elde edilmektedirler⁽¹⁰⁻¹³⁾. Çoğu partiküller dış magnetik alana karşılık olarak, süperparamagnetik gibi davranırlar, fakat magnetik alanın uzaklaştırılması sonucu hemen sistem içerisine yeniden suspansiye olmaları büyük avantaj sağlamaktadır ve manyetik alan yokluğunda kendi aralarında etkileşim olmamaktadır^(14,15).

Genellikle biyomateryal ve biyoteknoloji uygulamalarında kullanılan magnetik destekler polimerizasyon işlemi sırasında ortama magnetik demiroksit partiküllerinin ilavesi ile hazırlanmaktadır. Ticari olarak temin edilebilen ve/veya laboratuvar koşullarında hazırlanan magnetik materyaller iki temel yapıdan oluşmaktadır. İlk yapı Fe_3O_4 , $MnFe_2O_4$ ve $CoFe_2O_4$ gibi inorganik magnetik nanopartiküllerden oluşan magnetik merkezdir. Magnetik materyalleri oluşturan ikinci yapı ise magnetik merkezi

çevreleyen polimerik kabuktur. Magnetik merkez materyale magnetik özellik kazandırırken polimerik yapı daha çok saflaştırma ve immobilizasyon gibi amaçlara hizmet etmektedir⁽⁹⁾.

Sunulan tez kapsamındaki çalışmamızda, invertaz enziminin immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanılmak üzere magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikroküreleri yeni bir metod kullanılarak süspansiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Kürelere magnetik özellik kazandırma işlemi literatürde yer alan magnetik partiküllerin polimerizasyon sırasında eklenmesi yerine öncelikli olarak demir içeren poli(GMA-ko-MMA) küreleri, Fe⁺³ iyonları varlığında sentezlenerek bir sonraki aşamada demir oksit kristali oluşumu için Fe⁺² iyonları içeren NH₃·H₂O sulu çözeltisinde klasik termal çöktürme reaksiyonunu kapsamaktadır. Bu yeni yöntem bize süperparamagnetik özelliğin mikrokürelere kazandırılmasını sağlayarak literatürde yer alan magnetik kürelere karşıtlarına göre önemli bir üstünlük sergilemektedir.

3.1. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) Mikrokürelerin Özellikleri

Destek materyalinin fiziksel yapısı ve kimyasal kompozisyonu, tutuklu enzimin mikro çevresini ve buna bağlı olarak onun biyolojik özelliklerini etkilediği çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir^(9,28). Enzimler çoğunlukla, dolgulu yatak reaktörlerinde biyolojik katalizör olarak kullanılmak üzere polimerler üzerine immobilize edilmektedir. Kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonu işlemi için biyoteknolojide çok sıklıkla kullanılan destek materyalleri; kitin, selüloz, akrilik polimer ve polivinilalkol gibi doğal ve sentetik polimerlerin aktivasyonundan sonra elde edilir⁽²⁴⁻²⁶⁾. Çalışmamızda

sunulan yöntem, süperparamagnetik mikrokürelerin magnetizasyonu aşamasında yüzeyinde erişilebilir epoksi gruplarının amin gruplarına dönüştürülmesini ve aktivasyon ajanı olarak gultarikdialdehitin kullanılarak modifiye edilmesi ve dolayısı ile invertaz enziminin yüzeye kovalent olarak bağlanmasını içeren etkili bir tekniktir. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelerinin aktivasyonu ve enzimin amino grubu üzerinden destek materyaline immobilizasyonu şematik olarak Şekil 3.1 de sunuldu.

Şekil 3.1. Magnetik poli (GMA-ko-MMA) mikrokürelere enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi

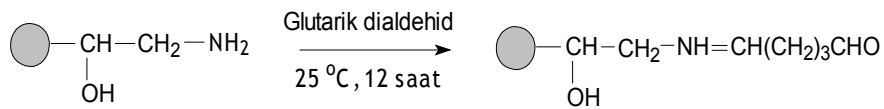
a) Amonyak varlığında amin grubunun oluşumu



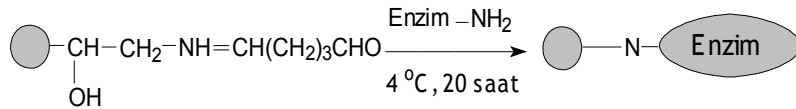
poli(GMA-ko-MMA)

magnetik poli(GMA-ko-MMA)

b) Magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelerin aktivasyonu



c) Aktive edilen magnetik kürelere enzim immobilizasyonu



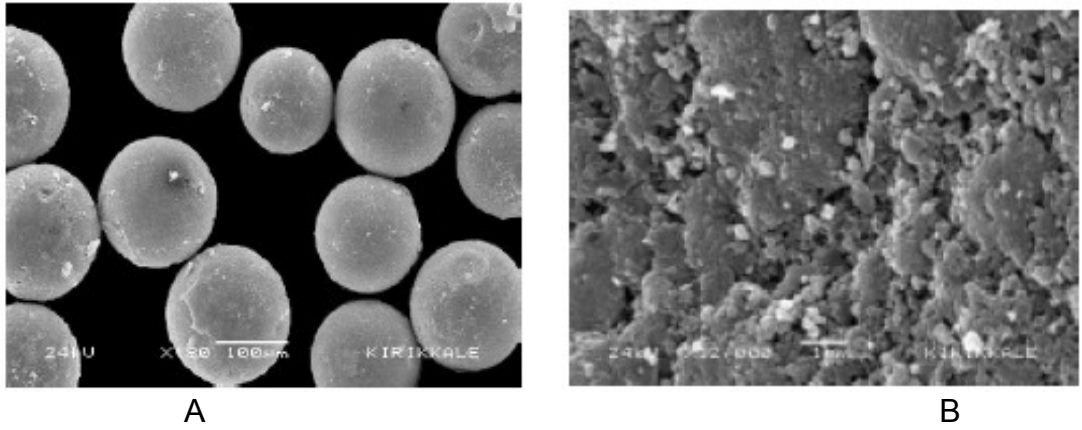
Enzim immobilize magnetik poli(GMA-ko-MMA)

Vakum etüvünde kurutulan magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikroküreleri moleküler elek ile elendi. Dağılım aralığı 300-212-150-75-53 µm gözenek çaplı moleküler elekler kullanılarak belirlendi. Polimerizasyon verimi %76 olarak belirlenen 75-150 µm boyut dağılımına sahip olan mikrokürelere, deneyde kullanılmak üzere ayrıldı. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) kürelerinin spesifik yüzey alanı, BET yöntemiyle ölçüldü ve 21.6 m²/g küre olarak bulundu. Mikrokürelere taşıdığı epoksi gruplarının bir kısmının magnetik kürelerin iç tarafında kalması nedeni ile analitik tayinler için ulaşılabilir olamaması sonucunda, ko-persipitasyon reaksiyonunda amino grubuna dönüşmemiş epoksi grubu miktarı pridin-HCl yöntemi kullanılarak 1.08 mmol/g küre olarak belirlendi.

