

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

129473

ALDEHİT DEKSTRAN SÜLFAT'IN ALFA-AMİLAZ VE  
MUCOR MİEHEİ RENNET ENZİMLERİ İLE SUDA  
ÇÖZÜNEN KOVALENT KONJUGATLARININ HPLC  
YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KONTROL  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

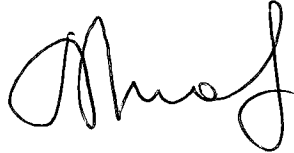
Hayrettin ÖZER

FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında  
Hazırlanan

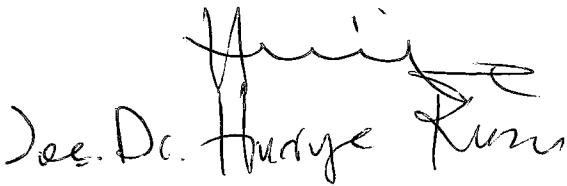
YÜKSEK LİSANS TEZİ

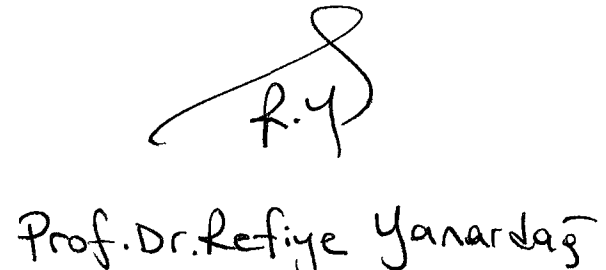
129473

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE



İSTANBUL, 2002

  
Doç. Dr. Hüseyin Kuru

  
Prof. Dr. Refiye Yanardağ

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ .....	i
KISALTMA LİSTESİ .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ .....	iii
ÇİZELGE LİSTESİ .....	x
ÖNSÖZ .....	xii
ÖZET .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1 GİRİŞ .....	1
2 TEORİK KISIM .....	3
2.2 Genel Bilgi .....	3
2.2 $\alpha$ -Amilaz enzimi .....	3
2.2.1 Amilaz Familyasının Etkilediği Substratlar .....	4
2.2.1.1 Nişasta .....	4
2.2.1.2 Glikojen .....	5
2.2.2 $\alpha$ -Amilazın Etki Mekanizması .....	6
2.2.3 $\alpha$ -Amilazın Molekül Yapısı ile İlgili Özellikler .....	6
2.3 Mucor <i>miehei</i> Rennet (EC 3.4.23.6) .....	8
2.3.1 Peynir Üretimi .....	10
2.3.1.1 Sütün Özellikleri .....	10
2.3.1.2 Peynir Eldesi .....	12
2.3.1.3 Peynir Üretiminde Kullanılan Proteazlar .....	13
2.4 Enzim-Polielektrolit Kompleksleri .....	14
2.5 HPLC Sistemi .....	16
2.5.1 Prensip .....	16
2.5.2 HPLC Sisteminin Teknik Özellikleri .....	16
2.5.2.1 Modüler Sistem .....	16
2.5.2.2 Entegre Sistem .....	17
2.5.3 HPLC Sistemi Üniteleri .....	17
2.5.3.1 Solvent Besleme Ünitesi .....	17
2.5.3.2 Enjeksiyon Bloku .....	18
2.5.3.3 Kolon .....	18
2.5.3.4 Dedektör .....	20
3 DENEYSEL KISIM .....	22
3.1 Kullanılan Cihazlar .....	22
3.2 Kullanılan Kimyasallar .....	22
3.3 Kullanılan Sarf Malzemeler .....	22
3.4 Örnek Hazırlama ve Enjeksiyon .....	23
3.4.1 Bovin Serum Albumin .....	23

3.4.1.1	BSA enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi	23
3.4.1.2	BSA enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi	34
3.4.2	$\alpha$ -Amilaz enzimi	46
3.4.2.1	Saf $\alpha$ -Amilaz enzimi enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi	46
3.4.2.2	Saf $\alpha$ -Amilaz enzimi enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi	51
3.4.2.3	Polimer miktarı sabit olan $\alpha$ -Amilaz – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi	56
3.4.2.4	Polimer miktarı sabit olan $\alpha$ -Amilaz – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi	64
3.4.2.5	UV dedektörde $\alpha$ -Amilaz-polimer çözeltisindeki $\alpha$ -Amilaz ile saf $\alpha$ -Amilaz arasında karşılaştırma	71
3.4.2.6	RI dedektörde $\alpha$ -Amilaz-polimer çözeltisindeki $\alpha$ -Amilaz ile saf $\alpha$ -Amilaz arasında karşılaştırma	74
3.4.2.7	$\alpha$ -Amilaz miktarı sabit olan $\alpha$ -Amilaz – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi	77
3.4.2.8	$\alpha$ -Amilaz miktarı sabit olan $\alpha$ -Amilaz – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi	85
3.4.3	Rennet enzimi	92
3.4.3.1	Saf rennet enzimi enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi	92
3.4.3.2	Saf rennet enzimi enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi	97
3.4.3.3	Polimer miktarı sabit olan Rennet – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi	102
3.4.3.4	Polimer miktarı sabit olan Rennet – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi	110
3.4.3.5	UV dedektörde Rennet-polimer çözeltisindeki Rennet ile saf Rennet arasında karşılaştırma	117
3.4.3.6	RI dedektörde Rennet-polimer çözeltisindeki Rennet ile saf Rennet arasında karşılaştırma	120
3.4.3.7	Rennet miktarı sabit olan Rennet – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi	123
3.4.3.8	Rennet miktarı sabit olan Rennet – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi	130
4	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	136
	KAYNAKLAR	138
	ÖZGEÇMİŞ	140

## SİMGE LİSTESİ

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\lambda$	Dalga boyu
mg	Miligram
$\mu$ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
s	Saniye
ns	Nanosaniye
pI	İzoelektrik nokta
$M_w$	Moleküler ağırlık
PK	Disosiasyon sabiti



## KISALTMA LİSTESİ

TR	Time Resolve
E.C.	Enzyme Classification
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
MCA	Milk Clotting Activity
PA	Proteolitic Activity
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-Page	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TRES	Zaman Ayrımlı Floresans Spektrumu
TEMED	N,N,N',N'-tetra metilen diamin
CZE	Sürekli Bölge Elektroforezi
LA	Laktik Asit
Asp	Aspartik Asit
Thr	Treonin
Arg	Arginin
Cyc	Sitozin
Ala	Alanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Glu	Glutamik Asit
Met	Metiyonin
Val	Valin
Phe	Fenil Alanin
His	Histidin
Trp	Triptofan
Lys	Lizin
Ile	İzolösün
Leu	Lösün
Tyr	Tirozin
Gly	Glisin
Ala <sub>29</sub>	29 tane alanin amino asidi
BSA	Bovin Serum Albumin
RID	Refraktif İndeks Dedektör
UV	Ultra Viyole
HPLC	Yüksek Basınçlı (Performanslı) Sıvı Kromatografisi

## ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa
Şekil 2.1	Amiloz .....	5
Şekil 2.2	Amilopektin .....	5
Şekil 2.3	Aspergillus oryzae $\alpha$ -Amilazının aminoasid dizilişi .....	7
Şekil 2.4	Laktoz Molekülü .....	12
Şekil 2.5	Kolon dolgu maddeleri .....	19
Şekil 2.6	Genel HPLC sistemi .....	21
Şekil 3.1	UV dedektör ile 280 nm'de %0,01'lik BSA çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	24
Şekil 3.2	UV dedektör ile 280 nm'de %0,01'lik BSA çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	24
Şekil 3.3	UV dedektör ile 280 nm'de %0,01'lik BSA çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	25
Şekil 3.4	UV dedektör ile 280 nm'de %0,01'lik BSA çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	25
Şekil 3.5	UV dedektör ile 280 nm'de %0,01'lik BSA çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	26
Şekil 3.6	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik BSA çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	26
Şekil 3.7	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik BSA çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	27
Şekil 3.8	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik BSA çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	27
Şekil 3.9	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik BSA çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	28
Şekil 3.10	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik BSA çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	28
Şekil 3.11	UV dedektör ile 280 nm'de %0,1'lik BSA çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	29
Şekil 3.12	UV dedektör ile 280 nm'de %0,1'lik BSA çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	29
Şekil 3.13	UV dedektör ile 280 nm'de %0,1'lik BSA çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	30
Şekil 3.14	UV dedektör ile 280 nm'de %0,1'lik BSA çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	30
Şekil 3.15	UV dedektör ile 280 nm'de %0,1'lik BSA çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	31
Şekil 3.16	%0,01,%0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltileri için 5,10,20,40, 100 $\mu$ l enjeksiyonlarda UV dedektör ile 280nm'de elde edilen alan değerleri .....	32
Şekil 3.17	%0,01,%0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltileri için 5,10,20,40, 100 $\mu$ l enjeksiyonlarda UV dedektör ile 280nm'de elde edilen yükseklik değerleri .....	33
Şekil 3.18	%0,01, %0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltilerinin farklı hacimlerde enjeksiyonu ile UV dedektörden 280nm'de elde edilen alan değerleri .....	33
Şekil 3.19	%0,01, %0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltilerinin farklı hacimlerde enjeksiyonu ile UV dedektörden 280nm'de elde edilen yükseklik değerleri .....	34

