

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNVERTAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ SİSTEMİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI VE DEMİR-TANİN
KOMPOZİTİ ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra KAT

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Semra
YILMAZER KESKİN**

Mayıs 2013

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNVERTAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ SİSTEMİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI VE DEMİR-TANİN
KOMPOZİTİ ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra KAT

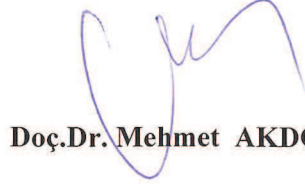
Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez 17/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ali Osman AYDIN

Jüri Başkanı



Doç.Dr. Mehmet AKDOĞAN

Üye



Yrd.Doç.Dr. Semra
YILMAZER KESKİN

Üye

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın her aşamasında, değerli bilgileri, yardımı ve anlayışı ile yanımda olan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Semra YILMAZER KESKİN'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Başta Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Mustafa Şahin DÜNDAR, Prof. Dr. Ali Osman AYDIN ve Kimya Bölümü öğretim elemanlarına teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalar süresince yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Can Serkan KESKİN ve Yüksek Lisans öğrencisi İsa ŞAHİN'e

Son olarak akademik hayatımın başlangıcından bu yana maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman sonsuz hoşgörü ve özverileriyle beni destekleyen değerli aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2012-50-01-061).

Büşra KAT

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| TEŞEKKÜR..... | ii |
| İÇİNDEKİLER..... | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ..... | vi |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | vii |
| TABLolar LİSTESİ..... | ix |
| ÖZET..... | x |
| SUMMARY..... | xi |
| | |
| BÖLÜM 1 | |
| GİRİŞ..... | 1 |
| | |
| BÖLÜM 2 | |
| ENZİMLER VE İMMOBİLİZASYONU..... | 3 |
| 2.1. Enzimlerin Yapısı..... | 3 |
| 2.1.1. İnvvertazlar ve biyokimyasaları..... | 3 |
| 2.1.2. İnvvertazların etki mekanizması..... | 6 |
| 2.1.3. İnvvertazların izolasyonu ve saflaştırılması..... | 7 |
| 2.1.4. İnvvertazların uygulama alanları..... | 7 |
| 2.2. Enzimlerin İmmobilizasyonu..... | 9 |
| 2.2.1. Fiziksel metodlar..... | 11 |
| 2.2.1.1. Polimer matrikste tutuklama..... | 11 |
| 2.2.1.2. Mikrokapsülleme..... | 11 |
| 2.2.1.3. Membran reaktörler..... | 11 |
| 2.2.2. Kimyasal metodlar..... | 12 |
| 2.2.2.1. Adsorpsiyon..... | 12 |
| 2.2.2.2. Kovalent bağlanma..... | 13 |
| 2.2.2.3. İyonik bağlanma..... | 13 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.2.4. Çapraz bağlanma..... | 14 |
| 2.3. İmmobilizasyonun Avantajları..... | 15 |
| 2.4. Kompozitler..... | 15 |
| 2.4.1. Demir-tanin bileşiği | 16 |
| BÖLÜM 3 | |
| ÜÇLÜ FAZ SİSTEMLERİ..... | 17 |
| 3.1. TPP'yi Etkileyen Parametreler..... | 18 |
| 3.1.1. Tuz konsantrasyonunun etkisi..... | 19 |
| 3.1.2. pH etkisi..... | 20 |
| 3.1.3. Sıcaklığın etkisi..... | 20 |
| 3.1.4. Hidrofobisite etkisi..... | 20 |
| 3.1.5. TPP'nin kullanım alanları..... | 21 |
| BÖLÜM 4 | |
| MATERYAL VE METOD..... | 22 |
| 4.1. Materyal..... | 22 |
| 4.2. Metod..... | 22 |
| 4.2.1. İnvvertazın aktivite tayini..... | 22 |
| 4.2.1.1. DNS reaktifinin hazırlanması..... | 24 |
| 4.2.2. Protein tayini (Bradford metodu) | 24 |
| 4.2.3. Sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve moleküler kütle tayini..... | 25 |
| 4.2.3.1. Polimerizasyon protokolü..... | 28 |
| 4.2.3.2. Örneklerin hazırlanması ve elektroforeze uygulanması..... | 28 |
| 4.2.3.3. Protein bantlarının boyanması..... | 29 |
| 4.2.4. Üçlü faz sistemi (TPP) ile invvertazın kokulu kara üzümünden (<i>Vitis Labrusca</i>) izolasyonu ve saflaştırılması..... | 29 |
| 4.2.5. Saflaştırılmış invvertazın demir-tanin (manyetit) bileşiği üzerine immobilizasyonu..... | 30 |

BÖLÜM 5

| | |
|--|----|
| SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... | 31 |
| 5.1. İvertaz Enziminin Kokulu Kara Üzümden (<i>Vitis labrusca</i>) İzolasyonu..... | 31 |
| 5.2. TPP ile Kokulu Kara Üzüm İvertazının Saflaştırılması..... | 32 |
| 5.3. Kokulu Kara Üzümden İvertazın Saflaştırılmasında TPP Sistemine Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi..... | 33 |
| 5.4. Kokulu Kara Üzümden İvertazın Saflaştırılmasında TPP Sistemine pH'ın Etkisi..... | 37 |
| 5.5. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ile TPP Yöntemiyle Saflaştırılan İvertaz enziminin Moleküler Kütle Tayini..... | 38 |
| 5.6. TPP Yöntemiyle Saflaştırılan İvertaz Enziminin Termal Kararlılığı..... | 39 |
| 5.7. TPP Yöntemiyle Saflaştırılan İvertaz Enziminin Depo Kararlılığı..... | 40 |
| 5.8. İmmobilize ve Serbest Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması.... | 41 |
| 5.9. Öneriler..... | 42 |
| KAYNAKLAR..... | 44 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 50 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-------------------|---|
| °C | : Santigrat derece |
| DNS | : Dinitro salisilik asit |
| g | : Gram |
| FTIR | : Fourier transform infrared |
| L | : Litre |
| Lit. | : Literatür |
| mg | : Miligram |
| mL | : Mililitre |
| mmol | : Milimol |
| NaNO ₃ | : Sodyum nitrat |
| pH | :Tayin edilebilen hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması |
| rpm | : Revolutions per minute |
| SDS-PAGE | : Sodyum dodesil sülfat, poliakrilamid jel elektroforezi |
| TEMED | : N,N,N,N-Tetrametilendiamin |
| TPP | : Three-phase partitioning |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | | |
|------------|--|----|
| Şekil 2.1. | İnvertaz enziminin genel reaksiyon mekanizması..... | 4 |
| Şekil 2.2. | İnvertaz enziminin üç-boyutlu yapısı..... | 4 |
| Şekil 2.3. | Hücre duvarı ve vakular invertazların aminoasit motifi..... | 5 |
| Şekil 2.4. | Thermotoga maritima invertazının kristal yapısı..... | 7 |
| Şekil 2.5. | İmmobilize enzim biyokatalistinin geliştirilmesinde ana strateji..... | 10 |
| Şekil 2.6. | Enzim immobilizasyon stratejileri..... | 14 |
| Şekil 2.7. | Tannik asit yapısı..... | 16 |
| Şekil 4.1. | DNS yönteminin prensibi..... | 23 |
| Şekil 4.2. | Glukozun enol anyonuna dönüşüm reaksiyonu | 24 |
| Şekil 5.1. | %20 Amonyum sülfat ve enzim:t-butanol oranının, kokulu kara üzüm invertazının saflaştırılma katına ve aktivite verimine etkisi. | 34 |
| Şekil 5.2. | %30 Amonyum sülfat ve enzim:t-butanol oranının, kokulu kara üzüm invertazının saflaştırılma katına ve aktivite verimine etkisi. | 34 |
| Şekil 5.3. | %40 Amonyum sülfat ve enzim:t-butanol oranının, kokulu kara üzüm invertazının saflaştırılma katına ve aktivite verimine etkisi. | 35 |
| Şekil 5.4. | %50 Amonyum sülfat ve enzim:t-butanol oranının, kokulu kara üzüm invertazının saflaştırılma katına ve aktivite verimine etkisi. | 35 |
| Şekil 5.5. | %60 Amonyum sülfat ve enzim:t-butanol oranının, kokulu kara üzüm invertazının saflaştırılma katına ve aktivite verimine etkisi. | 36 |
| Şekil 5.6. | Kokulu kara üzüm invertazının üçlü faz ayırma sisteminde ayırma pH'ın etkisi..... | 38 |
| Şekil 5.7. | Kokulu kara üzüm invertazının SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi A) Sigma Moleküler Kütle Standartları (ColorBurst Electrophoresis Marker) B) Sulu üçlü faz sistemi sonrası invertaz..... | 39 |
| Şekil 5.8. | SDS-PAGE yöntemiyle saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı tayin grafiği..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Şekil 5.9. İvertazın termal kararlılığı (Substrat: Sükroz; İnkübasyon süresi: 30 dakika) | 40 |
| Şekil 5.10. Tanin (a) ve invertaz immobilize edilmiş tanin (b) FTIR spektrumları..... | 42 |

TABLolar LİSTESİ

| | | |
|------------|---|----|
| Tablo 4.1. | SDS-PAGE solüsyonlarının hazırlanma protokolleri..... | 26 |
| Tablo 4.2. | Yürütme jeli yüzdelerine göre ayırma boyutları aralıkları..... | 27 |
| Tablo 4.3. | Yürütme jeli (%15) hazırlama protokolü..... | 27 |
| Tablo 4.4. | Yükleme jeli (%4) hazırlama protokolü..... | 27 |
| Tablo 5.1. | Kokulu kara üzüm invertazının TPP ile saflaştırma sonuçları (%50 amonyum sülfat, 1:1,5 enzim:butanol, pH 4,5)..... | 33 |
| Tablo 5.2. | Serbest ve immobilize enzimin aktivite değerleri..... | 41 |

ÖZET

Anahtar kelimeler: Üçlü Faz Sistemi, İnvvertaz, Tanin–Demir Bileşiği

İnvvertazlar, hidrolaz sınıfı enzimlerinden olup, sükrozun früktoz ve glukoza hidrolizini katalizlerler. İnvvertazlar, üzüm suyu, şarap, şampanya gibi içeceklerde yaygın olarak bulunan ve gıda sanayinde geniş bir uygulama alanına sahip, genellikle kristalize olmayan invert şeker şuruplarının eldesinde kullanılan ve doğada eldesi kolay olan enzimlerdir.

Protein ve enzimlerin saflaştırılmasında son zamanlarda kullanılan yeni biyokimyasal yöntemler arasında affiniteye dayalı teknikler ön plana çıkmaktadır. Endüstriyel bir enzim olan invvertaz, tanin-demir üzerinere kolay, rejenerasyonun mümkün ve immobilizasyon maliyetinin düşük olduğu bir yöntem olan fiziksel adsorpsiyon ile immobilize edildi.

SUMMARY

Keywords : Three-phase partitioning, Invertase, Tanin-iron composite

Invertases are enzymes of hydrolase class which catalyzing the hydrolysis of glucose to fructose and sucrose. Invertases, found in grape juice, wine, champagne and food industries, such as commonly beverages with a wide range of applications, it's used to produce invert sugar syrup is often non-crystalline in nature, that are easy retrieval.

Used in the purification of proteins and enzymes has recently come to the fore new techniques based on affinity of biochemical methods.

An industrial enzyme invertase, immobilized on tanin-iron composite, easy, low and regeneration is possible method of immobilized, that physical adsorption.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

İnvertaz (β -D-fruktofuronozid fruktohidrolaz; E.C. 3.2.1.26) (Sükraz), β -D-fruktofuranozidlerin terminal indirgen olmayan β -fruktofuranozid artıklarının hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfına ait glukoenzimdir. İnvertazlar sü kroza etki ederek glukoz hidrolizini veya değişen derecelerde fruktosil aktarımını gerçekleştirirler. Bunun için tepkiyen β -D-fruktofuranozil grubu içermelidir. Doğada yaygın olarak bulunan bu enzim bitkisel (örneğin; üzüm, patates, bambu, tütün, ananas, havuç, mango, pirinç, arpa, yulaf, elma, portakal, şeftali, domates, kavun, soya fasulyesi, nohut vb.) ve mikrobiyal (örneğin; *Sacromises cerevisia*, *Aspergillus niger*, vb.) kaynaklarda bulunmaktadır [1].

İnvertazlar endüstride ve genellikle gıda sanayinde geniş bir uygulama alanına sahip olan enzimlerdir. Bunlara invert şeker şuruplarının eldesi, çikolata üretimi, şekerlemelerde kullanımı, kondense sütlerin üretimi, bebek gıda ürünlerinde tercih edilmesi ve sığır yemlerinin hazırlanmasında kullanımı örnek olarak verilebilir. Gıda sanayinde invert şeker şuruplarının hazırlanmasında asit hidrolizi ya da enzimatik olarak sü krozun invertaz ile hidrolizi gerçekleştirilmektedir. Asit hidrolizi oldukça yüksek şiddette renkli ürünler, kül ve istenmeyen pek çok yan ürün oluşturduğu için endüstriyel alanda enzimatik hidroliz tercih edilmektedir. Hidroliz sonucu oluşan fruktoz, kolay kolay kristalize olmadığı ve daha tatlı olduğu için gıda sanayinde sü kroza tercih edilmektedir. Ayrıca invertaz enzimi, analitik amaçla sü kroz konsantrasyonunun tayini amaçlı biyosensörlerde kullanılmaktadır.

Günümüze kadar birçok araştırmacı tarafından invertazın saflaştırılması konusunda çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Fakat bu tekniklerin çoğu çöktürme, iyon değişim kromatografi, jel filtrasyon kromatografi, ultrafiltrasyon gibi çok adımlı aşamaları içermektedir. Bu aşamadaki basamak sayılarının artması ürün verimini olumsuz etkilemektedir. Daha da önemlisi bu basamakların çoğu uygulaması zor ve pahalı

yöntemler içermektedir. Yaptığımız çalışmada kokulu kara üzümünden (*Vitis labrusca* ya da *isabella*) izole edilen invertaz enzimi üçlü faz yöntemiyle (TPP) uygun tuz konsantrasyonu, pH, sıcaklık gibi parametrelerin etkileri incelenerek optimizasyonu sağlandı. Optimize edilen TPP sistemi ile invertaz enzimi tek adımda saflaştırıldı. Daha sonra saflaştırılmış olan bu enzimin demir-tanin kompoziti üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilerek serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri karşılaştırıldı.

BÖLÜM 2. ENZİMLER VE İMMOBİLİZASYONU

2.1. Enzimlerin Yapısı

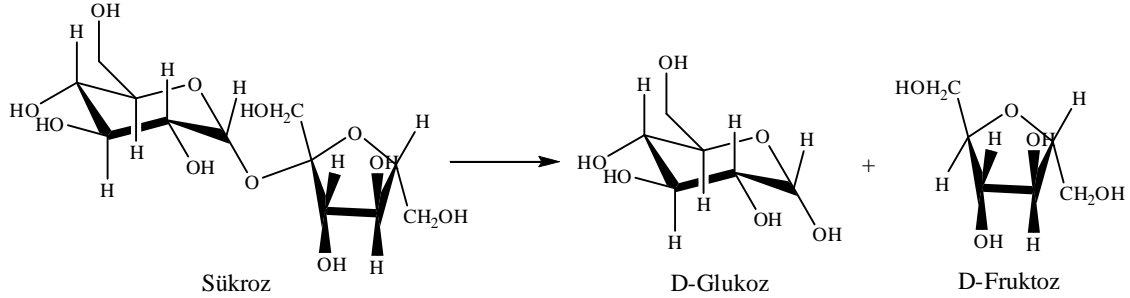
Enzimler seçiciliği ve aktivitesi yüksek, biyokatalizörlerdir. Her enzimde proteini oluşturan amino asitlerin sayısı, diziliş sırası ve moleküllerin konformasyonu belirli bir düzen içerisinde ve bu düzen enzimin substrata seçiciliğini belirler. Seçiciliğin belirlenmesinde rol alan enzimlerin sahip olduğu aktif bölge, enzim-substrat kompleksi oluşturmak ve substratı ürüne dönüştürmek üzere substrata bağlanır. Aktif bölge protein yüzeyinde, çoğu zaman bir çatlak ve oyuk şeklinde olan üçboyutlu bir oluşumdur ve substrat buraya çoklu zayıf etkileşimlerle bağlanır. Bir enzimin substrata bağlanması anahtar-kilit modeli ve indüklenmiş uyum modeli ile açıklanır.

Doğada oldukça yaygın olarak bulunan pek çok mikrobiyal ve bitkisel kaynaktan İnvertaz enzimi izole edilmiştir. İnvertaz, kimliği ilk belirlenen proteinler arasında bulunmaktadır ve enzim kinetiğinin prensiplerinin çıkarılmasında model enzim olarak kullanılmıştır [2].