Su içeriği, enzim immobilizasyonunda, destek materyallerinin kullanımı tasarlandığında çok önemlidir. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) kürelerinin denge şişme oranı 1.31 olarak belirlendi. Bu değer biyoteknolojik uygulama konusu olan enzim immobilizasyonu sürekli sistem reaktör uygulamaları için makul sınırlar arasında bulunmaktadır. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) kürelerinin yoğunluğu ise 1.32 g/cm³ olarak ölçüldü.

İmmobilize enzimlerin immobilizasyon sonrası özellikleri, enzimin ve destek materyalin özelliklerine bağlı olduğu bilinmektedir. İmmobilize enzimin verimi, hem bağlanma sırasında meydana gelen aktivite kayıplardan dolayı hem de enzim moleküllerinin destek malzemesinden sızması ile azalmaktadır. Bu limitler tutuklu enzimin verimi düşürmektedir. Enzimatik reaksiyon verimini artırmak için çeşitli önlemler alınabilmektedir. Genel olarak, desteğin boyutu ve gözenek çapını küçültmek, yüksek spesifik

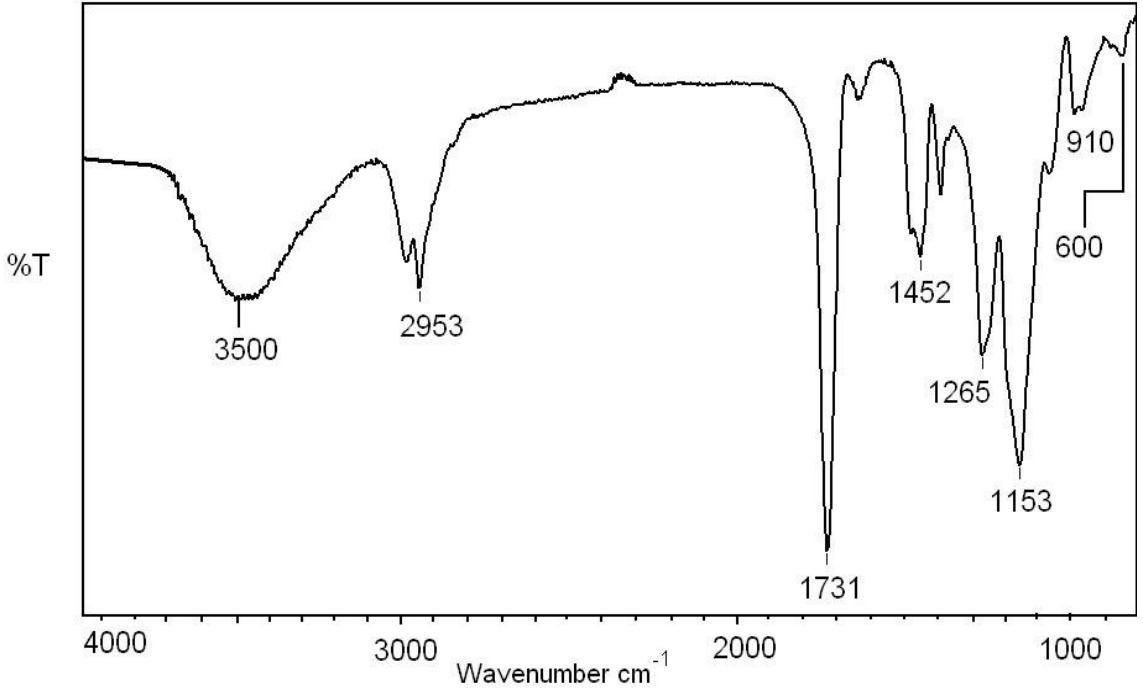
aktivitesi olan enzimlerde enzim yükleme miktarını azaltmak ve enzimi taşıyıcı materyalin dış yüzeyine bağlamak şeklinde tasarlanabilmektedir. Bu amaç doğrultusunda geniş bir yüzey alanı elde etmek için küre geometrisine sahip destek materyalinin ayrıca gözenekli yapıda sentezlenmesi amaçlanmaktadır. Şekil 3.2’de sunulan SEM mikrograflarında sırasıyla, mikrokürelerin yüzey ve enine kesit yapısı gösterildi. Magnetik mikrokürenin, yüksek iç yüzey alanı sağlayan oldukça gözenekli bir yapıya sahip olduğu görüldü. Destek materyalinin sunduğu bu yüzey özellikleri, destek üzerinde düşük difüzyonel kütle transfer direnci ile geniş iç yüzey alanından dolayı yüksek kütle transfer hızı da sağlayacağını düşündürdü.



Şekil 3.2. Magnetik mikrokürelerin SEM mikrografları A) yüzey ve B) kesit görüntüsü

Magnetik poli(GMA-ko-MMA) kürelerinin FTIR spektrumu, Şekil 3.3’de sunuldu. Magnetik poli(GMA-ko-MMA)’nın FTIR spektrumu, $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ ’de alkolün hidrojen bağının karakteristik gerinim titreşimine sahiptir. $\sim 2953 \text{ cm}^{-1}$ ’de metilen titreşimi glisidilmetakrilat ve metilmetakrilatın her ikisinin karakteristik titreşimleri arasında yer alır. 1731 cm^{-1} ’deki titreşim her iki monomerin ester konfigürasyonunu sunar. Epoksi grubu, 910 cm^{-1}

¹'de (epoksi halkası titreşimleri) bandı verdiği görüldü. Fe₃O₄, 600 cm⁻¹'de karakteristik banta sahiptir ve bu poli(GMA-MMA) kürelerinin yapısı içinde Fe₃O₄ moleküllerinin başarılı bir şekilde oluştuğunu göstermektedir. Bu, gravimetrik analiz ile doğrulandı ve küre yapısındaki çökmüş demir oksit kristalinin miktarı 134 mg/g küre olarak belirlendi.



