T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALFA AMİLAZ ENZİMİNİN POLİETİLEN GLİKOL İLE KOVALENT KONJUGATLARININ HAZIRLANMASI VE TERMAL STABİLİTELERİNİN İNCELENMESİ

Merve ALBAYRAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ

Şubat, 2020

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALFA AMİLAZ ENZİMİNİN POLİETİLEN GLİKOL İLE KOVALENT KONJUGATLARININ HAZIRLANMASI VE TERMAL STABİLİTELERİNİN İNCELENMESİ

Merve ALBAYRAK tarafından hazırlanan tez çalışması 19/02/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Kadriye KIZILBEY, Üye
T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan 'Alfa Amilaz Enziminin Polietilen Glikol ile Kovalent Konjugatlarının Hazırlanması ve Termal Stabilitelerinin İncelenmesi' başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Merve ALBAYRAK

İmza

Aileme,

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübeleri ile daima çalışmalarıma yön veren, her türlü sorunumda en büyük destekçim olan, anlayışı ve güler yüzü ile her daim yanımda olan çok kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ'e;

Hem yüksek lisans ders döneminde hem de tez döneminde paylaştığı bilgi birikimi ve bütün eksiklerimde destekçim olan Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL'e

En başından beri laboratuvar çalışmalarımın her anında bana çok büyük yardımları olan, her zaman bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Ecem BAYKAL ve Gökay VARDAR'a;

Lisans tez çalışması ile aramıza katılan ve tez çalışmam da bana yardımlarıyla çok büyük destek olan güler yüzlü arkadaşım Cansu SAZAK'a

Laboratuvar hayatımızı neşelendiren, her türlü eksiğimde yardımıma koşan hep yanımda olan Alihan KOCABAŞ'a

Yorucu ve uzun süren çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyip hep yanımda olan en büyük destekçilerim annem, babam ve minik kardeşime;

En içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Merve ALBAYRAK

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ x

TABLO LİSTESİ xii

ÖZET xiii

ABSTRACT xv

1 GİRİŞ 17

1.1 Literatür Özeti ... 17
1.2 Tezin Amacı ... 19
1.3 Hipotez ... 19

2 ENZİMLER 20

2.1 Enzimin Tarihi ... 22
2.2 Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması ... 23
2.3 Enzimlerin Özellikleri ... 24
2.4 Enzimlerin Yapısı ... 25
2.5 Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler ... 28
2.5.1 Enzim Konsantrasyonunun Etkisi ... 28
2.5.2 Substrat Konsantrasyonunun Etkisi ... 29
2.5.3 Sıcaklığın Etkisi ... 29
2.5.4 İnhibitör Etkisi ... 30
2.5.5 pH Etkisi ... 30
2.6 Amilaz Enzimi ... 31
2.6.1 α-Amilaz ... 32

3 POLİMERLER 35

3.1 Biyopolimerler ... 38
3.2 Biyopolimerlerin Çevresel Etkileri ... 40
3.3 Biyopolimer Çeşitleri ... 41
3.3.1 Selüloz ... 42
3.3.2 Kitin ve Kitosan ... 44
3.3.3 Nişasta ... 48

3.4 Polietilen Glikol 55
3.4.1 Pegilasyon 56
3.4.2 PEG'lerin Özellikleri 57
3.4.3 PEG-Etkin Madde Konjugatlarının Avantajları 57
3.4.4 Pegilasyonun Farmasötik Alandaki Uygulamaları 58
3.4.5 PEG-Protein Konjugatlarının Biyodağılımı ve Farmokinetik Özellikleri 59
3.4.6 PEG Kullanımını Kısıtlayan Faktörler 60
4 ENZİM –BİYOPOLİMER ETKİLEŞİMLERİ 61
4.1 Enzim İmmobilizasyonu 62
4.1.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri 66
4.2 Protein Mühendisliği 66
4.3 Yüksek Stabiliteye Sahip Enzimleri Üreten Mikroorganizmaların Bulunması 67
4.4 Stabilize Edici Bazı Maddelerin Enzim Çözeltisine İlavesi 67
4.5 Enzimlerin Kimyasal Modifikasyonları 67
4.5.1 Tek Fonksiyonlu Olarak Yer Değiştirmiş Proteinler 68
4.5.2 Polimerlere Aşılama 69
4.5.3 Polisakkaritlere Aşılama 70
4.5.4 Glutaraldehit ve Başka İki Fonksiyonlu Olan Ajanlar ile Ağsılaşma 70
5 MATERYAL ve YÖNTEM 72
5.1 Kullanılan Cihazlar, Malzemeler ve Kimyasallar 72
5.1.1 Kulanılan Cihazlar 72
5.1.2 Kullanılan Malzemeler 72
5.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler 73
5.2 α-Amilaz Enziminin Aktivite Tayini 73
5.2.2 %1.0 (W/V) Nişasta Çözeltisi 74
5.3 α-Amilaz Enzim Aktivitesinin Tayini 74
5.4 Maltoz Standartlarının Hazırlanması 75
5.4.1 Hesaplamalar 75
5.5 PEG Aldehit Türevinin Eldesi 77
5.6 Farklı Mol Oranlarında α-Amilaz-PEG Aldehit Konjugatlarının Sentezi 77
5.7 α-Amilaz-PEG Aldehid Konjugatının Aktivitelerinin Tayini 79
6 SONUÇ VE ÖNERILER 80

6.1 α-Amilaz Serbest Enziminin ve α-Amilaz-PEG Aldehid Konjugatının Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi 80
6.1.1 Farklı Oranlardaki Aktivite Sonuçları 80
6.1.2 1/10 Oranındaki α-Amilaz-PEG Aldehid Konjugatlarının Farklı Sıcaklıklardaki Aktiviteleri 81
6.1.3 1/10 Oranındaki α-Amilaz-PEG Aldehid Konjugatların Farklı pH Değerlerinde Aktiviterleri 81
6.1.4 α-Amilaz Enziminin ve Konjugatın Termal Stabiliteleri 82
6.2 Tartışma 83
Kaynakça **84**
Tezden Üretilmiş Yayınlar **94**

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
Da	Dalton
$C_{\alpha\text{-amilaz}}$	Enzim konsantrasyonu
U/IU	Enzim Ünitesi
C	Konsantrasyon
$C_{PEG\text{-}\alpha\text{-amilaz}}$	Konjugatın konsantrasyonu
kDa	Kilodalton
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
^0C	Santigrat Derece

KISALTMA LİSTESİ

ASTM	Amerika Malzeme Test Metodları Standartları
DMA	Dimetil adipimidat
DMS	Dimetil suberimidat
DNA	Deoksiribonükleik asit
DP	Polimerizasyon derecesi
DTBP	Dimetil 3,3'-ditiyobispropiyonimidat
EC	Enzim Komisyonu
ES	Enzim-substrat kompleksi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
IUB	Uluslararası Biyokimya Birliği
IV	İntravenöz
MA	Molekül ağırlığı
$NaBH_4$	Sodyum Borhidrür
PEG	Polietilen glikol
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Poliaktik asit
PLGA	Poliaktik koglikolik asit
RNA	Reoksiribonükleik asit
Q10	Sıcaklık sabiti

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Enzimlerin kullanım alanları 21
Şekil 2.2 Enzimin yapısı 25
Şekil 2.3 Substrat-enzim etkileşimleri: a) Anahtar-kilit modeli, b) Etkileşme sonucu uygunluk modeli 27
Şekil 2.4 Reaksiyon hızının sıcaklık ile değişimi 30
Şekil 2.5 Reaksiyon hızı ile pH değişimi 31
Şekil 2.6 α-Amilazın amino asit bileşimi 32
Şekil 2.7 α-amilaz molekülünün şematik diyagramı 33
Şekil 2.8 α-Amilazın aktif bölgesi 34
Şekil 2.9 Bacillus licheniformis K-amilazın pH aktivite probu ile yaklaşık pKa1 ve pKa2 değerlerini gösterir. Etkinlik isteğe bağlı olarak gösterilir 34
Şekil 3.1 Katılma polimerizasyon çeşitlerinin şekilleri 35
Şekil 3.2 Basamaklı polimerizasyon ve katılma polimerizasyonunun herhangi bir aşamasında ortamda bulunan moleküllerin büyüklükleri açısından karşılaştırılması 36
Şekil 3.3 Biyopolimer üretim sürecini gösteren bir şema 38
Şekil 3.4 Doğal polimerlerin sınıflandırılması 40
Şekil 3.5 Bitki hücresi içerisindeki selülozun görünümü 42
Şekil 3.6 Selüloz molekül yapısı 43
Şekil 3.7 Selülozdaki hidrojen bağları 43
Şekil 3.8 Sellobioz kimyasal yapısı 44
Şekil 3.9 Deniz hayvanı kabukları ve mantarlardan kitin eldesi 45
Şekil 3.10 Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı 46
Şekil 3.11 Selüloz ve kitosanın kimyasal yapısı 46
Şekil 3.12 Nişasta granülünün yapısı 48
Şekil 3.13 Amilozun yapısı 49
Şekil 3.14 Amilopektinin yapısı 49
Şekil 3.15 Nişasta granülü içinde bulunan amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısı (A) ve şematize edilmiş granül organizasyonu (B, C, D). Amorf büyüme halkaları ile ayrılmış kristal lameller (B), amorf ve kristal bölgenin büyütülmüş hali (C), yan yana bulunan amilopektin zincirleri tarafından oluşturulan çift heliks yapısı kristal lamelleri oluştururken, dallanma noktaları ise amorf bölgede yer alır (D). 54
Şekil 3.16 Polietilen glikol'ün (PEG) yapısı 55
Şekil 3.17 PEG veya türevleri ile protein modifikasyonunun yapıldığı çalışmalar 55
Şekil 3.18 Polimer enzim arasındaki kovalent immobilizasyon 57
Şekil 3.19 Pegilasyona uğramış proteinin avantajları 58
Şekil 3.20 1970 yılından beri gerçekleştirilen önemli pegilasyon uygulamaları ... 59
Şekil 4.1 Enzim immobilizasyon yöntemleri 66
Şekil 5.1 Maltoz kalibrasyon eğrisi 76
Şekil 6.1 Farklı mol oranlarındaki α-amilaz-PEG konjugatlarının aktiviteleri 80
Şekil 6.2 Serbest enzim ve konjugatın farklı sıcaklıklardaki yüzde aktivite değerleri 81
Şekil 6.3 Serbest enzim ve konjugatın farklı pH değerlerindeki aktivite sonuçları82

Şekil 6.4 Serbest enzim ve 1/10 oranlı konjugata ait termal stabilite 82

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması 23
Tablo 2.2 Enzimler için kofaktör görevi yapan bazı inorganik elementler 26
Tablo 2.3 Grup transferi gerçekleştiren bazı koenzimler 27
Tablo 3.1 Polimerizasyon yöntemlerinin üstünlük ve eksiklik açısından karşılaştırılması 36
Tablo 3.2 Polimerlerin sınıflandırılması 37
Tablo 3.3 Biyopolimerlerin fizyolojik olarak sınıflandırılması 39
Tablo 3.4 Çeşitli Biyopolimerler, monomerleri ve işlevleri 41
Tablo 3.5 Kitin ve kitosanın bazı uygulama alanları ve spesifik kullanımları 47
Tablo 3.6 Amiloz ve amilopektinin yapısal karşılaştırılması 50
Tablo 3.7 Nişastanın kullanım alanları 51
Tablo 3.8 Nişasta çeşitlerinin büyüklükleri ve şekilleri 52
Tablo 4.1 İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri 64
Tablo 4.2 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar 65
Tablo 4.3 Taşıyıcıların sahip olması gereken özellikler 65
Tablo 5.1 Kullanılan Cihazlar 72
Tablo 5.2 Kullanılan kimyasal maddeler 73
Tablo 5.3 Maltoz standartlarının hazırlanması 75
Tablo 5.4 Maltoz standartları 76
Tablo 5.5 Cprotein: 1 mg/ml konsantrasyonu sabit alınarak hesaplanan polimer (PEG) konsantrasyonları 78

ÖZET

Alfa Amilaz Enziminin Polietilen Glikol ile Kovalent Konjugatlarinin Hazirlanmasi ve Termal Stabilitelerinin İncelenmesi

Merve ALBAYRAK

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ

Alfa amilaz, başlıca gıda, tekstil, deterjan endüstrilerinde kullanılmaktadır. Bu gibi endüstriyel uygulamalarda çalışma ortamlarının sıcaklık, pH v.b. değerleri ya da mevcut kimyasallar enzimin aktivitesini olumsuz etkileyebilir. Endüstriyel enzimlerin uygulamalardaki stabilitesi biyoteknolojide kritik bir sorundur. Protein stabilizasyonunda, protein mühendisliğinden, immobilizasyon tekniklerinden veya kimyasal modifikasyondan yararlanılmaktadır. Taşıyıcı olarak çözünmeyen materyaller kullanılarak elde edilen immobilize enzimlerin ise serbest enzimlere göre çeşitli avantajları vardır. Bu avantajlar stabiliteyi arttırmak, kolayca tekrar kullanılır durumda olmak ve sürekliliği olan işlemler için uygun olmak şeklinde sıralanabilir. Bu çalışmada, alfa amilaz enzimi ile polietilen glikol polimerinin farklı mol oranlarında kovalent konjugatları sentezlenmiştir. Konjugatların UV-Vis spektrofotometre ile karakterizasyonu yapıldı.

Sentezlenen konjugatların ve serbest enzimin farklı sıcaklıklarda, farklı pH değerlerindeki aktiviteleri, termal stabiliteleri incelendi ve sonuçlar kıyaslandı.

Anahtar Kelimeler: Alfa amilaz, enzim stabilizasyonu, polietilen glikol, kovalent konjugasyon

ABSTRACT

Preparation of Covalent Conjugates and Polyethylene Glycol of Alpha Amylase Enzyme and Investigatiın of Their Thermal Stability

Merve ALBAYRAK

Department of Chemistry

Master of Science Thesis

Advisor: Associate Prof. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ

Alpha amylase is mainly used in food, textile and detergent industries. In such industrial applications, the temperature, pH etc. of the working environment. or existing chemicals may adversely affect the activity of the enzyme. The stability of industrial enzymes in applications is a critical problem in biotechnology. Protein stabilization, protein engineering, immobilization techniques or chemical modification are utilized. The immobilized enzymes obtained by using insoluble materials as carriers have various advantages over free enzymes. These advantages can be listed as increasing the stability, being easily re-used and suitable for continuous processes.

In this study, the covalent conjugates of the polyethylene glycol polymer with different molar ratios were synthesized by the alpha amylase enzyme. Conjugates were characterized by UV-Vis spectrophotometer. The thermal stability of synthesized conjugates and free enzyme at different temperatures, different pH values were investigated and the results were compared.

Keywords: Alpha amylase, enzyme stabilization, polyethylene glycol, covalent conjugation

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonları katalize eden enzimler biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olma, substrat spesifikliğine sahip olma, yenilenebilir kaynaklardan elde edilme ve üretimlerinin basit olmasından dolayı endüstirinin birçok alanında yaygın olarak kullanılmaktadır[1]–[3]. Enzim prosesleri oda koşullarına yakın, atmosferik basınç altında, sulu ortamlarda, yüksek hız ile gerçekleştirilmektedir. Konveksiyonel tepkimelere göre daha ekonomik olan enzimatik prosesler hem çevre dostu hem de enerji verimleri yüksektir. Enzimler sahip oldukları bütün bu avantajlara rağmen sürekli bir stabilitelerinin bulunmaması ve reaksiyonun gerçekleştiği ortamdan geri kazanımının güç olması ve tekrar tekrar kullanılamaması sebebiyle endüstriyel uygulamalarda dezavantaj oluşturmaktadır[1].

Enzimler endüstrinin hemen hemen her alanında kullanılmakta olup ticari enzim üretimi iki aşamada meydana gelmektedir. İlk aşamada bulundukları hayvansal, bitkisel ve mikrobiyel kaynaklar üzerinden izole edilirler ve daha sonrasında ise saflaştırılırlar. Bu işlemler sırasında enzimler inaktive edici şartlar ile karşılaşmakta ve enzim kaybına uğramaktadır. Enzimlerin üretim aşamasında sonra endüstriyel çalışmalarda ve üretim prosesleri sırasında enzimlerin inaktivasyonu ile enzim kayıpları meydana gelmektedir. Bu olay pH, sıcaklık, oksijen, denatüre edici maddeler, proteazların varlığı gibi birçok faktörün etkisi ile ortaya çıkabilmektedir. Bu sebepten dolayı enzimlerin inaktive olmaları olayına karşı stabilizasyonu endüstriyel çalışmalar için mecburidir. Stabilitenin arttırılması ile meydana gelen enzim kayıpları önlenerek, enzim preparatlarının işletmede oluşturduğu maliyeti azaltacaktır. Enzimlerin işlevselliği ile endüstriyel uygulamalar ve depolama esnasındaki stabiliteleri birbiri ile bağlantılıdır. Endüstriyel alanlarda kullanımı ile alakalı stabiliteleri işlemler sırasında enzim

aktivitesinin korunması olarak bilinmektedir. Depolama stabilitesi ise enzimin üretiminden kullanımına kadar geçen zamanda aktivite kaybının en aza indirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde katkı maddelerinin kullanımı, protein mühendisliği ve kimyasal modifikasyonlar oldukça sık kullanılan metodlardır. İmmobilizasyon ise kayda değer bir stabilite sağlamasına rağmen, genellikle biyoreaktör uygulamalarında gelişmeler sağlamak ve biyokatalizörlerin kaybını engellemek için uygulanmaktadır[4]–[7].

Nişastadaki α -1,4 bağlarını hidrolize eden amilazlar, endüstriyel olarak çok önemli enzimlerdir. Amiloz, amilopektin ve glikojeni oluşturan glikozlar arasında bulunan glikozidik bağları parçalayabilme yeteneğine sahip olan amilazlar doğada hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır. α-amilaz glukoz/früktoz şurup üretiminde, kâğıt, bira, nişasta, deterjan ensütrisinde ve ekmek yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Amilaz, uzun moleküllere sahip olan oligosakkkaritlerin saptanmasında gümüş nitrat testi ile mukayese edildiğinde daha başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Klinik kimya analizleri ile biyoteknoloji çalışmalarında amilaz enzimi kullanılmaktadır[8]–[11].

α-Amilaz nişasta kaynaklarını sindirebilme kabiliyetleri ve immobilizasyonu endüstriyel olarak oldukça önem taşımaktadır. α-Amilazın %1'lik konsantrasyondaki patates, buğday ve mısır'ın parçalanma oranları 8 saat içerisinde %45.1, 53, 57.5 ve 12 saat içerisinde %48.6, 56.4, 63.2 olarak sıralanmaktadır. Ham nişasta granüllerini direkt olarak parçalayabilen enzimler, ekonomik açıdan çok cazip görülmektedir[12].

Enzim stabilizasyonu, uzun süreli devam eden ve yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen endüstriyel prosesler için oldukça önem arz etmektedir. Literatür verilerine göre, A. Carbonarius amilazın 20 dakika gerçekleştirilen inkübasyonundan sonra 30°C ile 80°C sıcaklık aralıklarında aktivitesinin %85'ini, 90°C'de ki sıcaklıkta ise ise %65'ini gösterdiği görülmüştür. Yapılan bir başka çalışmada A. flavus, α-amilazın 50°C sıcaklıklarda 60 dakika boyunca stabil olduğu görülmüştür. Endüstriyel çalışmalarda, yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen şekerleştirme metodlarında genellikle yüksek termostabiliteye sahip mikrobiyal amilazlar tercih edilmektedir[13], [14].

1.2 Tezin Amacı

İmmobilizasyon yöntemleri, stabilize edici bazı maddelerin enzim çözeltisine eklenmesi, modifikasyon yöntemleri, yüksek kararlılığa sahip olan enzimleri üreten mikroorganizmaların varlığı, protein mühendisliği ile enzimlerin stabilizasyon işlemleri gerçekleştirilmektedir. Enzimleri inaktive edici özelliklerini engellemek üzerine yapılan modifikasyon işlemlerinden biri de enzim yüzeyinde kılıf olarak çeviren polimerler ile gerçekleştirilen çalışmalardır. Enzim yüzeyinde kılıf oluşturan hidrofilik özellikteki polimer, hidrofobik ara yüzeyler ile enzimlerin etkileşimini engellerken, enzim üzerinde bulunan gruplar ile reaksiyon verebilmektedir. Polietilen glikol aldehit polimerleri kullanılarak gerçekleştirilen enzim-polimer konjugatları, enzimlerin kararlılığını arttırmaktadır. Bu tez çalışması, α-amilaz-PEG aldehid konjugatlarının hazırlanması ve farklı koşullardaki kararlılıklarının incelenmesini amaçlamaktadır.

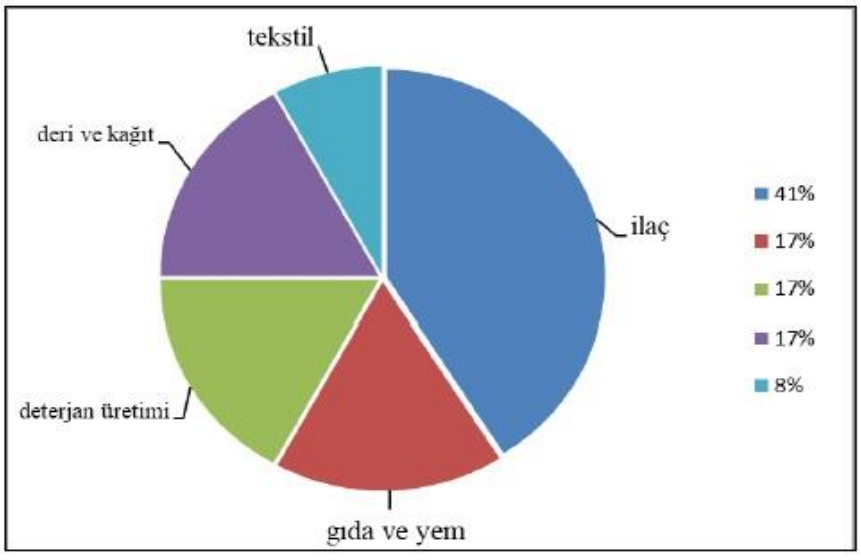
1.3 Hipotez

Hedeflenen çalışma ile α-amilaz enziminin α-amilaz/PEG aldehid konjugatları başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve çalışma amacına ulaşmıştır. Bu konjugatların optimum koşulları belirlenmiş; serbest enzime göre kıyasla termal stabiliteleri daha yüksek, uzun ömürlü ve kararlı konjugatlar elde edilmiştir. Kararlı yapısı ve sahip olduğu uzun raf ömrü ile geliştirilen konjugatların enzim bazlı biyosensör uygulamalarında özellikle avantajlı bir kullanım sağlayacağı görülmektedir.

2
ENZİMLER

Enzimler, kimyasal katalizörlerden farklı olarak, reaksiyonları sulu çözeltilerde normal sıcaklık ve pH, düşük sıcaklık gibi çok ılımlı koşullarda katalizleyen, böylelikle ısıya duyarlı substratların bozunması olasılığını azaltan, süreç boyunca korozyon etkilerini ve enerji ihtiyaçlarını azaltan katalizörlerdir[15]. Katalitik RNA moleküllerinin çok az bir kısmının dışındaki bütün enzimler protein yapısındadırlar[16]. Enzimler yüksek substrat özgürlügüne sahiptirler. İstenmeyen yan ürünlerin reaksiyonlarda daha az oluşmasını sağlarlar, dolayısıyla materyal maliyetini düşürürler ve ürün ayrıştırma işlemlerinin daha kolay yapılmasına katkıda bulunurlar[15]. Enzimler, canlı organizmalar tarafından üretilen, farklı maddeler içeren spesifik bir kimyasal reaksiyonu katalizleyen ya da kolaylaştıran, kendisi reaksiyondan bozulmadan ve degişikliğe uğramadan çıkabilen protein molekülleridir[17]. Enzimler molekül agırlığı 6000-600000 aralığında olan uzun aminoasit zincirleridir. Bütün enzimlerin proteinleri genler ile sifrelendiğinden ötürü her enzimin de aminoasit dizilimi farklıdır. Bu sebepten dolayı her bir enzim birbirinden farklı bir üç boyutlu yapıdadır[18]. Yapay ve inorganik katalizörlerden farklı olarak enzimler oldukça fazla katalitik güce sahiptirler. Enzimlerin reaksiyonları uygun ortamda spesifik ve hızlı biçimde katalizliyor olması, enzimlerden dogal ortamlarının dışındada faydalanabilme olanağı sağlar[16]. Uygun ortamın sağlanma şartıyla etkilerini normal ortamlarının dışındada gösterebiliyor olmaları, enzimlerden birçok alanda yararlanabilme olanağı vermektedir[4]. Enzimlerin birçok avantajı bulunmaktadır. Yüksek ürün kalitesi, gereksiz enerji tüketiminin önlenmesi, tepkimenin ılımlı ortamlarda gerçekle˛smesi ve tepkime hızının 1016 kata kadar yükselmesi gibi avantajları bulunur[19]. Enzimlerin canlı hücrelerin işlev ve özelliklerini organize etme görevinden endüstriyel ölçekli pek çok reaksiyona kadar görevi olmakla birlikte bazı dezavantajları da mevcuttur. Üretim maliyetinin yüksek olması, kararlı yapıda olmamaları, çok az substrat spesifitesine sahip olmaları bu dezavantajlar arasında yer almaktadır[20]. Enzimlerin katalizledikleri reaksiyon sonunda ürünü

kirletmeleri ve bu enzimin tekrar elde edilmesinin fazla maliyetli olması gibi olumsuz yanları bulunmaktadır. Bunun yanı sıra dogal ortamından izole edilen bir enzimin aktivitesinde düşüş gözlemlenir[21]. Endüstrideki yeni ihtiyaçlar ve biyoloji-kimya alanındaki yeni gelişmeler, enzimlerin dezavantajlarını yok etmek için birçok çalışma yapılmasını saglamıştır. Seçicilikleri arttırılan enzimler ile dogal veya doğal olmayan substratları faydalı ara yada son ürünlere dönüştüren pek çok enzimatik reaksiyonun oldugu kanıtlanmıştır. Aynı zamanda enzim reaksiyonlarının kapasitelerinin arttırılması amacıyla; enzimlerin tekrar kullanımı adına geri kazanımlarının kolaylaştırılması ve kararlılıklarının arttırılması için teknikler üretilmiştir[22]. Enzimler Şekil 2.1'de gösterildiği gibi tekstil, gıda, deri ve deterjan gibi birçok endüstri alanında önemli kullanım alanına sahiptir. Enzimler gıda endüstrisinde sterilizasyon ve pastörizasyonun uygun bir şekilde yapılıp yapılmadıgını tayin etmek için kullanılır. İlk çağlardan beri peynir üretiminde enzimler kullanılmaktadır. Peynirin üretiminde mayalar ve gıda bakterileri kullanılmıştır. Aynı zamanda peynirin üretilmesi enzimlerin dondurulması veya enzim etkinlikleri ile gerçekleştirilmiştir. Yine çok kullandıgımız gıda ürünlerinden olan ekmegin mayalanmasında da, karbondioksitin enzimatik ürün olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir[23], [24].