Şekil 3.20	RI dedektör ile %0,01'lik BSA çözeltisinin 5µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	35
Şekil 3.20b	RI dedektör ile %0,01'lik BSA çözeltisinin 10µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	35
Şekil 3.21	RI dedektör ile %0,01'lik BSA çözeltisinin 20µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	36
Şekil 3.22	RI dedektör ile %0,01'lik BSA çözeltisinin 40µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	36
Şekil 3.23	RI dedektör ile %0,01'lik BSA çözeltisinin 100µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	37
Şekil 3.24	RI dedektör ile %0,05'lik BSA çözeltisinin 5µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	37
Şekil 3.25	RI dedektör ile %0,05'lik BSA çözeltisinin 10µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	38
Şekil 3.26	RI dedektör ile %0,05'lik BSA çözeltisinin 20µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	38
Şekil 3.27	RI dedektör ile %0,05'lik BSA çözeltisinin 40µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	39
Şekil 3.28	RI dedektör ile %0,05'lik BSA çözeltisinin 100µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	39
Şekil 3.29	RI dedektör ile %0,1'lik BSA çözeltisinin 5µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	40
Şekil 3.30	RI dedektör ile %0,1'lik BSA çözeltisinin 10µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	40
Şekil 3.31	RI dedektör ile %0,1'lik BSA çözeltisinin 20µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	41
Şekil 3.32	RI dedektör ile %0,1'lik BSA çözeltisinin 40µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	41
Şekil 3.33	RI dedektör ile %0,1'lik BSA çözeltisinin 100µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	42
Şekil 3.34	%0,01,%0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltileri için 5,10,20,40, 100µl enjeksiyonlarda RI dedektör ile elde edilen alan değerleri .....	44
Şekil 3.35	%0,01,%0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltileri için 5,10,20,40, 100µl enjeksiyonlarda RI dedektör ile elde edilen yükseklik değerleri .....	44
Şekil 3.36	%0,01, %0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltilerinin farklı hacimlerde enjeksiyonu ile RI dedektörden elde edilen alan değerleri .....	45
Şekil 3.37	%0,01, %0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltilerinin farklı hacimlerde enjeksiyonu ile RI dedektörden elde edilen yükseklik değerleri .....	45
Şekil 3.38	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik α-Amilaz çözeltisinin 5µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	47
Şekil 3.39	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik α-Amilaz çözeltisinin 10µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	47
Şekil 3.40	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik α-Amilaz çözeltisinin 20µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	48
Şekil 3.41	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik α-Amilaz çözeltisinin 40µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	48
Şekil 3.42	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik α-Amilaz çözeltisinin 100µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	49
Şekil 3.43	α-Amilaz çözeltisinin 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon	

		hacmine karşı UV 280nm'de elde edilen alan grafiği .....	50
Şekil	3.44	$\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı UV 280nm'de elde edilen yükseklik grafiği .....	50
Şekil	3.45	Refraktif İndeks Dedektör'de %0,05'lik $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	52
Şekil	3.46	Refraktif İndeks Dedektör'de %0,05'lik $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	52
Şekil	3.47	Refraktif İndeks Dedektör'de %0,05'lik $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	53
Şekil	3.48	Refraktif İndeks Dedektör'de %0,05'lik $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	53
Şekil	3.49	Refraktif İndeks Dedektör'de %0,05'lik $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	54
Şekil	3.50	$\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı RID'de elde edilen alan grafiği .....	55
Şekil	3.51	$\alpha$ -Amilaz için 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı RID'de elde edilen yükseklik grafiği .....	55
Şekil	3.52	Amilaz : Polimer oranı 0,5 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı .....	57
Şekil	3.53	Amilaz : Polimer oranı 1 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı .....	57
Şekil	3.54	Amilaz : Polimer oranı 3 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı .....	58
Şekil	3.55	Amilaz : Polimer oranı 5 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı .....	58
Şekil	3.56	Amilaz : Polimer oranı 10 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı .....	59
Şekil	3.57	Amilaz : Polimer oranı 20 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı .....	59
Şekil	3.58	Amilaz : Polimer oranı 30 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı .....	60
Şekil	3.59	Amilaz : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen $\alpha$ -Amilaz alanı grafiği .....	62
Şekil	3.60	Amilaz : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen $\alpha$ -Amilaz yüksekliği grafiği .....	62
Şekil	3.61	Amilaz : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer alanı grafiği .....	63
Şekil	3.62	Amilaz : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği .....	63
Şekil	3.63	Amilaz : Polimer oranı 3 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla RID'de elde edilen kromatogramı .....	65
Şekil	3.64	Amilaz : Polimer oranı 5 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla RID'de elde edilen kromatogramı .....	65
Şekil	3.65	Amilaz : Polimer oranı 10 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla RID'de elde edilen kromatogramı .....	66
Şekil	3.66	Amilaz : Polimer oranı 20 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla RID'de elde edilen kromatogramı .....	66



Şekil 3.67	Amilaz : Polimer oranı 30 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı .....	67
Şekil 3.68	Amilaz : Polimer oranı’na karşı RID’de elde edilen α-Amilaz alanı grafiği .....	68
Şekil 3.69	Amilaz : Polimer oranı’na karşı RID’de elde edilen α-Amilaz yüksekliği grafiği .....	69
Şekil 3.70	Amilaz : Polimer oranı’na karşı RID’de elde edilen Polimer alanı grafiği .....	70
Şekil 3.71	Amilaz : Polimer oranı’na karşı RID’de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği .....	71
Şekil 3.72	UV dedektörde Amilaz-Polimer karışımındaki α-Amilaz’ın ve polimersiz çözeltideki α-Amilaz’ın konsantrasyona karşı alan grafiği .....	72
Şekil 3.73	UV dedektörde Amilaz-Polimer karışımındaki α-Amilaz’ın ve polimersiz çözeltideki α-Amilaz’ın konsantrasyona karşı yükseklik grafiği .....	73
Şekil 3.74	RID’de Amilaz-Polimer karışımındaki α-Amilaz’ın ve polimersiz çözeltideki α-Amilaz’ın konsantrasyona karşı alan grafiği .....	75
Şekil 3.75	RID’de Amilaz-Polimer karışımındaki α-Amilaz’ın ve polimersiz çözeltideki α-Amilaz’ın konsantrasyona karşı yükseklik grafiği .....	76
Şekil 3.76	Polimer : Amilaz oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	78
Şekil 3.77	Polimer : Amilaz oranı 1 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	78
Şekil 3.78	Polimer : Amilaz oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	79
Şekil 3.79	Polimer : Amilaz oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	79
Şekil 3.80	Polimer : Amilaz oranı 10 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	80
Şekil 3.81	Polimer : Amilaz oranı’na karşı UV 280nm’de elde edilen Amilaz alanı grafiği .....	82
Şekil 3.82	Polimer : Amilaz oranı’na karşı UV 280nm’de elde edilen Amilaz yüksekliği grafiği .....	82
Şekil 3.83	Polimer : Amilaz oranı’na karşı UV 280nm’de elde edilen Polimer alanı grafiği .....	83
Şekil 3.84	Polimer : Amilaz oranı’na karşı UV 280nm’de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği .....	83
Şekil 3.85	Polimer : Amilaz oranı’na karşı UV 280nm’de elde edilen Konjugat alanı grafiği .....	84
Şekil 3.86	Polimer : Amilaz oranı’na karşı UV 280nm’de elde edilen Konjugat yüksekliği grafiği .....	84
Şekil 3.87	Polimer : Amilaz oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektörde elde edilen kromatogramı .....	86
Şekil 3.88	Polimer : Amilaz oranı 1 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektörde elde edilen kromatogramı .....	86
Şekil 3.89	Polimer : Amilaz oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektörde elde edilen kromatogramı .....	86
Şekil 3.90	Polimer : Amilaz oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektörde elde edilen kromatogramı .....	87
Şekil 3.91	Polimer : Amilaz oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI	