Şekil 3.3. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelerin FTIR spektrumu

3.2. İnvertz Enziminin Aktivitesi

İnvertz enziminin magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelere kovalent olarak bağlanması için iki basamaklı bir işlem uygulandı. İlk basamakta, mikrokürelerin yapısında bulunan amino grupları glutarikdialdehit ile aktive edildi. İkinci basamakta, aktif aldehit grupları ile enzimin amino grubu arasındaki reaksiyon ile kovalent bağlanma gerçekleştirildi (Şekil 3.1). Serbest ve immobilize invertzın aktiviteleri, hidroliz reaksiyonu süresince oluşan invert şeker derişiminin, belirli

zamanlarda alınan örneklerdeki glukoz miktarının tayin edilerek ve reaksiyon hızları hesaplanarak bulundu. Bu çalışmada elde edilen immobilize invertaz aktivitesi %89 civarındadır ve bu değer literatürdeki değerlerle kıyaslanabilir derecede olduğu gözlemlendi.

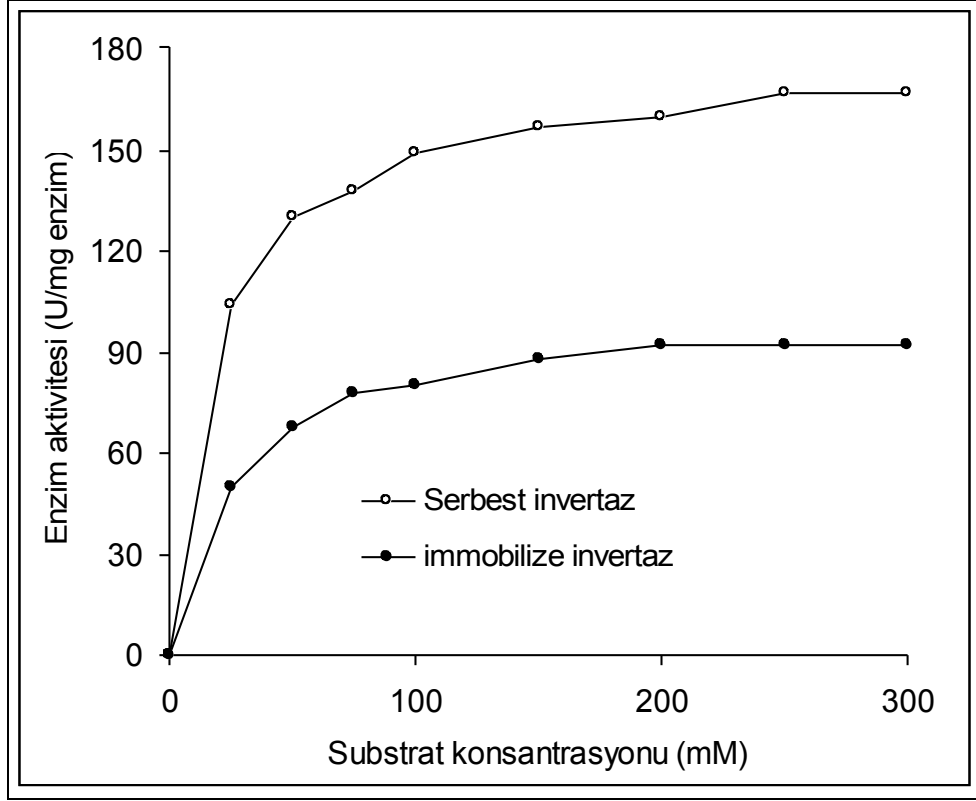
Literatürde, invertaz farklı destek materyalleri üzerine tutuklama çalışmaları mevcuttur. Örneğin, Chen ve ark., modifiye edilmiş polianilin film desteği yüzeyine invertazın kovalent tutuklanmasını çalışmışlardır. Tutuklu enzimin hidroliz aktivitesini yaklaşık 1.3 Ucm² film olarak tespit etmişlerdir⁽³⁸⁾. Akgöl ve ark., invertazın kovalent tutuklanması için magnetik polivinil alkol mikrokürelerini kullandılar. Serbest enzime göre tutuklu invertazın kalan aktivitesini %74 olarak tespit ettiler ⁽²⁹⁾. De Queiroz ve ark., aşılınmış kopolimerize polietilen pelletleri üzerine invertazın kovalent tutuklanmasını çalıştılar⁽⁵⁰⁾. Tutuklu invertaz yaklaşık %50'lik bir aktivite sonucuna sahipti. Vrabel ve ark., aktive edilmiş küreler üzerine kovalent olarak tutuklanmış invertazın, %50 ve %96 arasında aktivite sonucunu rapor etmişlerdir⁽⁵¹⁾. Ahmad ve ark., *C. cajan* lektin desteği üzerine invertazın kovalent tutuklanmasını ve tutuklu invertazın aktivite sonucunu %76 olarak bildirmişlerdir⁽¹⁸⁾. Arıca ve ark., uzatma kolu takılı poli(HEMA) membranı üzerine invertazın kovalent tutuklanmasını rapor ettiler. Tutuklu invertaz aktivitesi, 23 Ucm⁻² membrandı. Reaktif poli(HEMA-GMA) filminin başarılı invertaz yüklemesi verdiği ve diğer membran ya da film tutuklu invertaz sistemleri ile karşılaştırıldığında, tutuklamadan sonra yüksek spesifik aktivite sağladığı gözlemlendi. Sunulan yeni poli(HEMA-GMA-3) filmi destek materyali ile en yüksek enzim

aktivitesi sağlandı (32.7 Ucm^{-2}) ve oldukça ümit verici bir gelişme olarak değerlendirildi⁽⁴⁰⁾.