Şekil 2.1 Enzimlerin kullanım alanları[23]

1930 yıllarında gıda endüstrisinde enzimler meyve suyu sanayisinde kullanılmaya başlanmıştır. 1960 yıllarında ise nişasta sanayisinde mikrobiyal enzimlerden faydalanılmıştır. Enzimlerin en çok kullanıldıgı sanayi dallarının en başında nişasta ve deterjan sanayisi gelmektedir. Endüstriyel enzimlerin %37'si deterjan, %12'si tekstil, %11'i nişasta, %8'i fırıncılık ve %6'sı hayvan yemi sanayisinde kullanılmaktadır. Bugüne bakınca enzim gelişen teknoloji ile birçok enzim firması çok geniş uygulama alanları için enzim ticareti yapmaktadır. Bu endüstriyel enzimlerin %75'inden çoğunu hidrolazlar oluşturuyor. Protein parçalayan enzimler ise toplam enzim satışının yaklaşık %40'ını oluşturuyor[25].

2.1 Enzimin Tarihi

Biyokimyanın tarihine baktıgımızda bilimsel çalışmaların çoğu enzimlerin incelenmesiyle alakalıdır[17]. Kataliz ilk defa 1700'lerin sonlarında etin mide salgılarıyla sindirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda fark edildi ve tanımlandı. Daha sonrasında yapılan çalışmalar ise 1800'lerde çeşitli bitki özleri ve tükrük ile nişastanın şekere dönüşümü üzerineydi[16]. 1833 yılında Payen ve Persoz nişastayı şekere dönüştüren termolabil bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleri enzim alanında yapılan en önemli çalışmalardan olmuştur. Günümüzde amilaz olarak bilinen bu enzime o günlerde diastaz deniliyordu ve bugün enzimlerin sistematik adlandırmasındaki 'ase' eki'nin kaynagı bu çalışmadan gelmektedir[26]. 1850'lerde Pasteur şekerin maya yardımı ile alkole fermentasyonunun fermentler aracılıgı ile katalizlediğini bulmuştur. Pasteur'un yaptıgı bu çalışma ile beraber vitalizm fikrinin bir süre ön plana çıkmasına sebep oldu. Daha sonraları bu görüşün çürütülmesi ile biyokimya biliminin önü açıldı[16]. 1897 yılında Eduard Buchner maya özütlerinin şekeri alkole dönüştürdügünü buldu. Bu çalışma sonrası fermentasyon işleminin hücrelerden uzaklaştırıldıklarında bile fonksiyonlarına devam eden moleküller ile gerçekleştiğini ispatladı. Daha sonrasında ise Frederick W. Kühne, Eduard Buchner tarafından keşfedilen bu moleküllere enzim adını verdi[16]. Kaj Ulrik Linderstrøm-Lang'ın ve James Batcheller Sumner'in yaptıgı çalışmalar, enzimlerin endüstriyel üretim ve kullanım metodlarının daha da gelişmesine olanak sağlamıştır[27].

2.2 Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Enzimler başlarda katalizledikleri reaksiyonda etki ettigi substratın sonuna 'az' eki getirilerek adlandırılıyordu. Örneğin, fosfat estelerinin hidrolizlenmesini sağlayan enzime fosfataz, üre hidrolizini saglayan enzime üreaz denilmiştir. Tripsin, pepsin gibi bazı enzimler de ilgili enzimatik reaksiyonla alakalı hiçbir ipucu vermeden isimlendirilir. Daha sonraları enzim çeşitliliginin artması ve yeni enzimlerin keşfedilmesi ile sistematik bir adlandırmaya ihtiyaç duyulmuştur. 1961 yılında Uluslararası Biyokimya Birligi (International Union of Biochemistry, IUB)'nin Enzim Komisyonu (EC), bugün de kullanılan ve enzim sınıflandırma ve isimlendirme kurallarını içeren bir rapor yayınlamıştır. Bu ilk rapor, yayınlandığı zaman süresince bilinen 712 enzimi içerecek şekilde yazılmıştır. 1964 yılında bu rapor degişikliklere uğramış, en son ise 1992 yılında 3196 enzim içerecek şekilde güncellenmiştir. Uluslararası Biyokimya Birliği enzimleri Tablo 2.1'de gösterildiği gibi katalizledikleri tepkimelerin tipine göre 6 gruba ayırmıştır.

Tablo 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması[16]

No.	Sınıf	Katalizlenen tepkime tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi
2	Transferazlar	Grup transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesi ile çift bağların oluşumu
5	İzomerazlar	Molekül içindeki grup transferleri
6	Ligazlar	ATP'nin ayrılması ile C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

Bu gruplarda kendi arasında gruplara ayrılmıştır. Bütün enzimlere katalizledigi tepkimeyi belirten 4 sayılı bir Numara ile sistematik bir isim konulmuştur. Bu numaralandırma E.C (Enzim Komisyonu) harflerinden sonra gelen 4 rakamdan oluşur. İlk sayı sınıfının adını gösterir, ikinci sayı bir alt sınıfını, üçüncü sayı alt-alt sınıfı, dördüncü sayı enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sınıfını belirtir. Örnegin; ATP + D- Glukoz ADP + D – Glukoz 6- Fosfat Tepkmesini ATP: Glukoz fosfotransferaz enzimi katalizlemektedir. Bu enzimin enzim komisyonu numarası ("Enzim Comission" Number) 2.7.1.1'dir[16], [17], [28], [29].

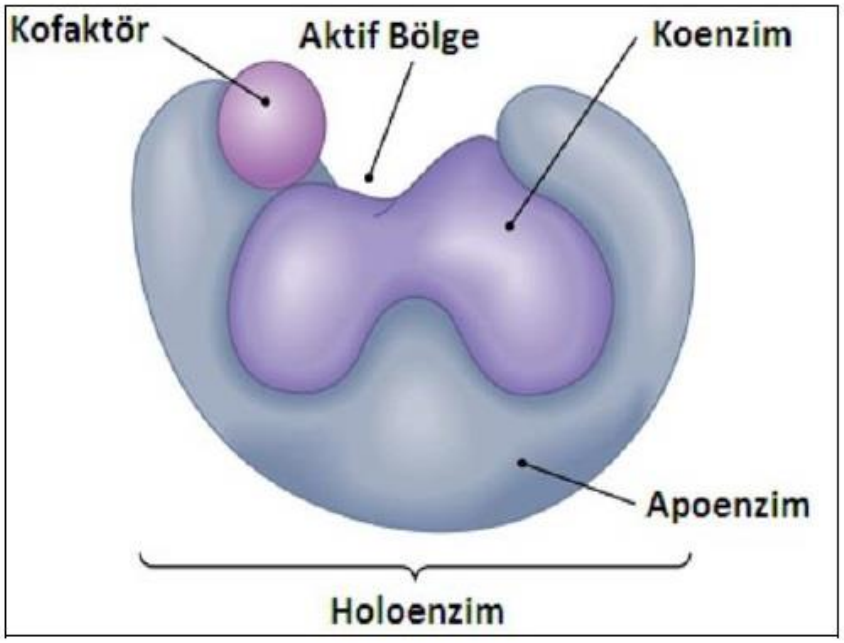
2.3 Enzimlerin Özellikleri

1. Genellikle enzimler 40°C 'nin üstünde ve pH'sı 5'den küçük 9'dan büyük çözeltilerde aktifligini kaybeder. Buzdolabında 2-5°C'de saklayarak aktifliklerini daha uzun süre koruyabiliriz[30].
2. Enzim tepkimeleri tersinir reaksiyonlardır ve moleküllerin yapım ve yıkım reaksiyonlarında görev alırlar.
3. Enzimler girdikleri reaksiyondan degişiklik görmeden çıkarlar ve tekrar tekrar kullanılabilirler.
4. Enzimler tepkimenin yönünü belirlemezler, dengenin oranını belirlerler. Dengenin oranını ise sıcaklık, konsantrasyon, gerekli ısı ve basınç belirler.
5. Genelde yüksek derecede seçicilik özelligine sahiptirler.
6. Az miktarda enzim ile çok kısa zamanda fazla miktarda ürün üretilebilir, kapasiteleri fazladır.
7. Enzimler substrat ile birleşerek enzim-substrat kompleksini oluştururlar ve reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürürler[31].
8. Enzimler takım olarak çalışırlar. Bir enzim etki edecegi reaksiyonun ürünü olabileceği gibi aynı zamanda kendinden sonra gelen enzimde substratı olabilir. Örneğin, amilaz nişastayı maltoza, maltaz enzimi de maltozu glikoza parçalar. Glikozda laktik aside dönüştürülür.
9. Kimyasal katalizörler birden fazla kimyasal reaksiyonda yer alırken, enzimler tek bir tepkimeyi katalizlerler.
10. Bazı faktörler enzim reaksiyonunu olumlu etkiler. Bunlara aktivatör denir. Enzimler belirli bir aktivatör yardımıyla aktifleşirler ve sonrasında da

aktivatörlerini degiştirmezler. Bu sebepten bir hücrede enzim miktarı aktivatör miktarından fazla gelir[32].

2.4 Enzimlerin Yapısı

Enzimler protein yapılı moleküllerdir. Bazı durumlarda proteine, protein yapısında olmayan daha ufak yapılı moleküllerin bağlanması ile oluşan bir yapı gözlenir. Enzimlerin yapısı Şekil 2.2'de gösterilmektedir. Oluşan bu yapıda enzimin protein kısmı 'apoenzim' olarak adlandırılır. Her ikisine birden de 'Haloenzim' adı verilir[33]. Bazı enzimler katalizi protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları protein yapısında olmayan ''kofaktör" denilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Enzimler için kofaktör görevi yapan bazı inorganik elementler Tablo 2.2'de gösterilmektedir. Kofaktörler Fe+2, Mg+2, Mn+2 ve Zn+2 gibi metal iyonu olabildiği gibi, ''koenzim" denilen kompleks organik yada metaloorganik bileşiği olabilir. Koenzimler enzimin protein yapısına kovalent bağlarla bağlanmışlarsa 'Prostetik Grup' adını almaktadır[16], [28]. Enzimin etki ettigi madde veya madde karışımına ise 'substrat' denir. Yani enzimlerin üzerinde etkili oldukları ve ürüne dönüştürebildikleri bileşikler o enzimin substratlarıdır[34]. Grup transferi gerçekleştiren bazı koenzimler Tablo 2.3'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2 Enzimin yapısı[35]

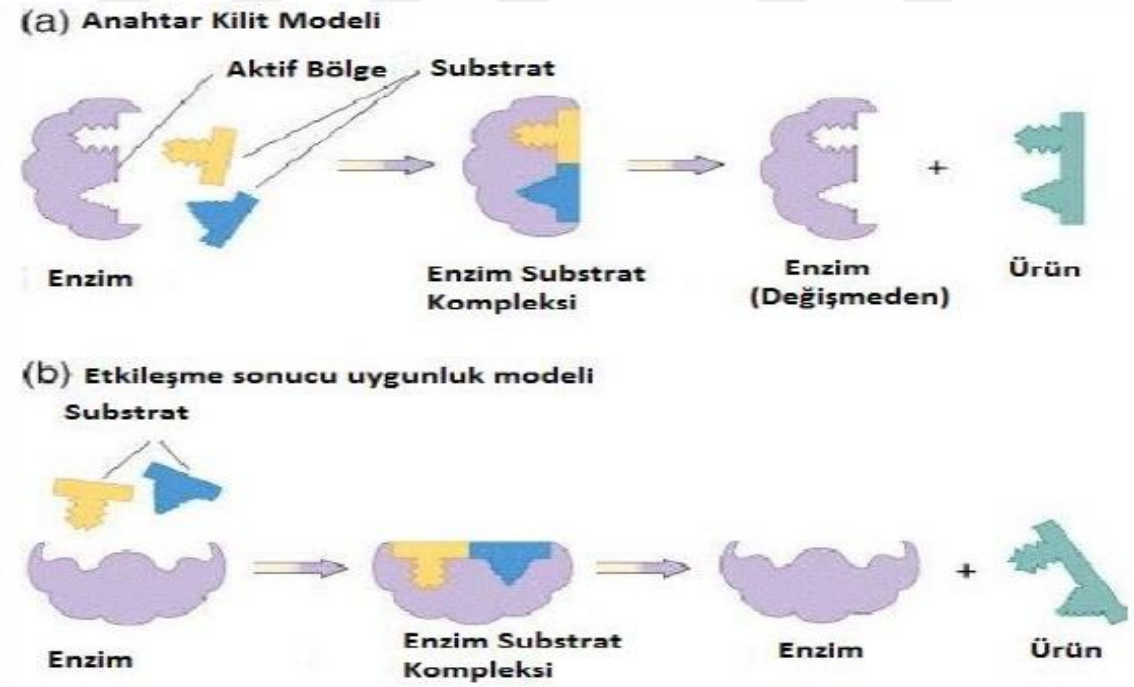
Tablo 2.2 Enzimler için kofaktör görevi yapan bazı inorganik elementler[16]

Metal iyonu	Enzim
Cu^{+2}	Sitokrom oksidaz
Fe^{+2} ve Fe^{+3}	Sitokrom oksidaz, Katalaz ve Peroksidaz
K^{+}	Piruvat kinaz
Mg^{+2}	Hekzokinaz, Glukoz 6-fosfotaz ve Piruvat kinaz
Mn^{+2}	Arjinaz, Ribonükleotid redüktaz
Mo	Dinitrogenaz
Ni^{+2}	Üreaz
Se	Glutatyon peroksidaz
Zn^{+2}	Karbonik anhidraz, Alkol dehidrogenaz

Enzimler genellikle bir tek substratı ürüne dönüştürür. Enzim moleküllerinde aktif merkez denilen özel bir cep ya da yuva bulunur. Aktif merkez substrata uyumlu olan üç-boyutlu bir yüzey oluşturan aminoasit yan zincirleri içerir. Aktif merkez substratı baglayarak bir enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirir. Enzim-substrat kompleksi enzin-ürün kompleksine dönüşür ve sonrada enzim üründen ayrılır[16], [36]. Şekil 2.3'de substrat-enzim etkileşimleri gösterilmiştir.

Tablo 2.3 Grup transferi gerçekleştiren bazı koenzimler[16], [17]

Koenzim	Taşınılan Birim
Biyotin	CO_2
Koenzim A	Açil grupları
Deoksi adenozil kobalamin	H atomları ve Alkil grupları
Flavin adenine dinükleotit	Hidrojen atomları (elektronlar)
Nikotinamid adenine dinükleotit	Hidrojen atomları (elektronlar)
Lipoamid	Açil grupları
Piridoksal fosfat	Amino grupları
Tiamin pirofosfat	Aldehit grupları



Şekil 2.3 Substrat-enzim etkileşimleri: a) Anahtar-kilit modeli, b) Etkileşme sonucu uygunluk modeli [37]

Enzimler spesifik aktiviteye sahip proteinler oldukları için, enzimin bu spesifitesi substratla geçici olarak enzim-substrat kompleksini kurmaya yarar. Bu geçici kompleks sayesinde ürünler oluşur, daha sonra enzim substrattan ayrılarak tekrar eski haline geri döner. Substratın enzimin üzerinde baglandığı aktif bölgeye ise katalitik bölge denir. Substratın enzime bağlanması anahtarın kilide uyması gibi bir uyum gösterir. Enzimler substratlarına karşı çok iyi spesifite gösterdikleri için kendine özgü ve uyumlu tek bir substratla bağlanarak tek bir ürün oluştururlar[38].

Aktivite tayinlerinde bazen oluşan ürün miktarı bazen de kaybolan substrat miktarı ölçülmektedir. Enzimlerin aktivite ölçümünde hassas ve pratik bir yöntem seçilmelidir. Uygun koşullarda ve bir dakikada bir mikromol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı bir ünite olarak adlandırılır. Enzim ünitesi U ya da UI şeklinde gösterilir. Yaygın olarak kullanılan bir diger birim ise spesifik aktivitedir. Spesifik aktivite bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısıdır ve ünite/mg protein olarak gösterilir[39].

2.5 Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

1. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi
2. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi
3. Sıcaklığın Etkisi
4. İnhibitör Etkisi
5. pH Etkisi

2.5.1 Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Enzimin substrata doymuş olduğu koşullarda enzim reaksiyon hızı ile enzim konsantrasyonu birbiriyle dogru orantılıdır. Enzimin konsantrasyonu arttıkça enzim reaksiyonunun hızı da ona bağlı olarak artar. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamda ne kadar enzim molekülü bulunuyorsa, reaksiyon da bu moleküllere bağlı olarak hızlı gerçekleşecektir[16]. Tepkimenin başlangıç hızı yeterli miktarda ürün oluşmadan evvel ki halidir. Enzim tepkimesinin başlangıç hızı, enzim miktarı ile dogru orantılıdır. Enzim miktarı tepkimenin hızını degil, yalnızca başlangıç hızına

etki eder[40]. Enzim konsantrasyonu yükselirken substrat konsantrasyonu sabit kalırsa, substratın tamamı ES kompleksine dönüşene kadar tepkimenin hızı artar. Substrat tükendiği anda reaksiyon hızında ki artış durur ve sabitlenir[41].

2.5.2 Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

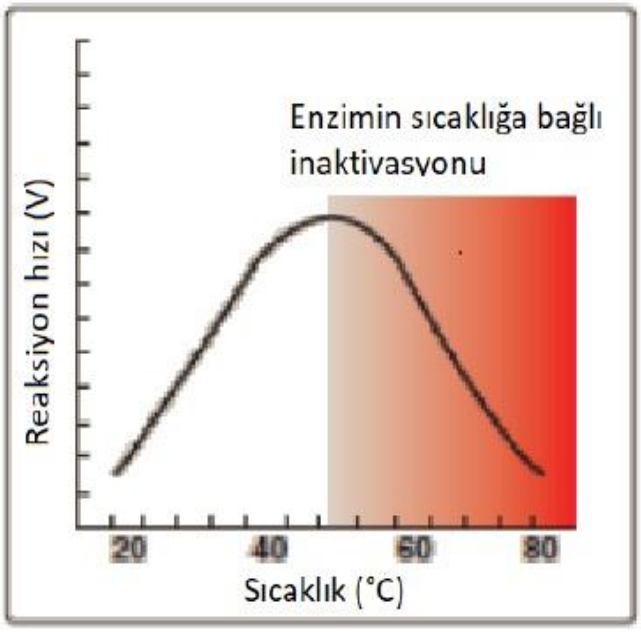
Sabit enzim konsantrasyonun da, enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat kosantrasyonu ile artar. Tepkime hızı en üst noktaya eriştikten sonra sabit kalır[16].

2.5.3 Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın etkisi enzimlerde iki farklı şekilde görülür. Başlangıçta enzimatik reaksiyonun hızı sıcaklık arttıkça artar. Fakat protein yapılı olan enzimler belirli bir ısıya geldikten sonra denatüre olurlar ve etkilerini kaybederler. Böylece hızlarında düşüş gözlemlenir. Enzimlerin aktivitelerinin maksimumum olduğu bu sıcaklığa da optimum sıcaklık adı verilir[16], [32]. 0°C ile 50°C' ye kadar olan sıcaklıklarda enzim reaksiyon hızı artar, 50°C-90°C'ye yükseldiğinde ise protein denatüre olur. Böylece enzim etkinliğini kaybeder.

Düşük sıcaklıklarda enzim aktivitesi çok yavaş gerçekleşir. Bu yüzden donmuş gıdalar ortalama −10°C ile −20°C arasında depolanır. Sıcaklık arttıkça enzim aktivitesi de artar ve 10°C'lik her artışta tepkime hızı iki katına çıkar. Bu etki sıcaklık sabiti (Q10) olarak adlandırılır[17]. Sıcaklık artışıyla beraber artan reaksiyon hızında ki bu artışın sebebi kinetik enerjinin artışından dolayı kaynaklanır. Kinetik enerjide ki bu artış enzim yapısındaki bağları yok edebilecek enerji bariyerini geçer. Optimum sıcaklığı aştıktan sonra tepkime hızı düşer.

Enzimlerin kararlı durumda bulunduğu sıcaklık, yer aldığı hücrenin sıcaklığına bağlıdır. Örneğin, vücut sıcaklığı 36 – 37°C olan bir insanda bulunan enzimlerin kararlı durumu 45–55°C'ye kadar sürer. Sıcak sularda yaşayan bakterilerde bulunan enzimlerde ise 70°C ve civarındaki sıcaklıklarda optimum sıcaklıga ulaşmış olurlar[40], [42]–[44]. Reaksiyon hızının sıcaklık ile değişimi Şekil 2.4'de gösterilmektedir.



Şekil 2.4 Reaksiyon hızının sıcaklık ile değişimi[45]

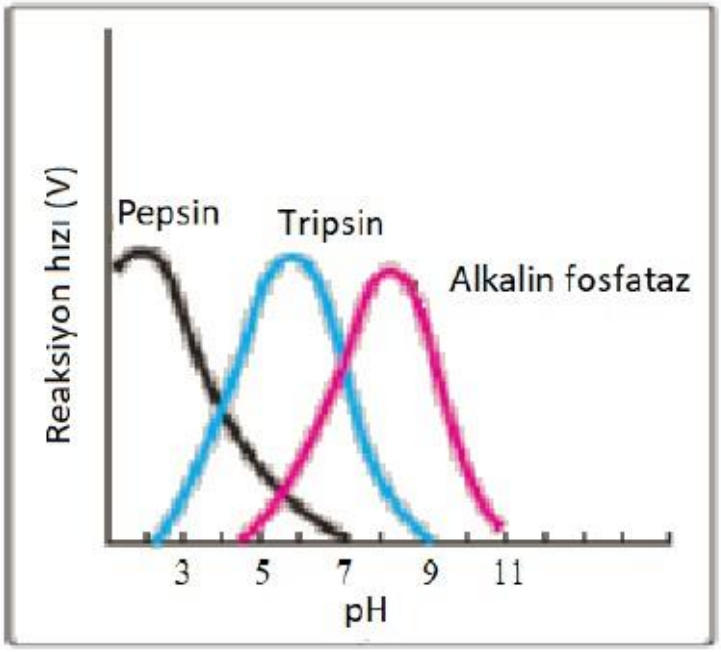
2.5.4 İnhibitör Etkisi

Enzimlerin aktivitelerinin bazı bileşikler aracılığı ile in vivo ve in vitro olarak azaltılması veya yok edilmesi işlemine inhibisyon denilir. Bu olaya neden olan bileşiklere de inhibitör adı verilir. Bu inhibitörler de enzim-substrat oluşumunun normal bir şekilde gerçekleşmesine engel olurlar. Metal iyonlarının bir çoğu enzim aktivasyonunda yer alsa da, bazı ürünler bulunduğu ortamın iyonik yapısını ve pH değerlerini değiştirerek enzimlerin aktivasyonunu inhibe ederler. Biyolojik sistemlerde enzimatik aktivitenin inhibisyonu tek başına bir kontrol sistemi oluşturur. Birçok zehirli bileşik ve ilaç işlevlerini bu yol ile gerçekleştirmektedir[17], [46]–[48].

2.5.5 pH Etkisi

pH derecesi ortamın asitlik ve bazlık derecesini belirtir ve 0-14 arasında degişir. Enzimlerin aktiviteleri H+ iyonu konsantrasyonu veya pH derişimlerinden etkilenir. Her enzimin optimum çalıştığı bir pH aralığı vardır. Bu noktaya optimum pH denilmektedir. Enzim aktivitesi, bu noktadan düşük veya yüksek pH'larda azalır[16]. Genellikle enzimlerin optimum pH degeri 6-8 arasında değişkenlik göstermesine rağmen bazı istisnai durumlarda mevcuttur. Örneğin, midede

bulunan pepsin enzimi en iyi pH 2'de çalışır. Bu ortamda birçok enzim denatüre olurken pepsin enziminin aktif konformasyonu mide ortamının asitliğine uyum sağlamıştır. Bu duruma karşılık ince bağırsakta bulunan tripsin enzimi en iyi pH 8'de çalışır[42]. Reaksiyon hızı ile pH değişimi Şekil 2.5'de gösterilmektedir.



Şekil 2.5 Reaksiyon hızı ile pH değişimi[45]

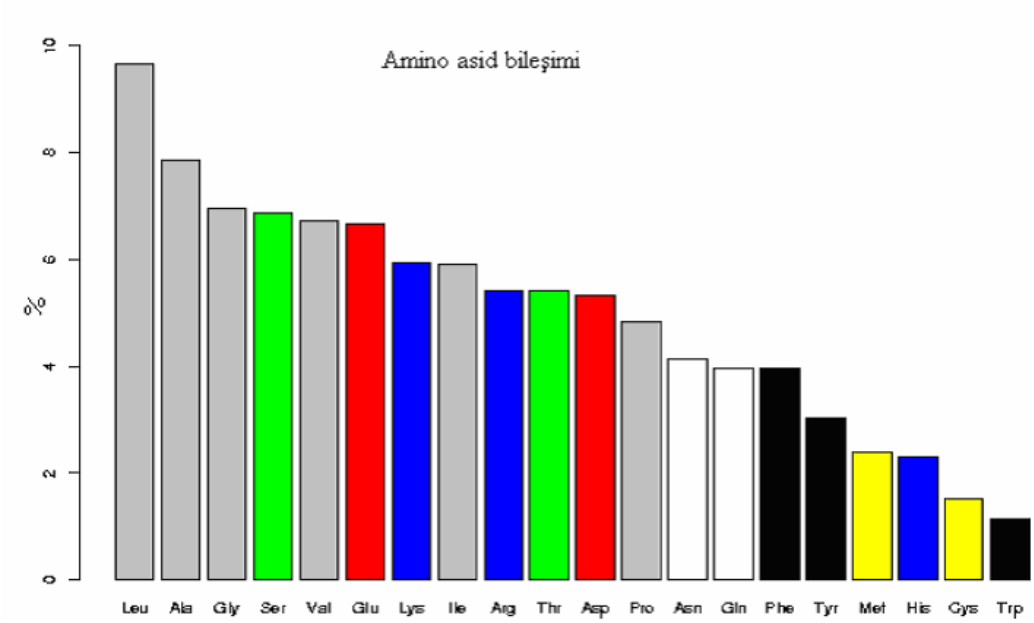
2.6 Amilaz Enzimi

Amilaz enzimi, nişasta endüstrisinde, fırıncılıkta, analitik kimyada, deterjanlarda, tekstilde, ilaç ve kâgıt endüstrilerinde büyük uygulamalarla enzim satışlarının yüksek pazar payını elinde tutan en önemli endüstriyel enzimlerden biridir[49]. Amilaz enzimleri bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi farklı kaynaklardan elde edilir[50]. Genellikle mikrobiyal kaynaklı enzimler endüstride tercih edilir[51]. Bunun sebebi mikrobiyal kaynaklı amilazların daha kararlı, daha uygun fiyatlı, çok yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir[52]. Günümüzde en önemli endüstriyel amilaz kaynakları Bacillus, Aspergillus ve Rhizopus türleridir[53]. Amilaz enzimi, nişasta molekülündeki glikozid bağlarını hidroliz yoluyla parçalar. Amilazlar, α-amilazlar ve β-amilazlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. α-amilazlar nişastada α-1,4 glikozid bağlarını kırarken, β-amilazlar nişastanın indirgenmeyen uçlarındaki α-1,

4 bağlarını kırarlar[49]. Önceden sadece amilopektin ve amilaz moleküllerinin α-1, 4-glukozidik bağlarını kıran endo-amilaz enzimler için amilaz denilirdi. Günümüzde ise dallanma göstermeyen amilazlar, endo-amilazlar, ekzo-amilazlar olmak üzere amilaz enzimi 3 gruba ayrılmaktadır[54].