2.1.1. İnvertazlar ve biyokimyası

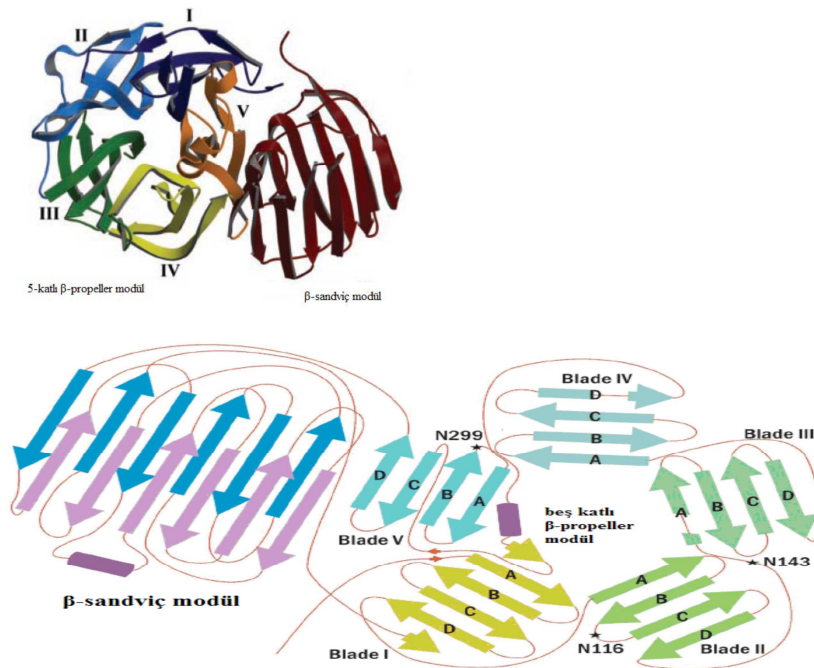
İnvertaz (β -D-fruktofuronozid fruktohidrolaz; E.C. 3.2.1.26) (Sükraz), β -D-fruktofuranozidlerin terminal indirgen olmayan β -fruktofuranozid artıklarının hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfına ait glukoenzimdir. İnvertazlar sükroza etki ederek glukoz hidrolizini veya değişen derecelerde fruktosil aktarımını gerçekleştirirler. Bunun için tepkiyen β -D-fruktofuranozil grubu içermelidir. Doğada yaygın olarak bulunan bu enzim bitkisel (örneğin; üzüm, patates, bambu, tütün, ananas, havuç, mango, pirinç, arpa, yulaf, elma, portakal, şeftali, domates, kavun, soya fasulyesi, nohut vb.) ve mikrobiyal (örneğin; *S. cerevisia*, *A. niger*, vb.)

kaynakta bulunmaktadır [1]. Şekil 2.1’de invertaz enziminin reaksiyon mekanizması gösterilmiştir.



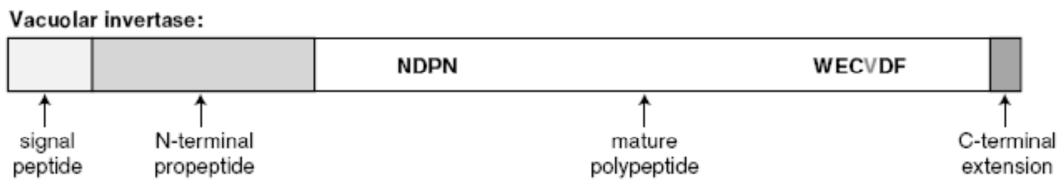
Şekil 2.1. İvertaz enziminin genel reaksiyon mekanizması

Son yıllarda invertazlarla yapılan klonlama çalışmaları da oldukça büyük bir önem ve hız kazanmıştır. Saflaştırılan enzimin oldukça büyük miktarda üretilmesi ve enzimatik özelliklerinin geliştirilmesi için invertazın cDNA klonunun izole edilerek dizisinin aydınlatılması gerekmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalardan birisinde *Saccharomyces cerevisiae* internal invertazını kodlayan cDNA klonlanmış ve ardından dizisi aydınlatılmıştır [3]. İvertaz enziminin üç boyutlu yapısı Şekil 2.2’de gösterildi [4].



Şekil 2.2. İvertaz enziminin üç-boyutlu yapısı

Bitkiler çözünürlükleri, hücresel lokalizasyonları, optimum pH ve izoelektrik noktalarına göre; vakular (Inv-V), hücre duvarına bağlı (Inv-CW) ve nötral (Inv-N) invertazlar olmak üzere üç çeşit invertaz izoenzimine sahiptirler [5]. Vakular invertazlar ve hücre duvarına bağlı invertazlar benzer enzimatik ve biyokimyasal özelliklere sahiptirler. Ayrıca yüksek derecede benzer dizi homolojileri ile birlikte iki tane korunmuş amino asit motifleri içerirler. Bu iki invertaz asidik optimum pH'a sahip olup β -fruktofuranozidaz aktivitesi gösterir. Çünkü sükrozun ve diğer β -fruktoz içeren oligosakkaritlerin fruktoz artıklarına saldırarak hidrolizlerler. Sükroz için Km değerleri düşük milimolar aralığındadır. Bunun yanında bu iki invertaz izoenzimi birer N-bağlı glikoproteindir ve çoğunlukla molekül kütlesinin 55 ve 70 kDa arası kısmını karbohidrat kalıntısı oluşturur. İvertaz aktivitesi sülfidril gruplarını bloke eden ajanlar (Hg^+ ve Ag^+) tarafından inhibe edilmektedir. Reaksiyon ürünleri tarafından da inhibe edilirler; glukoz yarışmasız inhibitör olarak, fruktoz ise yarışmalı inhibitör olarak etki gösterir. İvertaz izoenzimleri küçük gen aileleri (iki tane vakular invertaz gen ailesi ve altı tane hücre duvarına bağlı invertaz gen ailesi) tarafından kodlanmaktadır. Genomik organizasyon ve intronekzon yapısı monokot ve dikot invertaz genleri arasında korunmuştur. Tüm bitki, bakteri ve fungus invertaz genlerinde var olan çok önemli bir özellik; dokuz tane nükleotitten oluşan küçük bir ekzonun varlığıdır. Bu ekzon, N-DPN-G/A kutusu şeklinde üç tane amino asiti kodlamaktadır. WECVDF amino asit motifinde ise vakular invertazlar valin artığına, hücre duvarına bağlı invertazlar ise valin yerine prolin artığına sahiptir. Vakular invertazın amino asit motifi şekil 2.3.' te gösterildi [5].



Şekil 2.3. Hücre duvarı ve vakular invertazların amino asit motifi

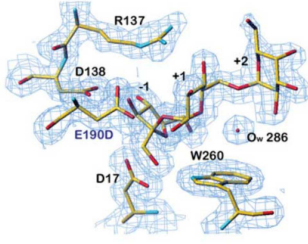
Vakular invertazlar, vakuolda lokalize olup pH 5,0–5,5 arası asidik optimum pH'a sahiptirler. Vakuolar invertazlar, çözünür asidik invertazlar olarak da adlandırılmaktadır. Vakulde depolanan sükrozun seviyesinden ve metabolik prosesler için sükrozun yeniden mobilizasyonundan sorumludurlar. Ayrıca meyve

dokularında ve olgun yumrularda karbohidrat dengesinin regülasyonunda görevlidirler [5, 6]. Hücre duvarına bağlı invertazlar ise ekstraselüler, apoplazmik veya periplazmik invertazlar olarak karakterize edilirler. Hücre duvarına bağlı invertazlar düşük optimum pH'a (pH 3,5–5,0) ve yüksek izoelektrik noktaya sahiptirler. Bu tip invertazlar hücre duvarına iyonik bir şekilde bağlanırlar. Sükrozun floemde hidrolizini katalizleyerek yıkım ürünlerinin hücre duvarında bulunan heksoz transporter proteinleri ile floemden stoplazmaya geçmesini sağlarlar [5, 6]. Üçüncü tip invertazlar olan nötral invertazlar ise, alkali veya stoplazmik invertazlar olarak adlandırılabilirler. Alkali denmesinin sebebi optimum pH'larının pH 6,8–8,0 arasında olmasından, sitoplazmik denmesinin sebebi ise subselüler lokalizasyonun stoplazmada olmasından dolayıdır. Bu tip invertazlar düşük enzim aktivitesine sahip olup aktivitesini hızla kaybettiğinden fizyolojik fonksiyonu hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Bugüne kadar ancak birkaç tane nötral invertaz klonlanıp karakterize edilmiştir [5, 6].

2.1.2. İvertazların etki mekanizması

Enzimler kendileri değişmeksizin bir tepkimenin hızını değiştiren katalizörlerdir. Enzimler yüksek derecede özgüdür ve aktiviteleri kontrol edilir. Katalitik olarak aktif olan bazı RNA'lar tanımlanmasına rağmen neredeyse bütün enzimler protein yapıdadır.

Enzimatik kataliz için asit-baz katalizi, kovalent kataliz, metal iyonu katalizi, çözen katalizi gibi çeşitli mekanizma tipleri önerilmektedir [6]. Enzimlerin reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında en önemli adım aktif merkezinde yer alan aminoasit yan zincirlerinin ve bunların konumlarının belirlenmesidir. Bu aminoasitler bağlanma merkezi ve katalitik merkezde aktif olarak görev alırlar. Çoğu kez X-ışınları yöntemi uygundur fakat en çok kullanılan yöntem seçimli olarak reaksiyon veren reaktiflerle yapılan modifikasyon çalışmalarıdır [5]. *Thermotoga maritima* invertazının kristal yapısı Şekil 2.4' de verildi [6] .



Şekil 2.4. *Thermotoga maritima* invertazının kristal yapısı

2.1.3. İnvertzaların izolasyonu ve saflaştırılması

Saflaştırmanın amacı daha sonraki çalışmalarda kullanılabilen uygun bir protein preparatının hazırlanmasıdır. Bunun için öncelikle gereksinim duyulan protein miktarı, ne düzeyde bir saflık istendiği, ne düzeyde bir aktivite kaybının tolere edilebileceği, ne kadar zaman ve para harcanabileceği belirlenmelidir. Saflaştırılacak olan enzim seçilen kaynaktan hem kararlı olmalı hem de bol miktarda bulunmalıdır. Ayrıca kolay sağlanabilir, bol ve ucuz kaynaklar daima tercih edilirler. Enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılmasında her zaman en etkili, en hızlı ve en ekonomik prosedürler belirlenmeye çalışılır. İzolasyon adımı genellikle homojenizasyon ve homojenatın separasyonu gerçekleştirilir. Saflaştırmanın ilk adımlarında daha çok deriştirme yöntemleri, daha sonra ise kromatografik teknikler kullanılır [7]. İzolasyon ve saflaştırmada kullanılan teknikler; amonyumsülfat ve organik çözümler ile fraksiyonlama, ısı muamelesi, asidifikasyon, iyon değişim, jel kromatografisi ve izoelektrik odaklama olarak sıralanabilir. Oldukça yüksek saflıkta ve hemen hemen homojen bir invertaz preparatının hazırlanabildiği çok az çalışma mevcuttur [6].

Literatürlerde verilen invertaz izolasyonu, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında bitkisel kaynaklara örnek olarak, zambak [8], armut [9], patates [10], soğan [11], üzüm [12], tütün [13], soya fasulyesi [14], kavun [15], bambu [16], şeker pancarı [17], papaya [18], domates [19], enginar [20], portakal [21] verilmektedir.

2.1.4. İnvertzaların uygulama alanları

İnvertzalar endüstride ve genellikle gıda sanayinde geniş bir uygulama alanına sahip olan enzimlerdir. Bunlara invert şeker şuruplarının eldesi, çikolata üretimi,

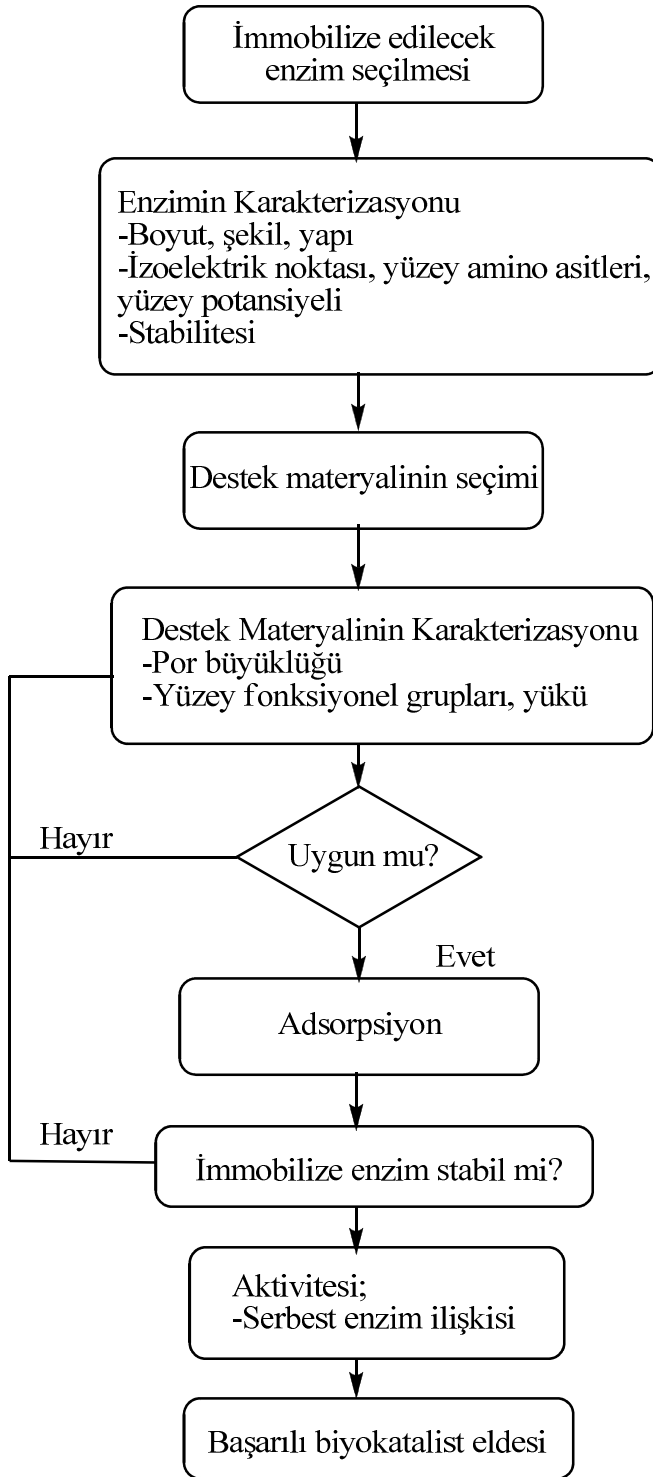
şekerlemelerde kullanımı, kondense sütlerin üretimi, bebek gıda ürünlerinde tercih edilmesi ve sığır yemlerinin hazırlanmasında kullanımı örnek olarak verilebilir. Gıda sanayinde invert şeker şuruplarının hazırlanmasında ya asit hidrolizi ya da enzimatik olarak sükrozun invertaz ile hidrolizi gerçekleştirilmektedir. Asit hidrolizi oldukça yüksek şiddette renkli ürünler, kül ve istenmeyen pek çok yan ürün oluşturduğu için endüstriyel alanda enzimatik hidroliz tercih edilmektedir. Hidroliz sonucu oluşan fruktoz, kolay kolay kristalize olmadığı ve daha tatlı olduğu için gıda sanayinde sükroza tercih edilmektedir. Ayrıca invertaz enzimi, analitik alanda sükroz konsantrasyonunun tayini amaçlı biyosensörlerde kullanılmaktadır [22].