3.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Özellikleri

Biyokatalistin tutuklu olduğu durumda, K_m ve V_{max} kinetik parametreleri serbest forma göre, substrat için affinite değişimini açığa vuran, değişikliklere maruz kalır. Bu değişiklikler, destek materyali, sterik engellemeler ve difüzyonel etkiler ile proteinin konformasyonel değişikliklerine yol açma gibi çeşitli faktörlere bağlanabilir. Bu faktörler, aynı zamanda yada ayrı ayrı sıra ile bağlı enzim etrafındaki mikroçevrede çalışabilir. Enzim reaktörleri ve biyosensörlerin yapımında, tutuklamanın bir sonucu gibi görünen, izlenebilen kinetik parametrelerdeki değişiklikler çok önemlidir. Serbest ve tutuklu invertazın substrat doygunluk grafiği Şekil 3.4'te sunuldu. Serbest ve tutuklu invertaz için maksimum reaksiyon hızı (V_{max}), Michaelis-Menten sabitleri (K_m) verilerin resiprokal grafiğinden (Lineweaver-Burk grafiği) hesaplandı. Grafik, enzim katalizli reaksiyon için Michaelis-Menten denklemine uyan iki doğru verdi. Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanan serbest invertaz için görünen Michaelis sabitleri K_m ve V_{max} , sukroz için, sırasıyla 18 mM ve 167 Umg^{-1} enzim olarak bulundu ve immobilize enzimin kinetik sabitleri kesikli sistemde tayin edildi. Magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikroküreler üzerine kovalent olarak bağlanan invertaz için görülebilir K_m değeri 32 mM olarak bulundu. İmmobilize enzimin V_{max} değeri, magnetik mikrokürelerine 92 U/mg protein olarak değerlendirildi. Beklenildiği gibi, glutaraldehit ile aktive edilen küreler üzerine enzim immobilizasyonu işleminde sonra K_m

ve V_{max} değerleri önemli oranda değişiklik gösterdi. Serbest ve tutuklu invertaz arasındaki kinetik parametreler arasında gözlenen farkın, enzimin immobilizasyon sırasında konformasyonunda deformasyon olması olarak düşünöldü. Poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat) filmi yüzeyi üzerine kovalent olarak tutuklanan invertaz için Bayramoğlu ve ark. tarafından elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, tutuklu enzimin K_m değeri, serbest forma kıyasla, 14'den 38 mM'a arttığı gözlendi. K_m değerindeki artış sonucu enzimin substrata olan ilgisinin azalmasından kaynaklandığı, ayrıca, tutuklamanın bir sonucu olarak V_{max} değerindeki azalış, K_m değerindeki artışla ilgili olduğu düşünöldü^(19,20,29,32,41). Chen ve ark., tarafından elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, yüzeyi modifiye edilmiş polianilin film üzerine invertazın tutuklanması sonucu, kovalent bağlanan enzimin K_m değeri, serbest enzime kıyasla yaklaşık 2.3 kat daha bulundu⁽³⁸⁾. Enzimin substrata olan afinitesindeki değişim, olası olarak, tutuklama işlemi sırasında enzimde meydana gelen yapısal değişiklikler sonucunda tutuklu enzimin aktif bölgesine substratın kolaylıkla ulaşamadığından kaynaklandığı düşünöldü⁽²³⁾. Ayrıca, enzim immobilizasyonu kürelerin yüzeyine yakın tarafındaki gözenekli boşluklarda da gerçekleşmektedir, bu yolla da kütle transfer direncinde bir artış beklenmektedir. Bu koşullar altında, tutuklu invertaz enzimi serbest eşleneğine kıyasla düşük özgülük sabitlerine sahip olduğu gözlendi.

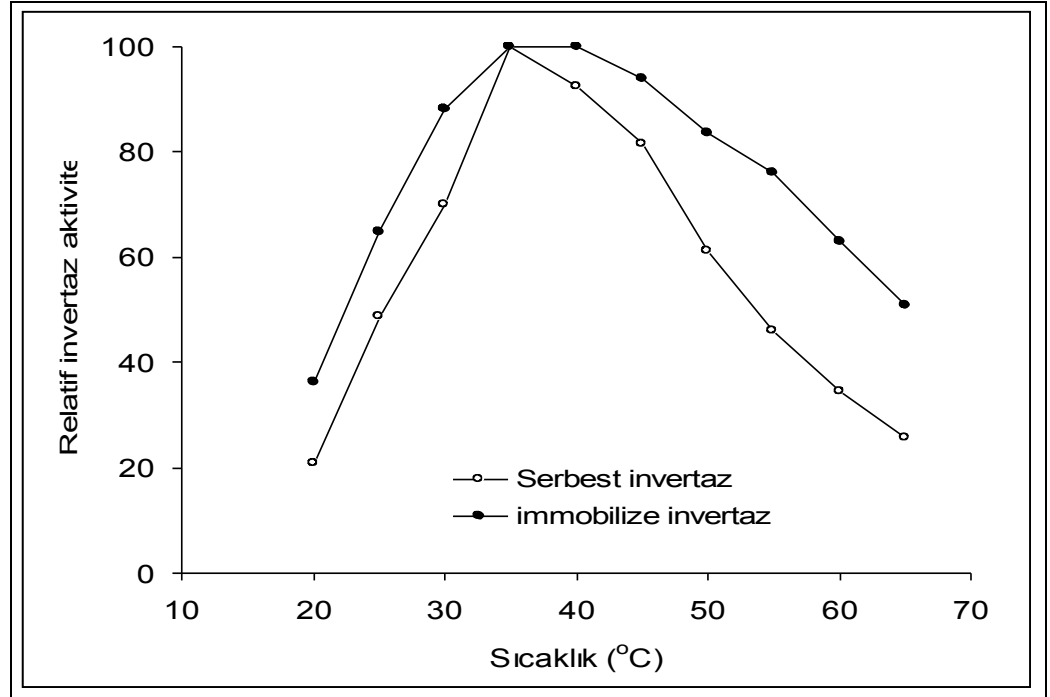


Şekil 3.4. Farklı sukroz konsantrasyonlarında serbest ve immobilize invertaz enzim eşleniklerinin doygunluk eğrisi

3.4. Serbest ve İmmobilize İvertazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık, pH ya da iyonik ortamdaki bir değişiklik proteinlerin denatürasyona neden olmaktadır. Serbest ve kovalent tutuklu invertazın aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 3.5'de gösterildi. 20-75 °C sıcaklık aralığında elde edilen aktiviteler, maksimum aktivitenin bir yüzdesi olarak ifade edildi. Serbest enzimin aktivitesi 35°C'de artarken daha yüksek sıcaklıklarda aktifliği azaldığı için daha hızlı düşer. Tutuklu invertaz için maksimum aktivite 35-40 °C arasında elde edildi ve sıcaklık profilinin serbest enzimden biraz daha geniş olduğu gözlemlendi. Optimum sıcaklıktaki