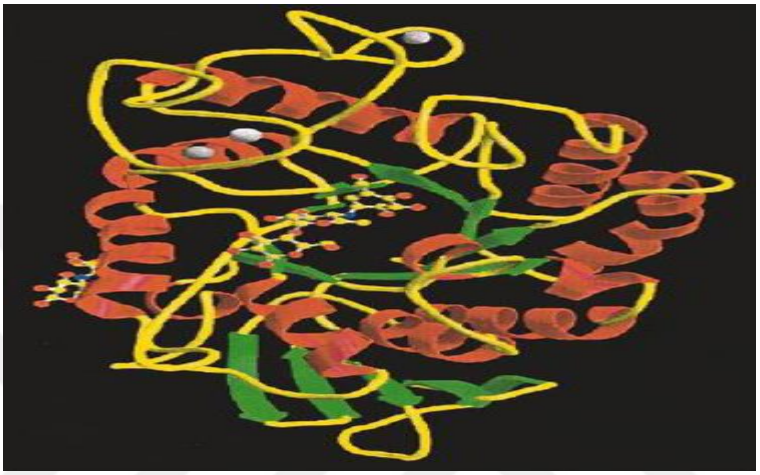
2.6.1 α-Amilaz

α-Amilazlar mikroorganizmaların, bitkilerin ve hayvanların karbonhidrat metabolizmasında merkezi bir rol oynarlar. Ticari olarak kullanılan ilk enzimdir[55]. Ayrıca, gıda ve nişasta işleme endüstrisinde yaygın olarak kullanılırlar ve proteazlardan sonra modern biyoteknolojide en çok kullanılan enzimler haline gelirler[56]. α-Amilazlar (1,4-α-D-glukan glukanohidrolaz; EC 3.2.1.1) endoenzim türünde enzimlerdir. α-amilaz enzimi nişasta molekülünün α-1, 4 bağlarını kırarak polimeri makro molekül olan dekstrin ve maltoza dönüştürür[57]. α-Amilaz enziminin bir çoğu saf kristal şeklinde üretilebilmektedir[58]. α-amilaz enzimi 294 tane su molekülü ve 478 adet amino asit (9 adet triptofan) içermektedir[59]. Ayrıca, α-amilazlar 10 ile 210 kDa arası degişen molekül ağırlıklarına sahiptirler. Mikrobiyal kaynaklı α-amilazların molekül ağırlıkları ise 40-70 kDa arasında değişiklik gösterir[49]. α-Amilazın amino asit bileşimi Şekil 2.6'da gösterilmektedir.



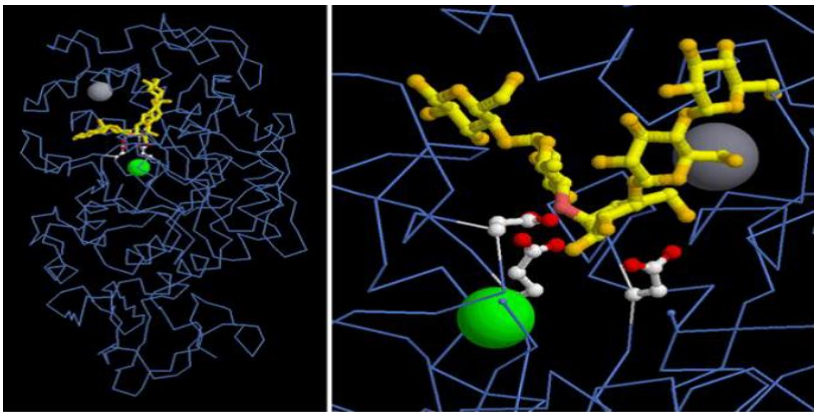
Şekil 2.6 α-Amilazın amino asit bileşimi [60]

Nişasta molekülünün iç kısımlarında bakteriyel α-amilazların hidroliz yapabilmelerinin temel sebebi anomerik karbon atomunun α-konfigürasyonundan kaynaklanmaktadır ve yüksek sıcaklığa dayanıklı enzimlerdir. α-Amilazlar termostabil enzimlerdir. Bu termostabilite özelliği, iyonik etkileşimlerin artmasından, yüzey alanının azalmasından ve iç kısmındaki paketlenme sağlayıcı etkileşimlerin artmasından kaynaklanabilir[59], [61]. α-amilaz molekülünün şematik diyagramı Şekil 2.7'de gösterilmektedir.



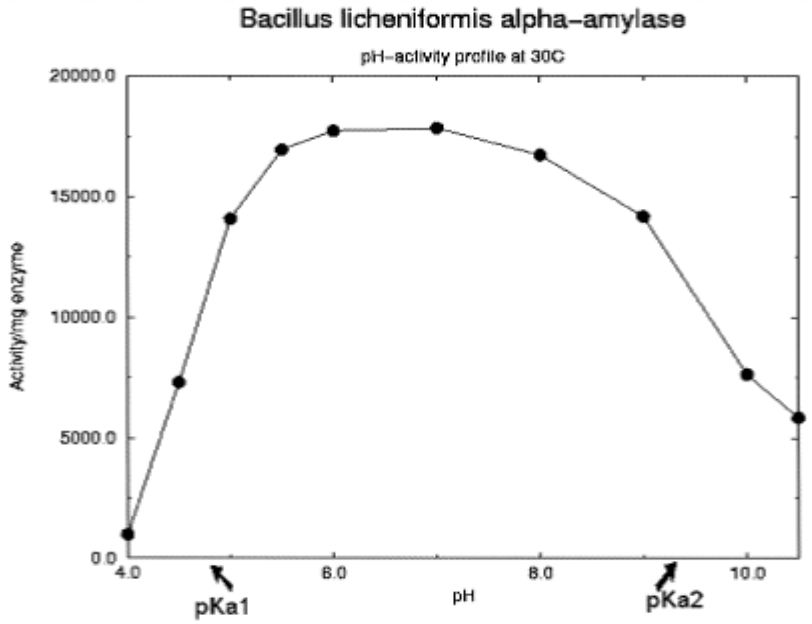
Şekil 2.7 α-Amilaz molekülünün şematik diyagramı[60]

Tekstil endüstrisinde, tutkal ve yiyecek üretiminde, nişastanın sıvılaştırılmasında termostabil özellik gösteren α-amilaz enzimi kullanılır. α-Amilazlar metaloenzim türündedirler ve en az bir tane Ca^{+2} içerirler. Diğer iyonlardan daha kuvvetli affiniteye sahip olan kalsiyum iyonu, α-amilazların aktivite gösterebilmeleri için çok önemlidir. Böylece bu enzimler Ca^{+2} iyonu bağlayabilmektedir. Bu iyon çalışmalar sonucunda enzimdeki protein yapının yakınında bulunmuştur. Buna ek olarak reaksiyonun oluşmasına yardım eden Cl^{-} iyonunu bağlama özelliğine de sahiptirler. Ancak bu iyon kalsiyum iyonundan farklı olarak aktif bölgenin altından bağlanır. α-Amilazın aktif bölgesi Şekil 2.8'de gösterilmektedir. Ca+2 iyonları, uç pH ve sıcaklık koşullarında α-amilazların dayanıklılığını tripsin ve pepsin gibi proteazlara karşı arttırırlar. Diğer bir deyişle enzimin stabilitesini arttırılar. Enzimin yapısında bulunan kalsiyum iyonları, diyaliz yöntemiyle enzimden uzaklaştırılabilir[49], [62]–[67]. α-Amilaz enzimi bazı ağır metaller tarafından inhibe olabilirler. Bunlara örnek olarak kurşun, bakır ve civa ağır metalleri verilebilir[68], [69].



Şekil 2.8 α-Amilazın aktif bölgesi[70] (Üçlü asidik grup (kırmızı), beş şeker biriminden oluşan zincir (sarı ve turuncu), kalsiyum iyonu (gri küre), klor iyonu (yeşil küre))

Enzimlerin kaynağına göre optimum pH değerleri değişmektedir. Çoğunlukla α-amilazların optimum pH degerleri 4-7 arasında değişmektedir. Substrat bağlanma alanları olan 5 alt üniteye sahip α-amilazların bu bölgelerine substratın yerleşme katalitik aktivitesinin maksimum pH'ı nötralden daha çok asidiktir. α-amilazların optimum sıcaklığı 20–40°C arasındadır. 50°C' nin üzerinde saflaştırılmış α-amilazlar aktivitelerini kaybederler. Substrat ve kalsiyum tesiriyle enzimin inaktivasyonu azaltılabilir[66], [71].



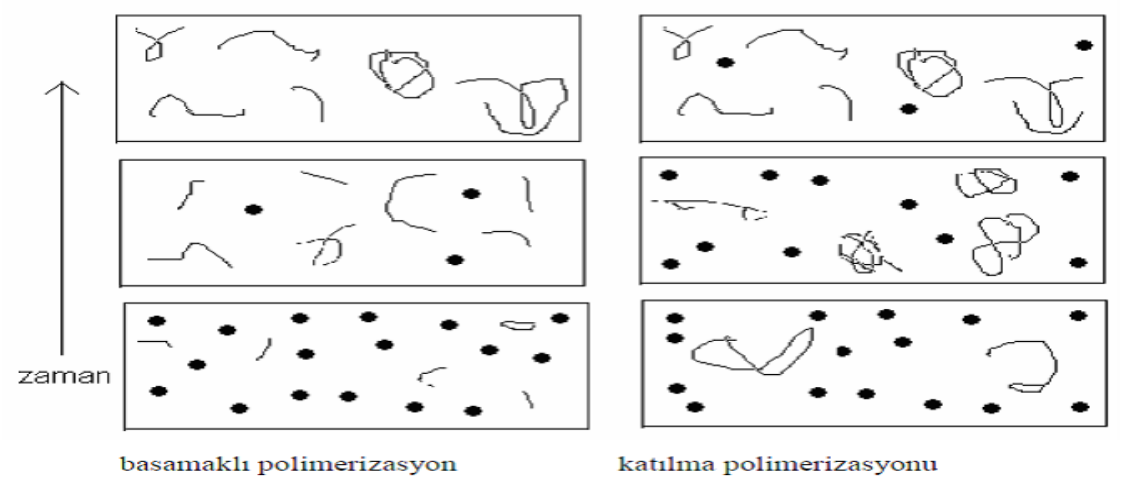
Şekil 2.9 Bacillus licheniformis K-amilazın pH aktivite probu ile yaklaşık pKa1 ve pKa2 değerlerini gösterir. Etkinlik isteğe bağlı olarak gösterilir.[72]

3
POLİMERLER

Polimerler, yüksek molekül kütlesine sahip, aynı ya da farklı çok sayıda monomerlerden oluşan yapılardır. Yapılarında çift bağ, üçlü bağ, iki veya daha fazla fonksiyonel grup bulundurabilen monomerler, kendisinden daha büyük molekül kütlesine sahip bileşikler oluşturmak amacıyla kendisiyle ve ya farklı bileşiklerle kimyasal bağ kuran küçük moleküllerdir. Polimerizasyon yöntemlerinin üstünlük ve eksiklik açısından karşılaştırılması Tablo 3.2'de gösterilmektedir. Kimyasal tepkimelerle monomerden polimer oluşumuna polimerleşme denir. Bu reaksiyonlara ise polimerizasyon reaksiyonları denir[73]–[75]. Polimerizasyon reaksiyonları işleyişleri mekanizmaları bakımından iki sınıfa ayrılır. Bunlar katılma polimerizasyonu ve basamaklı polimerizasyon olarak adlandırılır. Polimerizasyon yöntemlerinin üstünlük ve eksiklik açısından karşılaştırılması Tablo 3.1'de gösterilmektedir. Katılma polimerizasyonu yöntemi ile üretilen polimerlere katılma polimerleri denirken basamaklı polimerizasyon yöntemi ile üretilenlere de basamaklı polimer denir[76]. Katılma polimerizasyonları iyonik zincir polimerizasyonu ve radikalik zincir polimerizasyonu olarak iki sınıfa ayrılır. Katılma polimerizasyon çeşitlerinin şekilleri Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Radikalik polimerizasyonda zincir büyümesini sağlayan aktif merkezler radikalik karakterdedir. İyonik polimerizasyonda ise zincir büyümesini sağlayan bu aktif merkezler iyonik karakterdedir ve aktif merkezin karakterlerine göre anyonik zincir polimerizasyonu ve katyonik zincir polimerizasyonu olarak sınıflandırılır[77]. Basamaklı polimerizasyon ve katılma polimerizasyonunun herhangi bir aşamasında ortamda bulunan moleküllerin büyüklükleri açısından karşılaştırılması Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1 Katılma polimerizasyon çeşitlerinin şekilleri [77]



Şekil 3.2 Basamaklı polimerizasyon ve katılma polimerizasyonunun herhangi bir aşamasında ortamda bulunan moleküllerin büyüklükleri açısından karşılaştırılması [76], [78]

Tablo 3.1 Polimerizasyon yöntemlerinin üstünlük ve eksiklik açısından karşılaştırılması [77]

Polimerizasyon Yöntemi	Üstünlük	Eksiklik
Basamaklı	Uygulanabileceği monomer ve çıkış maddesi sayısı fazla	Düşük molekül ağırlıklı ürün, molekül ağırlığı dağılımı geniş, stereokimyasal kontrol söz konusu değil, çoğu kez ısı gerekli, tepkime hızı yavaş.
İyonik Serbest Radikalik	Uygulanabileceği monomer sayısı fazla	Stereokimyasal kontrol söz konusu değil, ısı veya radyasyon gerekli olabilir, seçiciliği zayıf.
Katyonik	Molekül ağırlığı kontrolü yapılabilir, uygulanabileceği monomer sayısı sınırlı.	Olefinik monomerlerle sınırlı, neme duyarlı, düşük sıcaklıklar gerekli olabilir.

Tablo 3.2 Polimerizasyon yöntemlerinin üstünlük ve eksiklik açısından karşılaştırılması [77] (Devamı)

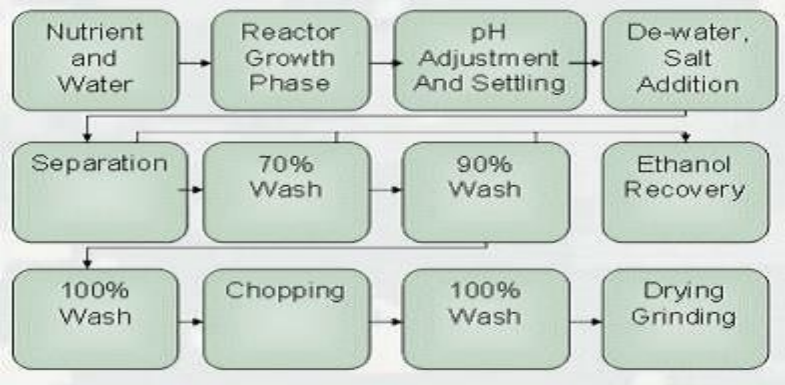
Anyonik	Molekül ağırlığı dağılımı dar, bazen stereokimyasal kontrol olası, blok kopolimer sentezine uygun.	Uygulanabileceği monomer sayısı sınırlı, düşük sıcaklıklar gerekli.
Koordinasyon	Yüksek seçicilik, çok iyi stereokimyasal kontrol, oda sıcaklığında gerçekleşir.	Olefinlere uygulanabilir, vinil monomerleri için yetersiz, molekül ağırlığı çok yüksek değil.

Tablo 3.3 Polimerlerin sınıflandırılması[79]

Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler	Anorganik Polimerler
Selüloz	Stiren Esaslı Polimer	Kil
Nişasta	Akrilamit Esaslı Polimer	Cam
Aljinat	Naylon	Silikajel
Karragenan	Vinil ve Allil Polimerler	Ponza Taşı
Kollagen	Akrilat Esaslı Polimerler	Aktif Karbon
Jelatin	İyon Değiştirici Reçineler	Metaller
Albumin	Maleik Anhidrit Polimerleri	Metal Oksitler
İpek	-	Bentonit

3.1 Biyopolimerler

Biyopolimerler, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen, toksik yapıda olmayan ve biyolojik açıdan parçalanma özelliğine sahip polimerlerdir. Biyopolimerler bakteri ve yosunlardaki karmaşık biyosentez işlemleriyle üretilir. Biyopolimer üretim süreci Şekil 3.3'de gösterilmektedir. Yaşayan organizmalar tarafından meydana getirilmiş olan biyopolimerler, ASTM'nın yaptığı tanıma göre: "bakteri, alg ve fungus gibi mikroorganizmaların doğal faaliyetleri sonucu tamamen yıkılabilen, doğal maddelerdir"[80], [81].



Şekil 3.3 Biyopolimer üretim sürecini gösteren bir şema[82]

Özellikleri üretildikleri hammaddelerin cinsine bağı olan biyopolimerler, aynı zamanda üretildikleri ortamların fizyolojik koşullarında yapılacak olan kimyasal modifikasyonlardan da etkilenmektedir. Bu durum biyopolimerlerin bazı özellikleri ve kullanım alanları üzerinde etkili olmaktadır. Nem, su dirençliliği, saydamlık, yüksek ısıya karşı dirençlilik gibi karakteristik özellikleri, bu materyallerin nasıl bir uygulamada yani hangi endüstriyel proseste kullanılabileceğini belirlemektedir[83],[84]. Biyopolimerler ile polimerler arasında temel fark yapılarından dolayıdır. Her iki yapıda birbirine bağlı monomerlerden meydana gelmiş olmasına rağmen biyopolimerin yapısı kendine özeldir. Biyopolimerlerin diğer polimerlere göre en büyük avantajı yenilebilir olmaları ve bol miktarda bulunmaları sebebiyle düşük maliyetle elde edilmeleridir[81], [85]. Proteinlerin yapıtaşlarının dizilme sırası birincil yapı olarak adlandırılırken, biyopolimerler kendiliğinden karakteristik olarak katlanıp biyolojik fonksiyonlarını kazanırlar. Aynı çeşit tüm biyopolimerler tamamıyla aynıdır. Bunun sebebi genellikle biyopolimerlerin sentezi in vivo sistem üzerinde belli kalıp

üzerinden yürüdüğünden hepsi benzer dizide olurlar. Yani; benzer sayıda monomer içerirler ve ağırlıkları aynıdır. Bu olaya biyopolimerlerin tekil-dağılım (monodispersity) özelliği denir[81], [86], [87]. Biyopolimerlerin metaller, yüzey partikülleri ve diğer polimerler ile kimyasal reaksiyonlara girme eğilimleri, tekrar eden bir düzene sahip olmalarından kaynaklanmaktadır[85]. Biyopolimerler, mikroorganizmalardan, bitkilerden veya hayvanlardan ya da aminoasit gibi materyallerden sentezlenmiş kimyasallardan oluşan polimerler ile aynı karakteristik özellikleri gösterir. Bu yüzden biyopolimerlerin farklı fiziksel özellik gösteren farklı türlerde birçok çeşidi vardır. Bu polimerleri kimyasal yapılarına göre sekiz ana gruba ayırabiliriz:

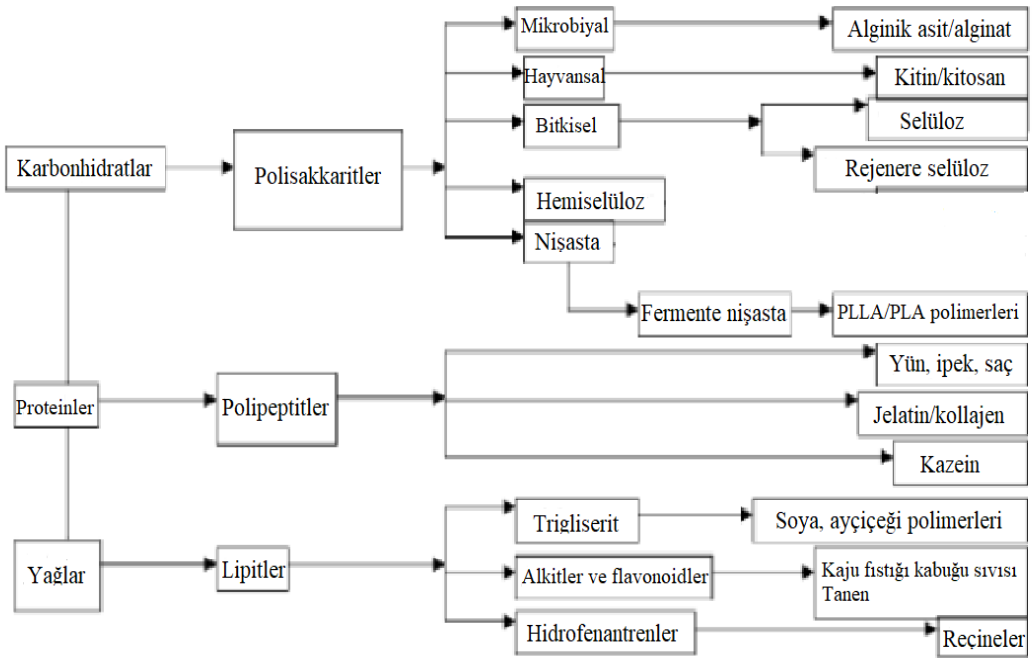
- DNA, RNA gibi **nükleik asitler**,
- Protein ve poliaminoasit gibi **poliamitler**,
- Selüloz, nişasta, zantan gibi **polisakkaritler**,
- Kitin, polimalik asit, polihidroksi alkanoik asit gibi organik **polioksiesterler**,
- **Politioesterler**,
- Polifosfat gibi inorganik **poliesterler**,
- Doğal kauçuk, sumatra zamkı gibi **poliizoprenoitler**,
- Linyin ve humik asit gibi **polifenollerdir**[81], [88].

Biyopolimerler, fizyolojik aktiviteleri temel alınarak Tablo 3.3'deki gibi üç temel grup altında sınıflandırılmışlardır.

Tablo 3.4 Biyopolimerlerin fizyolojik olarak sınıflandırılması[89]

Polimer	Yapısal Tanım	Ticari Uygulama Alanları
Polisakkaritler	Monosakkaritlerin poliasetal ve/veya poliketal organizasyonları	Gıda Maddeleri, Fiberik Yapı, Yapıştırıcı Kaplama, Yapısal Materyaller
Proteinler	α-aminoasitlerin poliamidleri	Gıda maddeleri, fiberik yapı, tıbbi ajan
Polinükleotidler	Nükleositlerin ve fosforik asitin poliesterleri	Genetik mühendisliği (Tıbbi ajan, Tarım kimyasalları)

Doğada en çok bulunan ve bitkisel kaynaklarda mevcut olan polisakkarit yapıdaki biyopolimerler nişasta ve selülozdur. Ancak polisakkaritik polimerler bitkiler dışında farklı miktarlarda farklı canlılarda da bulunurlar. Yapılan araştırmalarda hayvan ve mikroorganizma yapısında da fazla oranda polisakkaritik bazda polimerik yapılara rastlanmıştır. Buna örnek olarak, kabuklu hayvanların kabuğunda, böceklerin dış iskeletinde ve ökaryotik mikroorganizma sınıfında yer alan fungusların hücre duvarında bulunan kitin ve kitosan polimeri verilebilir[90]. Doğal polimerlerin sınıflandırılması Şekil 3.4'de gösterilmektedir.



Şekil 3.4 Doğal polimerlerin sınıflandırılması[70]

3.2 Biyopolimerlerin Çevresel Etkileri

Biyopolimerlerin negatif çevresel etkileri, yaşam döngüsünün başına ve sonuna bakıldığında çok düşüktür. Biyopolimerler fosil olmayan maddelerden oluşarak, biyolojik olarak dekompozisyona uğrayabilmelidir. Yani, mikroorganizmalar tarafından tüketilerek toprağa geri dönemeli ve süreci tekrar başlatabilmelidir. Böylece çevre dostu olan biyopolimerler doğada CO_2, H_2O ve biyokütleye dönüşebilir ve gübre olarak kullanılabilirler[70], [91]. Biyopolimerler, süresiz yetiştirilebilir tarımsal bitkilerden meydana gelen maddelerden sentezlendiklerinden dolayı yenilenebilir ve sürdürülebilir polimerlerdir. Bu

nedenle biyopolimerlerin kullanımı sürdürülebilir bir sanayi oluşturur. Bunların aksine, petrokimyadan türetilen polimerler için besleme stokları sonunda yok olacaktır[92].

3.3 Biyopolimer Çeşitleri

Tüm canlı organizmaların temel yapı üniteleri kabul edilen biyopolimerlerin en çok kullanılan ve tanınanları, insanlar ve hayvanların ana besin kaynağı olan karbonhidratlar, vücudun temel yapı taşı olan proteinler ve nükleik asitlerdir (DNA ve RNA). Çeşitli Biyopolimerler, monomerleri ve işlevleri Tablo 3.4'de gösterilmektedir. Son yıllarda, PGA (poliglikolik asit), PLA (polilaktik asit) ve PLGA (polilaktik koglikolik asit) gibi doğal yollarla oluşan monomerler ile üretilen polimerlerin de katılmasıyla biyopolimer çeşitleri artmıştır[93].