	dedektörde elde edilen kromatogramı .....	87
Şekil 3.92	Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektörde' de elde edilen $\alpha$ -Amilaz alanı grafiği .....	89
Şekil 3.93	Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektör' de elde edilen $\alpha$ -Amilaz yüksekliği grafiği .....	89
Şekil 3.94	Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektörde elde edilen Polimer alanı grafiği .....	90
Şekil 3.95	Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektör' de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği .....	90
Şekil 3.96	Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektör' de elde edilen Konjugat alanı grafiği .....	91
Şekil 3.97	Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektör' de elde edilen Konjugat yüksekliği grafiği .....	91
Şekil 3.98	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	93
Şekil 3.99	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	93
Şekil 3.100	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	94
Şekil 3.101	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	94
Şekil 3.102	UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	95
Şekil 3.103	Rennet için 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı UV 280nm'de elde edilen alan grafiği .....	96
Şekil 3.104	Rennet için 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı UV 280nm'de elde edilen yükseklik grafiği .....	96
Şekil 3.105	RID'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	98
Şekil 3.106	RID'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	98
Şekil 3.107	RID'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	99
Şekil 3.108	RID'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	99
Şekil 3.109	RID'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram .....	100
Şekil 3.110	Rennet için 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı RID'de elde edilen alan grafiği .....	101
Şekil 3.111	Rennet için 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı RID'de elde edilen yükseklik grafiği .....	101
Şekil 3.112	Rennet : Polimer oranı 0,5 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı .....	103
Şekil 3.113	Rennet : Polimer oranı 1 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı .....	103

Şekil 3.114	Rennet : Polimer oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	104
Şekil 3.115	Rennet : Polimer oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	104
Şekil 3.116	Rennet : Polimer oranı 10 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	105
Şekil 3.117	Rennet : Polimer oranı 20 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	105
Şekil 3.118	Rennet : Polimer oranı 30 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	106
Şekil 3.119	Rennet : Polimer oranı’na karşı UV 280nm’de elde edilen Rennet alanı grafiği .....	108
Şekil 3.120	Rennet : Polimer oranı’na karşı UV 280nm’de elde edilen Rennet yüksekliği grafiği .....	108
Şekil 3.121	Rennet : Polimer oranı’na karşı UV 280nm’de elde edilen Polimer alanı grafiği .....	109
Şekil 3.122	Rennet : Polimer oranı’na karşı UV 280nm’de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği .....	109
Şekil 3.123	Rennet : Polimer oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı .....	111
Şekil 3.124	Rennet : Polimer oranı 1 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı .....	111
Şekil 3.125	Rennet : Polimer oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı .....	112
Şekil 3.126	Rennet : Polimer oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı .....	112
Şekil 3.127	Rennet : Polimer oranı 10 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı .....	113
Şekil 3.128	Rennet : Polimer oranı 20 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı .....	113
Şekil 3.129	Rennet : Polimer oranı’na karşı RID’de elde edilen Rennet alanı grafiği .....	115
Şekil 3.130	Rennet : Polimer oranı’na karşı RID’de elde edilen Rennet yüksekliği grafiği .....	115
Şekil 3.131	Rennet : Polimer oranı’na karşı RID’de elde edilen Polimer alanı grafiği .....	116
Şekil 3.132	Rennet : Polimer oranı’na karşı RID’de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği .....	116
Şekil 3.133	UV dedektörde Rennet-Polimer karışımındaki Rennet’in ve polimersiz çözeltideki Rennet’in konsantrasyona karşı alan grafiği .....	118
Şekil 3.134	UV dedektörde Rennet-Polimer karışımındaki Rennet’in ve polimersiz çözeltideki Rennet’in konsantrasyona karşı yükseklik grafiği .....	119
Şekil 3.135a	RID’de Rennet-Polimer karışımındaki Rennet’in ve polimersiz çözeltideki Rennet’in konsantrasyona karşı alan grafiği .....	121
Şekil 3.135b	RID’de Rennet-Polimer karışımındaki Rennet’in ve polimersiz çözeltideki Rennet’in konsantrasyona karşı yükseklik grafiği .....	122
Şekil 3.136	Polimer : Rennet oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	124
Şekil 3.137	Polimer : Rennet oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı .....	124
Şekil 3.138	Polimer : Rennet oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV .....	

		280nm'de elde edilen kromatogramı .....	125
Şekil	3.139	Polimer : Rennet oranı 10 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı .....	125
Şekil	3.140	Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Rennet alanı grafiği .....	127
Şekil	3.141	Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Rennet yüksekliği grafiği .....	127
Şekil	3.142	Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer alanı grafiği .....	128
Şekil	3.143	Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği .....	128
Şekil	3.144	Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Konjugat alanı grafiği .....	129
Şekil	3.145	Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Konjugat yüksekliği grafiği .....	129
Şekil	3.146	Polimer : Rennet oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektör'de elde edilen kromatogramı .....	130
Şekil	3.147	Polimer : Rennet oranı 1 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektör'de elde edilen kromatogramı .....	130
Şekil	3.148	Polimer : Rennet oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektör'de elde edilen kromatogramı .....	131
Şekil	3.149	Polimer : Rennet oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektör'de elde edilen kromatogramı .....	131
Şekil	3.150	Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Rennet alanı grafiği .....	133
Şekil	3.151	Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Rennet yüksekliği grafiği .....	133
Şekil	3.152	Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Polimer alanı grafiği .....	134
Şekil	3.153	Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği .....	134
Şekil	3.154	Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Konjugat alanı grafiği .....	135
Şekil	3.155	Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Konjugat yüksekliği grafiği .....	135
Şekil	4.1	Enzimin polimerden fazla olduğu sistemde oluşan reaksiyon modeli.....	137
Şekil	4.2	Polimerin enzimden --fazla olduğu sistemde oluşan reaksiyon modeli...	137

## ÇİZELGE LİSTESİ

			Sayfa
Çizelge	2.1	Süt proteinleri .....	11
Çizelge	2.2	Kazein çeşitleri ve özellikleri .....	11
Çizelge	3.1	UV dedektörle 280nm'de farklı konsantrasyondaki BSA çözeltileri ile elde edilen kromatogramlardan okunan değerler .....	31
Çizelge	3.2	RI dedektör ile elde edilen farklı konsantrasyondaki BSA kromatogramlarının sonuçları .....	42
Çizelge	3.3	UV dedektörle 280nm'de elde edilen $\alpha$ -Amilaz kromatogramlarının sonuçları .....	49
Çizelge	3.4	RID ile elde edilen $\alpha$ -Amilaz kromatogramlarının değerleri .....	54
Çizelge	3.5	UV 280nm'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının $\alpha$ -Amilaz'a ait sonuçları .....	61
Çizelge	3.6	UV 280nm'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları .....	61
Çizelge	3.7	RID'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının $\alpha$ -Amilaz'a ait sonuçları .....	68
Çizelge	3.8	RID'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları .....	68
Çizelge	3.9	UV dedektörde Amilaz-Polimer karışımı çözeltisi ile $\alpha$ -Amilaz çözeltisi alan sonuçları .....	72
Çizelge	3.10	UV dedektörde Amilaz-Polimer karışımı çözeltisi ile $\alpha$ -Amilaz çözeltisi yükseklik sonuçları .....	73
Çizelge	3.11	RID'de Amilaz-Polimer karışımı çözeltisi ile $\alpha$ -Amilaz çözeltisi alan sonuçları .....	75
Çizelge	3.12	RID'de Amilaz-Polimer karışımı çözeltisi ile $\alpha$ -Amilaz çözeltisi yükseklik sonuçları .....	76
Çizelge	3.13	UV 280nm'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının $\alpha$ -Amilaz'a ait sonuçları .....	81
Çizelge	3.14	UV 280nm'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları .....	81
Çizelge	3.15	UV 280nm'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Konjugat'a ait sonuçları .....	81
Çizelge	3.16	RID'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının $\alpha$ -Amilaz'a ait sonuçları .....	88
Çizelge	3.17	RID'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları .....	88
Çizelge	3.18	RID'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Konjugat'a ait sonuçları .....	88
Çizelge	3.19	UV dedektörle 280nm'de elde edilen Rennet kromatogramlarının değerleri .....	95
Çizelge	3.20	RID'de elde edilen Rennet kromatogramlarının değerleri .....	100
Çizelge	3.21	UV 280nm'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Rennet'e ait sonuçları .....	107
Çizelge	3.22	UV 280nm'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları .....	107
Çizelge	3.23	RID'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Rennet'e ait sonuçları .....	114
Çizelge	3.24	RID'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları .....	114