Sükroz polarize ışık düzlemini sağa (+66,5, dekstrorotatori), hidroliz sonucu meydana gelen şeker karışımı ise polarize ışık düzlemini sola (-33,3, levorotatori) çevirir. Bu nedenle, bu işlem *inversiyon*, hidroliz ürünü de *invert şeker* olarak adlandırılır. Sükrozun tatlılık derecesi 100 olarak kabul edildiğinde, invert şekeri oluşturan glukoz ve fruktozun tatlılık dereceleri sırasıyla 70 ve 180'dir. Bu nedenle invert şeker eşdeğer miktardaki sükroza daha fazla tatlılık sağlar ve şekerli ürünlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılır. İvert şekerin diğer bir kullanım amacı da kristalizasyon kontrolüdür. Sükrozun hidrolizi sonucu oluşan invert şekerdeki glukoz ve fruktozun sudaki toplam çözünürlükleri sükrozun tek başına çözünürlüğünden daha fazladır. Kristalizasyonun azalmasında sükroz konsantrasyonunun azalması da etkilidir. Bu sebeple şekerli ürünlerde invert şeker içeriği çok önemlidir. Örneğin; lokumda invert şeker içeriğinin fazla olması lokum dilimlerinin birbirine yapışmasına ve depolama sorunlarına, yetersiz olması ise kristallenmeye ve pürüzlü yapıya neden olmaktadır. İversiyon çikolata kaplı sıvı veya krem dolgulu şekerlemelerin üretiminde de kullanılmaktadır. Kalıplama ve kaplama işlemleri dolgu kısım katı iken yapılır. Daha sonra dolguya verilen invertaz enzimi sükrozu invert şekere dönüştürür ve çözünürlükteki değişimle dolguda yumuşama veya sıvılaşma görülür. Şeker endüstrisinde, kamış melasının etanole fermantasyonu, sığır yemlerinin ve invert şeker şuruplarının hazırlanması, likör, yapay bal ve dondurulmuş tatlı ve benzeri üretimlerin yapılmasında kullanılan biyoteknolojik proseslerde invertaz enzimleri kullanılmaktadır. Biyoteknolojik uygulama alanları nedeniyle invertazlar oldukça önemli ve değerli bir enzim grubudur [22].

2.2. Enzimlerin İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu için geliştirilen yöntemler ve materyaller, biyoteknoloji, biyokatalizasyon, protein dağılım sistemi ve biyosensörler gibi farklı uygulama alanlarında önem kazanan bir alan olmuştur. Enzim İmmobilizasyonunda amaçlanan, biyoygunluğu olan fonksiyonel materyallerin dizaynı ve enzimin bağlanabildiği, aynı zamanda aktivite ve stabilitesinin doğal yapısına yakın oranda korunabildiği sistemlerin geliştirilmesidir [23]. İmmobilize enzimleri özellikleri, enzim ve taşıyıcı materyalin özelliklerine bağlıdır. İmmobilize enzim bu iki parametreyle kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikler kazanır. 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 avantajları arasında yer almaktadır.

İmmobilize enzimin verimi, bağlanma sırasındaki kayıplardan ve enzimin destek materyalinin gözeneklerinden sızmasından dolayı azalır. Verimi düşüren bu durumlara karşı alınabilecek önlemler ise, taşıyıcının parçacık boyutlarının düşürülmesi, enzim yükleme miktarının azaltılması ve enzimi taşıyıcı materyalin dış yüzeyine bağlamaktır. İmmobilizasyon işleminin akış şeması Şekil 2.5'te verildi [23].



Şekil 2.5. İmmobilize enzim biyokatalistinin geliştirilmesinde ana strateji

2.2.1. Fiziksel metotlar

2.2.1.1. Polimer matrikste tutuklama

Yöntemin esası, enzim moleküllerinin etrafında polimer bir ağ oluşturulmasına dayanır. Enzim molekülü çözeltide serbesttir fakat jelin kafes yapısı ile enzimin hareketi sınırlandırılmış olur. Jel kafesinin, enzimin sızmasını engelleyecek derecede sıkı olması gerekmektedir. Jel yapısı, enzimin dışarı çıkmasını engellerken, substrat ve reaksiyon sonucu oluşan ürünün serbestçe giriş çıkışını sağlar. Bu tür immobilizasyon işleminde en çok kullanılan matriks materyalleri, poliakrilamid, pektin, jelatin, agar ve silika jeldir.

2.2.1.2. Mikrokapsülleme

Yöntemde enzim molekülleri yarı geçirgen bir membran ile kuşatılır. Yarı geçirgen membranın gözenek çapı substrat ve ürünlerin geçişine izin verecek boyutta seçilmelidir. Mikrokapsülleme yönteminde herhangi bir modifikasyon olmadığından enzim aktifliği, serbest enzim aktifliğine çok yakındır. Bu yöntemle büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır. Yüzey-hacim oranının büyük olması, mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat tepkimesini artırır. Bu yöntemin dezavantajı mikrokapsülleme sırasında yüksek protein değerlerine gerek duyulmasıdır [24].

2.2.1.3. Membran reaktörler

Mikrokapsülleme yönteminin, büyük ölçekli ve mekanik olarak akış dinamiğine uygun, sürekli sistem amaçlı bir immobilizasyon yöntemidir. Membran reaktörler, oyuk fiber, tübüler ve kaskat yapılarında olabilirler. Zarın özelliği, substrat ve ürün giriş çıkışına izin verecek şekilde yarı geçirgen olması ve prosesin mekanik etkilerinden enzimi koruyacak derecede dayanıklılığıdır [25].

2.2.2. Kimyasal Metotlar

2.2.2.1. Adsorpsiyon

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. Aynı zamanda adsorpsiyon yöntemi, enzimlerin nanopartiküllere immobilizasyonundaki en popüler yöntemdir [23]. 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, adsorpsiyon ile immobilizasyon yöntemine dezavantaj kazandırır. Prensip olarak bir proteinin aktif yüzeylerde adsorpsiyonu tersinir bir işlem olabilir.

Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkili olan Van der Waals kuvvetleridir. Enzim adsorpsiyonunda, en çok kullanılan taşıyıcılar gözenekli cam, diatome toprağı, bentonit, seramik, kollodyum, silikajel, kül, aktif karbon, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

Yöntemin avantajları; immobilizasyon işleminin basit oluşu, enzim konformasyonu üzerine etkinin az oluşu, değişik özelliklere sahip taşıyıcıların seçilebilir olmasıdır. Adsorpsiyonun en önemli dezavantajı ise enzimin desorpsiyonudur. Genellikle şiddetli hidrodinamik kuvvetler varlığında enzim serbest halde tepkime ortamına geçmektedir [25].

2.2.2.2. Kovalent Bağlanma

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 çözültüye geçmesini engeller. Kovalent bağlanma genelde enzimin yapısının ve fonksiyonel grupların bulunduğu durumlarda kullanılır.

İki basamakla gerçekleşen bu yöntemde, ilk olarak katı destek materyallerinin aktive edilmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda, destek materyali amino, karboksil vb. gibi fonksiyonel gruplar taşımalıdır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak glutaraldehit, karbodiimid, epiklorhidrin vb. 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. Taşıyıcı ile enzim arasındaki birleşme ya doğrudan bileşikler arasındaki bağlantı ile ya da "spacer" denilen bağlantı ajanları aracılığı ile gerçekleştirilir. Spacer enzimlere büyük ölçüde hareket özgürlüğü vermekte, böylelikle enzim aktivitesi, bazı özel koşullar altında doğrudan taşıyıcıya bağlanmış enzimin aktivitesinden daha fazla olabilmektedir. Bu yöntemin sağladığı en önemli avantaj, güçlü kimyasal bağ sayesinde enzim stabilitesinin yükselmesidir. Kovalent bağlanmada kullanılan yöntemlerin pahalı ve karmaşık olması, zor deney koşulları altında enzim yapısının bozulması ya da enzimin aktif bölgesinin maskelenmesi, enzimin geri kazanımının düşük olması bu yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır [26, 27, 28, 29].

2.2.2.3. İyonik Bağlanma

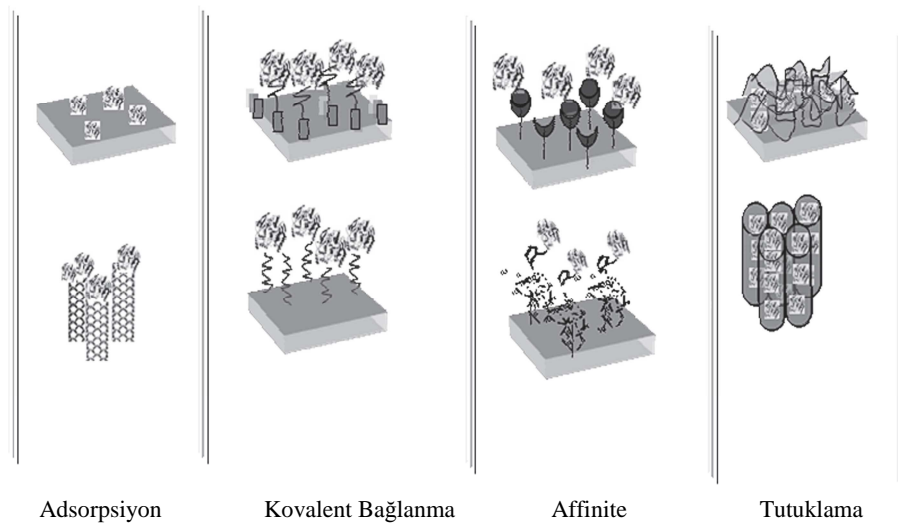
Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. İyonik bağlanma, ılımlı koşullarda

gerçekleştirildiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişiklik görülmez. Yöntemin dezavantajı, enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ, kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışının meydana gelmesidir. Sephadex, amberlite, dowex gibi iyon değıştirici reçineler taşıyıcı olarak kullanılmaktadır [30].

2.2.2.4. Çapraz Bağlanma

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 daha çok fonksiyonel maddelerin kullanılması bu yönetime büyük bir avantaj kazandırmaktadır. Enzimin yapıdan sızması da oldukça güçtür. Yöntemin uygulanması esnasında oluşan kontrol zorluğu, enzim aktivitesinde ve aktif merkezinde meydana gelebilecek değışimler yönetime dezavantaj olarak yansımaktadır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, klorformat ve karbonildiimidazol, metal iyonları ve epiklorohidridir. Çapraz bağlama yöntemi, enzimlerin aktif bölgelerinde çok önemli değışikliklere yol açabilir, ayrıca difüzyon kısıtlamaları görülebilir. Çapraz bağı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdır ve genellikle immünolojik testlerde kullanılmışlardır [31].

İmmobilizasyon stratejileri Şekil 2.6'da özetlendi [29].



Şekil 2. 6. Enzim immobilizasyon stratejileri

2.3. İmmobilizasyonun Avantajları

Enzimlerin, yüksek sıcaklıklardan ve organik çözücülerden etkilenmeleri gibi nedenlerden dolayı canlı mikroorganizmalarda gösterdikleri kararlılıklarında, laboratuvar koşulları içerisinde bir kayıp söz konusudur. Enzimlerin immobilizasyonu bu kararsızlıkların çoğu ortadan kaldırılsa da tamamen yok edilememektedir. İmmobilizasyon ile enzimin kararlılığı artmakta, tekrar kullanımı sağlanabilmekte, tepkimeler kontrol edilebilmekte ve yüksek saflıkta ürünler elde edilebilmektedir. İmmobilize enzimler, serbest hallerine göre inhibisyondan daha az etkilenirler. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilmesi, maliyeti önemli ölçüde düşürmekte ve substrat ölçümleri için uygun enzim kaynakları sağlamaktadır [32]. Deneysel uygulamalar için bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimler, endüstriyel uygulamalar için ise mikroorganizmalardan elde edilen enzimler kullanılmaktadır. Bunun nedeni, enzimlerin mikrobiyolojik kaynaklardan elde edilmesi, bitki ve hayvanlardan elde edilmesinden daha düşük maliyetli olması, üretimin zamanının daha kısa olması ve geniş aralıkta üretim yapılabilmesidir.

3.4. Kompozitler

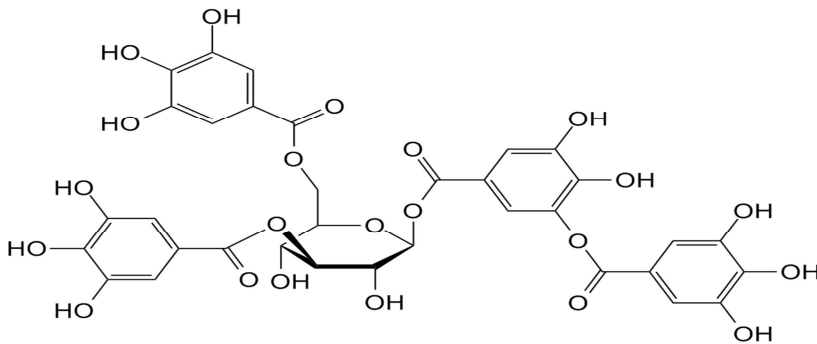
İstenen amaç için tek başlarına uygun olmayıp farklı iki ya da daha fazla malzemeyi istenen özellikleri sağlayacak şekilde, belirli şartlar ve oranlarda fiziksel olarak makro yapıda bir araya getirilerek elde edilen malzemeye kompozit malzeme denir. Kompozit malzemelerde yapıyı oluşturan bileşenler birbiri içerisinde çözünmezler, kimyasal olarak tepkimeye girmezler. Özellikle metalik sistemlerde düşük oranlarda bile olsa, bir miktar çözünme bileşenler arasında kompozit özelliklerini etkileyebilen ara yüzey tepkimeleri görülebilir. Kompozit malzemelerde çekirdek olarak kullanılan bir fiber malzeme bulunmakta, bu malzemenin çevresinde hacimsel olarak çoğunluğu oluşturan bir matris malzeme bulunmaktadır. Bu iki malzeme grubundan, fiber malzeme kompozitin dayanıklılık ve yük taşıma özelliğini, matris malzeme ise, plastik deformasyona geçişte olabilecek çatlak ilerlemelerini önleyici rol oynamakta ve kompozit malzemenin kopmasını geciktirmektedir. Kompozit malzeme türleri genel olarak, metal kompozitler, seramik kompozitler ve polimer kompozitler olarak sınıflandırılır.

3.4.1. Demir-tanin bileşiği

Taninler kimyasal açıdan, hidroliz olabilen taninler ve kondanse taninler olmak üzere iki ana grupta incelenir. Birinci grupta yer alan taninler bir asit ya da enzim eşliğinde hidroliz olarak gallik asit, pirokateşik asit ve şeker gibi, suda çözünebilen bileşikler verir. Suda az, alkolle asetonda iyi çözünür. Hidroliz olabilen taninlerin en iyi bilinen örneklerinden biri gallotanenlerdir. Çok daha geniş bir grup olan kondanse taninler ise hidroliz olamazlar. Bunlar ısı karşısında kuvvetli asitlerle ya da bazı yükseltgeyici maddelerle flobafen denen koyu kırmızı renkli çözünmez bileşikler oluşturur.

Taninler, ayrıca tripsin ile a-amilazların sindirimdeki aktivitesini, substratlarla kompleks teşkil ederek önlerler veya onlara bağlanarak protein ve nişasta sindirimini aksamasına yol açarlar. Taninler, vitamin B ile de kompleks oluşturarak emilimini önlerler, Şekil 2.7.'da fenolik bileşikler içeren tanin yapısı verildi.

Manyetit, spinal yapısındaki ferrimanyetik, Fe_3O_4 formülüyle gösterilen demir mineralidir. Ferro-ferrik oksit olarak da bilinen manyetit ayrıca demir 2-3 oksit olarak da adlandırılır. Kimyasal formülü $FeO.Fe_2O_3$ şeklinde de yazılmaktadır. Bu gösterim demirin iki farklı değeriğe aynı anda (2+ ve 3+) sahip olduğunu göstermektedir. Manyetik özelliğini 858 K'in üzerinde kaybetmektedir.



Şekil 2.7. Tannik asit yapısı

BÖLÜM 3. ÜÇLÜ FAZ SİSTEMLERİ

Üçlü faz sistemleri, son zamanlarda geliştirilmiş protein çökmesinin kollektif birçok basamağını kapsayan bir biyoayırım tekniğidir. TPP (Three-phase partitioning) genellikle proteinlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması prosesinde ön akım ya da son akım işlemi olarak bazen de tek adımda saflaştırma amaçlı kullanılabilen, uygulaması kolay bir tekniktir [33-38].

Rekombinant proteinlerin ve enzimlerin üretimi için makul fiyata yeterli saflaştırmayı gerçekleştirebilen teknolojilerin gelişmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple bilim insanları daha ekonomik protein saflaştırma teknikleri geliştirmek için uğraşmaktadırlar. Son elli yılda, araştırmacılar protein geri kazanımı ve saflaştırılması için sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemlerine ilgi duymaktadırlar. Normalde sıvı-sıvı ekstraksiyonu organik çözümlerin kullanımını içermektedir. Ancak proteinler organik çözümlerde çözünmemekte ve denatürasyona uğramaktadır. Üçlü faz sistemleri, proteinlerin sulu çözeltisine, genellikle tuz olarak amonyum sülfat ve bir organik çözümler olarak butanol eklenmesiyle oluşur. Uygun koşullar altında üç faz oluşur. Butanolce zengin üst faz (non-polar bileşikleri içerir), polar bileşikleri içeren sulu fazdan ara yüzey protein çökeltisi ile ayrılır. Saflaştırılmış protein dağılımı, üstteki organik çözümler fazı ile alttaki sulu fazın arasındaki çözünmeyen ara yüzeyde görünür [39, 40].