Tablo 3.5 Çeşitli biyopolimerler, monomerleri ve işlevleri[93]

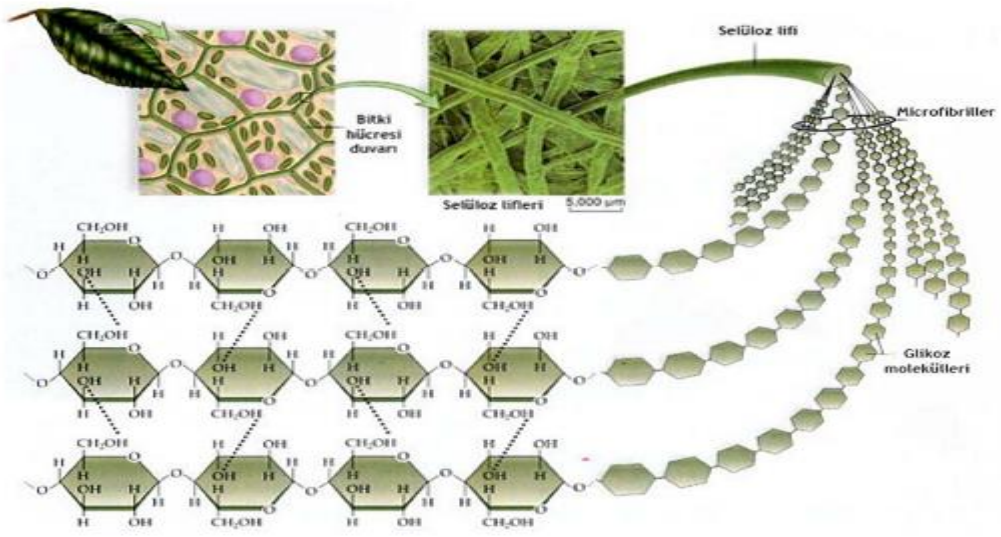
Polimerler	Monomer	İşlevleri
Nükleik Asitler (DNA ve RNA)	Nükleotid	Tüm organizmalarda bulunan genetic bilgi taşıyıcıları
Proteinler	Aminoasit	Biyolojik kataliz(enzimler), büyüme etkileri, algılayıcı, yapı malzemesi (yün, deri, ipek, saç, bağ dokuları), hormonlar(insulin)
Polisakkaritler (Karbonhidratlar)	Şeker	Bitki hücrelerinde ve diğer bazı organizmalarda yapı malzemesi(selüloz), enerji depo malzemeleri (nişasta, glikojen), moleküler tanımlama (kan türleri), bakteriyel salgılar
Polihidrosialkonatlar	Yağ Asitleri	Mikrobiyolojik enerji depolama malzemeleri

Tablo 3.6 Çeşitli biyopolimerler, monomerleri ve işlevleri[93] (Devamı)

Polifenoller	Fenoller	Bitkilerde yapı malzemeleri(lignin), bitki savunma sistemleri(tanen)
Polifosfatlar	Fosfatlar	İnorganik enerji deposu
Polisülfatlar	Sülfatlar	İnorganik enerji deposu

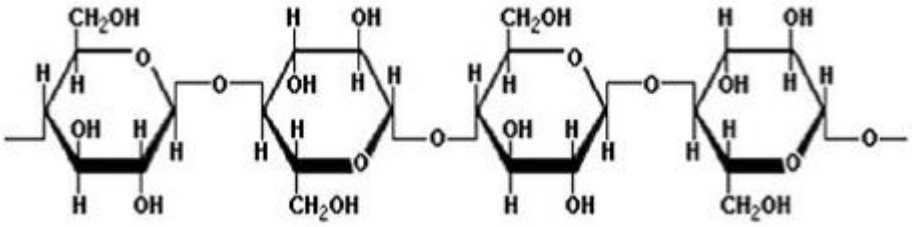
3.3.1 Selüloz

Dünyada en yaygın bulunan biyopolimer ve organik bileşik selülozdur ve yeryüzü materyalinin %33'ünü oluşturur. Senelik yenilenebilir kaynaklardan elde edilen toplam selüloz miktarı 10^{11}-10^{12}ton arasındadır. Dünyadaki toplam selüloz miktarı ise 7.10^{11} tondur. Bitki hücresi duvarlarının temel yapısını meydana getiren bileşik olan ve bitkiye esneklik sağlayan selüloz, İngilizce'de "hücrelerden yapılmış" anlamına gelmektedir. Epeyce kompleks bir yapıya sahip olan bitki hücresi duvarları selüloz dışında hemiselloz, ksiloglukanlar, pektin ve protein molekülleride içermektedir. Bitki hücresi içerisindeki selülozun görünümü Şekil 3.5'de gösterilmektedir. Bitkiye enerji verip gelişmesini ve kendisini onarmasına yardım eden besi suyundaki şekerin bir kısmı da selüloza dönüşür. Bu dönüşen selüloz bitkinin bitkinin hasar görmüş kısımlarının onarımında ve yeni oluşan hücrelerin çeperlerinde kullanılmaktadır[94]–[98].



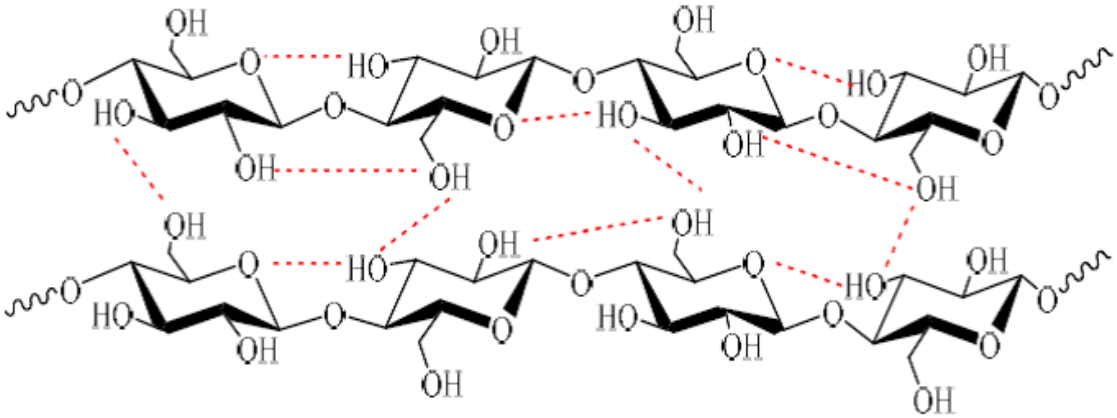
Şekil 3.5 Bitki hücresi içerisindeki selülozun görünümü[98]

Anhidroglukoz birimlerinin uç uca eklenmesiyle $(C_6H_{10}O_5)_n$ molekül formülüne sahip selüloz oluşmaktadır. Bu birimler, her iki birimden birisi diğerine göre 180 derecelik bir dönüşle tutunacak şekilde birbirilerine 1, 4-β-glukozidik bağlarla bağlanmıştır. Polimerizasyon derecesi (DP) bu birimlerin miktarını göstermektedir[97]. Selüloz molekül yapısı Şekil 3.6'da gösterilmektedir.



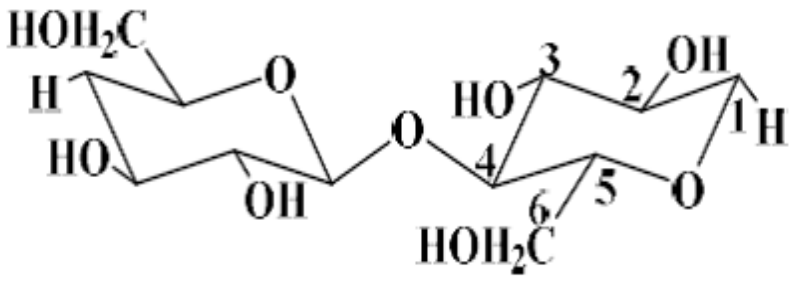
Şekil 3.6 Selüloz molekül yapısı[70]

Doğrusal bir molekül olan selüloz, her monomerinde üç adet hidroksil grubu bulundurur. Bu hidroksil grupları oksitlenmeye karşı hassas olup, diğer selülozlardaki hidroksil gruplarıyla hidrojen bağı kurabilme özelliğine sahiptir. Selüloza hidrofilik özelliği hidrojen bağları kazandırır. Selüloz biyopolimerinde molekül içi hidrojen bağlarıda bulunmaktadır. Molekül içi hidrojen bağları, selülozdaki tek zincir konformasyonu ile ilgilidir. Selülozdaki moleküller arası hidrojen bağları kafes düzlem şeklindedir ve OH grupları ile C-6 ve C-3 komşu karbonları arasında bulunur[99]–[101]. Selülozdaki hidrojen bağları Şekil 3.7'de gösterilmektedir.



Şekil 3.7 Selülozdaki hidrojen bağları[102]

Sellobioz, selülozun en ufak alt ünitesi olup bir disakkarittir ve iki glikoz molekülünün bir araya gelmesiye oluşmaktadır. Sellobiozlar bir araya gelerek bazik bir selüloz polimeri oluşturur. 8.000-12.000 glukoz monomerinden oluşan doğal selüloz molekülü, kendi üzerine bir çok kez katlanmış ipliksi ve uzun bir misel yapısında bulunmaktadır[91], [96], [97], [103]. Sellobioz kimyasal yapısı Şekil 3.8'de gösterilmektedir.

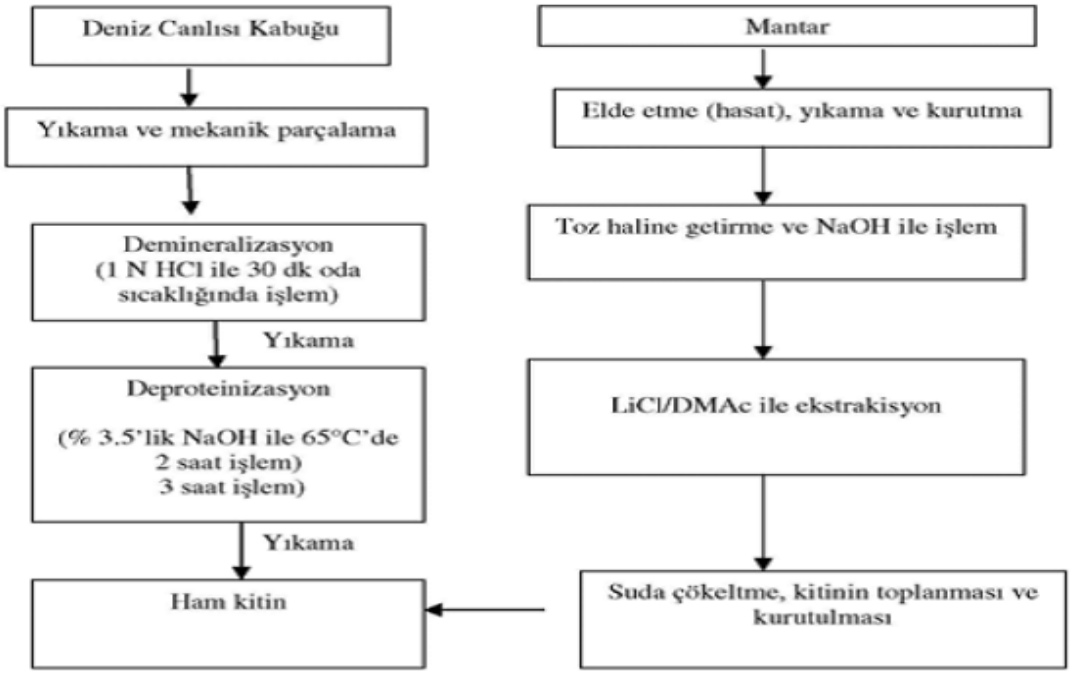


Şekil 3.8 Sellobioz kimyasal yapısı[96]

Selüloz, diyaliz membranlarının çok büyük bir bölümünü oluşturmala birlikte yara ve yanık örtü malzemesi olarakta biyomedikal alanda kullanılmaktadır. Selülozun en yaygın kullanılan biyopolimerlerden biri olmasının sebepleri; toksik olmaması, hesaplı olması, kan ve dokularla yüksek uyumluluk özelliği göstermesi olarak sıralanabilir[104].

3.3.2 Kitin ve Kitosan

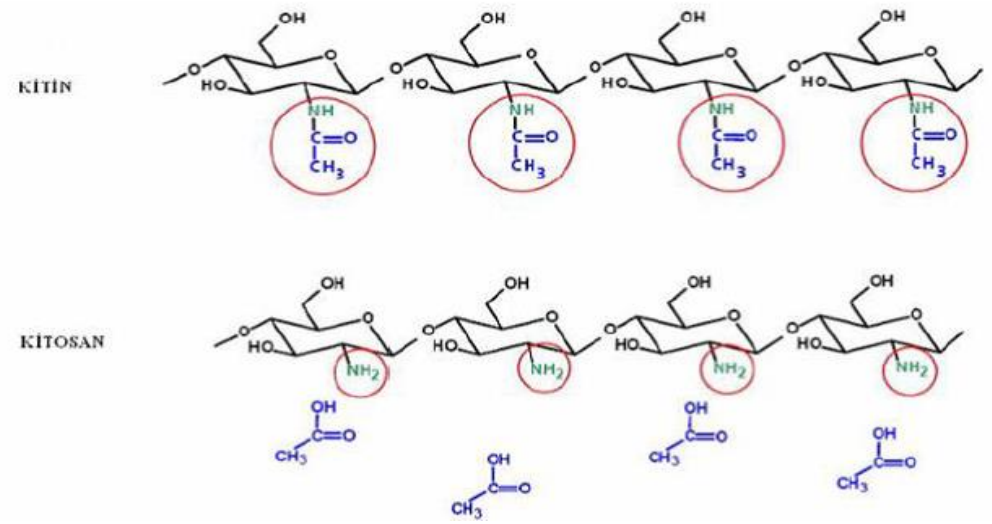
Yapısal olarak selüloza büyük benzerlik gösteren ve uzun, lineer yapılı bir biyopolimer olan kitin doğada selülozdan sonra en sık bulunan ikinci polimerdir. İlk kez 1811 yılında mantarın yapısında bulunan kitin, yengeç, istakoz, karides gibi deniz kabuklularının temel bileşeni olup, bu kabuklu su ürünlerinin dış iskeletinden, böceklerden ve mantarların hücre duvarından elde edilmektedir. *Deniz hayvanı kabukları ve mantarlardan kitin eldesi* Şekil 3.9'da gösterilmektedir. Mikroorganizmaların hücre duvarlarında bulunan ve kabuklu deniz canlılarının kabuk bölümlerinin hemen hemen %20-30'luk bir bölümünü meydana getiren kitin, bu yapılara dayanıklık ve kararlılık sağlar. Kitinin şelatlama ajanı olarak kullanılmasının temel sebebi yapısında bulundurduğu azottan dolayı kaynaklanmaktadır[105]–[107].



Şekil 3.9 Deniz hayvanı kabukları ve mantarlardan kitin eldesi[108]

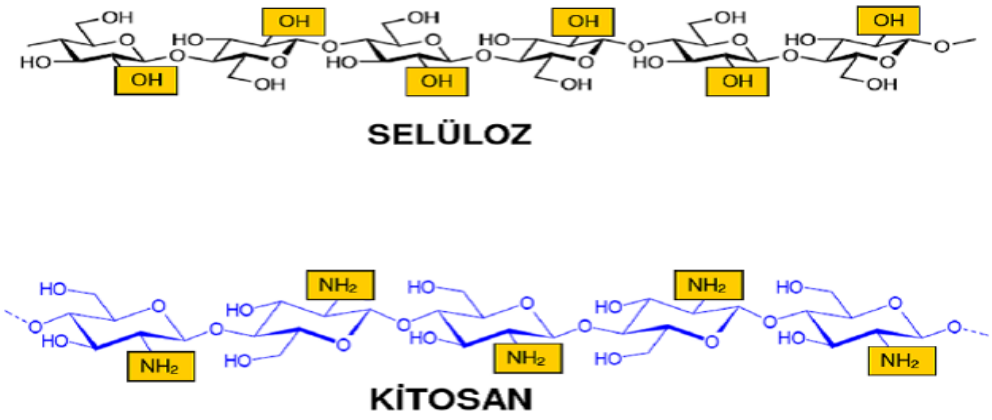
Kitin böcek kabuklarında hemen hemen %23,5, yengeçlerde %17 ve karideslerde %32 oranında bulunduğundan ekonomik olarak önemli bir kar sağlamaktadır. Buna karşın deniz kabukları yerine funguslardan sağlanan kitin daha avantajlıdır. Son yapılan araştırmalarda omurgalı canlılarda da kitine rastlanmıştır. Bu çalışmalar sonunda yeryüzündeki bütün canlıların %70'inden fazlasının kitine sahip olduğu anlaşılmıştır[106], [109], [110].

1811'de Henri Bracannot tarafından keşfedilen kitosan kitinin türevlerinden en önemlisidir. Bracannot mantarlardaki kitini sülfirik asitte çözmeyi denemiş ancak başarılı olamamıştır. Sonrasında 1894 yılında Hoppe-Seyler kitinden asetil oranı daha az olan kitosanı elde etmek için kitini 180°C'de potasyum hidroksit ile reaksiyona (deasetilasyon) sokmuş ve kitosan eldesinde başarılı olmuştur. Kitin ve kitosan polimerlerinin yapısal olarak farkı, kitosanda bulunan amin grubundan kaynaklanmaktadır. Bu amin grubu bir çözünme sırasında protonlanır ve bunun sonucunda katyonik polielektrolit formuna dönüşür. Kitosanda bulunan reaktif amino grupları sayesinde kitosan kitine göre daha reaktiftir. Buna ek olarak kitini çözerken yüksek oranda toksik olan çözücüler kullanılırken, kitosanda seyreltik asit olan çözücüler bile rahatlıkla kullanılabilir[107], [111], [112].



Şekil 3.10 Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı[112]

Kitin biyopolimeri aslında poli-[β-(1,4)-2-asetamid-2-deoksi-β-D-glukopiranoz] yapısındadır ancak çok az oranda 2-amino-2-deoksi-β-glukopiranoz monomerlerini de bulundurmaktadır. Kitosan ise poli-[β-(1,4)-2-amino-2-deoksi-β-D-glukopiranoz] kimyasal yapısındadır. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı Şekil 3.10'da gösterilmektedir. Kimyasal olarak kitin ve kitosan polimerleri selüloz biyopolimeri ile benzerlik göstersede kendi aralarında birkaç farklılığa sahiptirler. Selüloz polimerinde ikinci karbona hidroksil (-OH) grubu bağlıyken, kitosanda amin ($-NH_2$) grubu, kitinde ise asetamid ($-NHCOCH_3$) grubu bağlı bulunmaktadır[113], [114]. Selüloz ve kitosanın kimyasal yapısı Şekil 3.11'de gösterilmektedir.



Şekil 3.11 Selüloz ve kitosanın kimyasal yapısı[115]

Günümüzde çok geniş bir kullanım alanına sahip olan kitosan tıptan gıdaya, eczacılıktan atıksu arıtımına, ziraatten kozmetiğe kadar birçok farklı alanda kullanılabilmektedir. Kitosanın bu geniş kullanımına olanak veren bazı özellikleri vardır. Bu özelliklerin en başında deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı yer alır. Sonrasında pH, viskozite ve renk şeklinde diğer özellikleri sıralanmaktadır. Mikroorganizmalarda kitokinaz enzimleri, üstün yapılı canlılarda lizozomal enzimleriyle kolay parçalanan kitosan, bu özelliği sayesinde ilaç sanayisinde kullanılabilmektedir. Kitosanın negatif yüklü heparin ile rahatlıkla stabil bir bileşik oluştura bilmesinin nedeni katyonik özelliğinde kaynaklanmaktadır. Kitosan-heparin bileşiği epital dokunun onarımına yardımcı olduğu için sargı bezleri ve yara bantlarında kullanılmaktadır[111], [115], [116]. Kitin ve kitosanın bazı uygulama alanları ve spesifik kullanımları Tablo 3.5'de gösterilmektedir.

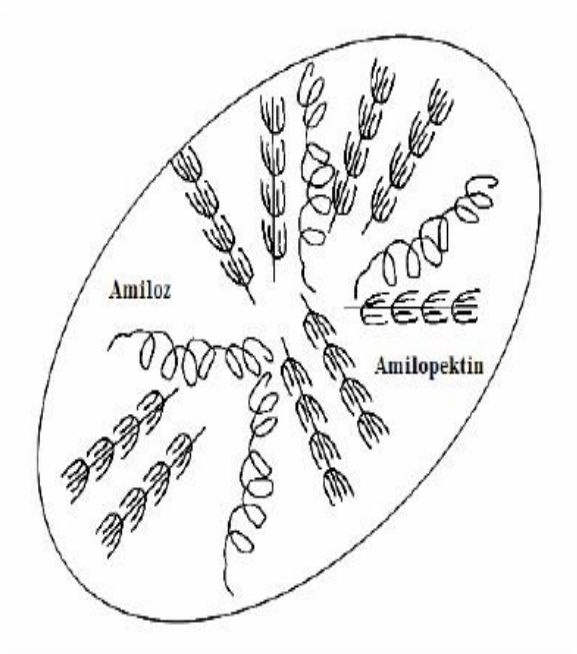
Tablo 3.7 Kitin ve kitosanın bazı uygulama alanları ve spesifik kullanımları[111]

Uygulama Alanı	Spesifik Kullanımları
Ziraat	Bitki katkı maddesi, antimikrobiyal madde, bitki tohumu kaplaması, gübre yapımı
Gıda	Doğal kıvamlaştırıcı, filtreleme ve temizleme, yiyecek işlemede, gıda katkı maddesi
Tekstil	Antimikrobiyal özellik kazandırması, yünlü kumaşlarda çekmezlik sağlaması, reaktif boyamada tuz miktarını azaltması, deodorant maddesi olarak kullanımı
Biyoteknoloji	Kromotografik yöntemler, enzim immobilizasyonu
Kozmetik	Saç şekillendirici yapımı, cilt nemlendirme, zayıflama maddesi, deodorantlarda koku giderici madde

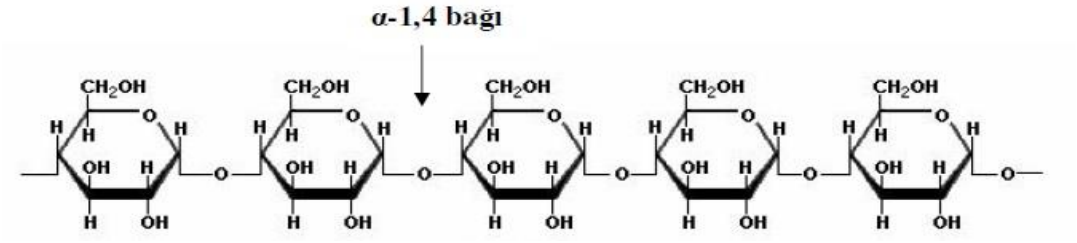
3.3.3 Nişasta

Nişasta, çok miktarda glukoz birimlerinin glikozidik bağlar ile bir araya gelmesi ile oluşan polimerik karbohidrattır. Bu biyopolimer yalnızca glukoz monomerlerinden oluşmuştur. Bu monomerler birbirine α-(1,4) bağları ile bağlıdır. Aynı zamanda nişasta bitkiler için bir enerji deposudur. Glukozun fazlasını nişasta olarak sentezleyip depo yaparlar. Nişasta, depolanmış enerjiyi simgelemektedir[42]. Nişasta granülünün yapısı Şekil 3.12'de gösterilmektedir.

Nişasta, kaynağına bağlı olarak farklı oranlarda amilopektin ve amiloz içeren iki farklı tür polisakkarit biriminden oluşmaktadır[117]. Amiloz, nişastanın dallanmamış zincir yapısı şeklinde olan en basit formudur[42]. Amiloz doğrusal yani lineer yapıda olan bir moleküldür. Molekül ağırlığı, bitkilerin olgunlaşmasına ve onların türlerine bağlı olarak ortalama 250 000 (1500 anhidro-glukoz) birimidir. Amiloz molekülünde zincirler uzun ve dallanmalar seyrek olduğu için dallanmamış kabul edilir. Amilozun yapısı Şekil 3.13'de gösterilmektedir.

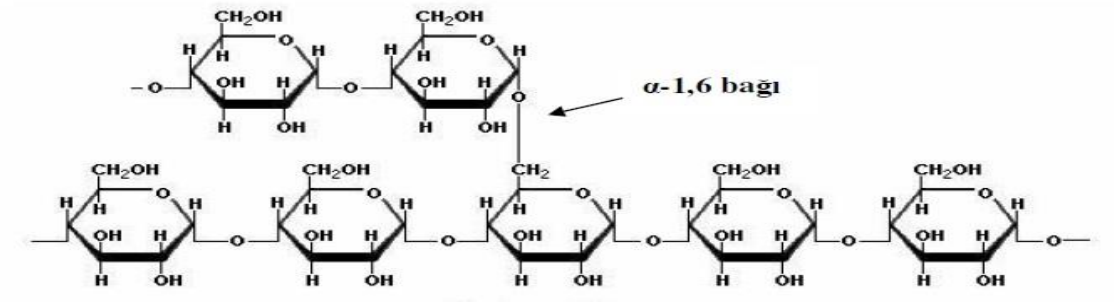


Şekil 3.12 Nişasta granülünün yapısı[118]



Şekil 3.13 Amilozun yapısı[119]

Amilopektin, α-(1, 4) bağları ile birbirine bağlanmış α-D-glukoz birimleri ile beraber α-(1, 6) bağı dallanma noktalarından bir araya gelmiştir. Bu bağların ortalama %5'i α-(1, 6) bağlarıdır. Amilopektinin molekül ağırlığı ise yaklaşık 107-108 'dir. Nişastanın kristal yapıdaki ana bileşenidir. Amilopektinin molekül ağırlığının yüksek olmasından dolayı moleküler yapısının belirlenmesi oldukça zordur[118]. Amilopektinin yapısı Şekil 3.14'de gösterilmektedir.



Şekil 3.14 Amilopektinin yapısı[119]

Nişastanın yapısında bulunan amiloz ve amilopektin bazı enzimlerin etkisiyle beraber parçalanma ürünlerine dönüşürler. α-amilaz, nişastanın yapısında bulunan α-(1-4) bağlarını rastgele bir şekilde kırarak küçük parçalara dönüştürür. β-amilaz ise nişastanın yapısında bulunan zincirlerde, öncelikle indirgen olmayan uçlardaki ve sonrasında diğer α-(1-4) bağlarını kırar. Sonucunda da maltoz ve dekstrinleri oluşturur. Glukoamilaz da nişastanın indirgen olmayan uçlarında bulunan α-(1-4) bağlarını kırar ve D-glukoz birimleri meydana gelir. Sonrasında dallanma noktalarında bulunan α-(1-6) bağlarını da kırar. Böylece nişasta tamamıyla D-glukoza dönüşmüş olur[118].

Amiloz, nişastanın suda çözünen bir bileşenidir. Amiloz, düz zincir yapısında olup zincirin uzunluğu 250-2000 glukoz birimi zincir uzunluğundadır. α-(1-4) bağları ile glukoz birimlerinin bir araya gelmesi sonucu amiloz molekülü oluşur. Her 1000

glikozidden sonra α-(1, 6) glikozid yan grupları bulunur. Amiloz da dallanma oldukça az olduğundan düz bir yapı gösterdiği kabul edilir[120]. Amiloz ve amilopektinin yapısal karşılaştırılması Tablo 3.6'da gösterilmektedir.

Tablo 3.8 Amiloz ve amilopektinin yapısal karşılaştırılması[121]

Karakter	Amiloz	Amilopektin
Granüldeki yüzde ağırlık	%15-35	%65-85
α-1,6 dallarının yüzdesi	<%1	%4-6
Molekül kütlesi (Da)	104-105	107-108
Polimerizasyon derecesi	102-103	103-104
Zincir uzunluğu	3-1000	3-50

Amilopektinin yapısında ise 1.000.000 glukoz birimi bulunmaktadır. Dallanmış bir yapıda olan amilopektin, nişastanın suda çözünmeyen bir yapıda olan bileşenidir. Amilopektin de amiloz molekülü gibi α-(1, 4) bağları ile bir araya gelmiş D-glukoz monomerlerinden oluşur. Ortalama 600-6000 glikozid grubu bulunmaktadır. Amilopektin dallanma kısımlarında α-(1, 6) bağlarınıda taşıdığı için amiloza kıyasla daha çok dallanma gösterir. Amilopektinin yapısındaki bağların ortalama %5'i α-(1, 6) bağlarından oluşur. Dallanma bölgelerinde molekül düzensiz yapıdadır. İki dallanma noktası aralığındaki bölgede ise çifte sarmallar sıralı bir şekilde dizilerek kristal yapı meydana getirirler. Bu sebepten dolayı mikroskopta nişastaya baktığımızda düzenli ve düzensiz alanlar büyüme halkaları şeklinde görünür. Amilopektin yapısında yer alan paralel iki zincir karşılıklı dolanarak çifte sarmal bir yapı oluştururlar[122], [123].