Çizelge	3.25	UV dedektörde Rennet-Polimer karışımı çözeltisi ile Rennet çözeltisi alan sonuçları .....	118
Çizelge	3.26	UV dedektörde Rennet-Polimer karışımı çözeltisi ile Rennet çözeltisi yükseklik sonuçları .....	119
Çizelge	3.27	RID'de Rennet-Polimer karışımı çözeltisi ile Rennet çözeltisi alan sonuçları .....	121
Çizelge	3.28	RID'de Rennet-Polimer karışımı çözeltisi ile Rennet çözeltisi yükseklik sonuçları .....	122
Çizelge	3.29	UV 280nm'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Rennet'e ait sonuçları .....	126
Çizelge	3.30	UV 280nm'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları .....	126
Çizelge	3.31	UV 280nm'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Konjugat'a ait sonuçları .....	126
Çizelge	3.32	RI dedektör'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Rennet'e ait sonuçları .....	132
Çizelge	3.33	RI dedektör'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları .....	132
Çizelge	3.34	RI dedektör'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Konjugat'a ait sonuçları .....	132

## ÖNSÖZ

Tez çalışma konumu belirleyen, çalışmanın uygulamasını yönlendiren ve değerlendirilmesini sağlayan, her konuda bilgilendiren ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE'ye,

Yüksek lisans hayatım boyunca yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Huriye KUZU'ya,

Yüksek lisans hayatım süresince her tür konuda yardımlarını ve desteklerini benden esirgemeyen değerli hocam Doç Dr. İnci ATAÇ'a,

Yüksek Lisans çalışmalarım için bana destek olan Doç. Dr. Güney ÖZAY'a ve Dr. Cemil OĞUZ'a,

Tezimin bütün aşamalarında yardımını ve desteğini esirgemeyen sevgili eşime,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme,

sevgimi ve saygılarımı belirtmeyi borç bilirim.

## ÖZET

Alfa-Amilaz ve Rennet enzimlerinin Dekstran Sülfat Aldehit ile suda çözünebilen kovalent konjugat oluşturma mekanizması ilk kez HPLC yöntemiyle incelendi. Çalışmada iki farklı dedektör (UV ve Refraktif İndeks) kullanıldı.

Konjugasyon reaksiyonu farklı enzim-polimer oranlarında gerçekleştirildi. 0,5 – 30 aralığında oluşturulan homojen karışımlar kromatografik analizde kullanıldı. Alınan sonuçlara dayanılarak Dekstran Sülfat'ın her iki enzimle de suda çözünebilen kovalent konjugat oluşturma mekanizması incelendi.

**Anahtar Kelimeler:** Amilaz, rennet, HPLC, Refraktif indeks, UV, konjugat



## **ABSTRACT**

The characteristics of water soluble covalent conjugation between aldehyde derivatives of dextran sulphate and both  $\alpha$ -Amylase and Rennet enzymes were determined by HPLC method for the first time. In this work two different detection system, UV and Refractive Index, were used.

Different ratios of enzyme and polymer were used for the conjugation reaction. The homogenous mixes between 0,5 and 30 mol ratios were used for chromatographic analyzing. According to the results of chromatography, the characteristics of water soluble covalent conjugation between aldehyde derivatives of dextran sulphate and both enzymes were studied.

**Keywords:** Amylase, Rennet, HPLC, Refractive Index, UV, conjugate



## 1.GİRİŞ

Suda çözünen polimerler son zamanlarda polimer kimya sahasında gerek teorik gerekse pratik uygulama olarak geniş çalışma alanı bulmuştur. Özellikle suda çözünen sistemler (polimerler, polikompleksler ve diğer polimer modifikasyonları) immünolojik açıdan (fizyolojik aktif maddeler olarak kullanılmasının düşünülmesi) büyük bir kazanç olarak görülmektedir. Bu amaçla fizikokimyasal yöntemler aracılığıyla bu sistemlerin yapısı hakkında geniş bilgi elde edebilmek için çalışmalar sürdürülmektedir.

Bu tip sentetik polimerler tıpta ve biyolojik temelli bilimlerin diğer sahalarında son zamanlarda pratik uygulamalar bulmuştur. Örnek olarak; sentetik polimerlerin adjuvant etkisi (organizmanın bağışıklığını arttırmak için antijenlerle birlikte organizmaya girebilen yardımcı kimyasal maddeler), kanın dolaşımını engelleyen tortuların çözülmesi etkisi (antitrombojen), antimikrobiyal etkisi, ilaçların etken maddelerinin uzun zaman organizmada saklanması etkisi (prolongation), ilaç salınım sistemleri (organizma içindeki ilacın yavaş yavaş serbest bırakılması) gibi etkileri gösterilmiştir.

Zayıf immunojenik antijenlerin (haptenerler, proteinler, polisakkaritler) farklı kökenli sentetik polielektrolitlerle (PE) bağlanması sonrasında organizmada antijen-PE'ye karşı bağışıklığın arttığı gösterilmiştir (Petrov ve Khaitov, 1988). Fizyolojik şartlar altında oldukça sağlam olan kompleksler en yüksek aktiviteyi gösterir (Kabanov vd., 1978; Petrov vd., 1979). Kompleks içeren sistemler, bileşenlerin fonksiyonel gruplarının kovalent bağlarla bağlandığı yerlerde PE'nin parçaları ve antijen molekülleri arasındaki elektrostatik ve hidrofobik etkileşim ile sağlanmıştır (dengeye gelmiştir) (Petrov, 1979). Ayrıca polimer antijenle konjüge edildiği zaman, kovalent bağ oluşumunda kendi katılımlarının bir sonucu olarak antijenik determinantın (belirtgen) kimyasal yapısında kısmi bir değişiklik olabilir. Bu durum teknolojik uygulamalar için uygun değildir. Çünkü ana reaksiyon ürünü ile birlikte serbest bileşenler de ortamda yer alır. Bu bileşenlerin ana üründen ayrılması gerekir, ayrılmadığı takdirde sistemde polimer ile antijenin çarpaz bağlanması esnasında kalır. Bu istenmeyen durum araştırmalara başka bir boyut kazandırmıştır. Böylece polielektrolitler ile antijenleri metal varlığında bağlamışlardır, hem taşıyıcı polimerin ve antijenin yapısında çok önemli değişiklikler olmamış hem de istenmeyen serbest bileşenler oluşmamıştır (Mustafaev ve Kabanov, 1981). Elektrostatik bağlı zehirli olmayan PE'ler ile protein antijenlerinin metal ( $Cu^{2+}$ ) varlığında oluşturulan üçlü ve suda çözünen yapılar immünolojik açıdan yüksek koruma sağlamıştır (Mustafaev ve Norimov, 1990).

$\alpha$ -Amilaz ve Rennet enzimlerinin Dekstran Sülfat Aldehit ile suda çözünebilen kovalent konjugat oluşturma mekanizması ilk kez HPLC yöntemiyle incelendi. Çalışmada iki farklı dedektör (UV ve Refraktif İndeks) kullanıldı. Konjugasyon reaksiyonu farklı enzim-polimer oranlarında gerçekleştirildi. 0,5 – 30 aralığında oluşturulan homojen karışımlar kromatografik analizde kullanıldı. Alınan sonuçlara dayanılarak Dekstran Sülfat'ın her iki enzimle de suda çözünebilen kovalent konjugat oluşturma mekanizması incelendi.



## 2. TEORİK KISIM

### 2.1 Genel Bilgi

Enzimler, biyokimyasal katalizörler olarak davranırlar. Kendilerinde değişim olmadan diğer maddelerde spesifik kimyasal değişimlere neden olurlar. Enzimlerin moleküldeki spesifik kimyasal bağlara etki etmesi, arzu edilen bileşiklerin üretiminin kontrol edilebilir durumda olmasını sağlar. Enzimler protein olduğundan yüksek sıcaklıkta inaktif hale gelirler, İnaktive oldukları kesin sıcaklık enzime göre değişir ve spesifik bir işlem için doğru enzim seçiminin yapılması gerektiği zaman önemli bir hal alır. Çoğu durumlarda amaç yüksek sıcaklık süresince enzimin aktivitesini sürdürmektir, diğer taraftan da üretim bittiğinde enzimi tam olarak inaktive etmektir. Enzimlerin optimum sıcaklık sınırları ve optimum pH sınırları vardır ki bunlar da enzim türüne ve elde edildiği kaynağa göre farklılık gösterir.