Butanolce zengin üst faz genellikle lipitleri ya da hidrofobik materyalleri uzaklaştırır. Ara yüzey fazı protein çökeltisidir. Altındaki sulu faz geriye kalan proteinleri, hücre debrisini, kontaminantları vb. içerir [33]. Değişen amonyum sülfat konsantrasyonu butanolün hacmi ve sıcaklık ile hedef proteininin ara yüzey tabakasında birikimi, oldukça seçimli bir biçimde gerçekleştirilebilir. Bazen TPP iki kez ardışık olarak uygulanır. İlk TPP adımı, kontaminant proteini ya da proteinleri uzaklaştırır ve sulu

faz istenen proteini içerir. İkinci TPP adımı, hedef proteininin saflaştırılmasıyla sonuçlanır.

TPP, iki ya da daha fazla bileşiğin ya da grubun, tek basamaklı ekstraksiyonu ile ayırımını gerçekleştirir. Üç sıvı fazın farklı fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, bu sistemler tek bir ekstraksiyonla iki ya da daha fazla bileşiğin ayırımının yeni olasılıklarını sunmaktadırlar. Konveksiyonel bir biçimde "salting out", proteinleri izoionik çöktürme, yardımcı çözenle çöktürme, ozmolitik ve kozmotropik çöktürme gibi pek çok tekniği içeren prensipleri ortaklaşa çalıştıran bir biyoayırım tekniğidir. Üçlü faz sistemleri biyolojik moleküllerin (protein, hücre, organel ve biyolojik membranlar) ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan seçimli ve etkin bir metottur. TPP bugüne kadar birçok proteinin saflaştırılmasında kullanıldı. Örneğin, *E. coli*'den ekstrakte edilen yeşil floresan prtoeinin [41], domatesten pektinazın [42], ragiden proteaz inhibitörünün [43], havuçtan fosfolipaz D'nin [44], *Aspergillus sojae*'den ekzo-poligalakturonazın [45], turptan peroksidazın [46], tavuk bağırsağından alkalın fosfatazın [47], *Aspergillus oryzae*'den invertaz ve α -galaktozidazın [48] saflaştırılmasında kullanılmıştır. Bu çalışmada TPP tek adımlı saflaştırma tekniği olarak kullanılmış ve kokulu kara üzümünden (*Vitis labrusca*) ekstrakte edilen invertazın, amonyum sülfat konsantrasyonu, t-butanol/enzim konsantrasyonu, sıcaklık, pH gibi parametrelerin optimizasyonu ile maksimum saflaştırma kat sayısı ve verim hedeflenmiştir.

3.1. TPP' yi Etkileyen Parametreler

Bütün proteinlerin fazlar arasındaki tabakada toplanması beklenmez. Bu ayırma işlemini etkileyen ve farklılandıran parametreler mevcuttur. Bu parametreler; hidrofobisite, proteininin moleküler ağırlığı, sıcaklık, pH gibi fiziksel koşullar olarak sıralanabilir.

Amonyum sülfat konsantrasyonu, ekstraktın butanol fazına oranı, pH ve sıcaklık faktörlerinin değişik kombinleri denenerek selektif koşullar elde edilebilir. Fizikokimsyal esaslı TPP tekniği kompleks bir yapıdadır ve iyonik kuvvet,

kozmotropi, ara yüzey gerilimi, osmatik stres, yığılma etkileşimleri gibi faktörler içerdiği düşünülmektedir.

Proteinlerin TPP prosesi içerisinde farklı davranışları olduğu görüşü de mevcuttur. Proteinlerin ara yüzeye absorplanması, karışmaz fazlar arasındaki gerilimin düşmesinden kaynaklı bir korelasyon gözlenir. Bu iki faz arasında oluşan arayüz tabakasında proteinin elde edilmesi bir çöktürme işleminden çok bir bölünme prosesidir.

TPP tekniğinde su ve butanol karışımı, belirli amonyum sülfat konsantrasyonlarında iki faza ayrılır ve proteince zengin arayüzey oluşumu gözlenir. Buradaki enzim aktivitesinde artış gözlenir. Pigmentler, lipitler ve enzim inhibitörleri üst faza konsantre olurken, sakkaritler gibi polar komponentler alt fazda toplanırlar [49].

3.1.1. Tuz konsantrasyonunun etkisi

Üçlü faz sistemlerinin bilinen ayırma ve saflaştırma tekniklerine (kromatografi, filtrasyon, santrifüjleme ve elektroforez) göre bazı avantajları vardır. Üçlü faz ayırma tekniği özellikle tek adımda saflaştırma için uygundur. Bir adımdan oluşan bir işlemle istenilen proteinin deriştirilmesi ve saflaştırmasını gerçekleştirebilmektedir. Üçlü faz sisteminin bir başka üstünlüğü ise ölçek büyütmenin kolayca mümkün olmasıdır. Yöntemin diğer avantajları ise; proses zamanı ve enerji tüketiminin düşük olması, yüksek rezolusyon ve verimlilikte ayırımın gerçekleştirilebilmesi ve maliyetin düşük olması olarak sıralanabilir [50]. Yüksek oranda tuz konsantrasyonuna sahip TPP sisteminde salting out etkisi büyük rol oynamaktadır. Prensipte olarak sülfat iyonu, salting out etkisini beş farklı şekilde gösterir. Bunlar, iyonik şiddet etkisi, kosmotropi, boş yüzey gerilimi, osmatik basıncın artması, sülfat iyonunun proteinin pozitif yan zincirlerine bağlanması ve yabancı ajanların uzaklaştırılması olarak sıralanabilir [35, 51]. Salting out etkisini ilk olarak amonyum sülfat konsantrasyonu, ikincil olarak ise proteinlerin net yükü belirler [52]. Bu nedenle tuz konsantrasyonu ilk olarak %20 gibi düşük yüzdelerde başlanarak optimize edilmesi kritik bir noktadır.

3.1.2. pH Etkisi

Üçlü faz sistemlerinde enzimler pH'a bağlı olarak farklı davranışlar gösterirler. Proteinler, genellikle izoelektrik noktalarına (pI) ulaştıklarında çökmeye başlarlar, Üçlü faz sisteminin pH'ı proteinin iyonize olabilen gruplarını ve yüzeyindeki yüklere etki etmektedir. pH'ın değiştirilmesiyle proteinlerin net yükü düşük pH'da pozitif, yüksek pH'da ise negatif olmaktadır. Proteinler izoelektrik noktadaki pH'da net sıfır yüke sahiptir. İsoelektrik noktanın altındaki pH değerlerinde ise iyonik etkileşimler hidrofilik dağılımından üstün gelecektir ve pozitif yüklü proteinler sulu alt faza doğru dağılacaktır [35, 1]. Ekstrakte edilen enzim solüsyonu içerisinde farklı izoelektrik noktalarına sahip birden fazla protein olacağından, sistemler için kullanılan pH'lar farklılık gösterebilmektedir. Papayadan invertaz enziminin saflaştırılmasında sistemin pH'ı 7,0 [53], ekmeek mayasından invertazın saflaştırıldığı bir diğer çalışmada ise sistem pH'ı 4,5 olarak optimize edilmiştir [49].

3.1.3. Sıcaklığın Etkisi

Üçlü faz sistemleri oda sıcaklığında gerçekleştirilebilen, uygulaması kolay sistemlerdir. Sistemde sıcaklığın birincil etkisi saflaştırılan protein yapısı üzerinedir. Genel olarak enzimlerin optimum çalışma aralığı 25-60 C° dir. Çalışılan yüksek sıcaklıkların proteinin üç boyutlu yapısında oluşturduğu deformasyon ve denatürasyondan dolayı enzim aktivasyonunu ve verimi olumsuz etkilemektedir [6].

3.1.4. Hidrofobisite etkisi

Saflaştırılmak istenen enzim ekstraktı içerisinde yer alan protein yapılarının içerdiği hidrofobik ve hidrofilik yan zincirlerin üçlü faz sisteminde ara yüzey fazında toplanabilmeleri üzerine etkisi, ortamın pH'ıyla da ilişkilidir ve içerdikleri yan zincirlerin yükleri sistemin pH'ını da belirler. TPP de sulu alt fazın hidrofobisitesi ortama katılan amonyum sülfat ile artırılarak izoelektrik noktasına ulaştırılmış protein yapıları orta fazda toplanmaya zorlanır.

3.1.5. TPP'nin kullanım alanları

TPP, proteinlerin inaktif kompleks karışımlarından renatürasyonunda, konsantre edilmesinde ve izolasyonunda kullanılmaktadır. Metal ve organik bileşikleri içeren kompleks sistemlerin analizi ve ayırımı için umut verici bir sistemdir. Farmasötik endüstrisinde ve atık su arıtımında kullanılabilir. Enzimlerin biyolojik ayırımında alt akım ve üst akım basamaklarının her biri için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkisel materyallerden yağ ekstraksiyonu için uygun bir strateji olarak geliştirilmiştir. Ham süspansiyonların geniş hacimlerinden proteinlerin direkt olarak ayırımının iyi olduğu bir yoldur. Enzimatik reaksiyonlarının hızlarının hesaplanmasında kullanışlı bir yöntemdir. Protein gibi biyolojik moleküller genellikle çok seyreltik solüsyonlarda bulunmaktadır ve bu yüzden geri kazanımında genellikle ilk adım deriştirme işlemi olmaktadır. Özellikle rekombinant DNA uygulamalarının artması protein üretiminde geleneksel proseslere ve ürünlerin geri kazanımına yeni bir bakış açısı oluşturmuştur. Geleneksel yöntemlerde saflaştırma işlemi santrifügasyon, filtrasyon ve deriştirme gibi birkaç adımdan oluşmaktadır. Çoğu zaman proses sayısının veya adımlarının artması hem zaman kaybına yol açmakta hem de ürün kaybını arttırmaktadır. Sulu ikili faz sistemi, geleneksel yöntemlerdeki bu eksikliklerin üstesinden gelmektedir. Uygun bir optimizasyona sahip sulu ikili faz sistemi, berraklaştırma, deriştirme ve kısmi saflaştırma adımlarının entegre olduğu tek adımlı bir saflaştırma prosesi sağlayarak hem ürün verimini geliştirmekte hem de ürünün geri kazanım maliyetini azaltmaktadır [1].

BÖLÜM 4. MATERYAL VE METOD

4.1. Materyal

Kullanılan kimyasal maddeler, Na/K tartarat tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$), t-Butanol, sodyum klorür (NaCl), sodyum hidroksit (NaOH), amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), metanol, asetik asit, N,N-Metilen bisakrilamid, N,N,N,N-Tetrametilendiamin (TEMED), etanol, o-fosforik asit, glisin Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. 3,5-Dinitro salisilik asit, sodyum fosfat, bradford reaktifi, akrilamid, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, Coomasie-Brilliant Blue, sükroz, bovin serum albümin, Sigma Molecular Weight Marker (M.W. 14,000–66,000) Sigma Chemical Co. (St. Louis, CA)'den temin edildi.

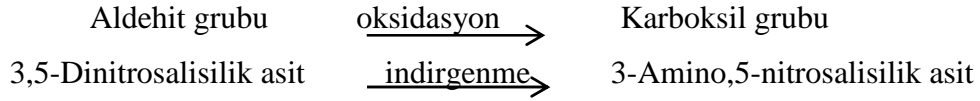
İnvertaz kaynağı olarak Sakarya'da yetiştirilmiş, kokulu kara üzüm (*Vitis labrusca*) kullanıldı.

4.2. Metod

4.2.1. İnvertazın aktivite tayini

İnvertaz enziminin aktivite tayininde esas, substrat olarak sükroz kullanılarak enzimatik reaksiyon sonucunda açığa çıkan invert şekerin miktarının dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile belirlenmesidir. Aktivite tayininde inkübasyonlar Stuart Scientific çalkalamalı su banyosunda (SBS-35), spektrofotometrik ölçümler ise Perkin Elmer marka cihazla gerçekleştirilmiştir. DNS metodunun esası indirgen şekerlerdeki serbest karbonil gruplarının ($C=O$) varlığını test etmektir. Bununla birlikte glukozdaki fonksiyonel aldehit grubu ile fruktozun fonksiyonel keton gruplarının oksidasyonunu ve aynı anda alkali koşullar altında 3,5-dinitrosalisilik asitin 3-amino,5-nitrosalisilik asite indirgenmesini içermektedir. Reaksiyonda bir

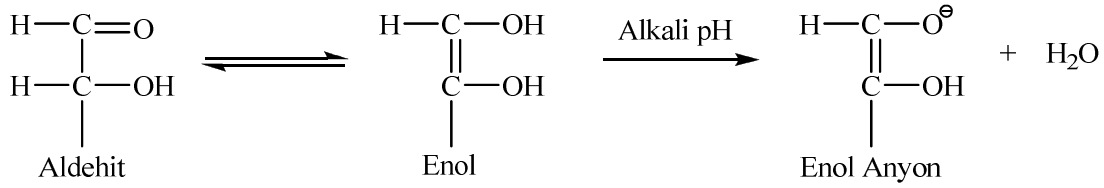
mol şeker bir mol 3,5-dinitrosalisilik asit ile reaksiyona girerek 3-amino,5-nitrosalisilik asit oluşturmaktadır. Nitroaminosalisilik asit konsantrasyonu 546 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir.



Şekil 4.1. Dinitro salisilik asit (DNS) yöntemi ile aktivite tayin prensibi

İnvertaz enzimi Şekil 2.1’de gösterilen reaksiyon ile sükrozun hidrolizini katalizler. Hidroliz reaksiyonu sonucunda oluşan glukoz ve fruktoz indirgen şekerler olduğu için bu monosakkarit karışımı “invert şeker” olarak adlandırılır ve açığa çıkan glukoz ile fruktoz indirgen şekerdirler ve bazik bir çözeltide aldehit ve keton oluştururlar [6].

Yapılarındaki anomerik karbonu açıkta olan şekerler indirgen şekerdir. Bunlar kimyasal olarak düz zincirli olabilecekleri gibi halka yapısında da bulunabilmektedir ve bu iki yapı formu kendi aralarında dengededir. Hemi-asetal veya hemi-ketal grupları boşa olduklarında indirgen şekerler alkali koşullar altında ortamda bulunacak oksitleyici etkenler (Örneğin; Cu^{+2}) karşısında indirgeyici bir madde haline gelmektedir; şekerin karbonil grubunun oksijen molekülü ile yükseltgen arasında oluşan redoks tepkimesi yükseltgeni indirgemektedir. Bir şeker oksitlendiği zaman onun karbonil grupları (Örneğin; aldehit ve keton grupları) karboksil grubuna dönüşmektedir. Örneğin; glukoz kimyasal olarak sulu çözeltide glukopiranoz formu ile dengede olan aldehit formunda bir aldoheksozdur. Fizyolojik pH’da glukopiranoz yapısı üstün şekildir. Aldehit endiol dengesi, glukozun kolaylıkla indirgenmesini ve yükseltgenmesini sağlar. Yani glukozun formülü aldehit ya da kısa ömürlü reaktif tür olan enol şeklinde yazılabilir. Aşağıda Şekil 4.3’de belirtildiği gibi alkali çözeltilerde enol anyonuna dönüşüm tercih edilmektedir. Çifte bağın varlığı ve enol anyonundaki negatif yük, glukozu bakır (Cu^{+2}) ve demir (Fe^{+3}) gibi orta derecede oksitleyici etkenlerle oksitlenebilen aktif bir redükleyici madde (indirgen şeker) haline getirir. Sıcak alkali çözeltide glukoz, Cu^{+2} iyonlarını hemen Cu^{+1} iyonlarına indirger [6].



Şekil 4.2. Glukozun enol anyonuna dönüşüm reaksiyonu

4.2.1.1. DNS reaktifinin hazırlanması

1 g DNS, 20 mL 2 N NaOH çözeltisine eklenir, ısıtılarak çözülür ve son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır. Daha sonra üzerine 30 g Na/K Tartarat ilave edilir ve karıştırılarak toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

İnvertazın aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,6 mL, 0,2 M sodyum asetat tamponu (pH 5,0), 0,2 mL, 0,5 M sükröz (asetat tamponunda hazırlanmış) ve 0,2 mL uygun oranda seyreltilmiş enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı, 37 °C'de 30 dakika boyunca lineer karıştırılmalı su banyosunda çalkalanarak inkübe edilir. İnkübasyondan sonra reaksiyon ortamından alınan 1 mL örnek üzerine 1mL DNS reaktifi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilir. Karışım soğutulduktan sonra 10 mL bidestile su ilave edilerek vorteks ile karıştırılır ve açığa çıkan invert şeker miktarı 546 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. Kör 0,2 mL enzim çözeltisi yerine 0,2 M sodyum asetat tamponu (pH 5,0) içerir. Enzim aktivite miktarlarının hesaplanmasında 1–10 µmol glukoz konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılır. Bir invertaz aktivite birimi, yukarıda belirtilen koşullar altında dakikada 1 µmol glukoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (IU/mL) [1].