Nişasta granülünün içinde amiloz ve amilopektin sıralı bir şekilde bulunurlar. Granül yüzeyinde bulunan hidroksil gruplarında gerçekleşen hidrojen bağlanmaları ile nişasta moleküller arasında kuvvetli etkileşimler ve hidrofilik özellik gösterir. Nişasta molekülünün sahip olduğu termal hassasiyet ve hidrofiliklik termoplastik uygulamalar açısından oldukça uygundur. Nişasta

molekülü tek başına kullanılabilir veya %50'yi geçen miktarlar olduğunda sentetik polimerler ile birleştirilebilir yapıya sahiptir[91].

Nişastada bulunan amiloz miktarı yaklaşık %17'den (pirinç) başlayıp %38'e (mercimek) kadar değişmektedir. Yumru ve hububat nişastalarının geneli % 20-27 amiloza sahiptir. Araştırmalara göre bazı hububat mutantlarının sahip olduğu nişastaların %100 amilopektin içerdiği saptanmıştır. Diğer hububat nişastalarına bakıldığında yüksek miktarda amiloz içerdiği saptanmıştır. Bu yüksek oranda amiloza sahip hububat nişastalarında amilotip nişasta denilmektedir[124]–[128].

Nişasta Tablo 3.7'de gösterildiği gibi yiyecek endüstrisinde soslar, donmuş yiyecekler, hamur işleri, çorbalar veya farklı endüstriyel alanlarda kaplama maddesi olarak kullanılabilmektedir. Örneğin; eczacılık sektöründe suda hızlı çözünebilen tablet ve kapsül olan ilaçların hazırlanmasında, kağıt endüstrisinde kağıdın baskı kalitesini ve dayanıklılığını arttırmada, inşaat sektöründe yanmaya dayanıklı olan duvar kağıtlarının yapımında ve ayrıca hem çimento katkı maddesi hem de boyalarda kullanılmaktadır. Günümüzde, artan çevresel problemlerden ötürü biyolojik açıdan parçalanabilir ve yenilenebilir hammaddelerin kullanımı üzerine yoğunlaşılmıştır. Paketleme ve plastik malzemelerinin yapımında kullanılan malzemeler petrol temelli maddelerdir. Bunun yerine nişasta temelli maddelerin kullanımı üzerine araştırma yapılmaktadır. Örneğin, polistiren'den yapılan gevşek paketleme materyalinin yerini mısır nişastasından yapılan almıştır[129].

Tablo 3.9 Nişastanın kullanım alanları[129]

Yiyecek-İçecek	Plastik Sanayi	Eczacılık ve Kozmetik	İnşaat Sanayi	Tekstil Sanayi	Kağıt Endüstrisi
Mayonez Bebek maması Ekmek Alkolsüz içecekler	Parçalanabilir plastik ve filmler	Tabletler Toz pudra Yüz kremi	Beton Yanmaya dayanıklı duvar kağıdı	Kumaş İplik Dokuma	Oluklu mukavva Karton Kaplama Yapıştırıcı

Nişasta, plastidlerde suda çözünmeyen granüller olarak bulunur. Bu granüllerin büyüklüğü, kompozisyonu ve şekli bitkinin cinsine, içinde bulunduğu büyüme evresine ve bulunduğu organa göre değişir. Örnek olarak, buğdayda iki farklı granül bulunmaktadır. Granül çapı 10-35 μm aralığında olanlar ve 10 μm'nın altında olanlardır. Patateste ise sadece bir tip granül vardır. Bu granülün çapı 5-100 μm aralığında değişmektedir[130], [131].

Nişasta granülleri amorf bölgeden ve bu bölgeyi takip eden semi-kristal büyüme halkalarından meydana gelir. Amorf bölgede amiloz ve amilopektin bulunur. Semi-kristal büyüme halkaları da ortalama 9-10 nm genişliğinde olan amorf ve kristal lamellerden oluşur. Amilopektinin yapısında bulunan zincirlerin sol elli α-helix şeklinde paketlenmesi ile kristal lameller oluşur. Amorf bölgede ise dallanma noktaları yer alır.

Amilopektin molekülünün iç ve dış zincirleri 3'e ayrılır. A zinciri; indirgenen ucundan diğer zincirlere α-(1, 6) bağlarıyla bağlanan kısa ve lineer zincirdir. B ve C zincirleri de bir ya da daha fazla miktarda A ve/veya B zinciri taşımaktadır. Molekül başına yalnızca tek bir C zinciri vardır. Molekülün tek indirgenen ucu da C zincirinde bulunmaktadır. Amilopektin sarmalları A tipi nişastada (çoğu tahıl nişastası) sıkı şekilde istiflenirken, B tipi nişastada (patates ve muz vb) aralıklı bir istiflenme görülür[129], [130], [132]. Nişasta çeşitlerinin büyüklükleri ve şekilleri Tablo 3.8'de gösterilmektedir.

Tablo 3.10 Nişasta çeşitlerinin büyüklükleri ve şekilleri[130]

Nişasta	Büyüklük	Şekil
Arpa	2-5 (B tipi granül) 15-25 (A tipi granül)	Spherical Lenticular
Mısır	2-30	Spherical/ Polyhedral
Yulaf	3-10 (basit) 80(bileşik)	Polyhedral
Bezelye	5-10	Rentiform

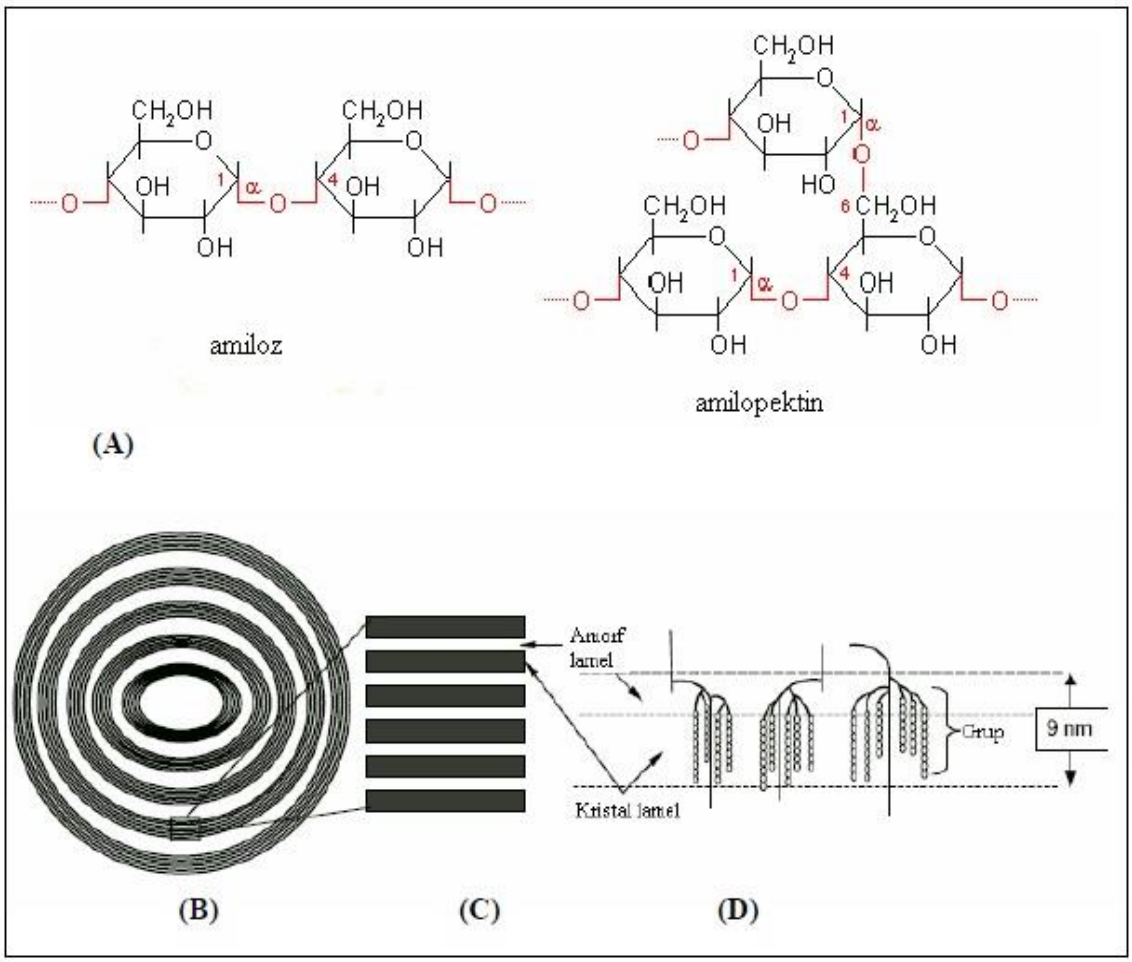
Tablo 3.11 Nişasta çeşitlerinin büyüklükleri ve şekilleri(Devamı)[130]

Patates	5-100	Lenticular
Pirinç	3-8 (basit) 150 (bileşik)	Polyhedral
Çavdar	5-10 (B tipi granül) 10-40 (A tipi granül)	Spherical Lenticular
Sorgum	5-20	Spherical
Triticale	1-30	Spherical
Buğday	2-10 (B tipi granül) 15-35 (A tipi granül)	Spherical Lenticular

Nişastanın endüstriyel kulanım alanının tayin edilmesinde fonksiyonel özellikler büyük önem taşır. Bu fonksiyonel özellikler; jel yapısı, spesifik viskozite, kristallik, berraklık, şişmeye dayanıklılık, donma-çözünme kararlılığı sayılabilir. Su ve sıcaklık etkisi ile nişasta granülleri yapısal bir değişime uğrar. Nişasta granülleri su ile karıştırıldığı vakit süspansiyon oluşur. Granüller ısıtmayla beraber suyu absorbe ettiğinden şişer ve süspansiyonu koyulaştırır. Amiloz sıcaklığın artmasıyla amilopektinden ayrılır. Amiloz granül üzerinden solüsyona geçer. Daha sonra soğutmayla amiloz diğer amilopektin ve amiloz ile beraber H+ bağı kurar. Böylece amiloz ve amilopektinden oluşan bu bağ arasında suyun hapsedilmesi ile jelatinimsi bir yapı meydana gelir. Bu jelatinimsi yapı uzun zaman aralığında soğutulduğu veya dondurulduğu vakit, amiloz molekülleri birbirine yakınlaşır. Bunun sonucunda yoğun kristal kümeleri oluşturur (retrogradasyon) ve su molekülleri ayrılır[130], [133], [134]. Nişasta granülü içinde bulunan amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısı ve şematize edilmiş granül organizasyonu Şekil 3.15'de gösterilmektedir.

Suyun açığa çıkması arzu edilmeyen bir durumdur. Örneğin, dondurulmuş unlu ürünlerde pek hoş olmayan değişimlere veya nişasta içeren işlenmiş gıdalarda

mikroorganizma üremesine sebep olabilir. Bu sebepten doğal nişastanın kullanım alanı sınırlıdır. Genelde yapıştırıcı ya da koyulaştırıcı olarak kullanılır[132].

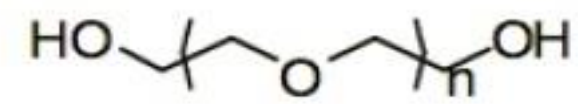


Şekil 3.15 Nişasta granülü içinde bulunan amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısı (A) ve şematize edilmiş granül organizasyonu (B, C, D). Amorf büyüme halkaları ile ayrılmış kristal lameller (B), amorf ve kristal bölgenin büyütülmüş hali (C), yan yana bulunan amilopektin zincirleri tarafından oluşturulan çift heliks yapısı kristal lamelleri oluştururken, dallanma noktaları ise amorf bölgede yer alır (D)[135].

Nişastanın fonksiyonelliğinde, nişasta granüllerinin sıcaklık ve su etkisiyle yaşadığı bu değişimlerin denetimi anahtar faktördür. Doğal bir nişasta enzimatik, kimyasal veya fiziksel olarak modifiye edildikten sonra spesifik bir kullanım içim lazım olan özellikler kazandırılabilir. Nişasta, enzimatik olarak nişastanın küçük polimerlere parçalanması yani hidrolizi veya fiziksel öğütmeyle modifiye edilebilir. Nişasta modifikasyonunun en yaygın olanı kimyasal modifikasyondur. Son yıllarda mutant ve genetik modifikasyon olan bitkilerde fonksiyonelliği arttırılmış bu tür nişastalar üretilmektedir[132].

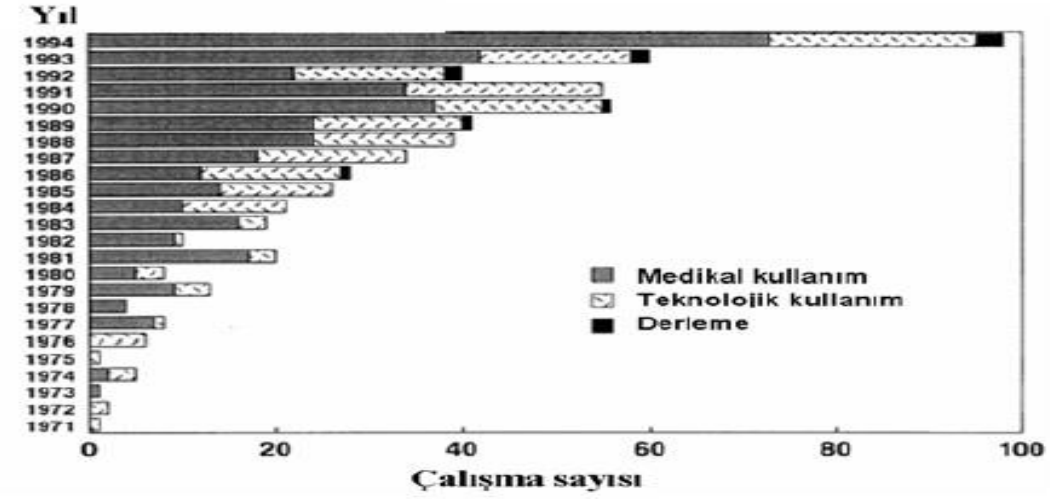
3.4 Polietilen Glikol

Polietilen glikol, immünojenik olmayan ve 500-20.000 aralığında bir molekül ağırlığı olan, etilen oksit birimlerinin bir araya gelmesiyle oluşan bir maddedir. Lineer veya dallanmış yapıda bulunurlar. Food and Drug Administration-FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmış olan bir polimerdir. Toksik yapıda değildir, aktif olan proteinlere veya hücrelere zarar vermez. PEG vücut içerisinden bütün bir halde feçes (> 20 kDa olan PEG'ler) veya böbrekler (< 30 kDa olan PEG'ler) yoluyla atılmaktadır[136]–[138]. Polietilen glikol'ün (PEG) yapısı Şekil 3.16'da gösterilmektedir.



Şekil 3.16 Polietilen glikol'ün (PEG) yapısı[139]

PEG, hem çok yönlü olan hem de çok ilgi çeken bir polimerdir. Protein modifikasyon işlemlerinde PEG ve türevleri çok kullanılmaktadır. Şekilde görüldüğü gibi PEG üzerine yapılan çalışmalar her geçen yıl artmaktadır[140]. PEG veya türevleri ile protein modifikasyonunun yapıldığı çalışmalar Şekil 3.17'de gösterilmektedir.



Şekil 3.17 PEG veya türevleri ile protein modifikasyonunun yapıldığı çalışmalar[139]

PEG ve türevleri gıda, kozmetik, tekstil, tarım, petrol, lastik, lubrikant ve birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. PEG'nin bu derece çekici olması, birçok avantajı olmasından kaynaklanır. Bu avantajlar hidrofilik, immünojik ve toksik olmamasıdır[136], [141].

PEG yapısında bulunan her bir etilen oksit biriminin 2-3 su molekülü ile koordinasyonundan kaynaklı kendine özgü bir çözünme özelliği bulunmaktadır. Bu çözünürlük ve PEG molekülünün esnekliğinin fazla olması biyouyumluluk, antijenik olmayan ve immünojenik olmayan özellik kazandırır. Çözünmenin bir başka etkisi ise aynı molekül ağırlığına sahip olan globüler proteine kıyasla hidrodinamik olarak 5-10 kat daha fazla büyüyebilir[140], [142].

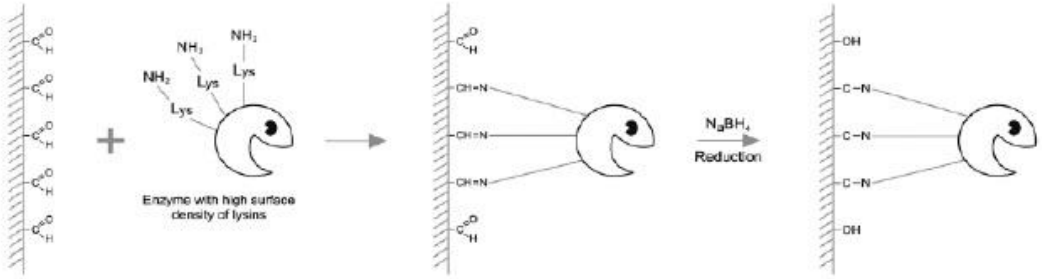
3.4.1 Pegilasyon

Peptid-protein yapısında olan moleküller veya farklı moleküllere bir veya daha fazla sayıda polietilen glikol (PEG) zincirinin bağlanması ve modifikasyona uğratılmaları işlemine pegilasyon denir. Bu işlem sonrasında moleküllerin reseptör tarafından algılanma veya enzimatik aktivite gibi biyolojik özellikleri sabit kalmaktadır. Pegilasyon işlemi genelde proteinlerin sahip olduğu amino gruplarından alkilasyon ve açilasyon reaksiyonları ile gerçekleştirilmektedir. Bunun nedeni de amino gruplarının proteinlerin yüzeyinde bulunmaları ve nükleofil açıdan aktif olmalarıdır. Özel enzimatik ve kimyasal işlemler yardımı ile hidroksil, amid ve tiyol grupları üzerinden de pegilasyon yapılabilmektedir[136].

PEG'nin moleküllere bağlanabilmesi için fonksiyonel gruba sahip olacak şekilde aktive olmaları gerekir. Bu fonksiyonel grubu seçerken molekülde olan ve PEG ile bir araya gelecek uygun reaktif grubun tipine göre tercih edilmelidir. Peptid ve proteinlerin yan zincirlerinde bulunan reaktif amino grupları serin, treonin, sistein, arjinin, lisin, C-terminal karboksilik asit ve N- terminal amino grubudur. Glikoproteinlerde hidroksil grupları kullanılmaktadır[143], [144].

Protein yapısında bulunan amino grupları ile polimerde bulunan yüksek reaktiflikte ki aldehit gruplarının birbiri ile reaksiyonu sonucu geri dönüşümlü olan imino grupları meydana gelmektedir. Sonrasında $NaBH_4$ ile indirgenerek hem geri dönüşümlü olan schiff baz tamamen geri dönüşümsüz kovalent bağlarına

dönüşür hem de aldehit gruplarının aktif olmayan hidroksil gruplarına geçişi engellenir[145]. Polimer enzim arasındaki kovalent immobilizasyon Şekil 3.18'de gösterilmektedir.



Şekil 3.18 Polimer enzim arasındaki kovalent immobilizasyon[145]

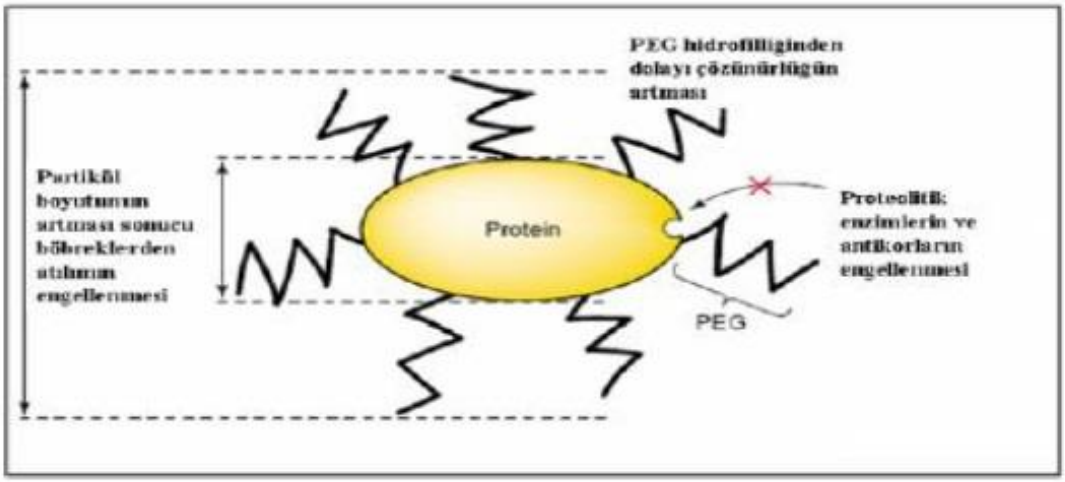
3.4.2 PEG'lerin Özellikleri

1. 1000'den büyük molekül ağırlığı (MA) olan PEG'ler toksik kategorisine girmemektedir. PEG'nin molekül ağırlığı 4000 olduğunda bunun %10'luk çözeltisi IV (İntravenöz) olarak 16g/kg miktarda domuz, sıçan, maymun, tavşanlara uygulanabilir.
2. Yüksek konsantrasyon olduğunda hücre füzyonuna neden olur.
3. Konsantre tuz çözeltisi veya dekstran gibi makromoleküllerin çözeltileriyle beraber iki fazlı sistemler meydana getirirler.
4. Amfipatik özellik gösterir; su, benzen, 1,1,1-trikloroetan ve toluende çözünür, alifatik hidrokarbonlar ve etil eterde çözünmez.
5. Nükleik asit ve proteinleri çöktürmek için kullanılabilirler.
6. Zayıf immunojeniktir[136].

3.4.3 PEG-Etkin Madde Konjugatlarının Avantajları

1. Pegilasyon sonucunda oluşan konjugatların avantajları ve gösterdiği özellikler aşağıda belirtilmiştir.
2. PEG zincirleri, antijen veya antikor işleyici hücrelerin temasını engellemektedir.
3. Polipeptidin moleküler olarak büyüklüğünü arttırır ve böylece renal ultrafiltrasyon azalır.
4. Protein immünojenisitesi elimine edilmekte veya azalmaktadır.

5. Protein yüzeyi, PEG'nin sterik engellemesi ile maskelenmekte ve degrade edici olan ajanlara karşı korunmaktadır.
6. Biyoaktif maddeler ve enzimler sulu çözeltilerde ya da organik çözücüde çözünmektedirler.
7. Tümörlü olan dokularda birikimi arttırmaktadır.
8. Bazı etkin maddelerin farmokinetik olan özelliklerini stabilize etmektedir.
9. Biyoaktif maddeler ve proteinlerin fizyolojik olan özelliklerini stabilize etmektedir.
10. PEG bağlandığı peptit veya nonpeptit'e fizikokimyasal özelliklerini taşımakta ve bunun sonucunda maddenin çözünürlük ve biyo dağılım özellikleri değişmektedir.
11. Biyolojik moleküller, hücre partikülleri, membranlar ve hücreler ayrılmaktadır.
12. İn vivo olarak PEG-protein'den oluşan konjugatın atılımını ve kanda olan sirkülasyonun sürecini uzatmaktadır[139]. Pegilasyona uğramış proteinin avantajları Şekil 3.19'da gösterilmektedir.



Şekil 3.19 Pegilasyona uğramış proteinin avantajları[146]

3.4.4 Pegilasyonun Farmasötik Alandaki Uygulamaları

PEG konjugatları ile enzim eksikliği, kan sübstitüsyonu, enflamasyon, kanser gibi birçok hastalığın tedavisi için çalışılmaktadır. Pegilasyon çalışmaları 1971 yılından

beri devam etmektedir[139]. 1970 yılından beri gerçekleştirilen önemli pegilasyon uygulamaları Şekil 3.20'de gösterilmektedir.

Yıl	
1977	PEG'nin serum albuminine ve katalaz enzimine kovalan olarak bağlanması sonucunda antikorlara karşı immün etkinin azaldığının gösterilmesi
1977	Alerjenlerin pegilasyonu
1986	Hidrofilik-hidrofobik enzimlerin pegilasyonu
1990	Kalıtsal adenozin deaminaz eksikliğine bağlı immün zayıflığın tedavisinde kullanılan yetim ilaç (orphan drug) olan Adagen®'in (PEG-adenozin deaminaz) FDA'dan onay alması.
1994	Lenfoblastik lösemi ve diğer lenfoid malignitelerin tedavisinde kullanılan Oncaspar®'ın (PEG-L-asparginaz) onay alması [25].
1995	Kaposi sarkoma, metastazik over kanseri tedavisinde kullanılan Doxil®'in (doksorubisinin pegile edilmiş lipozomal formülasyonunun) onay alması.
2000	Hepatit C tedavisinde kullanılan PEG-Intron®'un (Peginterferon alfa-2b) onay alması [26,27].
2002	Hepatit C tedavisinde kullanılan Pegasys ®'in (Peginterferon alfa-2a) onay alması [28,29].
2002	Kemoterapi sırasında meydana gelen granülosit azalmasının tedavisinde kullanılan, Pegfilgrastim ®'in (PEG-granülosit stimule edici faktör) onay alması.
2002	Akromegali tedavisinde kullanılan Pegvisomant®'ın (PEG-büyüme hormonu reseptör antagonisti) onay alması.
2004	Yaşa bağlı makular dejenerasyon tedavisinde kullanılan Pegaptanib®'ın (PEG-anti-vasküler epitelyal büyüme faktörü aptameri) onay alması.

Şekil 3.20 1970 yılından beri gerçekleştirilen önemli pegilasyon uygulamaları[139]

3.4.5 PEG-Protein Konjugatlarının Biyodağılımı ve Farmokinetik Özellikleri

Doğal proteinlerin yapıları bilinse dahi farmakokinetik özelliklerinin tam ve doğru bir şelilde belirlenebilmesi oldukça zor olmaktadır. Bu durum PEG konjugatlarında daha da zor olmaktadır. Bunun sebebi değişen molekül ağırlığı, modifikasyonun büyüklüğü, polimer şekli ve PEG bağlanma bölgesi gibi bazı değişkenlerin de sisteme ilave edilmiş olmasıdır. Bu parametrelerin hepsi bellirli bir miktarda konjugatın vücut içindeki stabilitesi, glomerüler filtrasyonu, immünojenitesi, doku lokalizasyonu, karaciğerden atılımı, hücresel alımı gibi birçok biyolojik olayları etkilemektedir. Bu konu günümüzde fazla açıklığa kavuşturulamamıştır ve ne yazık ki PEG konjugatlarının bütün durumlar için ayrı ayrı çalışılıp deneysel olarak gösterilmesi şarttır[147], [148].