### 2.2 $\alpha$ -Amilaz enzimi

Payen ve Persoz'un 1833 yılında nişastayı şekere dönüştüren termolabil bir maddeyi, alkol çöktürmesi ile elde etmeleri enzimoloji alanındaki önemli adımlardan biri olmuştur. Bugün amilaz olarak bilinen bu enzim, nişasta endüstrisinde önemli bir yere sahiptir.

Çok geniş bir aileden oluşan amilazların doğada fazla miktarda bulunan çeşidi  $\alpha$ -amilazlardır.  $\alpha$ -amilazlar (1,4- $\alpha$ -glukan 4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1) bir çok hayvan, bitki ve protist genera denen tek hücreli mikroorganizmalarda üretilirler.  $\alpha$ -amilazlar, nişastanın fraksiyonları olan amiloz ve amilopektindeki aynı zamanda hayvan ve insanlarda karaciğerde depo görevi yapan glikojendeki  $\alpha$ -(1,4) glikozid bağlarını hidrolizleyerek,  $\alpha$ -konfigürasyonunda oligosakkaridler üreten endohidrolazlardır.  $\alpha$ -Amilazlar  $\alpha$ -(1,6) glikozid bağlarına saldırımlazlar.

$\alpha$ -Amilazın etki mekanizması ve fizikokimyasal özellikleri enzimin kaynağına da bağlıdır. Ticari öneme sahip olan amilaz, bakteriyel  $\alpha$ -amilazdır. Literatürde açıklandığı gibi  $\alpha$ -amilazların optimum pH değeri 4-6 arasındadır(Kazuhiko,1993;Ishikava,1990). pH aktivite profiline kesin pH optimumları enzim kaynağına göre değişmektedir.  $\alpha$ -Amilazlar, bir enzim molekülü başına en az bir atom kalsiyuma sahip olan kalsiyum-metaloenzimlerdir. Kalsiyum iyonu ve substrat varlığında daha geniş bir pH aralığında kararlıdırlar. Safılaştırılmış  $\alpha$ -amilazlar 50°C'nin üstünde aktivitelerini hızla kaybederler.

$\alpha$ -Amilazın kapsamlı kullanım alanlarından biri, nişasta endüstrisidir. Nişastayı parçaladıklarından dolayı amilazlar, eczacılıkta siklo dekstrinlerin üretiminden glukoz şuruplarına kadar çeşitli üretim dallarında uygulama alanı bulmaktadırlar.

Nişasta enzimatik hidroliz ile glukoz şuruplarına dönüştürülebilir ve bu şuruplar gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılırlar. Hidroliz işlemi kimyasal olarak da yapılabilir fakat bu durumda maliyet yükselmektedir. Enzimatik hidroliz daha uygun ve etkili bir yöntem olduğundan kullanımı yaygındır. Parçalanma sırasında, "limit dekstrinler" ile birlikte fermente olan şekerler oluşmaktadır. Bazı bira türlerinin üretiminde, (light bira gibi) daha düşük karbohidrat ve daha yüksek alkol içeriğine sahip bir ürün elde etmek için, bu limit dekstrinlerin oranı düşürülmektedir.

$\alpha$ -Amilazlar bira ve maya endüstrilerden başka deterjan sanayiinde, meyva suyu üretiminde, kağıt ve kumaş endüstrilerinde de yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Brzozowski and Davies, 1997).

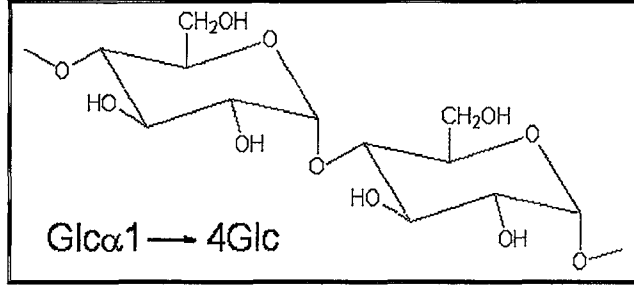
Tekstilde çözümlü iplikleri, tezgahta gergin durmaları ve aşınmalara karşı dayanıklı olmaları için nişasta gibi koruyucu bir madde ile kaplanmaktadır (Haşılama). Nişastalı haşılın sökülmesi için, nişastanın suda çözünen ürünlere parçalanmasında amilaz enzimi kullanılmaktadır (Başer, 1983).

## **2.2.1 Amilaz Familyasının Etkilediği Substratlar**

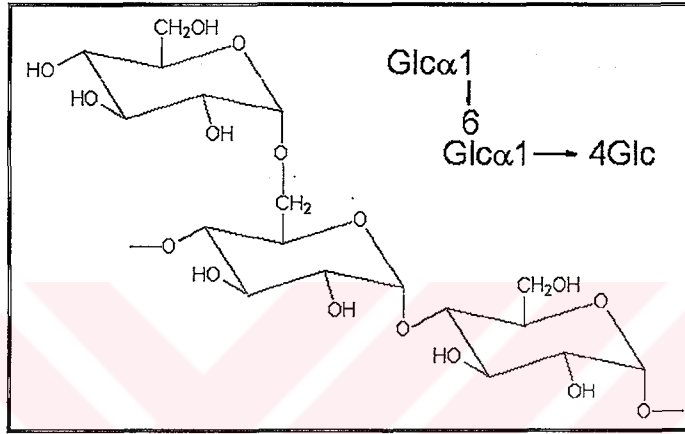
### **2.2.1.1 Nişasta**

Nişasta daha çok patates gibi yumrulu bitkilerde ve mısır, fasulye, buğday, pirinç gibi tahıllarda bulunmakla birlikte, bütün bitki hücreleri nişasta yapma yeteneğine sahiptirler. Nişasta iki farklı yapısal formda bulunmaktadır. Bunlardan biri amiloz diğeri ise amilopektindir.

Amiloz, nişastanın lineer fraksiyonu olup  $\alpha$ -(1,4) glikozid bağları ile bağlanmış durumda 1100 ile 4400 glukoz ünitesi içermektedir. Bu form tamamıyla dallanmamış uzun zincirden meydana gelmektedir. Nişastanın dallanmış fraksiyonu olan amilopektin ise;  $\alpha$ -(1,4) bağları yanında dallanma yerlerinde  $\alpha$ (1,6) bağları da bulundurmaktadır.(Beazell, 1941).



Şekil 2.1 Amiloz



Şekil 2.2 Amilopektin

### 2.2.1.2 Glikojen

Hayvan hücrelerinde karbohidrat depo maddesi olan glikojen karaciğer dokusunda fazla miktarda olmakla birlikte, iskelet kaslarında da bulunmaktadır. Karaciğer hücrelerinde büyük glikojen granüllere rastlanmaktadır. Glukojen bir D-glukoz polimeridir. Glikojenin molekul yapısı amilopektine benzemekle birlikte daha sık dallanma görülmektedir.. Glukoz üniteleri düz zincirlerde  $\alpha$ -(1,4) bağları ile, dallanma noktalarında ise  $\alpha$ -(1,6) bağları ile bağlanarak glikojen molekülünü meydana getirmektedirler(Buryan, 1991; Dordick, 1991).

### 2.2.2 $\alpha$ -Amilazın Etki Mekanizması

$\alpha$ -Amilazlar (1,4- $\alpha$ -glukan 4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1) nişastanın fraksiyonları olan amiloz ve amilopektin ile glikojen ve maltooligosakkaridlerdeki  $\alpha$ -(1,4) glikozid bağlarının hidrolizini katalizleyen bir endohidrolazdır. İç kısımdaki bağlara daha yüksek ilgi gösterirler ve uzun zincirlerde daha aktiftirler. Bu enzimin kopardığı bağların yeri sabit olmadığı için sonuçta ürünlerin bir karışımı meydana gelir (Minxie, 1994).

$\alpha$ -Amilaz mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanların karbonhidrat metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Memelilerde  $\alpha$ -amilaz tükürkte ve pankreas salgısında bulunmaktadır. İnsandaki  $\alpha$ -amilaz, kromozom 1 üzerindeki bir multigen ailesi tarafından kodlanmakta ve tek bir polipeptid zincirinde 478 aminoasitten oluşmaktadır (Mischa, 1996).