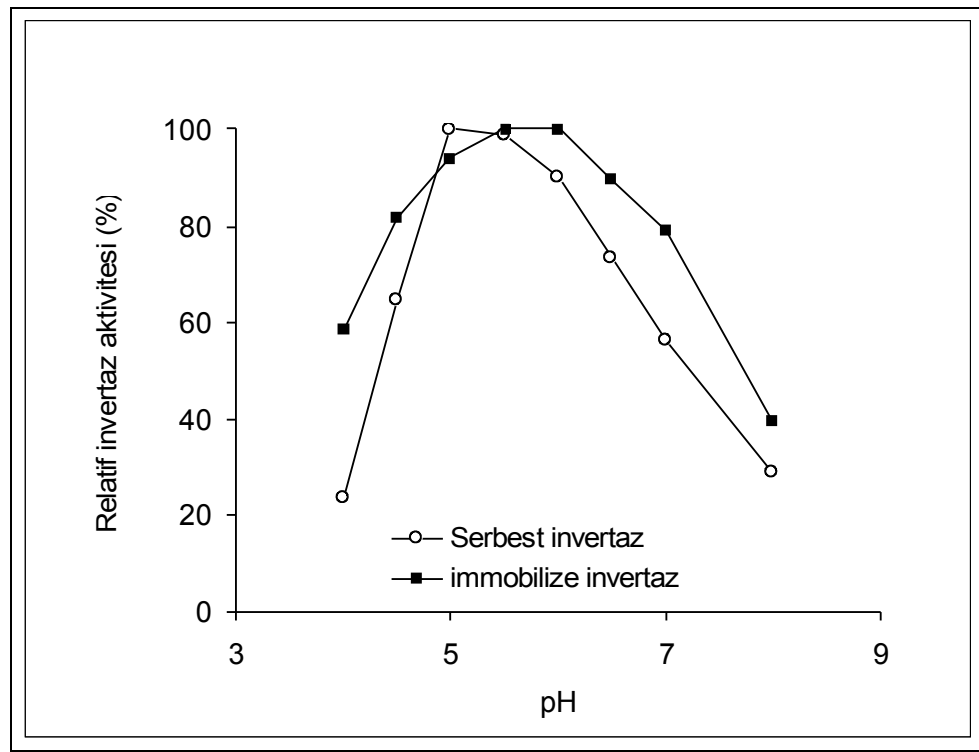
artıŖa, enzimin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin deęiŖmesi neden olduğu gözlendi. Tutuklu invertazın amino grupları vasıtasıyla kovalent bağ oluŖturması sonucu enzimin konformasyonel esnekliğini azaldığı ve enzim molekülün substratına bağlanmak için uygun konformasyonuna sahip olma olasılığının azalması sonucu, daha yüksek bir aktivasyon enerjisi gereksinimi ile sonuçlandığı düşünöldü. Enzim tutuklanmasının ana nedenlerinde bir diğeri de, tutuklamayı takiben, enzim moleküllerin sınırlı konformasyonel hareketliliğinden dolayı, çeŖitli deaktive edici kuvvetlere karŖı kararlılığında oluŖmasına beklenen artıŖlardır⁽⁹⁾.



Ŗekil 3.5. Serbest ve immobilize invertaz enzim eŖleniklerinin aktivitesine sıcaklığın etkisi

3.5. Serbest ve Tutuklu İvertaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Sukroz hidrolizinde, serbest ve immobilize enzim preparasyonlarının aktivitesi üzerine pH'nın etkisi, asetat (pH =3.0-5.5) ve fosfat (pH =6.0-8.0) tamponlarında çalışıldı ve sonuçlar Şekil 3.6'da sunuldu. Serbest ve tutuklu enzimin en yüksek aktivite değerinin gözleendiği optimum pH değeri sırası ile 5.0 ve 6.0 olarak belirlendi. Immobilize invertaz için pH a bağımlı aktivite profilinin serbest enzime kıyasla daha geniş olduğu görüldü. Bu sonuç bize kovalent bağlanma ile invertaz enziminin immobilizasyon sonucu enzimin Sıcaklığa karşı kararlılığının arttığına bir göstergesi olarak düşünöldü. Ayrıca, pH profilinde gözlenen bu genişleme, tutuklu enzimin substrat difüzyon kısıtlamasının yanında invertaz enzim moleküllerinin magnetik mikrokürelerin yüzeyine çok noktadan da bağlandığını bir göstergesi olarak da düşünöldü^(9,29-33). İlave olarak literatürde, pH profilinde genişlemenin enzim ve polimerik destek materyali arasındaki ikincil etkileşimlerden (iyonik ve polar etkileşimler, hidrojen bağı) kaynaklanma ihtimali olduğu da rapor edilmiştir^(11,23).