3.4.6 PEG Kullanımını Kısıtlayan Faktörler

Polietilen glikol kimyasal sentez yöntemi ile elde edilmekte ve diğer bütün sentetik polimerler gibi farklı sayıda monomerlere sahip olan moleküllerden (polidispers) meydana gelmektedir. Bu durum ilaç konjugatlarının immünojenitesi ve vücutta kalma süresi açısından değişik biyolojik özellikler göstermesine sebep olabilmektedir. Günümüzde çeşitli saflaştırma yöntemleri ile polidispersite özelliği azaltılmıştır. Fakat bu durumun, peptitlerle ya da düşük molekül ağırlıklı peptit yapısında olmayan etkin maddelerle çalışılıyorsa, dikkate alınması ve hesaba katılması gerekir. İkinci sorun ise polimerin vücuttan atılımıyla alakalıdır. Diğer bütün polimerler gibi PEG de feçesle ya da idrarla atılmaktadır. Ancak molekül ağırlığı yüksek ise karaciğerde birikir ve bu da makromoleküler sendroma neden olabilmektedir[146].

4
ENZİM –BİYOPOLİMER ETKİLEŞİMLERİ

Günümüzde endüstriyel alanda enzimler deterjan, meyve suyu, süt, tekstil, içki endüstrilerinde kullanılması için bulundukları kaynaklar üzerinden izole edilip saflaştırılmaktadırlar. Ticari enzim üretimi iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşama izolasyon, ikinci aşama ise saflaştırmadır. İlk aşamada enzimler mikroorganizma, hayvan veya bitki kaynağından izole edilir ve sonra saflaştırma yoluna gidilir[6], [149].

Enzimler saflaştırma, izolasyon ve endüstriyel işlemler sürecinde inaktive edici koşullara maruz kalmakta ve miktar olarak kayba uğramaktadır[7].

Birçok alanda kullanılan enzimlerin optimal değerinden farklı pH, sıcaklık değerleri, deterjanlar, yüksek tuz konsantrasyonları, radyasyon ve mekanik kuvvetlerin verdiği etki ile denatürasyona uğramaları büyük bir sorun teşkil etmektedir. Biyoteknolojik alanlarda kullanılan enzimlerin uzun bir süre kararlılığını sürdürmesi gerekir. Enzim stabilitesinin korunması enzim kullanımında ekonomik maliyeti düşürmekte ve enzim tekrarlarını azaltmaktadır[150], [151].

Enzimlerin çevresel etkenlere karşı daha kararlı yapıda olabilmesi ve denatürasyonun önlenmesi amacıyla enzim stabilizasyonu sağlanmalıdır. Enzim stabilizasyonu hem uygulama sırasında enzim özelliklerinin hem de raf ömrünün ne kadar iyi bir şekilde korunduğunu gösterir[97], [150], [151].

Enzim stabilizasyon yöntemleri farklı yollarla gerçekleştirilebilir. Bunlar;

1- Enzim immobilizasyonu
2- Protein mühendisliği
3- Enzimlerin kimyasal modifikasyonları
4- Enzim çözeltisine stabilize edici çözeltilerin ilavesi ve
5- Yüksek stabiliteli olan enzimleri üreten mikroorganizmaların bulunmasıdır[23], [151], [152].

4.1 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimlerin aktivitesini kaybetmeden süreğen bir şekilde ve tekrar tekrar kullanılmasını sağlamak üzere, kimyasal ya da fiziksel olarak taşıyıcı materyaline tutturulması işlemine immobilizasyon denir[153].

İmmobilizasyon işlemleri enzim sistemlerinden başka, uygun taşıyıcı materyallerine protein, hayvan ve bitki hücreleri, mikroorganizma, ilaç, biyoreaktör ve biyosensör uygulamalarında ve kontrollü ilaç salınım sistemlerinde de oldukça kullanılmaktadır[154].

Kimyasal tepkimelerde büyük bir özgünlüğe sahip olan enzimler reaksiyonlara katıldıkları sırada herhangi bir değişime uğramazlar. Bu sayede birçok kez kullanılabilirler ve maliyet açısından kazanç sağlarlar. Ancak eğer ki enzim bir çözeltide ise, enzimi o tepkimeden ayırmak oldukça güçtür. Aynı zamanda büyük maliyet gerektirir. Bu yüzden enzimin yeniden kullanımı için; ürünler tepkimeden uzaklaştırıldıktan sonra bir taşıyıcı materyali üzerine veya içerisine immobilize edilirler. Suda çözünen enzim moleküllerinin; suda çözünmeyen bir destek materyaline kimyasal ya da fiziksel olarak tutturulması işlemine enzim immobilizasyonu denir. Enzim moleküllerinin hareketleri bu işlem ile sınırlandırılır[155].

1916 senesinde Griftin ve Nelson tarafından tarihin ilk enzim immobilizasyonu adsorpsiyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Sakkarozun hidrolizi amacıyla yapılan çalışmada maya intervazını; Nelson ve Griftin mangal kömürünün yüzeyine bağlamışlardır. Pratikte enzim sistemlerini ilk olarak 1954 yılında Grobhofer ve Scheilth kullanmıştır. Bu çalışmada pepsin, ribonükleaz, karboksipeptidaz, diastaz enzimlerini poliaminostiren reçinesinin üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Daha sonrasında bu immobilize edilmiş olan enzimlerin kinetik parametreleri üzerine çalışılmıştır. Bu çalışmalardan sonra dünyanın her yerinde immobilizasyon çalışmaları yaygınlaşmış ve bazı enzimler farklı amaçlarla immobilize edilmiştir[154].

Analitik proseslerin veya endüstriyel proseslerin geneli sulu ortamlarda gerçekleşmektedir. Bu proseslerdeki reaksiyonlarda enzim substrat ile birleştikten

sonra ortamda ürünler elde edilir. Ancak bu reaksiyon sonrasında enzimler geri kazanılamazlar. Aynı zamanda her zaman üretim süreçlerinde serbest enzimler kullanılamazlar. Enzimlerinde hem pahalı olması hem de tek bir kere kullanılmaları sebebiyle, bu süreçlerin maliyeti oldukça fazladır. Bu yüzden de enzimler bir taşıyıcı materyale immobilize edilir. Böylece sürekli proseslere uygulanabilirler ve tekrar tekrar kullanılabilirler. Bu sayede ekonomik olarak da kazanç sağlanmış olur. Günümüzde endüstri alanında immobilize enzimler oldukça kullanılmaktadır[153]. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri Tablo 4.1'de gösterilmektedir.

Enzim immobilizasyonu sürecinde amaç sadece enzimi reaksiyon ortamından ayırıp uzaklaştırmak değil, ayrıca immobilizasyon işlemi sonrasında enzimatik aktivitede fazla bir düşüşün olmamasıdır. Bu yüzdende enzim immobilizasyonu ılıman koşullarda gerçekleşmelidir. Enzimin taşıyıcı materyale, aktif merkezi biraraya getiren aminoasit kalıntıları tarafından bağlanması engellenmelidir. Bu engellenme için enzimin aktif merkezini oluşturan aminoasitler bilinmeli ve ona göre uygun taşıyıcı materyal seçilmelidir. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar Tablo 4.2'de gösterilmektedir. Taşıyıcıların sahip olması gereken özellikler Tablo 4.3'de gösterilmektedir.

Enzim immobilizasyonundan sonra mikroorganizma immobilizasyonu da oldukça önem kazanmıştır. Substrat, mikroorganizmanın sahip olduğu enzimlerden herhangi biri için spesifik ise enzimin immobilizasyonun yerine bunu içeren mikroorganizmanın saflaştırılmasına ve immobilizasyonuna ihtiyaç kalmayacağından ekonomik olarak büyük kazanç sağlanacaktır[156], [157].

Biyolojik ortamlardan enzimlerin saflaştırılarak geri kazanılması oldukça maliyetli ve zaman alan bir işlemdir. Tepkimeye katalizör olarak giren enzimin ürünlerin arasından ayrılmasının güçlüğü, serbest enzimlere dezavantaj sağlar. Aynı zamanda saflaştırma sürecinde kullanılan kimyasal maddeler enzim için inhibitör etkisi yaratır. Bunun sonucunda enzimin yapısı bozulabilir. Bu problemlerin çözümlenmesi için geliştirilen yöntemlerden biri de enzim immobilizasyonudur. Bu sayede immobilize enzimler tekrar tekrar ve sürekli kullanılabildiklerinden dolayı serbest enzimlere göre çok daha fazla tercih edilirler. Enzimler

immobilizasyon yöntemiyle biyoteknoloji, ilaç bilimi, analitik kimya gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmak için yeniden işlevsel hale getirilir[150], [158].

Tablo 4.1 İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri[159]

İmmobilize Enzimlerin Serbest Enzimlere Göre Üstünlükleri
Reaksiyon sonunda ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabilir.
Çevre koşullarına karşı direnci yüksektir.
Tekrar tekrar kullanılabilir.
Sürekli işlemlere uygulanabilir.
Doğal enzime kıyasla kararlılığı yüksektir.
Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
Birbirini izleyen çok basamaklı reaksiyonlar için uygundur.
Serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
Enzimin kendini parçalama olasılığı düşüktür.
Mekanik çalışmalar için uygundur.
Üretim kaybını engeller.

İmmobilize enzimlerin avantajlarının yanında bazı dezavantajlarıda bulunmaktadır. Bunlardan bazıları;

-İmmobilizasyon süreci boyunca enzimlerin aktifliği düşebilir veya kaybolabilir.

-Çok basamaklı immobilizasyon proseslerinde enzimlerin kararlılığı sınırlıdır.

-Enzim taşıyıcılarının ekonomik olarak maliyeti yüksektir[160].

Tablo 4.2 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar[161]

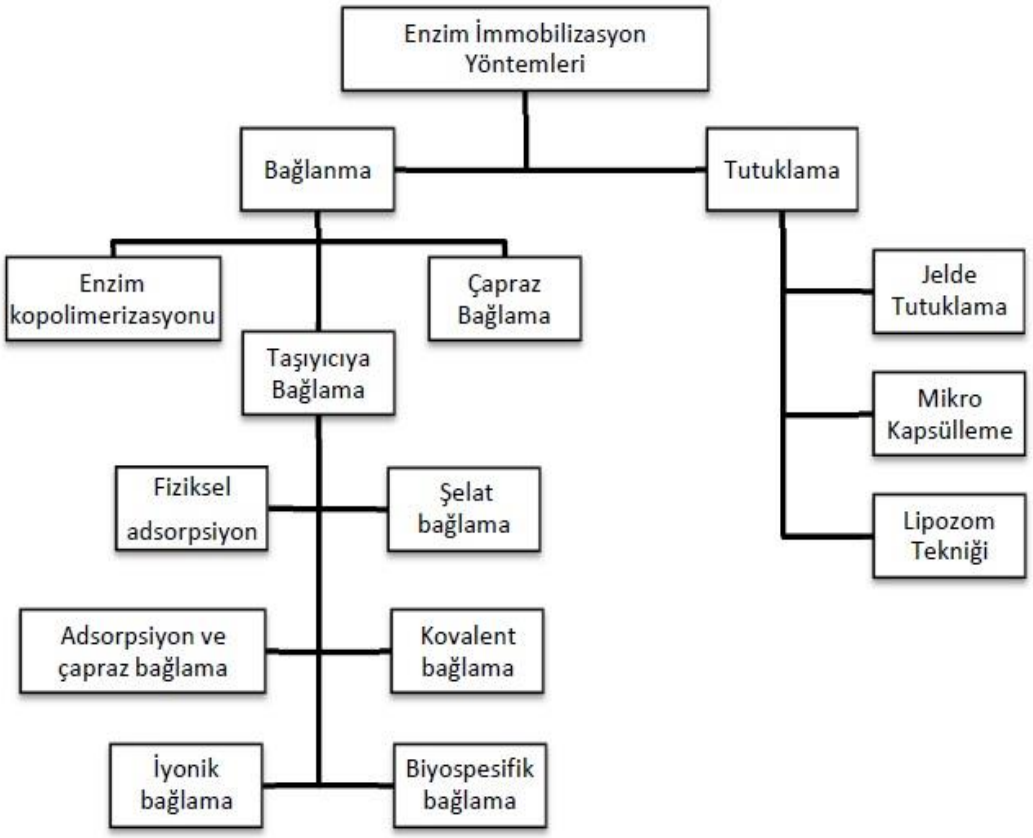
Organik Maddeler		Anorganik Maddeler	
Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler	Doğal Mineraller	İşlenmiş Materyaller
Selüloz	Polistiren	Bentonit	Cam
Nişasta	Poliakrilat	Silika	Metal ve Oksitleri
Dekstran	Polimetakrilat		
Kitin	Poliakrilamit		
Agaroz	Poliamid		
Aljinat	Vinil Polimerler		

Tablo 4.3 Taşıyıcıların sahip olması gereken özellikler [162]

Taşıyıcıların Özellikleri
Hidrofiliklik
Suda çözünmeme
Gözenekli yapı
Mekanik kararlılık ve uygun tanecik şekli
Kimyasal kararlılık
Ilımlı koşullarda enzimle kovalent bağ oluşturabilecek fonksiyonel gruplar taşıması
Mikroorganizmalara karşı dirençlilik
Ucuzluk
Zehirsizlik
Yenilenebilme
Enzim tarafından parçalanmama

4.1.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 4.1'de gösterildiği gibi sınıflandırılmaktadır.



Şekil 4.1 Enzim immobilizasyon yöntemleri[107]

4.2 Protein Mühendisliği

Protein mühendisliği, kararlılığı arttırılmış enzimlerin ticari üretimi amacıyla kullanılan modern bir yöntemdir. Bu teknikle enzim yalnızca yüksek sıcaklığa değil aynı zamanda organik çözücüler, yüksek pH ve okside edici bileşiklere karşı da dayanıklı olurlar. Termostabil yani ısıya dayanıklı enzim genlerinin klonlanması en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Termostabil enzimlerin kaynağı termofil mikroorganizmalardır. Ancak bu ısıyı seven mikroorganizmalardan enzim üretimi çok nadir yapılmaktadır. Bunun nedeni ise mikroorganizmaların patojen olması ve bu yüzden güvenli olmamaları, aynı zamanda yavaş büyümeleri gibi olumsuzlukları olmasıdır. Bu yüzden termofil mikroorganizmalardan üretilen

termofilik yani sıcağı seven genler, büyüme koşulları daha güvenli ve daha ılımlı olan mezofil mikroorganizmalara klonlanmaktadır[163].

4.3 Yüksek Stabiliteye Sahip Enzimleri Üreten Mikroorganizmaların Bulunması

Halofilik ve termofilik gibi canlılar düşük ve yüksek sıcaklıklarda, yüksek basınçlarda, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşamaya adapte olmuşlardır. Yapılan çalışmalar neticesinde bu tür canlılardan üretilen enzimlerin stabilitesinin fazla olacağını göstermektedir. Yüksek sıcaklıklarda stabil olan bu enzimler aynı zamanda detarjanlar ve organik solventler gibi denatüre eden ürünlere karşı da oldukça stabildir[23], [37].

4.4 Stabilize Edici Bazı Maddelerin Enzim Çözeltisine İlavesi

Enzim çözeltisine bazı maddelerin ilavesi ile beraber enzim stabilizasyonuna pozitif bir etki yaratmaktadır. İlave edilen bu maddeler polimerler (PEG, kitosan, dekstran), polioller, bazı tuzlar, şekerler, polietilenimin, organik çözücülerdir. Enzimin doğasına ve yapısına göre hangi maddenin ekleneceği tercih edilir. Enzimlerin katalizlendiği bu reaksiyonlarda eklenen maddeler enzime substratı, kofaktörü veya koenzimi gibi bağlandığı için enzime bağlanması oldukça zordur. Enzim çözeltisine ilave edilen bu maddeler enzimin üretim ve depolama aşamalarında uzun bir süre kararlı kalmasını sağlar[37], [151], [152].

4.5 Enzimlerin Kimyasal Modifikasyonları

Kimyasal modifikasyon yöntemi ile protein molekülünün stabilize edilmesi oldukça dikkat çekmesine rağmen yeterli ilgiyi görmemiştir. Enzimin fonksiyonunu ve yapısını değiştiren diğer yöntemlerin aksine, kimyasal modifikasyon yalnızca temel olan 20 aminoasit için geçerli değildir. Aminoasit yan zincirinde bu yöntem ile neredeyse sınırsız değişiklik sağlanır. Günümüzde, değişik kaynaklardan proteinlerin bileşimleri ve üç boyutlu yapıları kıyaslanarak, enzimlerin stabilitesini arttırmaya yönelik bazı kimyasal düzenlemelerle alakalı bilgiler elde edilmiştir[151].

Enzimlerin kimyasal modifikasyonu için yapılan çalışmalar şu şekildedir:

- Glutaraldehit ve başka iki fonksiyonlu olan ajanlar ile ağsılaşma
- Polimerlere aşılama
- Polisakkaritlere aşılama
- Tek fonksiyonlu olarak yer değiştirmiş proteinler

4.5.1 Tek Fonksiyonlu Olarak Yer Değiştirmiş Proteinler

Bunlar alkilleşmiş proteinler, asilatlanmış proteinler, aminoasit türevleri ve çeşitli birimleri bulunan proteinlerin modifikasyonlarını içerir. Protein moleküllerinin açilasyonu yoluyla gerçekleşen stabilizasyon üzerine yapılan çalışmalar oldukça azdır. Genellikle stabilitede gerçekleşen artış açilasyon maddesinin tipine ve sübstitüsyon miktarına bağlı olarak değişir. α-amilazın termostabilitesine etki eden açilleyici reaktifler incelendiğinde, termostabilitenin dimetil propanoil> asetil >formil> dimetil karbomoil, etoksi formil> sübstitüent yok-(NH2) sırasıyla azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca termostabilite üzerine sübstitüentlerin hidrofobisitesinin de etkisi vardır. α-amilazın yüksek zincir uzunluğu olan açil grupları ile açilasyonu sonucu, enzimlerin termal stabilitesinde düşüş gözlenmiştir.

Protein tirosil ve amino grupları, bunlar dışındaki diğer yan zincirleri büyük oranda reaksiyona girmedikçe kolay bir şekilde açillenebilir ya da fazlasıyla kararsız bir yapıdadır. Örnek vericek olursak sistein ve histidin residülerinin açilasyonu seyrek olarak gözlenmiştir. Bunun nedeni ürün kolay bir şekilde hidrolizlenebilir. Threonine ve serin hidroksil gruplarına baktığımızda sulu ortamlarda kolay bir şekilde hidrolizlenemediklerini görürüz. Bunun sebebi ise zayıf nükleofiller olmasındandır. Proteinleri açillemek amacıyla kullanılan maddelerin reaktifliği ve yapıları önemli ölçüde farklıdır. Reaktifin hızları nükleofilin sahip olduğu atak hızına bağlıdır ve tetrahedral ara ürününden karbonil-X bağının kopması sonucu gerçekleşir. Açillenme hızından pH oldukça etkilenir[164].

Proteinlerin amino grupları ile aldehit ve ketonlar tersinir ve hızlı reaksiyon verirler. Bu reaksiyonların sonucunda Schiff bazları meydana gelir. Seyreltik çözeltilerde schiff bazları çok stabildir, ancak protein amino gruplarının tam bir

modifikasyonunun gerçekleşmesi için Schiff bazlarınında daha fazla stabil olması gerekir. Bunun içinde sekonder amine indirgenmesi gerekir.

Redüktif alkilasyon, protein moleküllerinin indirgen olarak sodyumborohidrür kullanılması ile keton ve aldehit gibi alkilasyon maddeleri ile gerçekleştirilmiş olur. Protein moleküllerinin £- ve α- amino grupları kolay bir şekilde modifiye olurken diğer protein grupları bu durumdan etkilenmezler. Bazı aldehit ve keton kullanılması ile eklenen sübstitüentlerin şekli, hidrofobisitesi ve büyüklüğü kolaylıkla değiştirilebilir. Literatürde proteinlerin redüktif alkilasyon metodları mevcuttur[165], [166].

Redüktif alkilasyon ile enzim stabilizasyonuna en iyi örneklerden biri de kemotripsinin stabilizasyonudur[165], [167].

Enzim molekülünün akrolein ile modifiye olduktan sonra, NaBH4 ile Schiff bazı indirgenmiştir. Bu işlemle beraber enzimin su geçirmezliğini (hidrofobisite) koruduğu gözlenmiştir, fakat stabilizasyon derecesi yükselmiştir[167].

Kloroasetik asit, bromoasetik asit ve iodoasetik asit yaygın olarak en fazla tercih edilen protein alkilleyici reaktiflerdir. Farklı koşullarda proteinlerdeki tiyoeter, imidazol, sülfidril amino grupları ile tepkime verirler[164].

4.5.2 Polimerlere Aşılama

Enzim yüzeyi ile polimer arasında meydana gelen hidrojen bağlanmaları, molekül içi ve moleküller arası oluşan çapraz bağlanmalar enzim stabilitesini arttırmaktadır. Bağışıklık sağlayıcı özelliğe sahip olan polimer-enzim konjugat sistemler, serbest enzime göre çok daha farklı biyokimyasal özelliklere sahiptir. Proteinler ile sentetik polimerlerin gerçekleştirdiği modifikasyon in vivo ve in vitro uygulamalar için oldukça fayda sağlar. Proteinler ile polimerlerin kovalent bağlanması sonucu protein ve polimerin çözünürlük özellikleri artar ve organik olan çözücülerde çözünür durumda olurlar. Enzimlerin polimerler ile oluşturduğu konjugasyon çözeltideki kararlılığı da arttırır. PEG, bu uygulamalarda en çok tercih edilen polimerlerden biridir. Doğrusal yapıda olan ve etilen oksit monomerinin tekrarı ile meydana gelen bir polimerdir. Yapısında olan eter ve hidroksil bağları polimere suda çözünürlük ve hidrofillik sağlar. PEG kimyasal yol aracılığı ile

yapısında bulunan hidroksil grupları sayesinde aktive olabilir ve bu sayede proteinler ile etkili bir biçimde konjuge olur. PEG türleri ile gerçekleştirilen kimyasal modifikasyon enzimlerin özelliklerini arttırır ve biyoteknolojide ve biotıp bölümlerinde uygulama alanını arttırır. Modifikasyona uğrayan enzimler, sahip olduğu immünoreaktifliğini kaybeder ve böylece proteinin tedaviye gösterdigi etki artar. PEG ile gerçekleştirilen konjugasyon enzimlerin kimyasal denatüre ediciler, proteolizler ve sıcaklığa karşı stabilitesini arttırır. PEG ile modifikasyona ugramış enzimler organik olan çözücülerde çözünürlüğü arttırdığından dolayı chiral ve/veya stabil olmayan bileşiklerin sentezi ya da biotransformasyonu için kataliz olarak çalışma alanının genişlemesini sağlar[23], [151].

4.5.3 Polisakkaritlere Aşılama

Glikoproteinler, sıcaklık, denatürantlar, saklama ya da proteolize kar¸sı molekülün sahip oldugu karbonhidrat bölümünden dolayı yükselen bir stabilite gösterirler. Ayrıca glikoproteinlerin geneli suda iyi çözünürler. Böylece aktive olmuş karbonhidratlar veya polisakkaritlerin enzimlere kovalent bir bağ ile bağlanması sonucu suda çözünen kararlı duruma gelmiş enzim-polimer konjugatlarının meydana gelmesi düşünülebilir. Dogal glikoproteinlerin sahip olduğu her bir karbonhidrat zinciri tek bir bağ ile polipeptid omurgasına bağlanmıştır. Üstelik protein-sentetik polisakkarit konjugatları daha fazla molekül içi çapraz bağa sahiptir. Bu fazladan olan bağlar sayesinde doğal konformasyonda fazladan kararlılık sağlanır. Genellikle protein-polisakkarit konjugatları proteolitik enzimlerin gösterdiği etkiye karşı daha dayanıklıdırlar. Bunun bir sebebi de glikosidasyon işlemi sonrasında protein molekülünün sahip olduğu lizin residülerinin sayısında meydana gelen azalma olarak açıklanabilir. Bu sayede lizin spesifitesi olan tripsin gibi proteazlarla proteoliz sorunu oldukça azalır[23], [151].

4.5.4 Glutaraldehit ve Başka İki Fonksiyonlu Olan Ajanlar ile Ağsılaşma

En çok tercih edilen ağsılaşma ajanları glutaraldehit, disülfonilklorürler, diimidatlar ve türevleridir. Enzime, bu ajanlar aracılığı ile moleküller arası çapraz bağlanma gerçekleşir. Bu çapraz bağlanmalar sayesinde enzimi denatüre eden faktörlere karşı enzim stabilizasyonunu arttırır. Moleküller arası çapraz bağlanma işleminin sonucunda ısıl dayanıklılık farklılık gösterir. Ribonükleaz ile

dimetilsuberimidat arasında gerçekleşen çapraz bağlanma sonucunda enzim kararlılığı artar ve ısıl dayanıklılık sağlanır. Selüloz biyopolimeri; DTBP, DMA, DMS olan çapraz bağlayıcılar aracılığı ile çapraz bağlanmayı gerçekleştirdiği zaman, DTBP ve DMA ile yapılan çapraz bağlanma işlemi ile ısıl kararlılık düşer. Fakat DMS ile gerçekleşen çapraz bağlanmada ısıl kararlılık artar[23], [151].

5
MATERYAL ve YÖNTEM

5.1 Kullanılan Cihazlar, Malzemeler ve Kimyasallar

5.1.1 Kulanılan Cihazlar

Tablo 5.1 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Model
Hassas Terazi	Precise XB 220A
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR 3001
pH Metre Cihazı	Hanna HI 2211
Saf Su Cihazı	Milipore F4SN77678
Su Banyosu	GFL 1086
Vorteks	Heidolph Type REAX top
Liyofilizatör	Telstar Cryodos
UV Spektrofotometresi	Model V-530 JASCO Programı

5.1.2 Kullanılan Malzemeler

Beher: 50 ml, 100 ml, 250 ml

Mezür: 50 ml, 100 ml

Otomatik pipet: Ependorf 8-200 mikro l, 100-1000 mikro l

Pasteur pipetler

Spatül

Deney tüpleri

Flakon şişe

Manyetik karıştırıcı magnetleri

Kuvartz küvet: 1 ml

5.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 5.2 Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Maddeler	Üretici Firma	Katalog No
PEG	Sigma-Aldrich	95172
α-Amilaz	Fluka	10065
$NaIO_4$	Fluka	71862
$NaHCO_3$	Sigma-Aldrich	144-55-8
$NaBH_4$	Merck	S6177973 107
NaH_2PO_4. $2H_2O$	Riedel-de Haen	31432
Na_2HPO_4. $2H_2O$	Sigma-Aldrich	04272
Nişasta	Sigma-Aldrich	S-2630
Na-K Tartarat	Analitik Kalite	6381 59 5
3,5- Dinitrosalisilik Asit	Sigma-Aldrich	D0550
Maltoz	Sigma-Aldrich	6363-53-7
Diyaliz Membranı	Sigma-Aldrich	D9777

5.2 α-Amilaz Enziminin Aktivite Tayini

5.2.1 Tampon Çözeltiler

0,01 M Asetik Asit Tamponu (pH 4; pH 5 olan çözeltiler hazırlandı.)

0,01 M Fosfat Tamponu (pH 6; pH 7 ve pH 8 olan çözeltiler hazırlandı.)

5.2.2 %1.0 (W/V) Nişasta Çözeltisi

0.25 g/25 ml nişasta yukarıda verilen tampon çözeltilerde, bir beherde karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtıldı. Kaynama noktasında 15 dakika süreyle ısıtmaya devam edildi.