İnsanda nişastanın sindirimi birkaç aşamada gerçekleşmektedir. Başlangıçta tükürük  $\alpha$ -amilazı, polimerik nişastadaki kısa oligomerleri parçalayarak kısmen sindirimi sağlar. Kısmen sindirilen nişasta, büyük ölçüde pankreasta sentezlenen  $\alpha$ -amilaz ile daha küçük oligosakkaridlere hidrolizlenir. Oluşan oligosakkarid karışımı maltoz, maltotrioz ve çok sayıda  $\alpha$ -(1,6) ve  $\alpha$ -(1,4) oligoglukanları içermektedir.

Bir çok mantardan  $\alpha$ -amilaz üretilmekle birlikte en çok incelenen ve genellikle ticari olarak kullanılan *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilaz (TAKA)'dır. Bu enzim nişastanın  $\alpha$ -(1,4) bağlarına saldıran fakat  $\alpha$ -(1,6) bağlarına saldırmayan bir endohidrolazdır. Belirtilen enzim ile nişasta %60 oranında maltoza dönüştürülebilmektedir (Gary, 1995).

### 2.2.3 $\alpha$ -Amilazın Molekül Yapısı ile İlgili Özellikler

$\alpha$ -Amilazın molekül ağırlığı 55200 Da dolayındadır ve molekülü sıcaklığa karşı önemli ölçüde stabilite göstermektedir. Bu enzimin dikkate değer termostabilite özelliği, artan iyonik etkileşimler, azalan yüzey alanı ve iç kısımdaki artan paket etkileşimlerden ileri gelebilir.

Termostabil  $\alpha$ -amilazın üç boyutlu yapısı X-ray kristallografi yöntemi ile incelenmiştir. Yapının 478 aminoasit kalıntısı ve 294 su molekülü içerdiği görülmüştür. Şekil 2.7'de de görüldüğü gibi yapısında 9 tane triptofan(trp) bulunmaktadır (Swift et.al,1991). Ayrıca  $\alpha$ -amilazın  $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarını bağlama özelliği vardır.  $\alpha$ -Amilazlar, bir enzim molekülü başına en az bir atom kalsiyuma sahip metaloenzimlerdir.  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarının aktivite üzerine etkisi incelenmiş ve  $\text{Ca}^{2+}$  iyonunun mikromolar seviyelerinin,  $\alpha$ -amilazın yapısını stabilize etmeye yaradığı görülmüştür (Bush, 1989).

ALA THR PRO ALA ASP TRP ARG SER GLN SER ILE TYR PHE  
 LEU LEU THR ASP ARG PHE ALA ARG THR ASP GLY SER THR  
 THR ALA THR CYS ASN THR ALA ASP GLN LYS TYR CYS GLY  
 GLY THR TRP GLN GLY ILE ILE ASP LYS LEU ASP TYR ILE  
 GLN GLY MET GLY PHE THR ALA ILE TRP ILE THR PRO VAL  
 THR ALA GLN LEU PRO GLN THR THR ALA TYR GLY ASP ALA  
 TYR HIS GLY TYR TRP GLN GLN ASP ILE TYR SER LEU ASN  
 GLU ASN TYR GLY THR ALA ASP ASP LEU LYS ALA LEU SER  
 SER ALA LEU HIS GLU ARG GLY MET TYR LEU MET VAL ASP  
 VAL VAL ALA ASN HIS MET GLY TYR ASP GLY ALA GLY SER  
 SER VAL ASP TYR SER VAL PHE LYS PRO PHE SER SER GLN  
 ASP TYR PHE HIS PRO PHE CYS PHE ILE GLN ASN TYR GLU  
 ASP GLN THR GLN VAL GLU ASP CYS TRP LEU GLY ASP ASN  
 THR VAL SER LEU PRO ASP LEU ASP THR THR LYS ASP VAL  
 VAL LYS ASN GLU TRP TYR ASP TRP VAL GLY SER LEU VAL  
 SER ASN TYR SER ILE ASP GLY LEU ARG ILE ASP THR VAL  
 LYS HIS VAL GLN LYS ASP PHE TRP PRO GLY TYR ASN LYS  
 ALA ALA GLY VAL TYR CYS ILE GLY GLU VAL LEU ASP GLY  
 ASP PRO ALA TYR THR CYS PRO TYR GLN ASN VAL MET ASP  
 GLY VAL LEU ASN TYR PRO ILE TYR TYR PRO LEU LEU ASN  
 ALA PHE LYS SER THR SER GLY SER MET ASP ASP LEU TYR  
 ASN MET ILE ASN THR VAL LYS SER ASP CYS PRO ASP SER  
 THR LEU LEU GLY THR PHE VAL GLU ASN HIS ASP ASN PRO  
 ARG PHE ALA SER TYR THR ASN ASP ILE ALA LEU ALA LYS  
 ASN VAL ALA ALA PHE ILE ILE LEU ASN ASP GLY ILE PRO  
 ILE ILE TYR ALA GLY GLN GLU GLN HIS TYR ALA GLY GLY  
 ASN ASP PRO ALA ASN ARG GLU ALA THR TRP LEU SER GLY  
 TYR PRO THR ASP SER GLU LEU TYR LYS LEU ILE ALA SER  
 ALA ASN ALA ILE ARG ASN TYR ALA ILE SER LYS ASP THR  
 GLY PHE VAL THR TYR LYS ASN TRP PRO ILE TYR LYS ASP  
 ASP THR THR ILE ALA MET ARG LYS GLY THR ASP GLY SER  
 GLN ILE VAL THR ILE LEU SER ASN LYS GLY ALA SER GLY  
 ASP SER TYR THR LEU SER LEU SER GLY ALA GLY TYR THR  
 ALA GLY GLN GLN LEU THR GLU VAL ILE GLY CYS THR THR  
VAL THR VAL

Şekil 2.3 Aspergillus oryzae  $\alpha$ -Amilazının aminoasid dizilişi

$\alpha$ -Amilaz proteini üç birimden(domain) oluşmuştur. En büyük boyutlu olan Domain A yaklaşık 291 aminoasid artığı içermektedir ve  $\alpha$ - heliks sarmallarıyla çevrilmiş '8-stranded paralel  $\beta$ -barrel' yapısından ibarettir. Üç aktif bölge kalıntısı olan Asp231, Glu 261 ve Asp328 Domain A'da yerleşmiştir. Cl<sup>-</sup> iyonları da aktif bölgeye bağlanmıştır. Domain A'nın ilginç özelliği 1-99 ve 169-404 kalıntılarını içeren iki polipeptit zincirinden meydana gelmiş olmasıdır. 104-206 aminoasid artığı bulunduran Domain B, Domain A'nın üçüncü  $\alpha$ -heliks ve ' $\beta$ -strand' arasına sokulmuş durumdadır. Heliks yapı küçük olmasına rağmen ilk başta  $\beta$ -yapısı oluşmuştur. Domain B'nin katlanması, Ca<sup>2+</sup> iyonlarının bağlı bulunduğu Domain A'nın  $\beta$ -barrel duvarlarına karşı bir cep oluşturmaktadır. Domain B'nin ana zincir atomları için termal



faktörler, Domain A ve C'ninkilerden daha yüksektir. 297-482 aminoasid artığı içeren domain C, '8-stranded anti paralel  $\beta$ -barrel' içinde tutulur ve fazlası Domain A ile asosiye olmuştur. Domain C farklı kaynakların  $\alpha$ -amilazları arasında en değişken olanıdır.  $\alpha$ -Amilazın kalsiyum ve klor iyonu bağlama pozisyonu literatürde gösterilmiştir (Gary,1995;Hwank,1997).

$\alpha$ -Amilazların optimum pH'ları genellikle 4-7 arasındadır. pH aktivite profilinin kesin optimum pH aralığı enzimin kaynağına göre değişmektedir. Safılaştırılmış  $\alpha$ -amilazlar 50°C'nin üzerinde aktivitelerini hızla kaydederler. Bu inaktivasyon işlemi kalsiyum ve substrat etkisiyle azaltılabilir. Etkili oldukları sıcaklık aralığı ise 20-40 °C'dir.

$\alpha$ -Amilazın 5 alt ünitesi yani substrat bağlama bölgesi vardır.  $\alpha$ -Amilazın bu bölgelerine substratın yerleşmesi işleminde maksimum katalitik aktivitenin, nötralden daha çok asidik pH'da olduğu görülmüştür(Kazuhiko,1993;Ishikava,1990).