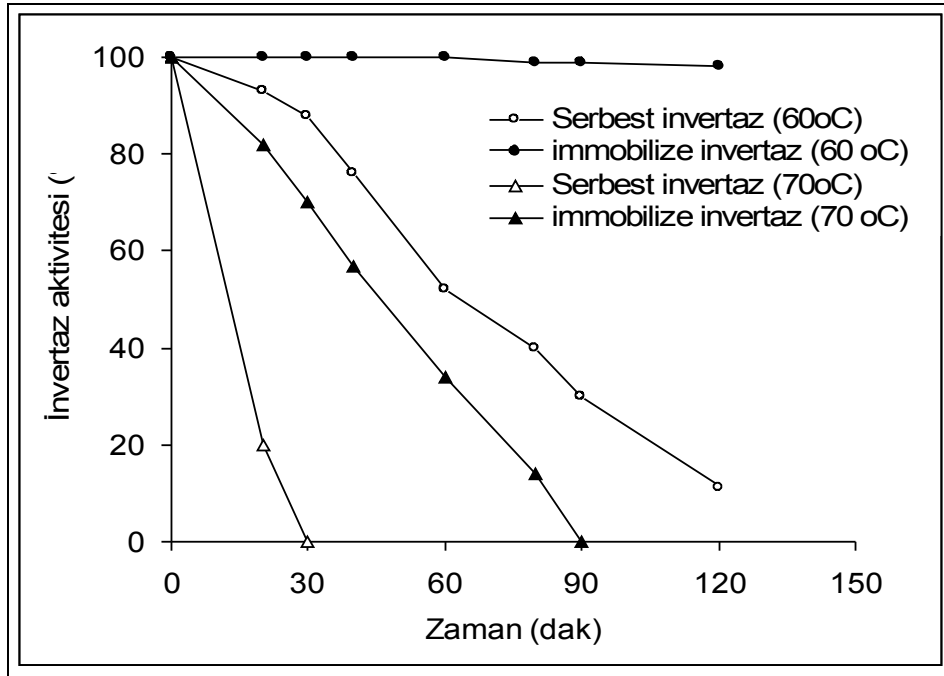


Şekil 3.6. Serbest ve immobilize invertaz enzim eşleniklerinin pH profilleri

3.6. Isısal Kararlılık

Isısal kararlılık deneyleri, çeşitli sıcaklıklarda substrat yokluğunda inkübe edilen serbest ve tutuklu enzimler ile gerçekleştirildi. Şekil 3.7’de serbest ve immobilize invertaz için 60 ve 70 °C arasındaki ısı inaktivasyon grafikleri gösterildi. Tutuklu invertaz 60°C’de başlangıç aktivitesinin tamamını korurken serbest enzim 120 dakika inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin %11’ini koruduğu belirlendi. Serbest ve tutuklu enzimler 70°C’de sırasıyla 30 ve 90 dakika işleminden sonra başlangıç aktivitelerini kaybettiler. Yarı ömür değerleri ve ısısal inaktivasyon hız sabitleri, serbest ve tutuklu enzim için iki farklı sıcaklıkta, yüzde kalan aktiviteden tayin edildi ve sonuçlar invertaz enziminin magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelere immobilizasyonu ile ısısal kararlılığının büyük ölçüde arttığını gösterdi. Serbest invertaz için gözlenen hızlı inaktivasyonun, invertazın konformasyonel yapısının bozunmasından kaynaklandığı düşünüldü⁽²⁰⁾. Serbest enzim 70 °C’de 30 dakika içinde hızla denatüre olurken, tutuklu enzim de gözlenen serbest enzime kıyasla daha yavaş denatürasyonun, invertazın magnetik kürelere çok noktadan

bağlandığını ve immobilize enzimin konformasyonel yapının kararlı kaldığının bir göstergesi olarak değerlendirildi⁽³²⁾. Yukarıdaki verilen bilgiler ışığında, bu çalışmada kullanılan tutuklama yöntemi sonucu, invertaz enziminin ısıl kararlılığının belirgin bir artış sağlandığı doğrultusundadır. Özellikle kovalent bağlı sistemlerde, sıcaklık ve denatüre edici ajanlara karşı tutuklu enzimin aktivite kaybı serbest formuna kıyasla daha fazladır.

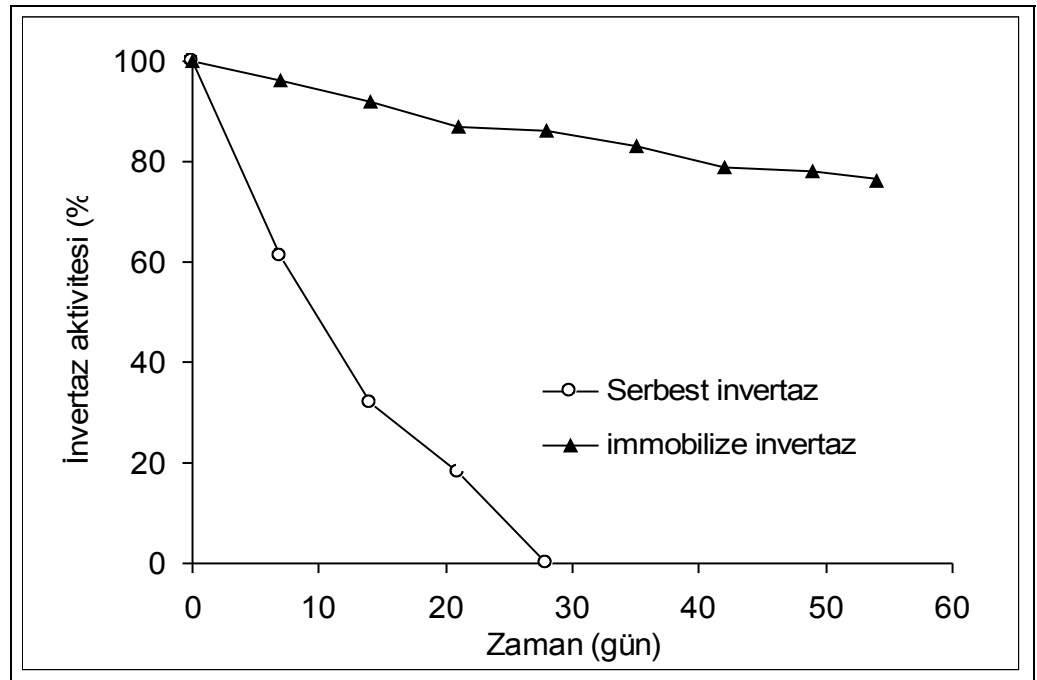


Şekil 3.7. Serbest ve immobilize invertaz enziminin kararlılığına sıcaklığın etkisi

3.7. Depolama Kararlılığı

Genel olarak, eğer enzim çözeltide bulunuyorsa, depolama sırasında kararlı değildir ve enzim aktivitesinin kademeli olarak azaldığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Serbest ve tutuklu invertaz preparasyonları, ıslak ve kuru formda saklanabilir. Immobilize enzimin depolama kararlılığı, özellikle sürekli sistem uygulamaları için önemlidir.

Asetat tamponu (50 mM, pH =5.0) içindeki serbest ve tutuklu invertazın depolama kararlılığı Şekil 3.8’de gösterildi. Şekilden görüldüğü gibi, tutuklama işlemi enzimin depolama kararlılığını arttırdı, serbest enzim 29 gün içerisinde tüm aktivitesini kaybetti. Bunun yanında, tutuklu enzim aynı depolama periyodu süresince aktivitesinin %14’ünü kaybettiği gözlemlendi. Bu sonuç, tutuklu invertazın serbest enzimden daha fazla bir depolama kararlılığı gelişimi sergilediğini gösterdi.