4.2.1. Protein Tayini (Bradford metodu)

Bu yöntem, Coomassie blue G-250 (organik) boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Boyanın özellikle arginin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin primer yapısının önemi vardır. Duyarlılık sınırları, total reaksiyon

karışımında 5-100 µg protein/mL olan bu yöntemde asidik boya proteine bağlanır ve 595 nm'de maksimum absorbanans verir. Bu deneyde standart protein olarak genellikle boya bağlama kapasitesi yüksek olan BSA (sığır serum albümini) kullanılır. Sığır serum albümininin (BSA), distile suda hazırlanmış 1 mg/mL'lik stok standart çözeltisinden 0,02–0,25 mg/mL konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılarak örnek protein konsantrasyonları hesaplandı. Cam küvet kullanımı boyanın cama absorplanmasına neden olduğundan polistiren küvetlerde ölçüm alınır [1].

Bradford Reaktifi:

40 mg Coomassie Brilliant Blue G250 %95'lik 50 mL etanolde çözülür. Üzerine 55 ml %88'lik fosforik asit ilave edilerek son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanır ve filtre edilir.

Protein tayini:

Protein konsantrasyonu ölçülecek uygun oranlarda seyreltilmiş örnek ve standartların 100 µL'si küvetlere pipetlenir. Üzerine 2 mL Bradford reaktifi eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilir. 595 nm'de ölçüm alınır.

4.2.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini

SDS-PAGE, protein karışımlarının özelliklerinin analizlenmesi açısından önemli olan jel elektrofrezinin en yaygın olarak kullanılanıdır. Protein saflık kontrolünün bir ölçüsüdür ve proteinin molekül boyutuna göre bir ayırım yapması nedeniyle bağlı molekül kütlesi tayininde de kullanılır [6].

SDS-PAGE uygulanan protein örnekleri Thermo Electron markalı elektrofrez ünitesi kullanılarak ve Laemmli [54] metoduna uygun olarak yürütüldü. Metod heterojen tampon sistemi temeline dayanır. Ayırma kapasitesi oldukça iyi olan bu

yöntemde, çalışılan proteinler yürütücü jele girmeden önce düzenleyici jelde, elektroforez tamponu ve jel arasındaki pH ve iyonik şiddet vasıtasıyla dengelenerek yoğunlaştırılırlar. Proseste, 150 V akım, %4 lük yükleme jeli ve %15 lik yürütme jeli kullanıldı. Solüsyonların ve jellerin hazırlanış protokolleri, Tablo 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4 'de verildi [41, 42, 55].

Tablo 4.1. SDS-PAGE solüsyonlarının hazırlanma protokolleri

| Çözeltiler | Eklenecekler | Miktar |
|---|--------------------------------|---------|
| %40 Akrilamid (37,5:1) | Akrilamid | 116,8 g |
| | N,N'-Metilen bisakrilamid | 3,2 g |
| | Deiyonize su | 300 mL |
| %30 Amonyum persülfat | Amonyum persulfat | 1,5 g |
| | Deiyonize su | 5 mL |
| Yürütme jeli tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 500 mL'ye tamamlanır) | Deiyonize su | 300 mL |
| | Tris | 90,75 g |
| | Konsantre HCl | 8 mL |
| Yükleme jeli Tamponu (1,0 M Tris- HCl, pH 6,8, 500 mL'ye tamamlanır) | Deiyonize su | 300 mL |
| | Tris | 60,54 g |
| | HCl | 36 mL |
| 4x SDS-PAGE Sample Buffer | 125 mM Tris-HCl, pH 6.8 1 M | 5 mL |
| | %20 Gliserol | 8 mL |
| | %4 SDS | 8 mL |
| | 10% β -Mercaptoethanol | 4 mL |
| | 0.5 mg/mL Bromfenol Mavisi | 20 mg |
| | Deiyonize su | 15 mL |
| Rezarvuvar tamponu 10xSDS-PAGE (1L'ye tamamlanır) | Tris | 30,3 g |
| | Glisin | 144 g |
| | SDS | 10 g |
| Coomassie Boyama (stain) Solüsyonu | Etanol | 150 mL |
| | Glasiyel asetik asit | 50 mL |
| | Deiyonize su | 300 mL |
| | Coomassie Brilliant Blue-R-250 | 1 g |
| Destain Solüsyonu | Etanol | 1200 mL |
| | Glasiyel asetik asit | 400 mL |
| | Deiyonize su | 2,4 L |

Tablo 4.2. Yürütme jeli yüzdelere göre ayırma boyutları aralıkları

| Akrilamid Yürütme Jeli | Ayırma Boyutu (kDa) |
|-------------------------------|----------------------------|
| %5 | 100–250 |
| %7,5 | 40–200 |
| %10 | 30–150 |
| %12 | 20–120 |
| %15 | 10–100 |
| %18 | 6–50 |

Kokulu kara üzümünden invertazın izolasyonunda SDS-PAGE' te kullanılan jellerin hazırlanışı;

Tablo 4.3. Yürütme jeli (%15) hazırlama protokolü

| Eklenecekler | Miktar |
|------------------------|---------------|
| Deiyonize su | 2,2 mL |
| 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 | 2,6 mL |
| %40 Akrilamid | 3,0 mL |
| %20 SDS | 200 µL |
| %10 Amonyum persülfat | 20 µL |
| TEMED | 8 µL |

Tablo 4.4. Yükleme jeli (%4) hazırlama protokolü

| Eklenecekler | Miktar |
|------------------------|---------------|
| Deiyonize su | 3,9 mL |
| 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8 | 500 µL |
| %40 Akrilamid | 500 µL |
| %20SDS | 100 µL |
| %30 Amonyum persülfat | 16 µL |
| TEMED | 8 µL |

4.2.3.1. Polimerizasyon protokolü

Poliakrilamid jeller akrilamid monomerlerinin bir çapraz bağlayıcı ajan ile kopolimerizasyonu sonucu oluşur. Poliakrilamid jeller için en çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajan da N,N'-metilenbisakrilamid (Bis) dir. Akrilamid polimerizasyonu serbest radikal katalize bir örnektir. Reaksiyon, amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) ile başlatılır. TEMED, persülfat iyonunun dekompozisyonunu katalizleyerek serbest bir radikal oluşumunu sağlar. Aktif monomer, aktiflenmemiş monomer ile reaksiyon verir ve polimer zincirin uzaması başlar. Uzayan polimer zincir çapraz bağlı metilen bisakrilamid ile birlikte yapılır. Oksijen, serbest radikalleri uzaklaştırdığından ve polimerizasyonu engellediğinden tüm jel çözeltileri kullanılmadan önce vakumla oksijen uzaklaştırılmalıdır [6].

Kaliteli bir SDS-PAGE için şu faktörlere dikkat etmek gerekir: Oldukça yüksek saflıktaki reaktifler, doğru başlangıç konsantrasyonları (yürütücü jel için %0,04 ve düzenleyici jel için %0,1), sıcaklık (polimerizasyon için genellikle 23 °C), çözeltilerin gazsızlaştırılması (oksijen polimerizasyonun inhibitörüdür) ve jel oluşturma tamponlarının pH'ıdır [6].

4.2.3.2. Örneklerin hazırlanması ve elektroforeze uygulanması

Hücre örneklerinde; hücre ekstraktından 100 µL alınır, hücre ekstraktı 20 µL, örnek tamponu ile süspanse edilir. Hazırlanan tüpler kaynar su banyosunda 5 dk kaynatılır. 12,000 g' de 30 dk santrifüj edilir. Solüsyon örneklerinde; 5-10 µg protein içeren solüsyondan bir hacim alınır ve eşit hacimde örnek tamponu eklenir. Hazırlanan tüpler kaynar su banyosunda 5 dk kaynatılır. 2,000 g'de 30 dk santrifüj edilir. 50 µL örnek, 50 µL örnek tamponu ile karıştırılıp 100 C^o'lik su banyosunda 5 dakika kaynatılır. Genel olarak yürütücü jelin her aralığına 20 µL örnek uygulanır. Boş aralıklar ise, elektroforez sırasında proteinlerin dağılmasını önlemek için 20 µL 0,1 M Tris/HCl (pH 6,8) ve ön işlem tamponu ile doldurulur. Anod ve katod rezervuarlarındaki Tris/glisin/SDS tamponu ile elektroforez yürütülür. Proteinlerin elektroforezinde düzenleyici jelde 25 mA/jel ve yürütücü jelde 35 mA/jel akım

uygulanır. Bromfenol mavisinin oluşturduğu bant jele ulaşmadan 0,5 cm önce elektroforez işlemine son verilir [1].

4.2.3.3. Protein bantlarının boyanması

Jellerin boyanmasında Coomasie-Brilliant Blue metodu kullanılmıştır. Bu boyama metodunda esas, boyanın asidik pH'da proteinlere bağlanmasıdır. Jeller, Coomasie Blue (%45 metanol / % 9 asetik asitte hazırlanmış %25'lik çözeltisi) çözeltisi ile 1 saat boyunca yavaşça çalkalanır. Jelde oluşan mavi zemin, jelin %10 metanol ve %14 asetik asitten oluşan sulu çözeltisi ile gece boyunca yıkanarak boyadan temizlenir [55].

4.2.4. Üçlü Faz Sistemi (TPP) ile İvertazın Kokulu Kara Üzümden (*Vitis Labrusca*) İzolasyonu ve Saflaştırılması

Çalışmada Sakarya bölgesinde yetiştirilmiş kokulu kara üzüm (*Vitis Labrusca*), invertaz kaynağı olarak seçilmiştir. Kaynağın genel protein içeriğini invertaz oluşturmaktadır. Elde edilmesi kolay ve maliyeti düşüktür. Söz konusu üzüm kaynağı şarap ve şampanya yapımında farklı aroma içeriğinden dolayı sıkça tercih edilmektedir [57, 58, 59].

İvertaz enziminin saflaştırılması oldukça zor ve masraflı bir işlemdir. Ayrıca, sonuçta elde edilen enzim genellikle yüksek aktiviteli fakat çok az miktardır. Bu nedenle, bu çalışmada daha sonraki amacımıza uygun bir enzim preparatı hazırlamak için invertaz enzimi basit ve geleneksel tekniklerle mayadan izole edilerek kısmi olarak saflaştırılmıştır. Enzimin izolasyonu ve kısmi saflaştırılmasında sırasıyla homojenizasyon ve santrifüjleme işlemleri yapılmıştır. Bu preparat üçlü faz saflaştırma sisteminde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Kokulu kara üzüm (*Vitis labrusca*) önce musluk suyu daha sonra distile su ile yıkandı, taneleri kalacak şekilde ayıklandı ve 1 M NaCl içeren 0,2 M pH 5,0 sodyum asetat tamponu ile blender yardımı ile homojenize edildi. Homojenat, kara üzümünden gelen liflerden uzaklaştırılmak amaçlı tül bent bezinden süzülerek filtre edildi. Elde

edilen filtratın pH'ı 5,7-6,0 aralığına çekildi ve 4 °C'de 2 saat bekletildi. Ardından 4 °C'de 10 000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında elde edilen pellet atılarak santrifüjate ayrıldı. Daha sonra santrifüjate %85'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak gece boyunca 4 °C'de bekletildi. 4 °C'de 10 000 rpm'de 30 dk santrifüjlenen amonyum sülfatlı enzim çözeltisinden enzimatik aktivite içeren çökelek ayrıldı. Çökelek uygun miktarda 0,2 M pH 5,0 sodyum asetat tamponu ile çözüldü, gece boyu tampona karşı 4 °C'de diyalizlendi. Diyaliz adımı tampon içeriği üç kez değiştirildi. Diyaliz sonrası diyalizat, sonraki aşamalarda kullanılmak üzere porsiyonlandı ve -20 °C'de depolandı. Enzim preparatının protein miktarı, aktivite ve spesifik aktivite değerleri "Sonuçlar ve Değerlendirme" bölümünde verilmiştir.

4.2.5. Saflaştırılmış invertazın demir-tanin bileşiği üzerine immobilizasyonu

1,0 mg/mL invertaz enzimi içerecek şekilde enzim-tampon solüsyonu hazırlandı. Tampon olarak 0,2 M pH 5,0 asetik asit tamponu kullanıldı. Tamponda hazırlanan 1,0 mL enzim solüsyonu, 1,0 mg manyetit ile üç saat boyunca karıştırıldı. Sonrasında Mıknatıs yardımıyla tutulan demir-tanin-enzim yapısından tampon uzaklaştırıldı. Tamamen kuruması için +4 °C'de dört gün boyunca kurumaya bırakıldı. Kuruyan yapının SEM görüntüleri alındı ve aktivite ölçümleri, DNS metodu ile yapıldı.

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. İvertaz Enziminin Kokulu Kara Üzümden (*Vitis labrusca*) İzolasyonu

İvertazlar (β -fruktofranozidaz, E.C 3.2.1.26), (Sükraz), β -fruktofranozidlerin terminal indirgen olmayan β -fruktofranozid artıklarının hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Doğada yaygın olarak bulunan invertazlar pek çok bitkisel ve mikrobiyal kaynaktan izole edilerek saflaştırılmıştır [60, 49]. Endüstriyel alanda özellikle gıda sanayinde geniş uygulama alanı bulan invertazlar şekerleme sanayinde, kamış melasının etanole fermentasyonunda, sığır yemlerinin hazırlanmasında, transfruktozilasyon reaksiyonlarında ve enzimatik oligosakkarit hidrolizlerinde kullanılabilmektedir [61].

Bu çalışmada, invertaz enziminin yeni biyoayırma tekniklerinden biri olan üçlü faz ayırma sistemi (TPP) ile saflaştırılması ve saflaştırılan enzimin demir-tanin nanopartikülü üzerine immobilizasyonu amaçlandı. Enzim kaynağı olarak bitkisel, eldesi kolay, şarap ve şampanya üretiminin ana hammaddesi olan kokulu kara üzüm (*Vitis labrusca*) tercih edildi.

İvertaz enzimi "Materyal ve Metod" bölümünde açıklandığı gibi geleneksel metotlar kullanılarak üzümden izole edildi. Ardından üçlü faz sisteminde saflaştırılması amaçlandı. Üzümden izole edilip %85'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak hazırlanan invertaz enzim ekstraktının aktivite, protein, ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla 4,3 U, 0,95 mg ve 4,5 U/mg olarak belirlendi.

5.2. TPP ile Kokulu Kara Üzüm İvertazının Saflaştırılması

Kokulu kara üzümünden izole edilen invertaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan TPP sisteminde organik çözen olarak t-butanol ve tuz olarak amonyum sülfat tercih edildi.

Üçlü faz ayırma sistemleri yeni gelişen bir biyoayırım tekniğidir. Sistem proteinlerin salting out, izoionik presipitasyon, kosolvent presipitasyonu, ozmolitik ve kozmotropik presipitasyonu gibi birçok farklı tekniğin prensiplerini kolektif bir şekilde içermektedir. Kısmi saf protein preparatlarının yanı sıra direkt ham ekstraktların da kullanılabilirdiği bu teknikte kolaylıkla ölçek büyütmede mümkündür [62].

Oldukça basit bir teknik olan TPP’de sulu preparatlardan protein ve enzimleri çöktürmek için bir tuz ve organik çözen kullanılır. Amonyum sülfat gibi bir tuzun yeterli miktarının ortama eklenmesiyle protein ekstraktı ve butanol tamamen karışır ve ortalama bir saat sonra üç fazın oluşumu gözlenir. Üst faz butanolce zengin faz olup non-polar bileşenleri içerirken, alt faz tuzca zengin fazdır ve polar bileşenleri içerir. Orta faz ise bir ara yüzey presipitattır ve çökelen proteinleri içerir [63].