### 2.3 *Mucor miehei* Rennet (EC 3.4.23.6)

Fungal rennetin üretiminde kullanılan *Mucor miehei* suşunun özelliği üretilen enzimin aminoasid kompozisyonunda ve molekül ağırlığında etkilidir (Smith ve Yada, 1991). Sadece *Mucor miehei* CBS 370.65 ve NRRL 3169 suşlarından elde edilen fungal rennetlerde amino asid kompozisyonları benzerdir, ancak molekül ağırlıkları farklıdır. *Mucor miehei*'e ait birkaç suş belgelenmiştir. Bunlar Dutch suşu CBS 370.65 (Ottensen ve Rickert, 1970; Rickert ve Elliot, 1973) , Wallerstein suşu NRRL 3420 (Sternberg, 1971) , "Cuban " suşu (Rickert ve Mc Bride – Warren, 1975) şeklinde sıralanabilir ve Rapidase proteinase da NRRL 3169 suşundan (Lagrange vd., 1980) elde edilmektedir . Rickert ve Elliot'a göre, *Mucor miehei*'nin CBS 370.65 suşundan olan Aspartik proteazın amino asid kompozisyonu Asp<sub>47</sub>, Thr<sub>32</sub>, Ser<sub>38</sub>, Glu<sub>25</sub>, Pro<sub>19</sub>, Gly<sub>37</sub>, Ala<sub>29</sub>, Cyc<sub>4</sub>, Val<sub>27</sub>, Met<sub>6</sub>, Ile<sub>20</sub>, Leu<sub>21</sub>, Tyr<sub>21</sub>, Phe<sub>22</sub>, Lys<sub>10</sub>, His<sub>2</sub>, Arg<sub>7</sub>, Trp<sub>3</sub>, şeklindedir. Lagrange ve arkadaşlarına göre ise bu yapı; Asp<sub>39</sub>, Thr<sub>22</sub>, Ser<sub>24</sub>, Glu<sub>26</sub>, Pro<sub>14</sub>, Gly<sub>37</sub>, Ala<sub>29</sub>, Cyc<sub>2</sub>, Val<sub>26</sub>, Met<sub>8</sub>, Ile<sub>18</sub>, Leu<sub>20</sub>, Tyr<sub>12</sub>, Phe<sub>17</sub>, Lys<sub>11</sub>, His<sub>2</sub>, Arg<sub>7</sub>, Trp<sub>3</sub> tarzındadır (Smith ve Yada, 1991; Brown vd., 1990). *Mucor miehei*'nin NRRL 3420 suşundan olan aspartik proteazın amino asit kompozisyonu da; Asp<sub>42</sub>, Thr<sub>18</sub>, Ser<sub>25</sub>, Glu<sub>15</sub>, Ala<sub>22</sub>, Cyc<sub>4</sub>, Val<sub>16</sub>, ½(Cys)<sub>4</sub>, Met<sub>5</sub>, Ile<sub>11</sub>, Leu<sub>14</sub>, Tyr<sub>13</sub>, Phe<sub>14</sub>, Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>8</sub>, His<sub>2</sub>, Arg<sub>4</sub>, Trp<sub>3</sub> (NH<sub>3</sub>)<sub>39</sub> olarak ifade edilmektedir (Sternberg, 1971).

Literatürlerde *Mucor miehei* proteinazın izoelektrik noktası 3,9 ya da 4,1 olarak verilmektedir (Brown vd., 1990). SDS-page elektroforez ile elde edilen sonuçlara göre bu enzimin molekül ağırlığı ise 44. 000 veya 34.000 olarak hesaplanmıştır (Brown vd., 1990). *Mucor miehei* rennet yaklaşık olarak %6'sı mannoz kompleksi şeklinde olan karbohidrat

içeriğine sahiptir (Ottesen ve Rickert, 1970).Yapıya bağlı karbohidratın proteolitik aktivitelere karşı proteini koruduğu, üç boyutlu yapısını stabilize ettiği ve böylece enzimin aktif kalma süresini arttırdığı düşünülmektedir (Berger vd., 1982). Moleküllerin sekonder yapıları fazla miktarda  $\beta$ -Sheet ve daha az oranda  $\alpha$ -heliks yapısı içermektedir (Yada ve Nakai, 1985). Mucor kaynaklı enzimlerin termal direnci hayvanlardan elde edilen kimozone göre oldukça fazladır ancak MCA/PA oranı daha düşüktür. Bu durum araştırmacıları fungal rennetleri modifiye etmeye yönlendirmiştir (Smith ve Yada, 1991).

Peynir üretiminde kullanılan rennetin yaklaşık %60 'ı aktif olarak peynir altı suyunda (whey) kalmaktadır (Holmes ve Ernstrom, 1973). Mucor *miehei* mantarından elde edilen rennet, kimozone göre çok daha fazla termal stabilite göstermektedir. Mucor *miehei* rennet peynir eldesinde kullanılan enzimler arasında ısıya en dirençli olanıdır. Peynir suyunda bulunan sıcaklığa en dayanıklı protein ise  $\alpha$ -lactalbumindir (Lyster, 1970) Bu protein *mucor miehei* rennete göre çok daha termalstabildir. Peynir suyunun yan ürün olarak değerlendirilmesi, örneğin bazı gıda maddelerinin üretiminde kullanılması nedeniyle, bazı olumsuzluklara yol açtığından içinde kalan proteazların inaktive edilmesi önemlidir. Sıcaklığa bağlı olarak, yani ısıtma ile sağlanan inaktivasyon bütün proteazlar için benzer etki göstermektedir ve bu etki pH'dan bağımsızdır. Ancak termal inaktivasyon prosesinin hızı pH'ya duyarlıdır. Düşük pH'larda termal inaktivasyona karşı direnç artmaktadır. % 50 oranında rennet ve pepsin içeren karışım sıcaklık etkisiyle, Mucor *miehei* ve Mucor *pusillus*a göre çok daha kolay inaktive olmaktadır (Hyslop vd., 1979).

Peynir endüstrisinde sütün koagülasyonunu sağlayan enzimler rennet olarak adlandırılır. Rennet hayvan ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Günümüzde peynir üretiminin fazla miktarda olan rennet ihtiyacı mikrobiyal üretim ile karşılanmaktadır. Çok eskiden beri şirden mayası olarak bilinen doğal rennet peynir eldesinde kullanılmıştır. Halen peynirde en iyi tat, koku ve verim sağlaması nedeniyle dana renneti tercih edilmektedir (Pszczola, 1989).

Dana renneti, genç danaların sindirim sistemindeki 4. bölgesinden (şirden) ekstrakte edilir. Bu rennet Kimozin (%75-95) ve pepsin (%5-25) olmak üzere iki tür enzim içermektedir. Kimozin Yunancadaki gastric liquid denen mideye ait sıvı anlamına gelen "chyme"den türemiştir. Kimozin (EC.3.4.23.4) pepsine göre daha spesifik olarak sütü pıhtılaştırma aktivitesine sahiptir. Pepsin spesifik olmayan proteolitik aktivitesinden dolayı tüm protein ağırlığını zayıflatır.

Rennet başlıca dana, sığır ve domuzdan elde edilmekte idi. Giderek artan talep üzerine gündeme gelen mikrobiyal rennet ise *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* ve *Mucor*

pusillus'dan elde edilmektedir. Son zamanlarda Rekombinant DNA tekniği ile bilim adamları dana şirdeninden elde edilen kimozinin üretiminden sorumlu geni izole ederek E.Coli bakterisi , Klyveromyces marxianus mayasının suşu lactis ve Asprgillus niger mantarının suşu awamori vasıtasıyla, peynir üretiminde tercih edilen bu renneti mikrobial kimozinin üretimi için uygun olan mikroorganizmalardan üretmeyi başardılar. Ancak Rekombinant DNA tekniği ile kimozin üretimi konusunda araştırmalar devam etmektedir.

### 2.3.1 Peynir Üretimi

#### 2.3.1.1 Sütün Özellikleri

Süt doğada bulunan besin değeri yüksek bir gıda maddesidir. Türlerine göre farklılıklar göstermekle birlikte hemen tüm süt çeşitleri vitaminler (genellikle thiamin, riboflavin, pantotenik asit ve A, B<sub>2</sub> ve D vitaminleri) , mineraller (kalsiyum, potasyum, sodyum, fosfor ve eser metaller), proteinler (çoğunlukta kazein), karbohidratlar (genellikle laktoz) ve lipidler (yağlar) içermektedir. Sütteki tek önemli noksanlığın demir ve vitamin C içermemesi olduğu belirtilmektedir. Belirtilen maddelerin süt içindeki miktarları türlere göre geniş ölçüde farklılıklar göstermektedir. Örneğin inek sütü %87,1 su , %3,4 protein, %3,9 yağ, %4,9 karbohidrat ve %0,7 mineral içermektedir. İnek sütü ve keçi sütü oldukça benzer özellikler göstermektedir. İnsan sütünde bulunan protein ve mineral miktarının inek ve keçi sütünde olanın yarısından daha az olduğu belirtilirken, şeker içeriğinin 1,5 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir. At sütünde diğer sütlere kıyasla protein ve yağ miktarı oldukça düşük değerdedir. Ren geyiği sütünde ise protein, mineral ve yağ miktarı yüksektir ve az miktarda karbohidrat bulunmaktadır.