Şekil 3.8. Serbest ve immobilize invertaz enzim eşleniklerinin depolama kararlılığı

4. SONUÇ

Enzim saflaştırılması işleminin yüksek maliyeti ve uygulamalarda bir defa kullanılması araştırmacıları alternatif çözümler bulmaya yönlendirmiştir. Enzimlerin kararlılıklarının ve tekrar kullanım sayılarının artırılması ve buna bağlı olarak üretim maliyetinin düşürülmesi, yüksek sıcaklık uygulamalarına dayanıklılıklarının artırılabilmesi amacı ile farklı immobilizasyon teknikleri

kullanılarak enzimlerin katı destek materyallerine kimyasal ve fiziksel yollarla immobilize edilebilmesi bu çalışmaların bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada, enzim immobilizasyonu teknikleri arasında yer alan kovalent bağlanma yöntemi ile invertaz enzimi magnetik kürelere tutuklandı. Bu doğruluda, küre yapıda manyetik destek malzemeleri geliştirildi. Sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar; *i)* Isısal çöktürme reaksiyonu sırasında, manyetik kürelerin epoksi grupları, ortamda mevcut olan amonyak varlığında amonolizis reaksiyonu sonucu kürelerin yüzeyinde, amino gruplarının oluşturulması sağlandı; *ii)* magnetik mikrokürelerin amino gruplarının aktivasyonu glutaraldehit kullanılarak sağlandı ve bu yolla invertaz enzimi manyetik kürelerin yüzeyine kovalent olarak immobilize edildi; *iii)* tez çalışması magnetik poli(GMA-ko-MMA) mikrokürelerin karakterizasyonu, ve *iv)* serbest ve immobilize invertaz eşleniklerinin aktivitelerinin tayini, enzimin katalitik özelliğinin belirlenmesi, ısısal ve işlemsel kararlılığına farklı parametrelerin etkisinin araştırılması yapılarak tamamlandı. Magnetik ayırma teknikleri, zor koşullu ayırma basamaklarını elimine ederek kısa işlem süresi ve ekonomik işletim maliyeti getirmesi ve otomasyona ve sürekli sistemlere kolaylıkla adapte edilmeleri nedeni ile diğer klasik enzim tutuklama tekniklerine kıyasla önemli üstünlükler sağlamaktadır.

Sunulan çalışmanın başlıca avantajları arasında; *i)* enzim tutuklanması için ön-aktivasyon basamağına ihtiyaç duyulmaması; *ii)* epoksi grubu yoğunluğu, gözenekliliğinin ve boy ve boyut dağılımının istenildiği gibi kolayca ayarlanabilmesi; *iii)* daha önce bildirilen destek

materyallerine kıyasla daha yüksek tutuklama kapasitesine sahip olması;
iv) enzim elektrodu yada enzim reaktörünün bir parçası gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için iyi bir mekanik kararlılığa sahip olması olarak sıralanılabilir. Daha önce bahsedildiği gibi, tutuklu enzimin optimum pH ve sıcaklık profili serbest formuna kıyasla farklılık göstermiştir ve enzimin ısıl kararlılığı tutuklama sonucunda artmıştır. Araştırmanın sonucunda elde edilen enzim tutuklu magnetik mikroküreler destek materyali olarak çok sayıda olumlu özelliklere sahip olduğu görüldü ve kovalent olarak invertaz enziminin tutuklanmasında kullanıldı.

KAYNAKLAR

1. Diekmann R., Hempel D. C., Immobilization techniques, bioreactors and improvements in downstream processing, Ann. of the Sci., **10**, 245-255, 1990.
2. Sheper T., Advances in Biochem. Eng./Biotech., Springer-Verlag, Berlin, Germany

3. Emerson D., Peteu S.F., Worden R.M., A catalase microbiosensor for detecting hydrogen peroxide, *Biosen. Bioelectron*, **10**, 673-678, 1996.
4. Scheller F., Karsten C., A combination of invertase reactor and glucose oxidase electrode for the successive determination of glucose and sucrose, *Anal. Chim. Acta*, **155**, 29-36, 1983.
5. Gouda D., Thakur M. S., Karanth N. G., Optimization of the multienzyme system for sucrose biosensor by response surface methodology, *Electroanal.*, **17**, 18-849, 2001.
6. Hearn E., Neufeld R. J., Poly(methylene co-guanidine) coated alginate as an encapsulation matrix for urease, *Process Biochem.*, **35**, 1253-1260, 2000.
7. Wiseman A. (Editor), *Handbook of Enzyme Biotechnology*, TJ Pres Ltd., Cornwall, UK, 465-466, 1995.
8. Boy M., Dominik A., Vos H., Fast determination of biocatalyst process stability, *Process Biochem.*, **34**, 535-547, 1999.
9. Arica M. Y., Epoxy-derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization, *Jour. Appl. Polym. Sci.*, **77**, 2000-2008, 2000.
10. Krizova J., Spanova A., Rittich B., Horak D., Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation, *Jour. of Chromatog. A*, **1064**, 247-253, 2005.
11. Bayramoğlu G., Loğoğlu E., Arica M. Y., Cytochrome c adsorption on glutamic acid ligand immobilized magnetic

poly(methylmethacrylate-co-glycidylmethacrylate) beads,
Colloids and Surfaces A: Physicochem. and Eng. Aspect,
Article in press

12. Bayramoğlu G., Arica M. Y., Kinetics of mercury ions removal from synthetic aqueous solutions using by novel magnetic p(GMA-MMA-EGDMA), Jour. Hazard. Material., 2007, in press
13. Melo J.S., D'Souza F.D., A simple approach for the simultaneous isolation and immobilization of invertase using crude extracts of yeast and Jack Bean meal, Jour. of Biochem. and Biophys. Meth., **42**,133-135, 2000.
14. Combess D., Monsan P., Influence of additives on the thermostability of glucose oxidase, Enz. and Microb. Technol., **10**, 498-502, 1988.
15. Schulz B., Riedel A., Abel P.U., Influence of polymerization parameters and entrapment in poly (hydroxyethyl methacrylate) on activity and stability of GOD, Jour. of Molec. Catal. B: Enzymatic, **7**, 85-91,1999.
16. Bayramoğlu G., Yılmaz M., Arica M. Y., Immobilization of a thermostable amylase onto reactive membranes kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis, Food Chem., **84**, 591-599, 2004.
17. Worsfold P. J., Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes (Technical reports) Pure and Appl. Chem., **67**, 597-600, 1995.