5.2.3 5.3 M Sodyum-Potasyum Tartarat

11,965 g Na-K tartarat, 8 ml 2M NaOH'de yavaş olarak sürekli karıştırma ve hafifçe ısıtarak çözüldü. Literatürde bu çözeltinin kaynama noktasına kadar kesinlikle ısıtılmaması konusunda uyarı bulunmaktadır.

5.2.4 9.6 mM 3,5-Dinitrosalisilikasid

0.4379 g 3,5-dinitrosalisilikasid 20 ml destile suda çözüldü. Çözünmeyi kolaylaştırmak için yavaş ve sürekli karıştırma ile birlikte ısıtma yapıldı. Literatürde bu çözeltinin kaynama noktasına kadar kesinlikle ısıtılmaması konusunda uyarı bulunmaktadır.

5.2.5 Renk Reaktif Çözeltisi

20ml D çözeltisine 8ml C çözeltisinin yavaş olarak ve karıştırılarak eklenmesi ile hazırlandı. Bu çözelti renkli şişede saklanmalıdır. Çözeltinin kullanılma süresi 6 aydır.

5.2.6 %0.2 (W/V) Maltoz Standard Çözeltisi

0.02 g Maltoz 10ml destile suda çözünerek hazırlandı.

5.2.7 α-Amilaz Çözeltisi

1 ünite (0,00025g) α-amilaz 1 ml destile suda çözüldü.

5.3 α-Amilaz Enzim Aktivitesinin Tayini

25°C'deki su banyosunda bekletilen test ve blank deney tüplerine 1ml nişasta çözeltisi ilave edildi. Sonrasında test tüpüne 1ml α-amilaz enzim çözeltisi eklendi, tam 3 dakika süreyle 25°C'lik su banyosunda bekletildi ve karıştırıldı. Daha sonra tüplerin her birine 1ml renk reaktif çözeltisinden eklendi. Blank tüpüne de 1ml α-amilaz enzim çözeltisinden ilave edildi ve tam 15 dakika 100°C'lik su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda çözeltiler oda sıcaklığına kadar soğutuldu. İşlemin

devamında tüplere 9ml destile su eklendi. Bu işlemler tamamlandıktan sonra UV-Vis Spektorofotometre ile test çözeltisinin 540 nm'deki absorbansı köre (blank'e) karşı okundu.

5.4 Maltoz Standartlarının Hazırlanması

Tablo 5.3 Maltoz standartlarının hazırlanması

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
Maltoz Çöz. (F)	1,2 ml	1,4ml	1,6 ml	1,8 ml	2 ml
Deiyonize Su	0,8 ml	0,6 ml	0,4 ml	0,2 ml	-
Renk Reaktifi (E)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Yukarıdaki tabloda verilen çözeltiler ve kör (blank) uygun tüplere alındı. Bu çözeltiler tam 15 dakika kaynama noktasındaki su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda çözeltiler buz banyosu kullanılarak oda sıcaklığına kadar hızla soğutuldu. Çözeltiler soğutulduktan sonra her birine 9 ml destile su ilave edildi. Her bir çözeltinin blank'e karşı 540 nm' de absorbansı okundu ve gerekli hesaplamalar yapıldı.

Amilaz aktivitesi, 1ml enzim tarafından 1 dakika içinde serbest bırakılan mg maltoz olarak ifade edildi. Spesifik aktivite, mg protein başına amilaz aktivitesi olarak gösterilmiştir.

5.4.1 Hesaplamalar

Ünite/mL enzim = (mg maltoz) (df) / X

X= Kullanılan enzim hacmi (ml cinsinden)

Df: Seyreltme faktörü

$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$

20 mg/10 ml x 1,2 ml = M_2 x 12 $M_{Std\ 1} = 0,20$

$M_{Std\ 2} = 0,23$

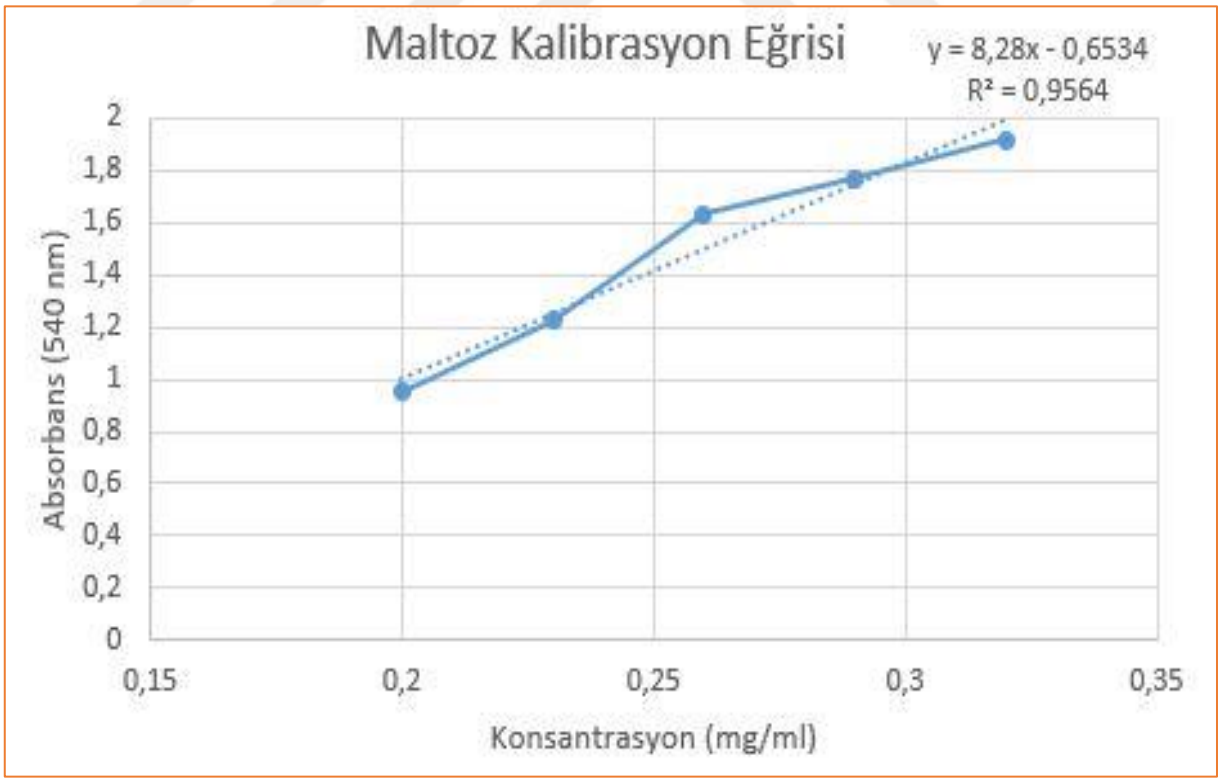
$M_{Std\ 3}$ = 0,26

$M_{Std\ 4}$ = 0,29

$M_{Std\ 5}$ = 0,32

Tablo 5.4 Maltoz standartları

Standartlar	Absorbans
Std 1	0,950
Std 2	1,224
Std 3	1,635
Std 4	1,768
Std 5	1,920



Şekil 5.1 Maltoz kalibrasyon eğrisi

5.5 PEG Aldehit Türevinin Eldesi

Kullanılan Çözeltiler

-3,33 g PEG (20.000 Da) 30 ml distile suda çözülmesiyle elde edilen çözelti.

-8 g $NaIO_4$ 70 ml distile suda çözünmesiyle elde edilen çözelti.

Deneyin Yapılışı

-$NaIO_4$ PEG çözeltisinin üzerine yavaş yavaş katılarak eklendi.

-Bu çözelti oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 24 saat boyunca karışmaya bırakıldı.

-Ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için elde edilen yükseltgenmiş PEG 24 saat boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda distile suya karşı diyalize bırakıldı.

-Ürün liyafilizatörde kurutularak aldehit grupları içeren PEG elde edildi.

5.6 Farklı Mol Oranlarında α-Amilaz-PEG Aldehit Konjugatlarının Sentezi

Gerekli miktarda PEG aldehid türevini bulunduran çözeltiye yeterli miktarda konsantre edilen α-amilaz çözeltisi eklendi ve 25°C' de 16 saat süreyle bekletildi. Bu süre sonunda oluşan Schiff bazı $NaBH_4$ eklenerek indirgendi. Çalışmada Ma = 20.000 Da olan PEG kullanılarak 1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/30, 5/1, 10/1, 20/1, 30/1 mol oranlarında konjugat sentezi gerçekleştirildi.

Bu işlemler için gerekli polimer miktarı aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$\frac{n_{protein}}{n_{polimer}} = \frac{C_{protein} \times Ma_{polimer}}{C_{polimer} \times Ma_{protein}}$$

C_{amilaz} = 1 mg/mL

Ma_{PEG} = 20.000

Ma_{amilaz} = 51.000 Oran 1/1 için;

$$\frac{1}{1} = \frac{1 \times 20.000}{C_{polimer} \times 51.000}$$

C polimer = 0,392 mg/ml

Tablo 5.5 Cprotein: 1 mg/ml konsantrasyonu sabit alınarak hesaplanan polimer (PEG) konsantrasyonları

n_{amilaz} / n_{PEG}	$C_{polimer}$ (PEG) (mg/ml)
1/1	0,392 mg/ml
1/5	1,96 mg/ml
1/10	3,92 mg/ml
1/20	7,843 mg/ml
1/30	11,76mg/ml
5/1	0,078 mg/ml
10/1	0,039 mg/ml
20/1	0,019 mg/ml
30/1	0,013 mg/ml

α-Amilaz - PEG Aldehid Konjugatı Elde Edilmesi için Uygulanan Çalışma Şeması:

2 ml enzim çözeltisi (α-Amilaz)

+

2 ml PEG Aldehit çözeltisi

↓ 250°C, 16 saat inkübatör

+ 5,6 ml (+4°C), 100 mM $NaHCO_3$; pH:8,5

↓+ 9,6 mg (1mg/ml) $NaBH_4$

15 dk karıştırma (+4°C)

↓+ 9,6 mg (1mg/ml) $NaBH_4$

15 dk karıştırma (+4°C)

↓

Saflaştırma öncesi konjugatın 280 nm'deki absorbansına bakılır.

↓

Diyaliz membran ile saflaştırma.

5.7 α-Amilaz-PEG Aldehid Konjugatının Aktivitelerinin Tayini

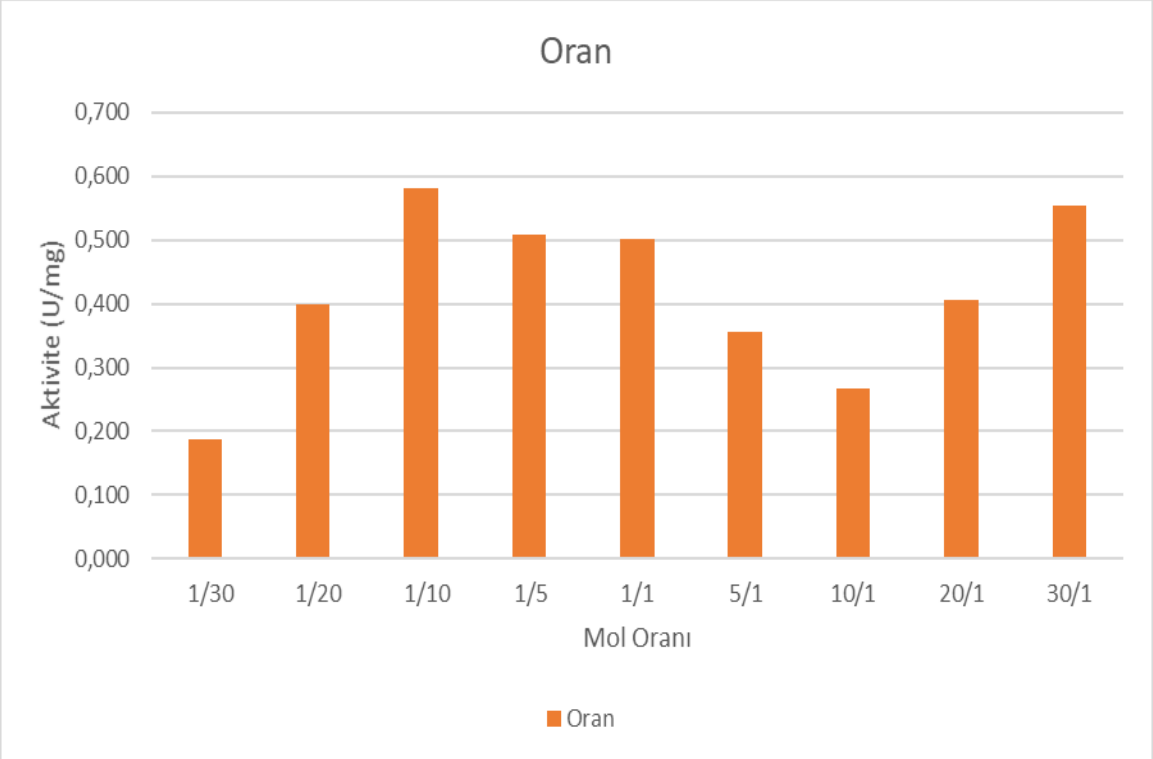
Öncelikle farklı mol oranlarında α-amilaz ve PEG konjugatlarının akitivite çalışmaları yapıldı ve sonrasında 1/10 mol oranlı α-amilaz- PEG aldehid kovalent konjugatlarının ve serbest enzimin farklı sıcaklıklarda aktiviteleri ölçülerek, bu sıcaklık aralıklarından 60°C baz alınarak termal stabilite çalışmaları yapılarak aktiviteleri tayin edildi.

6
SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1 α-Amilaz Serbest Enziminin ve α-Amilaz-PEG Aldehid Konjugatının Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

6.1.1 Farklı Oranlardaki Aktivite Sonuçları

Satın alınan α-amilaz enzimi ile PEG'in farklı oranlarda (1/10, 1/5, 1/1, 5/1, 10/1) hazırlanan konjugatlarının göstermiş oldukları aktiviteler Şekil 6.1'de gösterilmektedir.

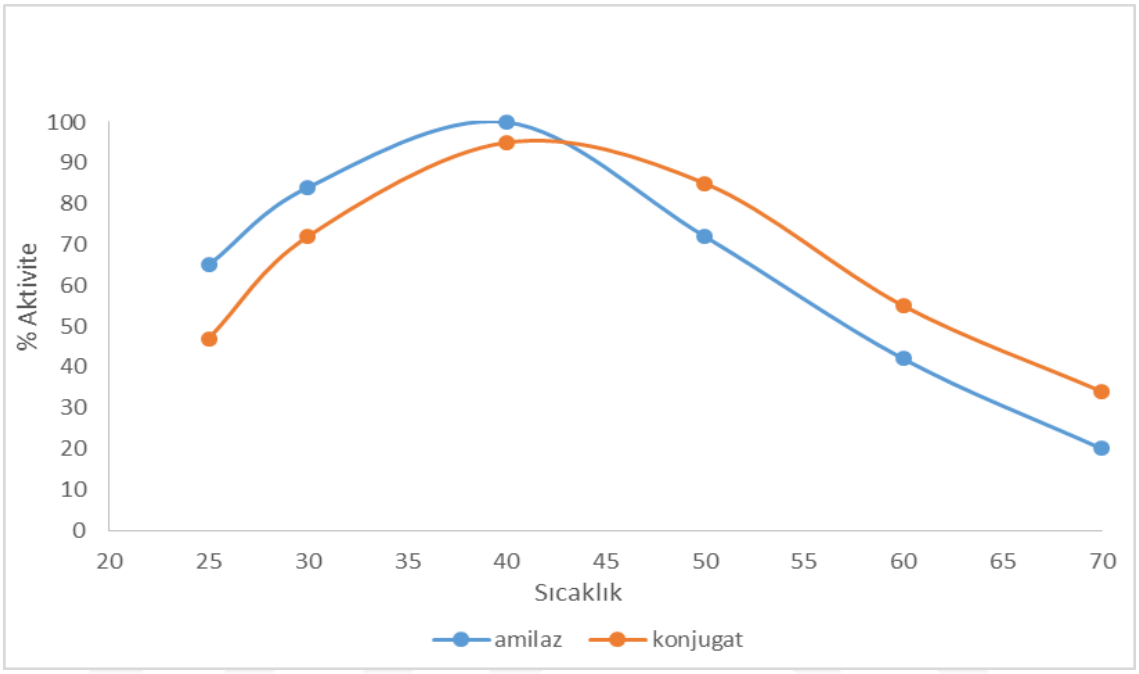


Şekil 6.1 Farklı mol oranlarındaki α-amilaz-PEG konjugatlarının aktiviteleri

Grafikten görüldüğü üzere farklı oranlarda hazırlanan konjugatlardan en yüksek aktiviteyi 1/10 oranlı kompleks gösterirken en düşük aktiviteyi 1/30 oranlı kompleks gösterdi.

6.1.2 1/10 Oranındaki α-Amilaz-PEG Aldehid Konjugatlarının Farklı Sıcaklıklardaki Aktiviteleri

Satın alınan α-amilaz enzimin ve 1/10 oranında hazırlanan α-amilaz-PEG-aldehit konjugatlarının farklı sıcaklık değerlerinde (25°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C) göstermiş oldukları aktiviteler Şekil 6.2'de gösterilmektedir.

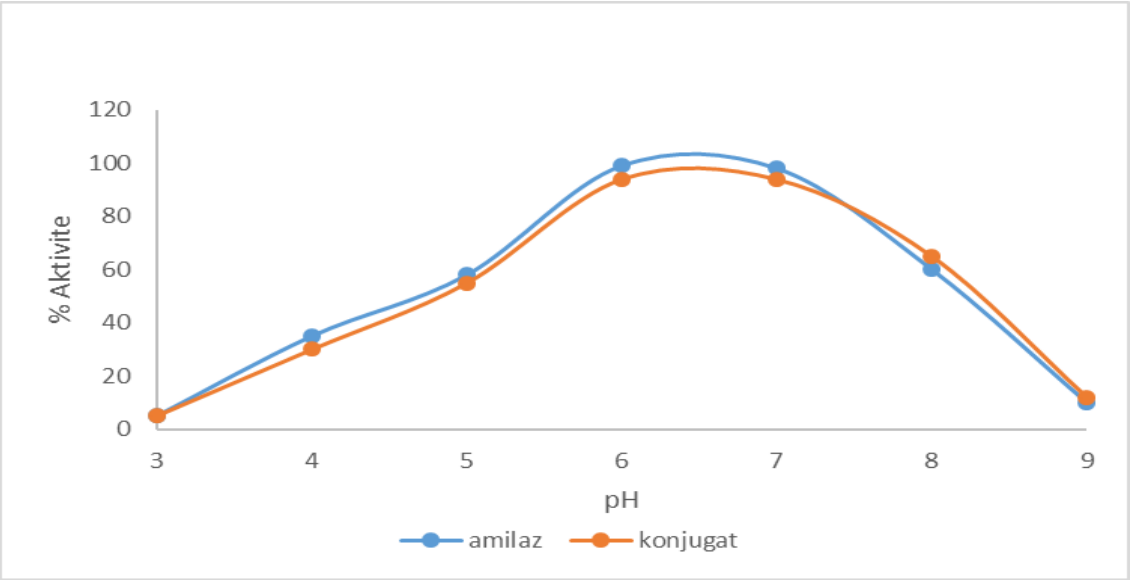


Şekil 6.2 Serbest enzim ve konjugatın farklı sıcaklıklardaki yüzde aktivite değerleri

Grafikten görüldüğü üzere α-amilaz enzimi ve konjugat, en yüksek aktivite değerini 40°C'de gösterdi. Serbest enzim ve konjugat sıcaklığa bağlı olarak birbirine benzer değişimler gösterirken yüksek sıcaklıklarda konjugatın saf enzime kıyasla daha yüksek aktivite gösterdiği gözlendi.

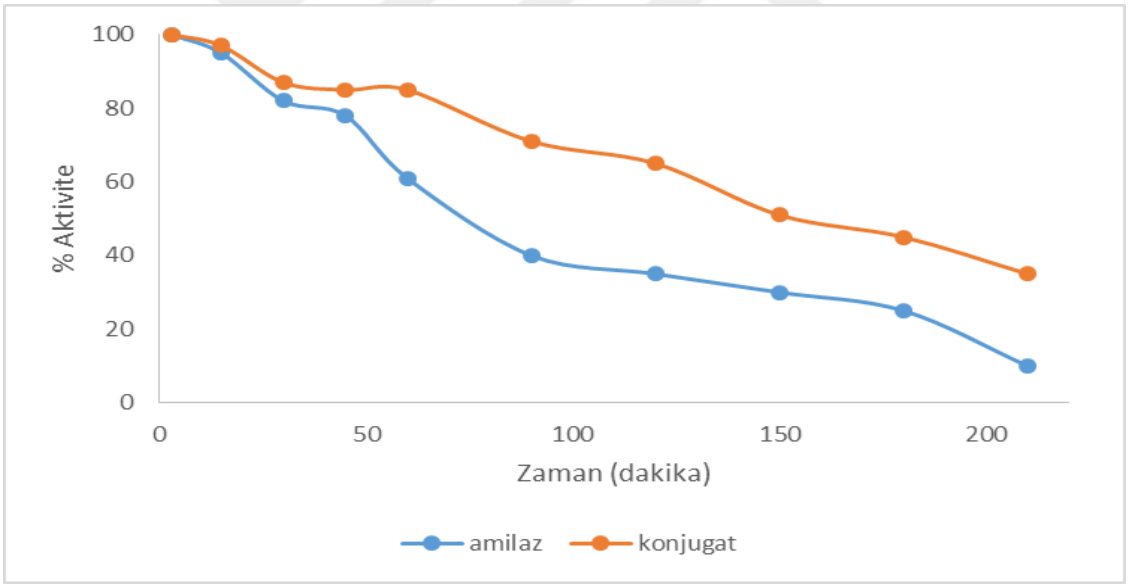
6.1.3 1/10 Oranındaki α-Amilaz-PEG Aldehid Konjugatların Farklı pH Değerlerinde Aktiviterleri

Serbest enzimin ve konjugatın 25°C'de, farklı pH değerlerindeki (pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) tampon çözeltiler içinde gösterdiği aktiviteler Şekil 6.3' de verilmektedir. Grafikten anlaşılacağı üzere, serbest enzim ve konjugat en yüksek aktivite değerini pH 6 ve 7'de göstermiştir.



Şekil 6.3 Serbest enzim ve konjugatın farklı pH değerlerindeki aktivite sonuçları

6.1.4 α-Amilaz Enziminin ve Konjugatın Termal Stabiliteleri



Şekil 6.4 Serbest enzim ve 1/10 oranlı konjugata ait termal stabilite

60°C'de zamana karşı α-amilaz enziminin ve konjugatın termal stabilite grafiği Şekil 6.3'de gösterilmiştir. Grafikten de görüldüğü üzere konjugat, serbest enzime göre daha iyi termal stabilite göstermiştir. 210 dakika sonunda serbest enzim neredeyse aktivitesini tamamen kaybederken konjugatın halen aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

6.2 Tartışma

Polimerler aracılığı ile enzimlerin modifiye edilmesinde, enzim molekülünün çevre koşullarının denatüre edici etkilerine karşı yapısal özelliklerini korumada direnen nitelik kazanması, sulu veya susuz ortamlarda tepkime katalizinde enzim etrafında meydana gelen mikro çevre oldukça önem taşımaktadır. Enzimlerin polimer molekülü ile çevrelenmesi oluşan rijid yapı termostabilitelerini arttırmaktadır. Modifiye etmek için kullanılan maddeler arasında polisakkaritler ve polietilen glikol gibi polimerler yer almaktadır.

Çalışmada α-amilaz enziminin ve sentezlenen PEG aldehid molekülünün 1/10 mol oranında kovalent konjugatları elde edildi ve diyaliz yöntemiyle saflaştırıldı.

Farklı oranlarda (1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/30, 30/1, 20/1, 10/1, 5/1) sentezlenen α-amilaz- PEG aldehid konjugatlarının 25°C'de aktiviteleri tayin edilerek aktivite sonuçları değerlendirildi. Konjugatın en yüksek aktiviteyi 1/10'da gösterdiği tespit edildi.

1/10 oranında sentezlenen α-amilaz- PEG aldehid konjugatının ve serbest enzimin farklı sıcaklık değerlerinde (25, 30, 40, 50, 60, 70°C) tayin edilen aktivite sonuçları değerlendirildi. Konjugatın serbest enzime göre daha düşük aktivite göstermesine karşın en yüksek aktiviteyi 40°C'de göstermiştir.

Serbest enzimin ve konjugatın 25°C'de, farklı pH değerlerindeki (pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) tampon çözeltiler içinde gösterdiği aktiviteler ölçülmüş ve serbest enzim ile konjugat en yüksek aktivite değerini pH 6 ve 7'de göstermiştir.

Sentezlenen α-amilaz–PEG aldehid konjugatının ve serbest enzimin 60°C'de termal stabilitesi incelenmiştir. Konjugatın serbest enzime göre daha düşük aktivite ile daha kararlı bir grafik gösterdiği gözlenmiştir.

Literatür çalışmalarına özellikle polimer oranı düşük olan konjugatların saf enzime kıyasla çok daha yüksek değerde ve geniş sıcaklık aralığında aktivite verdiği belirlendi.

Kaynakça

[1] H. Vaghari vd., "Application of Magnetic Nanoparticles in Smart Enzyme Immobilization", Biotechnol. Lett., c. 38, sayı 2, ss. 223–233, 2016, doi: 10.1007/s10529-015-1977-z.

[2] R. A. Meryam Sardar, "Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix", Biochem. Anal. Biochem., c. 04, sayı 02, 2015, doi: 10.4172/2161-1009.1000178.

[3] R. A. Sheldon ve S. van Pelt, "Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How", Chem. Soc. Rev., c. 42, sayı 15, ss. 6223–6235, 2013, doi: 10.1039/c3cs60075k.

[4] A. Wiseman, "Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd edn.", Anal. Chim. Acta, c. 184, sayı 1, s. 336, 1986, doi: 10.1016/s0003-2670(00)86504-6.

[5] S. Godfrey, T., West, Industrial enzymology. New York, 1996.

[6] W. Aehle, Enzymes in Industry Production and Applications. 2004.

[7] K. V. Weijers, S.R., Riet, "Enzyme Stability in Downstream Processing part 1: Enzyme inactivation, stability and stabilization", ss. 237–249, 1992.

[8] D. Tezi, "Kat ı Substrat Fermentasyonu ile Ham Nişastayı Parçalayan Yeni Bir Fungal Amilaz Üretimi Saflaştırılması ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi", 2008.

[9] A. AYGAN, "HALOALKALOFİL Bacillus Sp.İzolasyonu,Amilaz, Selülaz Ve Ksilan Enzimlerini Üretimi, Karakterizasyonu Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanilabilirliği", 2008.

[10] T. Kaneko, T. Ohno, ve N. Ohisa, "Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase from a Streptomyces sp. isolated in a milling factory", Biosci. Biotechnol. Biochem., c. 69, sayı 6, ss. 1073–1081, 2005, doi: 10.1271/bbb.69.1073.

[11] A. Aygan, "Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen Bacillus sp. Tarafından Alfa-Amilaz Üretimi ve Karakterizasyonu", Karaelmas Fen ve Mühendislik Derg., c. 5, sayı 2, ss. 68–74, 2015, doi: 10.7212/zkufbd.v5i2.159.