İvertaz enziminin saflaştırılmasında kullanılacak TPP sistemini optimize etmek ve enzimi iyi bir verimle yüksek oranda saflaştırabilmek için sistemi etkileyen tuz konsantrasyonu, enzim/butanol oranı, pH gibi parametreler incelenmiştir. Bunun için uygun konsantrasyonlarda enzim, butanol ve amonyum sülfat içeren ayırma sistemleri "Materyal ve Metod" bölümünde açıklandığı gibi hazırlandı. Optimizasyon çalışmaları sonucunda kokulu kara üzüm invertazı %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, 1:1,5 enzim:butanol oranı (v/v) ve pH 4,5’te %269,7 verimle 10,3 kat saflaştırıldı (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. Kokulu kara üzüm invertazının TPP ile saflaştırma sonuçları (%50 amonyum sülfat, 1:1,5 enzim:butanol, pH 4,5)

| Enzim Çözeltisi | Aktivite (U) | Protein (mg) | Spesifik Aktivite (U/mg) | Saflaştırma Katı (fold) | Aktivite Verimi (%) |
|---|--------------|--------------|--------------------------|-------------------------|---------------------|
| Ham enzim ekstraktı (%85 A.S. çöktürmesi) | 4,3 | 0,95 | 4,5 | 1 | 100 |
| TPP-orta faz | 11,6 | 0,25 | 46,4 | 10,3 | 269,7 |
| TPP-alt faz | 0,7 | 0,18 | 3,9 | 0,85 | 1,6 |

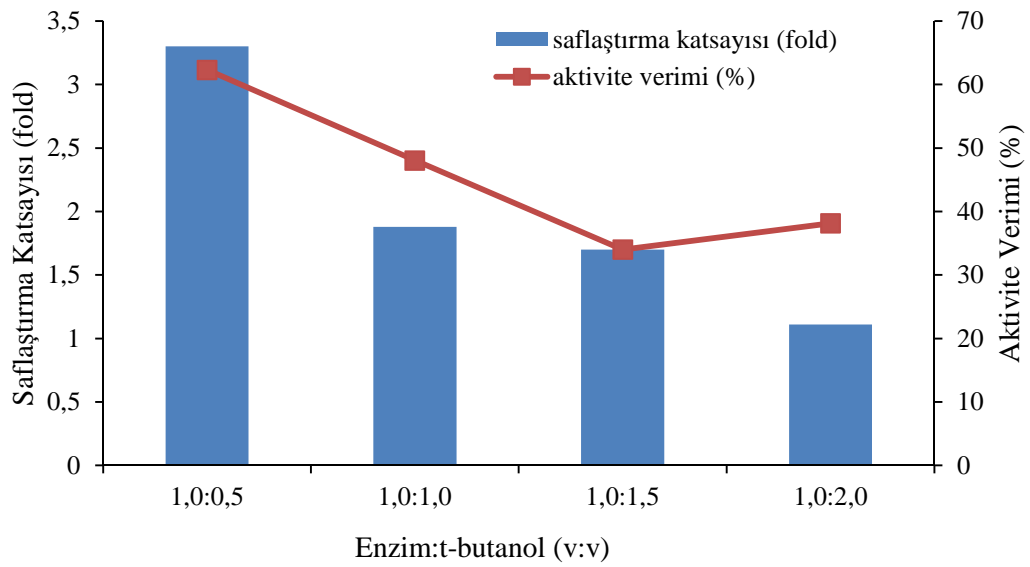
Tüm optimizasyon çalışmaları oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Üçlü faz ayırma sistemleri konformasyonel sıkıştırmayı ve protein hidrasyonundaki değişimleri de içeren çoklu etkinin bir arada olduğu koşullarda gerçekleşen bir sistemdir. Sıcaklık bu değişimlere etki eden en önemli parametrelerden biridir. Bu nedenle genellikle ayırma sistemleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmektedir [63].

Çeşitli TPP sistemleri kullanılarak domates pektinazı %183 verimle 9 kat [63], aspergillus oryzae invertazı %54 verimle 12 kat [64], aspergillus oryzae α -galaktozidazı %50 verimle 14,5 kat [64], havuç fosfolipazı %72 verimle 13 kat [63] ve Ipomoe peroksidazı % 61,7 verimle 2,3 kat [65] saflaştırılmıştır.

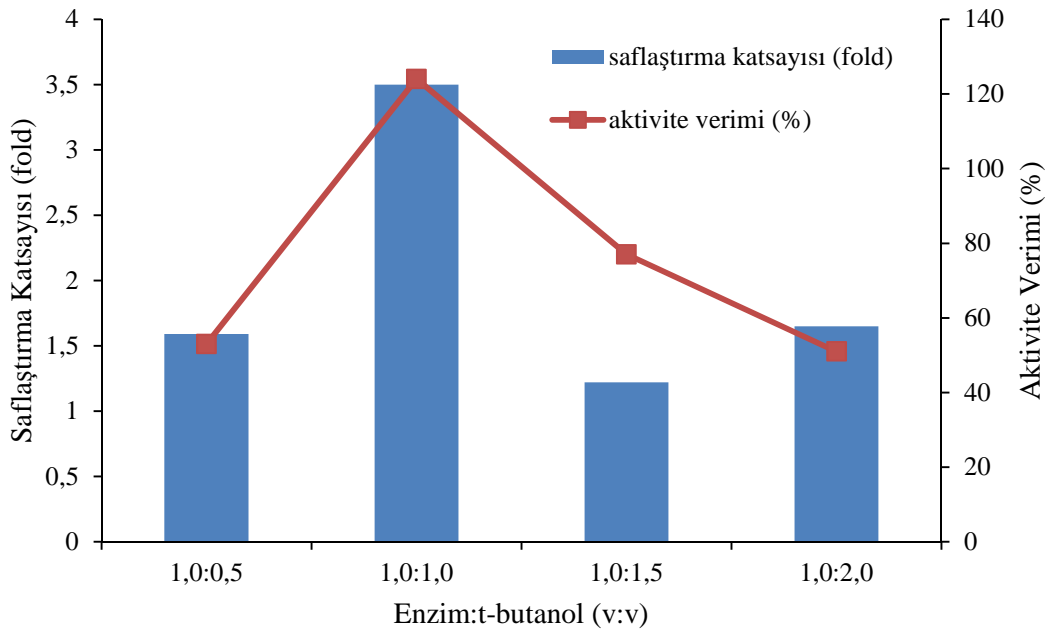
5.3. Kokulu Kara Üzümden İvertazın Saflaştırılmasında, TPP Sistemine Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi

İvertaz enzimlerinin TPP ile saflaştırılmasında optimizasyon yapmak ve uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu ve enzim/butanol oranını belirlemek için farklı amonyum sülfat konsantrasyonları (%20, %30, %40, %50 ve %60) ve farklı enzim/t-butanol oranları (1:0,5, 1:1, 1:1,5 ve 1:2) kullanılarak üçlü faz sistemleri hazırlanmıştır. Bu sistemleri oluşturmak için 2 mL enzim ekstraktı (4,5 U/mg aktiviteye

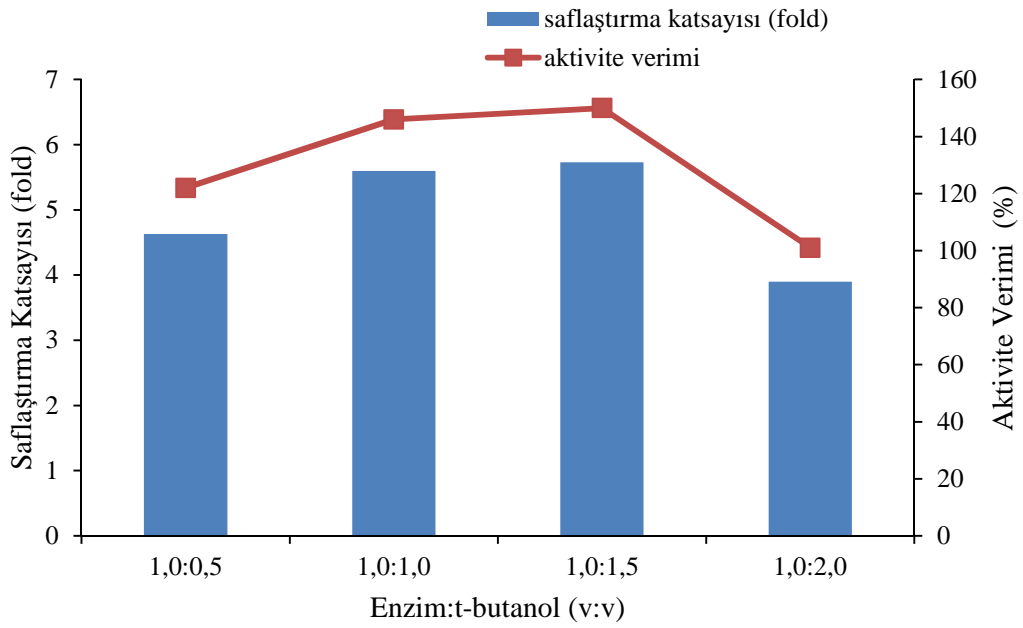
sahip) , %20-60 aralığında farklı amonyum sülfat (w/v) doygunluklarına getirildi ve enzim ekstraktına farklı miktarlarda t-butanol (v/v) (1:0,5 , 1:1 , 1:1,5 ,1:2) eklenerek oda sıcaklığında faz ayırımı gerçekleştirildi. Bu sistemlerden kara üzüm invertazı için elde edilen sonuçlar Şekil 1-Şekil 5’de gösterilmiştir. TPP sistemlerinde proteinleri çöktürebilmek için butanol ve amonyum sülfat arasındaki karşılıklı ilişkiden yararlanılır. Enzim/t-butanol oranı saflaştırmada oldukça önemlidir. Eğer butanol miktarı çok düşük ise butanol tuz ile yeterince sinerjize olmamakta, yüksek ise proteinin denatürasyonuna yol açmaktadır [66].



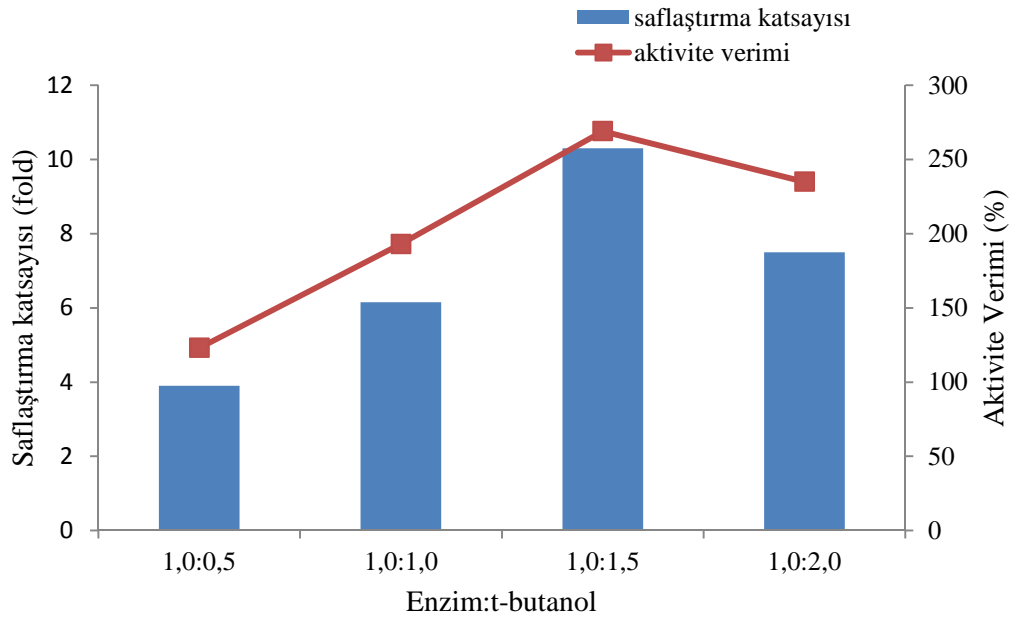
Şekil 5.1. %20 Amonyum sülfat ve enzim:t-butanol oranının, kokulu kara üzüm invertazının saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



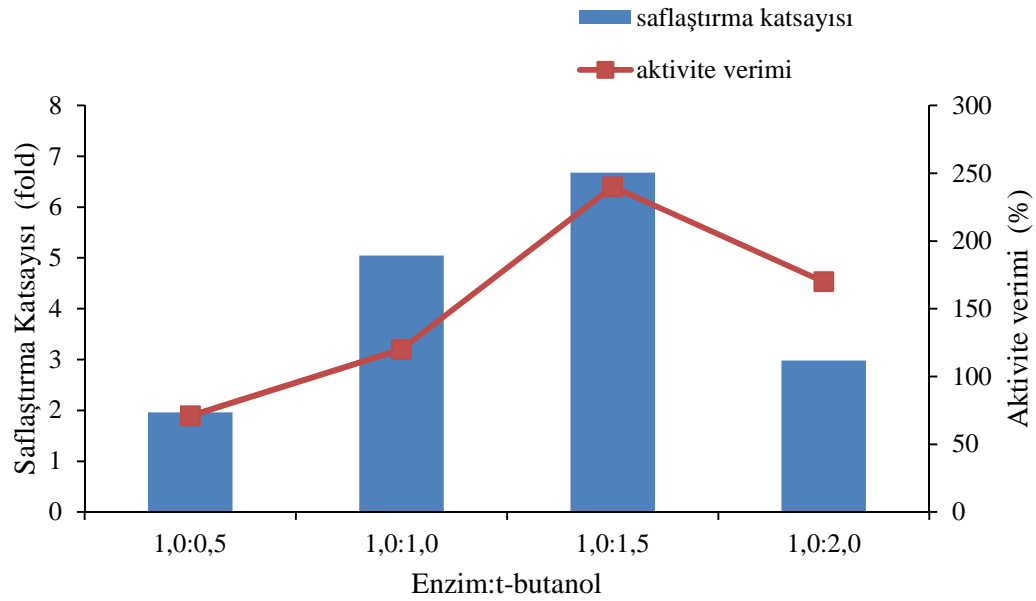
Şekil 5.2. %30 Amonyum sülfat ve enzim:t-butanol oranının, kokulu kara üzüm invertazının saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



Şekil 5.3. %40 Amonyum sülfat ve enzim:t-butanol oranının, kokulu kara üzüm invertazının saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



Şekil 5.4. %50 Amonyum sülfat ve enzim:t-butanol oranının, kokulu kara üzüm invertazının saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



Şekil 5.5. %60 Amonyum sülfat ve enzim:t-butanol oranının, kokulu kara üzüm invertazının saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi

Şekil 5.1 ve Şekil 5.2’de görüldüğü gibi *Vitis labrusca* invertazı için hazırlanan üçlü faz ayırma sistemlerinde amonyum sülfat konsantrasyonu %20 ve %30 iken enzim alt ve orta fazda yaklaşık oranlarda dağılım göstermektedir. Alt fazda toplanan enzimin geri eldesi için, alt faza ikinci bir TPP sistemi uygulanabilir fakat bu ikinci adım maliyeti arttırmakta, işlem süresini uzatmakta ve daha çok analiz işlemlerine

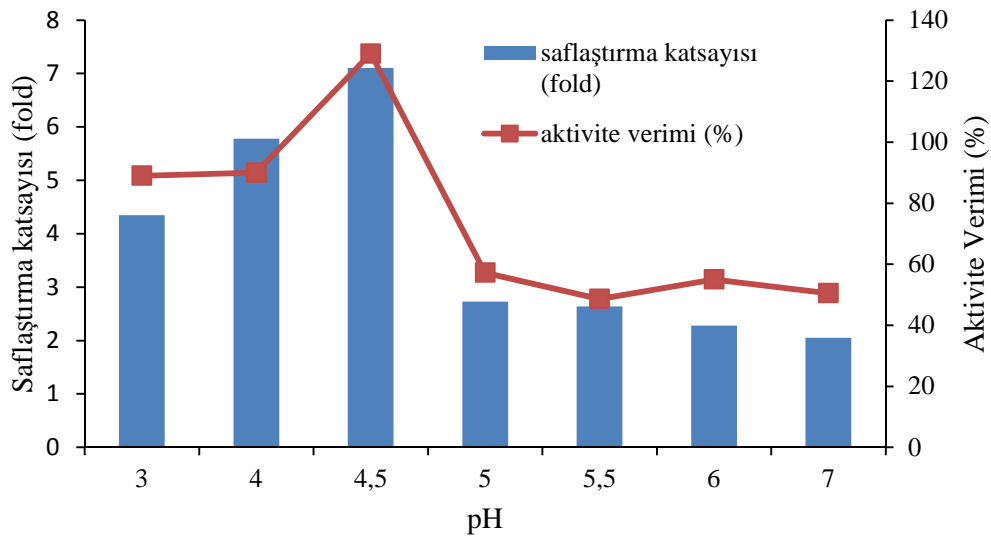
gerek duyulmaktadır. Bu nedenle ikinci kez TPP adımını uygulamak yerine amonyum sülfat konsantrasyonu %60'a kadar arttırıldı. Şekil 5.3'de ise %40 amonyum sülfat konsantrasyonu ile birlikte enzim saflaştırma katsayısında ve aktivite veriminde artış gözlenmeye başlandı. %50 doygunlukta ve 1:1,5 enzim:t-butanol oranı ile hazırlanan sistemde ise Şekil 5.4'de görüldüğü gibi enzim %269 maksimum verimle, 10,3 kat saflaştırıldı. Şekil 5.5' de ise %60'lık doygunlukta sistemde enzim alt fazdan üst faza doğru ilerlerken enzim dışındaki diğer safsızlık proteinleri de üst faza geçtiğinden aktivite verimi %240'a saflaştırma kat sayısı ise 6,7'ye düştü. Ayrıca, enzimler yüksek tuz konsantrasyonunun "salting-out" etkisi ile denatüre olduklarından aktiviteleri ve geri kazanımları düşmektedir [67].