18. Ahmad S., Anwar A., Saleemuddin M., Immobilization and stabilization of invertase on Cajanas cajan lectin support, *Biores. Technol.*, **79**, 121-127, 2001.
19. Braun B., Klein E.& Lopez, J.L., Immobilization of *Candida rugosa* Invertase to Nylon Fiber Using Its Carbonhydrate Groups as The Chemical Link, *Biotechnology & Bioengineering*, **51**, 327-341, 1996.
20. Choi S-H., Wu W-T., Immobilization of *Candida rugosa* invertase on Chitosan with activation of the hydroxyl groups, *Biomaterials*, **25**, 197-204, 2004.
21. Edwards W., Leukes W. D., Rose P.D., Burtan S. G., Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-coated polysulphone capillary membranes for improved phenotic effluent Bioremediation, *Enzy. and Microb. Technol.* , **25**,769-773, 1999.
22. Corma A., Farnes V., Jorda J. L., Rey F., Fernandez, Lafuente R., Guisan J.M., Mateo C., Electrostatic and covalent immobilization of enzymes on ITQ-6 delaminated zeolitic materials, *Biotechnol. Bioengineering*, **68**, 419-420, 2000.
23. Arıca M.Y., Bayramoğlu G., Invertase reversibly immobilized onto polyethylemine-grafted poly(GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis, *Jour. of Molec. Catal. B: Enzymatic*, **38**, 131-138, 2006.
24. Arıca M.Y., Senel S., Alaeddinoğlu N.G., Patır S., Denizli A., Invertase immobilized on spacer-arm attached

- poly(hydroxyethyl methacrylate) membrane: Preparation and properties, *Jour. of Appl. Poly. Sci.*, **75**, 1685-1692, 2000.
25. Sidney S., *Quantitative Organic Anal.*, 3. Baskı, 1967.
26. Bayramoğlu G., Tunalı Y., Arıca M. Y., Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly (GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor, *Catal. Commun.*, Article in press.
27. Lochmuller C.H., Ronsicle C.S., Wigman L.S., Fluidized-bed separators reviewed: A Low pressure drop approach to column chromatography, *Prep. Chroma.*, **1**, 93-108, 1988.
28. Burns M.A., Graves D.J., Continuous affinity chromatography using a magnetically stabilized fluidized bed, *Biotechnol. Prog.* **1**, 95-103, 1985.
29. Bayramoğlu G., Akgöl S., Bulut A., Denizli A., Arıca M. Y., Covalent immobilization of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: Properties and application in a continuous flow system, *Biochem. Eng. Jour.*, **14**, 117-126, 2003.
30. Wada S., Ichikawa H., Tatsumi K., Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant, *Biotechnology and Bioengineering*, **45**, 304-309, 1995.
31. Pieters B. R., Bardeletti G., Coulet P. R., Glucoamylase immobilization on a magnetic microparticle for the continuous

- hydrolysis of maltodextrin in a fluidized bed reactor, *Appl. Biochemical and Biotechnology*, **32**, 37-53, 1992.
32. Bahar T., Çelebi S.S., Characterization of Glucoamylase Immobilized on Magnetic Poly (styrene), *Enz. and Microb. Technol.*, **23**, 301-304, 1998.
33. Arıca M.Y., Alaeddinoğlu N.G., Hasırcı V., Immobilization of glucoamylase onto activated PHEMA/EGDMA microspheres: Properties and Application to a packed-bed reactor, *Enz. and Microb. Technol.*, **22**, 152-157, 1998.
34. Boyer P.D. (Editor), *The Enzymes*, Academic Press. USA, **5**, 1971.
35. Sahmetlioğlu E., Yörük H. Toppare L., Ciango I., Yağcı Y., Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting copolymers of thiophene functionalized poly(vinyl alcohol) with pyrrole, *Reac. and Func. Polym.*, **66**, 365-371, 2006.
36. David A.E., Wang N.S., Yang V.C., Yang A.J., Chemically surface modified gel (CSMG); An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes, *Jour. of Biotechnol.*, **35**, 2095-2098, 2006.
37. Cirpan A., Alkan S., Toppare L., Hepuzer Y., Yağcı Y., Immobilization of invertase in conducting copolymers of 3-methylthienyl methacrylate, *Bioelectrochem.*, **59**, 29-33, 2003.
38. Chen Y., Kang E.T., Neoh K.G., Tan K.L., Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified

- polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid, *Europ. Polym. Jour.*, **36**, 2095-2103, 2000.
39. Tümtürk H., Arslan F., Dişli A., Tufan Y., Immobilization of invertase attached to a granuler dimer acid-co-alkyl polyamine, *Food Chem.*, **69**,5-9, 2000.
40. Arslan F., Tümtürk H., Çaykara T., Şen M., Güven O., The Effect of gel composition on the adsorption of invertase on poly (acrylamide/maleic acid) hydrogels, *Food Chem.*, **70**, 33-38, 2000.
41. Soares C.M.F., de Castro H.F., de Mareas F.F., Zanin G.M., Characterisation and utilisation of *Candida rugosa* invertase immobilized on controlled pore Silica, *Appl. in Biochem. and Biotechnol.*, **77**, 745-751, 2000.
42. Bagal D., Karve M.S., Entrapment of plant invertase within novel composit of agarose-guar gum biopolymer membrane, *Anal. Chim. Acta*, **555**, 316-321, 2006.
43. Amaya-Delgado L., Hidalgo-Lara M.E., Montes-Horcasitas M.C., Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads, *Food Chem.*, **99**, 299-304, 2006.
44. Emregül E., Sungur S., Akbulut U., Polyacrilamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization, *Food Chem.*, **97**, 591-597, 2006.
45. Gomez L., Hector L.R., Villalonga J.H., Villalonga R., Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-

coated chitin support via polyelectrolyte complex formation, *Enz. and Microb. Technol.*, **38**, 22-27, 2006.

46. Bora U., Kanan K., Nahar P., A simple method for functionalization of cellulose membrane for covalent immobilization of biomolecules, *Jour. of Memb. Sci.*, **250**, 215-222, 2005.
47. Gürsel A., Aklan S., Toppare L., Yağcı Y., Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/ polypyrrole black copolymers, *React. and Func. Polym.*, **57**, 57-65, 2003.
48. Işık S., Aklan S., Toppare L., Ciango I., Yağcı Y., Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices, *Europ. Polym. Jour.*, **39**, 2357-2381, 2003.
49. Prodanovic R.M., Simic M.B., Vojcic Z.M., Immobilization of periodate oxidized invertase by adsorption on sepiolite, *Jour. Serb. Soc.*, **68**, 819-824, 2003.
50. De Querioz A., Vitolo M., de Oliveira R.C., Zazuco H.O., Invertase immobilization onto radiation-induced graft copolymerized polyethylene pellets, *Radiat. Phys. Chem.*, **47**, 873-880, 1996.
51. Vrabel P., Polakovic M., Godo S., Bales V., Gemeiner P., Influence of immobilization on the thermal inactivation of yeast invertase, *Enz. and Microb. Technol.*, **21**, 196-202, 1997.