[12] X. D. Liu ve Y. Xu, "A Novel Raw Starch Digesting alfa-Amylase from A Newly Isolated Bacillus sp. YX-1: Purification and characterization", Bioresour. Technol., c. 99, sayı 10, ss. 4315–4320, 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2007.08.040.

[13] M. N. Khoo, S.L., Amirul, A.A., Kamaruzaman, M., Nazalan, N., Azizan, "Purification and characterization of alpha-amylase from Aspergillus flavus", c. 39, sayı 5, ss. 392–398, 1994.

[14] F. J. Okolo,N.B. ,Ire, S. F., Ezeogu, I. L., Anyanwu, C.U. and Odibo, "Purification and Some Properties of A Novel Rawstarch-Digesting Amylase From Aspergillus Carbonarius", ss. 329–336, 2000.

[15] D. Erarslan, A. ve Kazan, "Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri", 1999.

[16] M. M. Nelson, D.L., Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 5th baskı. New York: Worth Publisher, 2013.

[17] Ö. G. Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Biyokimya. Aktif Yayınevi, 2005.

[18] A. Demirsoy, "Genel Biyoloji/Genel Zooloji", 1989.

[19] Ç. Bilen, "Paraoksonaz Enziminin Glutaraldehit ile Immobilizasyonu ve Bazı Ağır -Metallere Karşı Afinitesinin Araştırılması", 2009.

[20] G. M. Wong, C.H. and Whitesides, Enzymes in Synthetic Organic Chemistry. Great Britain: Pergamon, 1994.

[21] W. Aehle, Enzymes in Industry Production and Applications. USA: Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, 2004.

[22] T. D. H. Bugg, Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry. Great Britain: Blackwell Science, 1996.

[23] L. lyer, P.V. and Ananthanarayan, "Enzyme Stability and Stabilization—Aqueous and Non-Aqueous Environment", c. 43(10), ss. 1019–1032, 2008.

[24] A. J. Wiley, Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, Second ed. Robert A. Copeland, c. 291, sayı 1. 2001.

[25] H. Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., Turunen, O. and Schoemaker, Industrial Use of Enzymes. UNESCO Encylopedia of Life Support Sys, 2001.

[26] M. Dixon, E. C. Webb, C. I. R. Thorne, ve K. F. Tipton, "Enzymes (Third Edition) Biology of Collagen", c. 130, sayı 1, s. 1981, 1981.

[27] J. Polaina ve A. P. MacCabe, Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. 2007.

[28] Worthington, "Manual of Clinical Enzyme Measurements", Worthingt. Publ., ss. 43–45, 1972.

[29] İ. Temiz, A. ve Saldamlı, "Enzimler", içinde Gıda Kimyası, Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1998, ss. 319–409.

[30] A. S. Park, T.G. and Hoffmann, "Thermal Cycling Effects on The Bioreactor Performances of Immobilized β-Galactosidase in Temperature Sensitive Hydrogel Beads", 1993.

[31] F. Shuler, M.L. and Kargi, Bioprocess Engineering: Basic Concepts, Second Edi. Prentice-Hall International Editions.

[32] M. Özata, A. ve Kutlu, Enzimoloji Ders Notları. Eskişehir: T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları, No:1254, Fen Fakültesi Yayınları, No:15, 2000.

[33] M. Elzigna, Methods in Protein Sequence Analysis. New Jersey: Humana Press, 1982.

[34] N. Tekman, S. ve Öner, “Genel Biyokimya Dersleri”, ss. 341–356, 1994.

[35] “Yeni Biyoloji, Apoenzim Nedir? Holoenzim Nedir?, http://www.yenibiyoloji.com/apoenzim-nedir-holoenzim-nedir-4269/,15.09.18.” .

[36] P. D. Boyer, The Enzymes. New York: Academic Press Inc, 1970.

[37] G. Vardar, “Yeni Enzim Polimer Konjugatlarına Dayalı Glukoz Biyosensörü Hazırlanması ve Uygulamaları”, 2014.

[38] C. Chaplin, M.F. and Bucke, Enzyme Technology. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.

[39] S. Cernia, E., Deflini, M., Cocco, E., Palocci, C. and Soro, “Investigation of Lipase-Catalysed Hydrolysis of Naproxen Methyl Ester: Use Of NMR Spectroscopy Methods To Study Substrate–Enzyme Interaction”, ss. 276–284, 2002.

[40] V. W. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell, Harper’s Illustrated Biochemistry, 26th baskı. New York: McGraw-Hill, 2014.

[41] R. Seriner, “Katalaz Enziminin Hıyardan Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi”, 2010.

[42] R. B. Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. and Jackson, Campbell Biology, 10th baskı. New York: Person Higher ED, 2013.

[43] C. Petrucci, R.H., Herring, F.G., Madura, J.D. and Bissonnette, General Chemistry, 10st baskı. Pearson Inc, 2011.

[44] A. Radzicka ve R. Wolfenden, “A proficient enzyme”, Science (80-.)., c. 267, sayı 5194, ss. 90–93, 1995, doi: 10.1126/science.7809611.

[45] D. R. Champe, P.C., Harvey, R.A. and Ferrier, Biochemistry, 3rd Ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2005.

[46] E. J. Pyler, Baking Science and Technology. Chicago, 1952.

[47] F. Pamuk, Biyokimya, 1. Baskı. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Ankara: Gazi Kitabevi, 2000.

[48] N. Altan, Biyokimya. Ankara: Palme Yayıncılık, 2000.

[49] B. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. and Chauhan, “Microbial alfa-Amylases: A Biotechnological Perspective”, içinde Process Biochemistry, 2003, ss. 1599–1616.

[50] A. A. and G. O. A. Burhan, U. Nisa, C. Gokhan, C. Omer, Process Biochemistry. 2003.

[51] D. F. Bailey, J. E. and Ollis, Biochemical Engineering Fundamental. Mc Graw-Hill Book Company, 1986.

[52] J. M. Zeman, N.W. and McCREA, “Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism”, Cereal Foods World, c. 30, sayı 1, ss. 777–780, 1985.

[53] and C. J. . . F. Oliveira, A.N; Oliveira, L.A; Andra de, J.S., "Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates", Brazilian J. Microbiol., c. 38, sayı 2, ss. 208–216, 2007.

[54] F. K. JOHN, Enzyme TechnoIogy. New York, 1987.

[55] J. A. RADLEY, Production of Microbial Amylolytic Enzymes : Starch Production Technology. England: Applied Science Publisher Ld., 1976.

[56] P. Vihinen, M. and Mäntsälä, "Microbial amylolytic enzymes", Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., c. 24, ss. 329–418, 1989.

[57] H. Keskin, Besin Kimyası. İstanbul: Fatih Yayınevi, 1982.

[58] I. JOHN, W., and SONS, Industrial Enzymes and Their Applications. United States of Amerika, 1998.

[59] J. P. Swift, H. J., Brady, L., Defwenda, Z. S., Dodson, J. and Turkenburg, "No Title", Acta Crystallogr., c. 47, s. 535, 1991.

[60] Ö. Öztolan, "Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarinin Sentezi ve Karakterizasyonu", Yildiz Tek. Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2007.

[61] İ. S. Igarashi, K., Hatada, Y., Iiagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, S., and Kobayashi, T, "Enzymatic Properties of a Novel Liquefying a-Amylase from an Alkaliphilic Bacillus Isolate and Entire Nucleotidc and Amino Acid Sequences", Appl. Environ. Microbiol., c. 64, sayı 9, ss. 3282–3289, 1998.

[62] K. P. BAJPAI, P., and BAJPAI, "High- Temperature Alkaline a-Amylase from Bacillus licheniformis TCRDC-B13", Biotechmlogy Bioeng., c. 33, ss. 72–78, 1987.

[63] F. Quian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee E. and Payan, "The Active Center of a Mammalian α-Amylase. Structure of the Complex of a Pancreatic α-Amylase with a Carbohydrate Inhibitor Refined to 2.2-A°", içinde Biochemistry, 1994, ss. 6284–6294.

[64] C. Decklerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R. and Gaillardin, "Probing Structural Determinants Specifying High Thermostability in Bacillus licheniformis α- Amylase", J. Mol. Biol., c. 301, ss. 1041–1057, 2000.

[65] E. FISCHER, Edmond. and STEINT, "The Resistance Of A-Amylases Towards Proteolytic Attack", Biochem. Univ. Washington, Seattle, Washingt.

[66] H. Ishikawa, K., Matsui, I., Kobayashi, S., and Nakatani, Biochemistry. 1990.

[67] R. Kadziola, A., Sùgaard, M., Svensson, B. and Haser, "Molecular Structure of a Barley α-Amylase-Inhibitor Complex: Implications for Starch Binding and Catalysis", J. Mol. Biol., c. 278, ss. 205–217, 1998.

[68] M. KANNO, "Bacillus acidocaldorius α-amylase that is highly stable to heat under acidic conditions", Agric. Biol. Chem., c. 50, sayı 1, ss. 23–31, 1986.

[69] T. Hidaka, H. and Adachi, "Studies on the α-amylase from Streptomyces hygroscopicus", 1980.

[70] M. L. Y. and T. N. Johnson R.M., Biopolymers, 1st Ed. Shrewsbury: Rapra Technology Inc., 2003.

[71] K. Ishikawa, K., Matsui, I., Kobayashi, S., Nakatani, H., and Honda, "Substrate Recognition at the Binding Site in Mammalian Pancreatic α-Amylases", içinde Biochemistry, 1993, ss. 6259–6265.

[72] T. V. Nielsen, J.E. and Borchert, "No Title", Biochim. Biophys. Acta, c. 1543, ss. 253–274, 2000.

[73] D. Azra, "Üreaz Enziminin Çeşitli Polimerlerle Modifikasyonu", Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilim. Enstitüsü, İstanbul., 2016.

[74] G. Odian, Principles of Polymerization, Fourth Edi. A JOHN WILEY & SONS, INC. PUBLICATION, 2004.

[75] E. G. Canbaz, "Biyopolimer/Kil Nanokompozitlerinin Üretimi ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilim. Enstitüsü, İstanbul, 2008.

[76] M. Saçak, Polimer Kimyası. Ankara: Gazi Kitabevi, 2010.

[77] M. Saçak, Polimer Kimyasına Giriş. Ankara: A.Ü.F.F. Döner Sermaye İşletmesi Yayınları, 1998.

[78] E. Çiğdem, "Nisastanin A,B-Doymamis Monomerlerle Modifikasyonu İle Asi Polimerinin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Absorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi", T.C. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 2005.

[79] E. Ataman, "Biyolojik Jellerde Difüzyon Mekanizmaları", Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilim. Enstitüsü, İstanbul, 2006.

[80] S. M. Visch, "Biopolymers; What Is Their Place in Future Society in Relation with Sustainable Design", Sustain. Des. Rep., 2002.

[81] Ç. Dursun, "Effect of Different Types of Biopolymers on Mechanical and Durability Properties of Cement Mortar", Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilim. Ensitüsü, Manisa, 2013.

[82] C. Griggs, "Modified Biopolymers as an Alternative to Petroleum-based Polymers for Soil Modification", Environ. Energy Secur. Sustain. Symp. Exhib., 2010.

[83] A. K. Mohanty, Natural Fibers, Biopolymers and Biocomposites. CRC Press, 2005.

[84] B. Seviour, R.J., and Kristiansen, "Effect of Ammonium Ion Concentration on Polysaccharide Production by Aureobasidium Pullulans In Batch Culture", Appl. Microbiol. Biotechnol., c. 17, ss. 178–181, 1983.

[85] T. F. Etemadi, O., Petrisor, I.G., Kim, D., Wan, M.W., and Yen, "Stabilization of metals in subsurface by biopolymers: Laboratory drainage flow studies", Soil Sediment Contam. An Int. J., c. 12, sayı 5, ss. 647–661, 2003.

[86] M. Fatholahzadeh, "Utulization off Class Fly Ashes Improved by Biopolymers for Impermeable Liner", Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilim.

Ensitüsü, Erzurum, 2013.

[87] P. Van de Velde, K. ve Kiekens, “Biopolymers: Overview of Several Properties and Consequences on Their Applications”, Polym. Test., c. 21, sayı 4, ss. 433–442, 2002.

[88] G. W. Margaritis, A., and Pace, Microbial polysaccharide. New York, Pergamon: Comprehensive biotechnology, 1985.

[89] M. P. Stevenson, Polymer Chemistry an Introduction. New York: Oxford University Press, 1999.

[90] F. Münzberg, J., Rau, U., and Wagner, “Investigations on regioselective hidrolysis of a branched β-1,3-glucan”, c. 27, ss. 271–276, 1995.

[91] M. Niaounakis, Biopolymers: Processing and Products, 1st Ed. San Diego, 2014.

[92] R. Chandra, R., and Rustgi, “Biodegradable Polymers”, içinde Progress in Polymer Science, 1998, s. 1273.

[93] J. Enderle, J., Blanchard, S. and Bronzino, Biomaterials: Properties, Types and Applications, Introduction to Biomedical Engineering. San Diego, California: Academic Press, 2005.

[94] G. Erdoğan, “Enzim ve Biyopolimer Modifikasyonları”, Lisans Bitirme Tezi, YTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi, İstanbul, 2015.

[95] R. and F. D. Champe, P.C., Harvey, Biochemistry, 5rd Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Inc., 2011.

[96] H. A. Krässig, “Cellulose: Structure, Accessibility and Reactivity. Gordon and breach science publishers (Polymer Monographs.)”, c. 11, 1993.

[97] A. Arslan, “Selülaz-Dekstran Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu”, 2007.

[98] C. B. Purves, “Chemical Nature of Cellulose and Its Derivatives”, içinde In: Cellulose and Cellulose Derivatives, M. W. Spurlin, H.M.and Grafflin, Ed. New York, 1954, ss. 29–98.

[99] M. Kırcı, H., Ateş, S. ve Akgül, “Selüloz Türevleri ve Kullanım Yerleri”, Fen ve Mühendislik Derg., c. 4, sayı 2, ss. 119–130, 2001.

[100] A. C. Osullivan, “Cellulose: The Structure Slowly Unravels”, c. 4, ss. 173–207, 1997.

[101] A. Sarko, “What is the crystalline structure of cellulose”, TAPPI J., c. 61, sayı 2, ss. 59–61, 1978.

[102] B. Orhan, “Pamuklu Tekstil Atiklarindan Selüloz Eldesi, Hidroksietil Selüloz Sentezi, Karakterizasyonu Ve Kullanim Alanlarinin Araştirilmasi”, T.C. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 2015.

[103] P. Karlson, Introduction to Modern Biochemistry, 4th Ed. Stuttgart: Elsevier, 1975.

[104] A. Gülsu, "Biyopolimer Bazlı Biyosorbent Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyoafinite Uygulamaları", Doktora Tezi, Muğla Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü, Muğla, 2011.

[105] M. Gümüşderelioğlu, "Biyomalzemeler", Bilim ve Tek. Derg. Temmuz Sayısı Eki, ss. 8–11, 2002.

[106] L. Agullö, E., Rodríguez, M.S., Ramos, V., and Albertengo, "Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food", içinde Macromolecular Bioscience, 2003, ss. 521–530.

[107] P. Kutlu, "Modifiye Kitosan Kompozitleri Üzerinde Lakkaz İmmobilizasyonu, Karakterizasyonu ve İmmobilize Enzim ile Tekstil Boyalarının Giderim Kinetiğinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü, Manisa, 2015.

[108] E. Khor, Chitin, Fulfilling a Biomaterials Promise. Dept. Of Chemistry, National Univercity of Singapore, Rep. Of Singapore, 2001.

[109] C. T. Tang, W.J., Fernandez, J.G., Sohn, J.J. and Amemiya, "Chitin is endogenously produced in vertebrates", Curr. Biol., c. 25, ss. 897–900, 2015.

[110] Z. Demir, "Aculepeira Ceropegia (Walckenear, 1802) (Araneae: Araneidae) Türünde Kitin ve Kitosan İzolasyonu ve Fizikokimyasal Karakterizasyonu", T.C. Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dali, Yüksek Lisans Tezi, 2017.

[111] W. Y. Guang, "The Effect of Chitosan and its Derivatives on the Dyeability of Silk", Hong Kong Polytech. Univ. Dr. Thesis, Hong Kong, 2002.

[112] S. M. Barış, "Antikolinesteraz İlaç Piridostigmin Bromürün Kitosan/Sodyum Aljinat Emulsiyon Çapraz Bağlı ve Kitosan/Metil Selüloz İç İçe Geçmiş Ağ Yapılı Mikroküre lerden Salımı", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü, Ankara, 2011.

[113] S. H. Lim, "Synthesis Of A Fiber-Reactive Chitosan Derivative And its Application to Cotton Fabric as an Antimicrobial Finish and a Dyeing-Improving Agent", 2002.

[114] Ç. Dursun, "Farkli Tip Biyopolimerlerin Çimento Harci Mekanik ve Durabilite Özelliklerine Etkisi", Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2013.

[115] Y. Gökçe, "Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi", 2008.

[116] E. Tarım, "Kitosan ile Sulu Çözeltilerden Krom Uzaklaştırması", 2011.

[117] C. L. and L. L. Liu H., Xie F., Yu L., "Thermal Processing of Starch- Based Polymers", içinde Progress in Polymer Science, 2009, ss. 1348–1368.

[118] H. Köksel, "Karbonhidratlar", içinde Gıda Kimyası, 3.baskı., İ. Saldamlı, Ed. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2005, ss. 49–132.

[119] J. A. Eerlingen, R.C. and Delcour, "Formation, Analysis, Structure and Properties of Type III Enzyme Resistant Starch", J. Cereal Sci., c. 22, ss. 129–138, 1995.

[120] Preiss, J., Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon and A., Colonna, P., "From Glycogen to Amylopectin: A Model For The Biogenesis of The Starch Granule", c. 86, ss. 349–352, 1996.

[121] R. G. F. Ball, S.G., van de Wal M.H.B.J. and Visser, "Progress in understanding the biosynthesis of amylose", Trends Plant Sci., c. 3, sayı 12, ss. 462–467, 1998.

[122] Seidel, C., Kulicke, W.M., Hess, C., Hartmann, B., Lechner, M.D., and Lazik, W., "Synthesis and Characterization of Cross-linked Carboxymethyl Potato Starch Ether Gels, Starch/Stärke", c. 56, ss. 157–166, 2004.

[123] R. C. Hoseney, Principles of Cereal Science and Technology. St. Paul, Minnesota, USA: AACC Inc, 1994.

[124] Shi, Y.-C., Capitani, T., Trzasko P. and Jeffcoat R., "Molecular Structure of a Low-Amylopectin Starch and Other High-Amylose Maize Starches", J. Cereal Sci., c. 27, ss. 289–299, 1998.

[125] Garcia-Alonso A., Jimenez-Escrig, A., Martin-Carron, N., Bravoa, L. and Saura-Calixto, F., "Assessment of Some Parameters Involved in The Gelatinization and Retrogration of Starch", Food Chem., c. 66, ss. 181–187, 1999.

[126] Yoshimoto, Y., Tashiro, J., Takenouchi, T. and Tekeda Y., "Molecular structure and Some Physicochemical Properties of High-Amylose Barley Starches", Cereal Chem., c. 77, sayı 3, ss. 279–285, 2000.

[127] Chung, H.-J., Jeong, H.-Y. and Lim, S.-T., "Effects of Acid Hydrolysis and Defatting on Crystallinity and Pasting Properties of Freeze-Thawed High Amylose Corn Starch", Carbohydr. Polym., c. 54, ss. 449–455, 2003.

[128] Sakharam, K.P., "Resistant Starches as Low-carb Ingredients-Current Applications and Issues", Cereal Foods World, c. 49, sayı 292–294, 2004.

[129] Andersson, L., "Studies on starch structure and the differential properties of starch branching enzymes", Dr. thesis, Swedish Univ. Agric. Sci. Uppsala, c. 13, 2001.

[130] Tester, R.F., Karkalas, J. and QI, X., "Starch Structure and Digestibility Enzyme-Substrate relationship", World's Poult. Sci. J., c. 60, ss. 186–195, 2004.

[131] A. M. Smith, "The Biosynthesis of Starch Granules", içinde Biomacromolecules, 2001, ss. 335–341.

[132] Jobling, S., "Improving starch for food and industrial applications", Curr. Opin. Plant Biol., c. 7, ss. 210–218, 2004.

[133] S. D. Dennis, D.T. and Blakeley, "In Biochemisty & Molecular Biology of Plants", içinde Carbohydrate metabolism, W. G. and R. L. J. Bob B. Buchanan, Ed. American Society of Plant Biology, 2000, ss. 630–675.

[134] Singh, N., Sandhu, K.S. and Kaur, M., "Physicochemical properties ıncluding granular morphology, amylose content, swelling and solubility, thermal and pasting properties of starches from normal, waxy, high amylose and sugary corn", Prog. Food Biopolym. Res., c. 1, ss. 44–54, 2005.

[135] J. Preiss, "Modulation of Starch Synthesis", içinde In A Molecular Approach to Primary Metabolism in Higher Plants, Christine H. Foyer and W. Paul Quick, Ed. Taylor & Francis, 1998.

[136] Y. Kodera, Y., Matsushima, A., Hiroto, M., Nishimura, H., Ishii, A., Ueno, T., and Inada, "Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications", Prog. Polym. Sci., c. 23, ss. 1233–1271, 1998.

[137] Bankar, S.B. Bule, M.V. Singhal, R.S. and Ananthanarayan, L., "Glucose oxidase—an overview", Biotechnol. Adv., c. 27, ss. 489–501, 2009.

[138] R. B. Haris, J.M., and Chess, "Effect of pegylation on pharmaceuticals", Nat. Rev., c. 2, ss. 214–221, 2003.

[139] Bayındır, Z.S. ve Yüksel, N., "Pegilasyon: PEG Konjugatlarının Hazırlanması ve Uygulamaları", Ankara Ecz. Fak. Derg, c. 36, sayı 4, ss. 249–266, 2007.

[140] G. Pasut, "Polymers for Protein Conjugation", içinde Polymers, 2014, ss. 160–178.

[141] Leskovac, V. Trivić, S. Wohlfahrt, G. Kandrač, J. and Peričin, D., "Glucose oxidase from Aspergillus niger: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors", Int. J. Biochem. Cell Biol., c. 37, ss. 731–750, 2005.

[142] Ak, G., "Folat-PEG-doxorubicin Türevinin Sentezlenerek Teknesyumla İşaretlenmesi ve Kanser Görüntüleme Ajanı Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması", Fen Bilim. Enstitüsü. İzmir Ege Üniversitesi., 2010.

[143] İçli, N., "İmmobilize Glukoz Oksidaz Enzimin Özellikleri ve Enzim Aktifliğinin Artırılması", Yüksek Lisans Tezi, G.Ü. Fen Bilim. Enstitüsü, Ankara, 2008.

[144] R. M. Sawant, "Polyethylene Glycol (PEG) As A Key Component Of Long Cırculating Delivery Systems For Therapy And Imaging", Pharm. Sci. Diss. Bost. Northeast. Univ., 2008.

[145] Balcão, V.M. and Vila, M.M.D.C., "Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art", Adv. Drug Deliv. Rev., 2014.

[146] G. Veronese, F.M., and Pasut, "PEGylation,successful approach to drug delivery", Drug Discov. Today, c. 10, sayı 21, ss. 1451–1458, 2005.

[147] F. M. Caliceti, P., and Veronese, "Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)–protein conjugates", Adv. Drug Del. Rev., c. 55, ss. 1261–1277, 2003.

[148] P. P. Na, D.H., Lee, K.C., and DeLuca, "PEGylation of Octreotide: II. Effect of N-terminal Mono-PEGylation on Biological Activity and Pharmacokinetics", Pharm. Res., c. 22, sayı 5, ss. 743–749, 2005.

[149] A. Erarslan, "Enzim Stabilizasyonu Notları", s. 41, 2005.

[150] L. Çelebi, S., İbibikcan, E., Kayahan, S. K., Yiğitsoy, B. and Toppare, "Immobilization of ınvertase in copolymer of 2,5-di(thiophen-2-yl)-1-p-tolyl-1hpyrrole", J. Macromol. Sci. Part A, c. 46, sayı 8, ss. 739–744.

[151] M. R. Gianfreda, L. and Scarfi, "Enzyme Stabilization: State of the Art", içinde

Molecular and Cellular Biochemistry, 1991, ss. 97–128.

[152] S. A. Costa, T. Tzanov, A. Filipa, A. Paar, ve G. M. Gu, "Studies of stabilization of native catalase using additives", c. 30, ss. 387–391, 2002.

[153] H. Karadağ, "Soya Fasulyesi Lipoksijenazının Poliakrilamid Jel Üzerine İmmobilizasyonu", ss. 26–28, 2001.

[154] C. Aksoy, "Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu", ss. 26–28, 2003.

[155] M. Y. Arica, "Epoxy-derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization: Covalently bound urease in a continuous model system", c. 77, sayı 9, ss. 2000–2008, 2000.

[156] W. H. Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. and Scounten, Immobilizations Methods, Solid Phase Biochemistry. New York: New York Press, 1995.

[157] W. H. Pitcher, "G. B. Broun et al. (eds.)", ss. 67–68, 1978.

[158] G. Bayramoglu, T. Doz, V. C. Ozalp, ve M. Y. Arica, "Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes : Kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis Improvement stability and performance of invertase via immobilization on to silanized and polymer brush grafted", Food Chem., c. 221, sayı March, ss. 1442–1450, 2004.

[159] E. Çalcı, "Biyospesifik Enzim İmmobilizasyon Teknikleri ile A- Galaktozidaz Enziminin İmmobilizasyonu", 2013.

[160] M. Dimitriu, S., Popa, M. and Dimitriu, "Polymeric Biomaterials as Enzyme and Drug Carriers", J. Bioact. Compat. Polym., c. 3, ss. 243–321, 1988.

[161] F. Brena, B.M. and Batista-Viera, Immobilization of Enzymes and Cells, 2nd Ed. New York: Springer, 2006.

[162] F. Hürrem, "Katalazın Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarını (Clea) Oluşturma Yöntemiyle İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu", 2010.

[163] A. Illanes, "Stability of Biocatalysts", Process Biotechnol., 1999.

[164] Means G.E. and Feeney R.E., "Chemical Modification of Proteins", Holden-Day, Inc, 1971.

[165] G. E. Means, "Reductive alkylations of amino groups", içinde Methods in Enzymology, C. H. W. H. and S. N. T. Eds, Ed. New York: Academic Press, 1997, ss. 469–479.

[166] Jenfont, N., and Dearborn, D.G., "Protein labelling by reductive alkylation", içinde in 'Methods in Enzymology, C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, Ed. New York: Academic Press, 1983, ss. 570–579.

[167] I. V. Martinek, K., Mozhaev, V.V. and Berezin, "Stabilization and reactivation of enzymes", içinde Enzyme Engineering-Future Directions, I. V. B. & A. A. K. E. L.B. Wingard, Ed. New York: Plenum Press, 1980, ss. 3–54.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: mervealbayrak04@hotmail.com

Bildiri

1. Albayrak, M., Vardar, G., Altıkatoğlu, M., (2018). ‘‘Alfa Amilaz Enzimin Polietilen Glikol ile Stabilizasyonu’’,12. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 5-7 Eylül 2018, İzmir.