5.4. Kokulu Kara Üzümden İnvertzim Saflaştırılmasında TPP Sistemine pH'nın Etkisi

Üçlü faz ayırma sistemlerinde önemli bir parametre sistemin pH'ı ve hedef proteinin izoelektrik noktasıdır. Ortamın pH'ı ayrımı gerçekleştirecek preparat içerisindeki biyomoleküllerin dağılımını önemli ve etkin bir biçimde değiştirmektedir. Saflaştırılması hedeflenen proteinin ve iyon kompozisyonunun yüküne, kontaminantların yüzey karakteristiğine pH etki eder ve fazlar arasında dağılımın farklılaşmasına sebep olur [68]. Bu nedenle, sistem pH'ının optimize edilmesi gerekir. Protein ayırma çalışmalarında, eğer hedef proteinin izoelektrik noktası biliniyorsa öncelikle proteinin izoelektrik nokta değerinden 2-4 pH birimi altındaki pH'larda sistem hazırlanır. Birbirinden farklı izoelektrik noktalarına sahip proteinleri içeren bir ekstrakt durumunda genellikle pH 3-7 aralığında sistemler hazırlanır. İzoelektrik noktasının altındaki pH değerlerinde proteinler pozitif yüklüdür ve TPP sistemleri ile çöktürülürler. Fakat izoelektrik nokta değerinin üzerindeki pH'larda protein negatif yüklüdür ve çökmez. Bu nedenle TPP sistemlerinin davranışları çoğu kez protein izoelektrik noktası civarında keskin bir değişim gösterir. Yani proteinin sülfat anyonlarına bağlanmasına ya da onları itmesine neden olur. Bunun sebebi

sülfat anyonunun katyonik proteinlere bağlandığında reaksiyondaki elektrostatik komponentlerin varlığıdır [69].

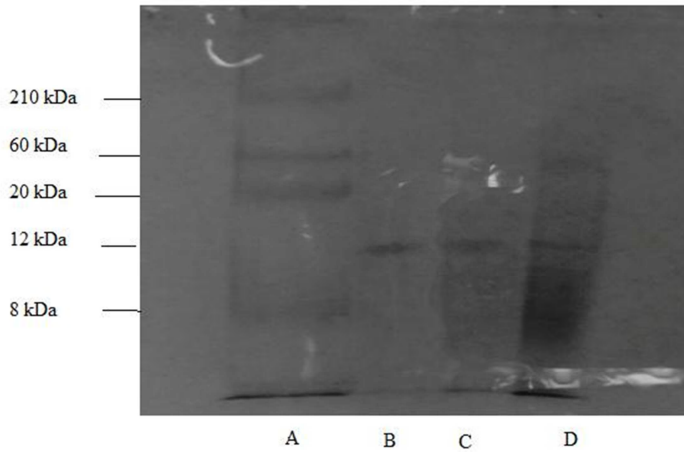
2 mL enzim %50 amonyum sülfat (w/v) doygunluğuna getirildi, ardından sistemin pH'ı 3-7 arasına ayarlanarak enzim:t-butanol oranı 1:1,5'e ayarlandı ve oda sıcaklığında faz ayrımı gerçekleştirildi. Üçlü faz sistemlerinde invertaz enziminin ayırımında sistem pH'ının aktivite verimi ve saflaştırma katına etkisi incelendi ve sonuçlar Şekil 5.6 de verildi.



Şekil 5.6. Kokulu kara üzüm invertazının üçlü faz ayırma sisteminde ayırımına pH'ın etkisi

5.5. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Poliakrilamid Jel Elektroföresi (PAGE) ile TPP Yöntemiyle Saflaştırılan İvertaz enziminin Moleküler Kütle Tayini

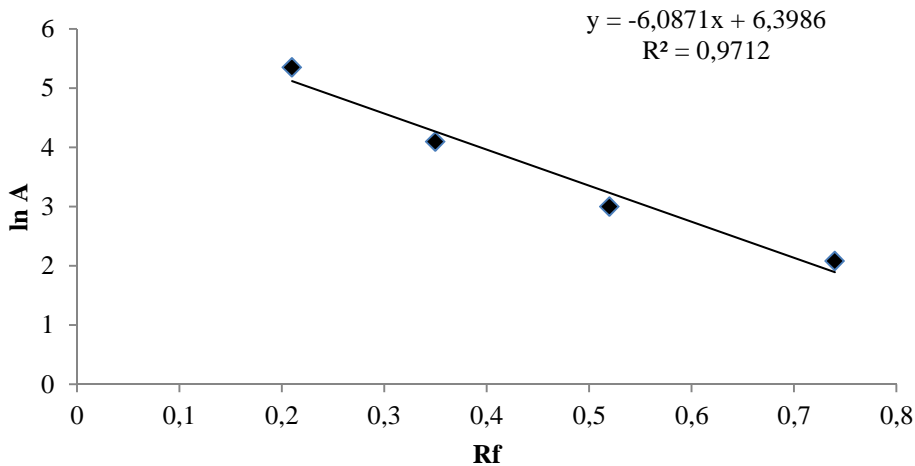
Üçlü faz ayırma tekniği ile saflaştırılan invertaz enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlelerini belirlemek için SDS-PAGE analizi "Materyal ve Metod" kısmında belirtildiği gibi %15' lik jel ile yapıldı. İvertaz enzimi santrifüjate kıyasla, 1:1,5 (enzim:t-butanol) oranı ve %50 amonyum sülfat konsantrasyonu ile optimize edilen sistemde 10,3 kat saflaştırıldı (Şekil 5.7).



Şekil 5.7. Kokulu kara üzüm invertazının SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi **A)** Sigma Moleküler Kütle Standartları (ColorBurst Electrophoresis Marker) **B)** Sulu üçlü faz sistemi sonrası invertaz enzim preparatı (20 µL örnek uygulandı) **C)** Santrifüj (20 µL örnek uygulandı) **D)** Ham ekstrat (20 µL örnek uygulandı).

İnvertazların moleküler kütleleri ve yapıları kaynaktan kaynağa ve kullanılan yöntemle bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin; maya invertazının molekül kütlesi kütle spektrometresi ile 60,64 kDa olarak [70], mango invertazının molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisi ile 68 kDa, SDS-PAGE ile 65,5 kDa olarak bulunmuştur [71]. Şeker kamışı invertazının molekül kütlelerinin SDS-PAGE ile 28 kDa olduğu belirtilmiştir [72].

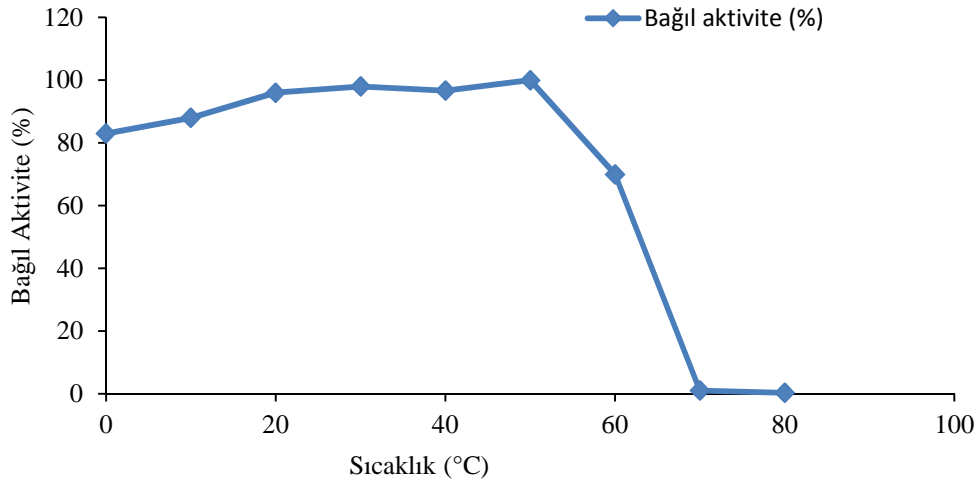
SDS-PAGE yöntemiyle saflaştırılan invertaz enziminin molekül ağırlığı tayini Şekil 5.8'deki grafikten yararlanılarak molekül kütlesi 18,7 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 5.8. SDS-PAGE yöntemiyle saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı tayin grafiği

5.6. TPP yöntemiyle saflaştırılan invertaz enziminin termal kararlılığı

Genellikle enzimler düşük sıcaklıklarda daha kararlı olurken yüksek sıcaklıklarda hızla termal denaturasyon gerçekleşir [1]. İvertazın termal kararlılığı için aktivite tayini “Materyal ve Metod” kısmında açıklandığı gibi belirlendi. Bunun için enzim önce farklı sıcaklıklarda (4-80 °C) inkübe edildikten sonra standart koşullarda aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen grafik Şekil 5.9’de verilmiştir.



Şekil 5.9. İvertazın termal kararlılığı (Substrat: Sükroz; İnkübasyon süresi: 30 dakika)

Sıcaklığın yükselmesi ya da inkübasyon süresinin uzaması gibi termal etkenler, protein yapıdaki enzimin denatürasyonuna sebep olarak, aktivitede kayıplara sebep olur. Aynı TPP sisteminin orta fazından ayrılan invertaz enzimi öncelikle 0-80 °C arasındaki sıcaklıklarda 30 dk inkübe edildi. Sonrasında DNS reaktifi kullanılarak, çalışmanın tamamında uygulanan yöntemle aktivite tayini yapıldı. Şekil 5.9’de görüldüğü gibi enzimin termal kararlılığının 4-50 °C arasında oldukça iyi olduğu, 50 °C’de enzimin aktivitesinin %95’ ini koruduğu belirlendi. 50 °C’ nin üstündeki sıcaklıklarda, enzim aktivitesini hızlı bir şekilde kaybetmektedir. İvertaz enzimi kaynağa bağlı olarak çeşitli kararlılık dereceleri göstermektedir [73].

5.7. TPP Yöntemiyle Saflaştırılan İnvertz Enziminin Depo Kararlılığı

Enzimin kararlılığı, belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak korunmasıdır. Bu sıradaki enzim aktivite kaybı çeşitli nedenlere dayanır. Bunlar, mikrobiyal yıkım ve termik, pH veya kimyasal inaktivasyon olarak sıralanabilir. Depo kararlılığı, özellikle enzimlerin uygulama alanı ile ilgili önemli bir faktördür. Enzimin saklanma koşullarına bağlı bir parametredir. TPP sistemi ile saflaştırılan kokulu kara üzüm invertazının depo kararlılığı iyi olup enzim 120 gün sonunda, +4 °C’de depolanan invertaz başlangıç aktivitesinin %80’ ini korumaktadır.

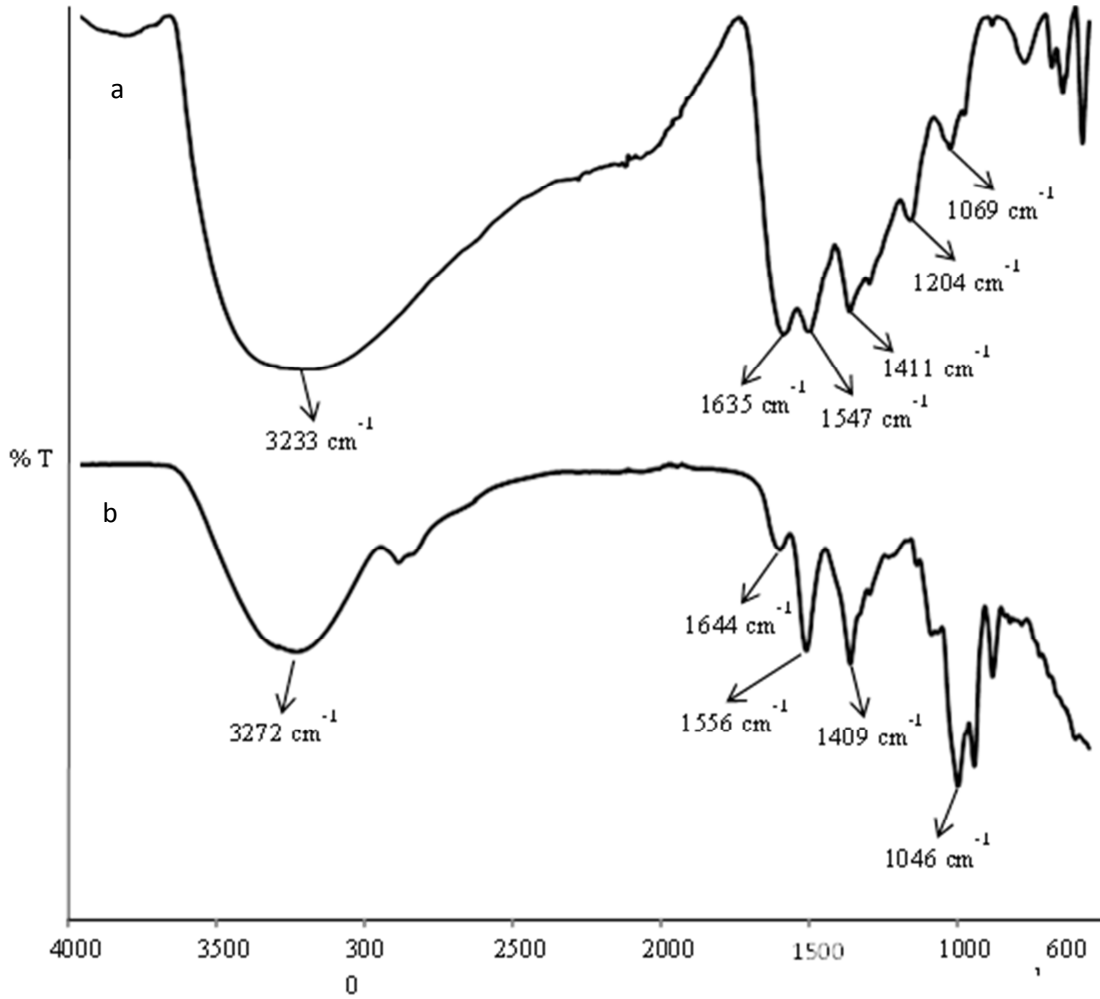
5.8. İmmobilize ve Serbest Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Serbest ve immobilize enzimin aktivite ve spesifik aktivite değerleri Tablo5.2’de verilmiştir. İmmobilize enzim total aktivitesinin sadece %10,3’ünü koruyabilmiştir. Bu durum fiziksel absorpsiyonun zayıf etkileşimleri invertaz enziminin tutunmasını yüksek oranda sağlayamamış olabileceği ya da tanin yapısının içerdiği fenolik yapılarının immobilize enzimin substrata ulaşımını sterik olarak engellemiş olabileceğini düşündürmektedir.

Tablo 5.2. Serbest ve immobilize enzimin aktivite değerleri

| | Aktivite (U) | Spesifik aktivite (U/mg) |
|-------------------------|--------------|--------------------------|
| Serbest enzim | 11,6 | 46,4 |
| İmmobilize enzim | 1,2 | 1,26 |

Demir-tanin bileşiğinin ve immobilize enzimin FTIR spektrumları Şekil 5.10a ve Şekil 5.10b’de gösterilmektedir. Demir-taninin FTIR spektrumunda olmayıp enzim immobilizasyonu sonrasında alınan FTIR spektrumunda enzime ait 1643 cm⁻¹’de C=O piki, 1556 ve 1408 cm⁻¹ dalga boylarında C–N ve COO⁻ gruplarına ait piklerin bulunması immobilizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir [74, 75].



Şekil 5.10. Tanin (a) ve invertaz immobilize edilmiş tanin (b) FTIR spektrumları

5.9. Öneriler

Günümüzde geliştirilmiş birçok saflaştırma tekniği bulunmaktadır, fakat TPP yöntemi basit oluşu, uygulanabilirliğinin kolaylığı, maliyetinin düşük olması ve büyük ölçekli çalışmaya yatkınlığı ile kromatografik çalışmalar içeren çok adımlı yöntemlere kıyasla endüstriyel uygulamalara daha uygundur.

İçecek endüstrisinde invertaz enziminin geniş bir uygulama alanı vardır. İvertaz enzimi, üzüm orjinli içeceklerin ana proteinini oluşturur. Şampanya, şarap gibi içeceklerdeki invertaz enzimi, sükrozun fruktoz ve glukozu hidrolizini katalizleyerek, içeceklerin stabilitelelerinin, berraklık ve aroma kalitelerinin azalmasına neden olur.

Şarap ve şampanya gibi üzüm kaynaklı içeceklerdeki invertazın ortamdan uzaklaştırılması ve istenilen konsantrasyonlarda tutulabilmesi, bu amaca uygun üretilmiş biyosensörleri gerektirmektedir.

Nanobiyoteknolojinin moleküler aygıtlar, yapay enzimler, yapay fotosentetik sistemler, biyolojik moleküllerin izlenmesi ile oluşan veya oluşacak hastalıkların izlenmesi, analizlerin doğru ve hızlı olarak yapılması gibi uygulama alanları vardır. Biyolojik moleküllerin tanısında kullanılacak en duyarlı ve spesifik yaklaşım, tanıyıcı olarak biyomoleküllerin eşleniklerinin kullanıldığı biyoafinite sistemlerinin (tanı kitleri, biyoçipler, biyosensörler vb.) uygulanmasıdır. Nanobiyoteknolojide yeni eğilim, pek çok biyolojik molekülün (enzimler, antibadiler ve diğer proteinler) teknolojik boyutta çok saf ve ekonomik olarak üretimleridir. Geliştirilen nanomalzemeler metal, seramik, organik moleküler topluluk, polimerik ya da kompozit malzemeler olabilir. Bu anlamda, nano yapıya enzim immobilizasyonu da oldukça ilgi çeken son gelişmelerdendir [76].

Bu çalışmada kokulu kara üzüm (*Vitis labrusca*) 10,3 kat saflaştırma katsayısıyla yüksek oranda saflaştırıldı. Elde edilen saf enzim nano boyutlu demir-tanin bileşiği üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilerek aktivite tayin çalışmaları yapıldı. Serbest enzim ile immobilize enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin sadece %10'u kadarını koruyabildiği hesaplandı. Nano boyutlu enzim immobilizasyon çalışmalarına daha yüksek aktivite gösteren immobilize enzim eldesi için çalışmalarımız devam edecektir.

KAYNAKLAR

- [1] KARKAŞ, T., İvertaz Enziminin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması için Sulu İkili-Faz Afinite Sistemlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Fakültesi, Ege Üniversitesi Bornova, İzmir, 5-61, 2009.
- [2] KEHA, E., KÜFREVİOĞLU, Ö., Biyokimya, Aktif Yayınevi, Ankara, 89-137, 2011.
- [3] SAROKİN, L., CARLSON, M., Upstream Region of the SUC2 Gene Confers Regulated Expression to a Heterologous Gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biology*, 10, 2521-2526, 1985.
- [4] LAMMENS, W., LE ROY, K., VAN LAERE, A., RABIJNS, A., VAN DEN ENDE, W., Crystal Structure of *Arabidopsis thaliana* Cell-Wall İvertase Mutants in Complex with Sucrose, *Journal of Molecular Biology*, 377, 378-385, 2008.
- [5] ROİTSCH, T., GONZÁLEZ, MC., Function And Regulation of Plant İvertases: Sweet Sensations, *Trends in Plant Science*, 12, 606-613, 2004.
- [6] YÜCEKAN, İ., İvertaz Enziminin Afiniteye Dayalı Teknikler ile Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi, Bornova- İzmir, 1-188, 2008.
- [7] TELEFONCU, A., Protein Saflaştırma Stratejisi ve Amacı, Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Yaz Okulu), 1-18, 1996.
- [8] SİNGH, MB., KNOX, RB., İvertases of Liliun Polen, *Plant Physiology*, 74, 510-515, 1984.
- [9] HASHİZUME, H., TANASE, K., SHİRATAKE, K., MORİ, H., YAMAKİ, S., Purification and Characterization of Two Soluble Acid İvertase İsozymes from Japanes Pear Fruit, *Phytochemistry*, 63, 129-129, 2003.
- [10] ISLA, MI., VATTUONE, MA., ORDÓÑEZ, RM., SAMPIETRO, AR., İvertase Activity Associated with The Walls of *Solanum Tuberosum* Tubers, *Phytochemistry*, 50, 525-534, 1999.

- [11] BENKEBLIA, N., ONODERA, S., YOSHIIHARA, T., KOSAKA, S., SHIOMI, N., Effect of Temperature on Soluble Invertase Activity and Glucose, Fructose and Sucrose Status of Onion Bulbs (*Allium cepa*) in Store, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55, 325-331, 2004.
- [12] DREIER, LP., HUNTER, JJ., RUFFNER, HP., Invertase Activity, Grape Berry Development and Cell Compartmentation, *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 865-872, 1998.
- [13] ROJO, HP., QUIROGA, EN., VATTUONE, MA., SAMPIETRO, AR., 1998, *Nicotiana Glauca* Invertase: Characterization and Effects of Endogenous Alkaloids, *Phytochemistry*, 49, 965-969, 1998.
- [14] MORELL, M., COPELAND, L., Enzymes of Sucrose Breakdown In Soybean Nodules, *Plant Physiology*, 74,1030-1034, 1984.
- [15] LINGLE, SE., DUNLAP, JR., Sucrose Metabolism In Netted Muskmelon Fruit During Development, *Plant Physiology*, 84, 386-389, 1987.
- [16] LIU, CC., HUANG, LC., CHANG, CT., SUNG, HY., Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells, *Food Chemistry*, 96, 621-631, 2006.
- [17] LEIGH, RA., REES, T., FULLER, WA., BANFIELD, J., The Location Of Acid Invertase Activity and Sucrose in The Vacuoles of Storage Roots of Beetroot (*Beta vulgaris*), *Journal of Biochemistry*, 178, 539-547, 1979.
- [18] LOPEZ, ME., VATTUONE, MA., SAMPIETRO, AR., Partial Purification and Properties of Invertase From *Carica Papaya* Fruits, *Phytochemistry*, 27, 3077-3081, 1988.
- [19] NAKAGAWA, H., KAWASAKI, Y., OGURA, N., TAKEHANA, H., Purification and Some Properties of Two Types of Beta-fructofuranosidase from Tomato Fruit, *Agricultural Biology and Chemistry*, 36, 18-26, 1971.
- [20] GOUPIL, P., CROISILLE, Y., CROISILLE, F., LEDOIGT, G., Jerusalem artichoke invertases: immunocharacterization of a soluble form and its putative precursor, *Plant Science*, 54, 45-54, 1988.
- [21] SCHAFFER, AA., Invertases in Young and Mature Leaves of *Citrus Sinensis*, *Phytochemistry*, 25, 2275-2277, 1986.
- [22] TELEFONCU, A., Enzimolojiye Genel Bakış: Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, E.Ü. Yayınları, İzmir, 1986.

- [23] ANDREESCU S., NJAGI, J., ISPAS C., Nanostructured Materials for Enzyme Immobilization and Biosensors, Department of Chemistry and Biomolecular Science, Clarkson University, Potsdam, NY, USA, 355-394, 2009.
- [24] WISEMANN, A., Handbook of Enzyme Biotechnology, Ellis Horwood, Third Ed., U.K, 243-372, 1994.
- [25] WISEMANN A., Handbook of Enzyme Biotechnology, Cornwall, UK, TJ Pres Ltd., 465-466, 1995.
- [26] GERARD, M., CHAUBEY, A. and MALHOTRA, BD., Application of Conducting Polymers to Biosensors, Biosens. Bioelectron., 5-345, 2002.
- [27] SCOUTEN, WH., LUONG, JHT. and BROWN, RS., Enzyme or Protein Immobilization Techniques for Applications in Biosensors Design., Tibtech., USA, 178-85, 1995.
- [28] THÉVENOT, DR., TOTH, K., DURST, RA. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification, Biosens. Bioelectron., 121-31, Paris, 2006.
- [29] ANDREESCU, S. and MARTY, JL. Twenty Years Research in Cholinesterase Biosensors, from Basic Research to Practical Applications, Biomol. Eng.,1-15, 2006.
- [30] SHULER, ML., and KARGI F.,Bioprocess Engineering, Prentice-hall, USA,1992
- [31] TELEFONCU,A.,Enzimolojiye Genel Bakış: Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, E.Ü. Yayınları, İzmir, 1986.
- [32] MATEO C., PALOMO J.M., LORANTE- FERNANDEZ G., GUÍSAN JM., FERNANDEZ- LAFUENTE R., Improvement of Enzyme Citivity, Stability and Selectivity, Enzim Microbiology Technology, Weinheim ,704-707, 2007.
- [33] ROY, I, GUPTA MN., Three-Phase Affinity Partitioning of Proteins, Anal. Biochem, 300, 11-14, 2002.
- [34] DHANANJAY, SK., MULIMANI VH., Three-Phase Partitioning of α -galactosidase from Fermented Media of *Aspergillus oryzae* and Comparison with Conventional Purification Techniques, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36, 123-128, 2009.
- [35] NARAYAN AV., MADHUSUDHAN MC., RAGHAVARAO KSMS., Extraction and Purification of Ipomoea Peroxidase Employing Three-Phase Partitioning, Appl. Biochem. Biotechnol. 151, 263-272, 2008.

- [36] SHARMA A., GUPTA MN., Purification of Pectinases by Three-Phase Partitioning, *Biotechnol. Lett.*, 23, 1625–1627, 2001.
- [37] SHARMA A., GUPTA MN., Three-Phase Partitioning as a Large-Scale Separation Method for Purification of a Wheat Germ Bifunctional Protease/Amylase Inhibitor, *Process Biochem*, 37, 193–196, 2001.
- [38] DENNISON C., LOURIEN R., *Protein Express. Purif.* 11, 149–161, 1997.
- [39] SAXENA L., IYER BK., ANANTHANARAYON L., *Process Biochem.* 42, 491–495, 2007.
- [40] PAULA BJA., MEYER. R., MOURA-COSTA, LF., BAHAI RC., CARMINATI R., REGIS LF., VALE, VLC., FREIRE SM., NASCIMENTO I.,SCHAER, R., AZEVEDO, V., *Protein Express. Purif.* 34, 311–316, 2004.
- [41] JAİN S., SINGH R., GUPTA MN., *J. Chromatogr.*, 83–86, 2004.
- [42] SHARMA A., GUPTA MN., *Biotechnol. Lett.* 23, 1625–1627, 2001.
- [43] SHARMA A., GUPTA MN., *Protein Express. Purif.* 21, 310–316, 2001.
- [44] . DOGAN N., TARI C., *Biochem. Eng. J.* 39, 43–50, 2008.
- [45] SINGH, N., SINGH, J., *Prep. Biochem. Biotechnol.* 33,125–135, 2003.
- [46] SHARMA A., SHARMA S., MN., GUPTA, *Bioseperation*, 9, 155–161, 2000.
- [47] SK. DHANANJAY, VH. MULIMANI, *Biotechnol. Lett.*, 30, 1565–1569, 2008.
- [48] JOHANSSON, G., *Aqueous Two-Phase Systems in Protein Purification*, *Journal of Biotechnology*, 3, 11–18, 1985.
- [49] AKARDERE, E., ÖZER, B., BIÇAK ÇELEM, E., ÖNAL, S., Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast, Ege University, Faculty of Science, Biochemistry Department, Bornova-İzmir, Turkey, 2010.
- [50] YUE, H., YUAN, Q., WANG, W., Purification of Penylalanine Ammonia-lyase in PEG1000/Na₂SO₄ Aqueous Two-Phase System by a Two-Step Extraction, *Biochemical Engineering Journal*, 37, 231-237. 2007.
- [51] RAWDKUENA, S., CHAIWUTB, P., PINTATHONGB, P., BENJAKULC, S., Three-Phase Partitioning of Protease from *Calotropis Procera* Latex, Food Technology Program, School of Agro-Industry, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand, 73-80, 2011.

- [52] LOVRIEN, R., DENNISON, C., Three-Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins, *Prot. Exp. Purif.*, 11, 149–161, 1997.
- [53] CHAIWUTA, P., PINTATHONGA, P., RAWDKUENB S., Extraction And Three-Phase Partitioning Behavior of Proteases from Papaya Peels, School of Cosmetic Science, Mae Fah Luang University, Muang, Chiang, Thailand, 2005.
- [54] LAEMMLI, UK, Cleavage Of Structural Proteins During Assembly Of Head Of Bacteriophage, 227, 680–685, 1970.
- [55] BIORAD, BioRad Readygel, Application Guide, 161, 9-46.
- [56] JEGOUA, S., CONREUXA, A., VILLAUMEAS, HOVASSEB, A., CHRISTINE SCHAEFFER B, Laboratoire d'Oenologie et Chimie Appliquée, Université de Reims Champagne-Ardenne, France, 2007
- [57] JEGOUA, S., CONREUXA, A., VILLAUMEAS, HOVASSEB, A., CHRISTINE SCHAEFFER B, Laboratoire d'Oenologie et Chimie Appliquée, Université de Reims Champagne-Ardenne, France, 2008
- [58] PORNTAVEEWAT, W., TAKAYANAGI, T., YOKOTSUKA, J., *Ferment. Bioeng.*, 4, 288, 1996.
- [59] PUFF, N., MARCHAL, R., AGUIÉ-BÉGHIN, R., DOUILLARD, R., *Langmuir*, 17, 2206, 2001.
- [60] HUSSAIN, A., RASHID, M. H., PERVEEN, R., ASHRAF, M., Purification, Kinetic And Thermodynamic Characterization of Soluble Acid Invertase from Sugarcane, Enzyme Engineering Group, National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering (NIBGE), Department of Botany, University of Agriculture, Pakistan, 1-3, 2011.
- [61] SALDAMLI, I., *Gıda Kimyası*, 2005.
- [62] SK. DHANANJAY, V. H. MULIMANI, *Biotechnol. Lett.*, 30, 1565–1569, 2008.
- [63] SHARMA, A., GUPTA, M. N., Purification of Phospholipase D Form *Dacus Carrota* by TPP, *Protein Expression and purification*, 21, 310-316, 2001.
- [64] DHANANJAY SK., MULIMANI, V. H., Purification of α -Galaktozidaz and Invertase by Three Phase Partitioning, 1565-1559, 2008.
- [65] NARAYAN, AV., MADHUSUDHAN, MC., RAGHAVARO KSMS., Ekstraktion and Purification of *Ipomoea* Peroxidase Employing TPP, 2009.

- [66] LABUSCHANGE, RB., TONDEER, A., LITTHAUER, D., Flavobacterium odoratum lipase, 21, 52-58, 1997.
- [67] VAİDYA, BK., SUTHAR, HK., KASTURE, S., NENE, S., Purification of Potato Polyphenol Oxidase (PPO) by Partitioning in Aqueous Twophase System, Biochemical Engineering Journal, 28(2), 161-16, 2006.
- [68] GAUTAM, S., SİMON, L., Partitioning of B-Glucosidase from *Trichoderma Reesei* in Poly (Ethylene Glycol) and Potassium Phosphate Aqueous Two-Phase Systems: Influence of Ph and Temperature, Biochemical Engineering Journal, 30, 104-108, 2006.
- [69] DENNİSON, C., LOVRIEN, R., TPP: Concentration and Purification of Proteins, 11, 149-161, 1997.
- [70] REDDY, VA., MALEY, F., Identification of an Active-Site Residue in Yeast İnvertase by Affinity Labeling and Site-Directed Mutagenesis, The Journal of Biological Chemistry, 265, 10817-10820, 1990.
- [71] RAHMAN, MH., AKAND, ASMAH., YAESMİN, T., UDİN, MS., RAHMAN, M., Purification and Properties of İnvertase from Mango Fruit, Pakistan Journal of Biological Sciences, 10, 1271-1274, 2001.
- [72] MASUDA, H., SUGAWARA, S., Purification and Some Properties of Cell Wall-Bound İnvertases from Sugar Beet Seedlings and Aged Slices of Mature Roots, Plant Physiology, 66, 93-96, 1980.
- [73] CHÁVEZ, FP., RODRİGUEZ, L., DÍAZ, J., DELGADO, JM., CREMATA, JA., Purification and Characterization of an İnvertase from *Candida utilis*: Comparison with Natural and Recombinant Yeast İnvertases, Journal of Biotechnology, 53, 67-74, 1997.
- [74] ÖZGÜNAY, H., SARI, Ö., Molecular investigation of valonea tannin, The Journal of the American Letter Chemists Association, 102. 154-157, 2007.
- [75] Mubofu, E.B., Mdoe, J.E.G., Kinunda, G., The activity of invertase immobilized on cashew nut Shell liquid-templated large pore silica hybrids, Catalysis Science & Technology, 1, 1423-1431, 2011.
- [76] ÖZTÜRK, N., Hidrofobik Nano Yapılarda Candida Rugosa Lipaz İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 2006.

ÖZGEÇMİŞ

Büşra KAT, 1986'da Sakarya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Sakarya'da tamamladı. 2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nden mezun oldu. 2011 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.