Tüm sütler mikron büyüklüğünde kürecikler (globuller) şeklinde dağılmış halde yaklaşık %3,9 oranında yağ içermektedir. Yağ emülsiyonları globullerin yüzeylerinde absorbe olan fosfolipidler ve protein kompleksleri tarafından stabilize edilmektedirler. Yağ globulleri sudan daha hafif olduğundan, bunlar sulu fazda yükselerek sütün yüzeyinde biraraya gelirler. Yağda çözünen Vitamin A ve D kremada yoğunlaşmış durumdadır.

Sütte Kazein,  $\beta$ -laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbumin olmak üzere başlıca üç tür protein bulunmaktadır. Bunların üçü de globüler proteinlerdir Globüler proteinler kompakt halde küresel yapıda kalmaya eğilim gösterirler ve fibroz proteinlerine göre koloidal süspansiyon şeklinde suda daha kolay çözünebilirler. Vücut için gerekli esas aminoasitlerin tamamını içermesinden dolayı süt, özellikle protein kaynağı olarak önemli bir besin maddesidir. Peynir eldesinde süt proteinlerinin ürün ve peynir suyunda dağılımı Çizelge2.1'de verildiği gibidir.

Çizelge 2.1 Süt proteinleri

<u>Süt Proteinleri</u>	<u>% Total</u>	<u>% Peynir suyu(Whey)</u>
Kazein	17	
$\beta$ -lactoglobulin	10	58
$\alpha$ -lactalbumin	2	13
İmmunoglobulinler	2	12
Serum albumin	1	6
Minor proteinler	2	12

Sütteki esas protein olan kazein bir fosfoproteindir. Fosfat grupları aminoasidlerin yan zincirlerindeki bazı hidroksil gruplarına bağlanarak fosfo protein yapısı oluşturmaktadır. Kazein , sütte kalsiyum kazeinat tuzu şeklinde bulunmaktadır. Kazein molekül ağırlığı ve içerdiği fosfor grupları miktarı farklı olan üç tür proteinin karışımıdır. Bu türler, özellikleri ve içerdiği bazı grupların oranları Çizelge 2.2’de verildiği gibidir.

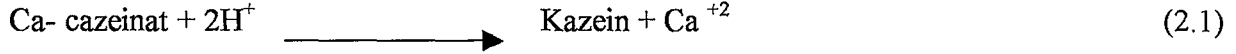
Çizelge 2.2 Kazein çeşitleri ve özellikleri

<u>Kazeinler</u>	<u>%</u>	<u>Mol başına P</u>	<u>Mol başına SH</u>	<u>Mol başına S-S</u>	<u>M<sub>w</sub></u>	<u>pK</u>
$\alpha_{s1}$ Kazein	45-55	8	0	0	23.500	4,6
$\beta$ -Kazein	25-35	5	0	0	24.000	5,0
Kappa Kazein	8-15	1	0	1	19.000	3,7-4,2
Gamma Kazein	3-7	1	0	0	20.000	5,8

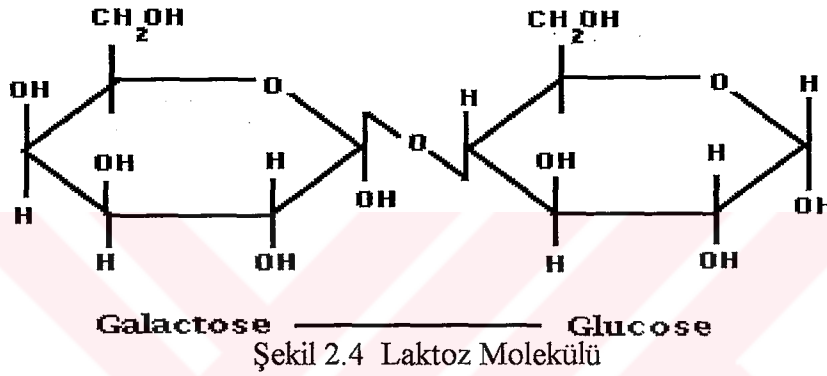
Alfa ve beta kazeinin molekül ağırlığı 25.000 dolayındadır ve bunlar sırasıyla molekül başına 9 ile 4-5 kadar fosfat grubu bulundurmaktadırlar. Her ikisi de suda çözünme özelliğine sahiptir. Molekül ağırlığı 8.000 dolayında olan kapa kazein 1-2 fosfat grubuna sahiptir. Kapa kazein misellerin oluşumunu sağlayarak diğer iki türün suda çözünmesinden de sorumludur .

Kalsiyum kazeinatın izoelektrik noktası pI: 4,6 ’dır. Bu protein pH’sı 4,6’dan daha az olan sulu ortamda çözünmez. Sütün pH’sı 6,6 olduğundan, kazein bu ortamda negatif yüklüdür ve tuzu şeklinde çözülmüş durumdadır.Eğer süte asit ilave edilirse, kazein misellerinin yüzeyindeki negatif yük nötralize olur (fosfat gruplarının protonlaşması sonucu ) ve nötral

protein çöker, kalsiyum iyonları ise çözeltide kalır. Bu işlem, süt kesildiği zaman meydana gelmektedir.



Yağlar ve proteinler çöktürülerek süttten uzaklaştırıldığında, karbohidratlar peynir altı suyunda kalmaktadır. Sütteki esas karbohidrat laktozdur. Laktoz [4-O-(β-D-galaktopiranoz) ] memeliler tarafından sentez edilen tek karbohidrattır. Bu karbohidrat bir molekül D-glukoz ve bir molekül D-galaktozun 1- 4 glikozidik bağıyla birleşmesinden oluşmakta ve 'mammary gland' de sentez edilmektedir.



### 2.3.1.2 Peynir Eldesi

Peynir sütün pıhtılaştırılıp peyniraltı suyunun ayrılmasından sonra, pıhtının değişik şekillerde işlenmesiyle elde edilen bir üründür. Sütün pıhtılaştırılması, peynir yapımında en önemli aşamalarından birisi olup, bu aşamada elde edilen pıhtının reolojik ve biyokimyasal nitelikleri, elde edilecek peynirin özelliklerini ve verimini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle kaliteli peynir üretiminde sütün pıhtılaştırılması aşaması önem taşımaktadır.

Sütün pıhtılaştırılması iki farklı yöntemle gerçekleştirilir.

1-Asid ile pıhtılaştırılma

2-Enzim etkisiyle pıhtılaştırılma

Birinci yöntemle sütün pıhtılaştırılması , sütü ya kendi halinde bir süre bekleterek , yada süte laktik kültür, asid ve laktonlardan birinin ilavesiyle pH değerini düşürerek gerçekleştirilir. Bu yöntemde izoelektrik noktanın (pH:4,6) üzerinde bir pH'da pıhtılaştırma yapıldığında ısı işleminden yararlanır (sütün %0.25 LA'da 82<sup>0</sup> C de pıhtılaştırılması gibi). Bu yöntemle kazeinin izoelektrik noktasında ya da buna yakın bir pH'da elde edilen pıhtılar taneli ve esnek olmayan bir yapı göstermektedirler. Bu tür uygulama enzimle pıhtılaştırmaya göre, oldukça sınırlı olarak kullanılmaktadır (Scott, 1981; Fox, 1987).

İkinci yöntemde sütün pıhtılaştırılması proteolitik enzimlerin etkisi ile sağlanmaktadır. Bu enzim preparatları Peynir Mayası olarak da adlandırılmaktadır. Peynir mayaları  $\kappa$ -kazeini, Para - $\kappa$ -kazein ve makropeptide parçalayarak sütün pıhtılaşmasını gerçekleştirmektedirler (Schwimmer, 1981).

Peynir üretiminde standardize ve pastörize edilen süt, seçilen mayalanma sıcaklığına kadar soğutulur. Uygulanan mayalanma sıcaklığı genellikle  $20^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerinde ve  $40^{\circ}\text{C}$ 'nin altındadır. En fazla uygulanan ise  $30^{\circ}\text{C}$  dolayında mayalanmadır. Çünkü  $21-27^{\circ}\text{C}$  'ler arasında elde edilen pıhtı yumuşak ve jelimsi,  $30^{\circ}\text{C}$  'de elde edilen sıkı ve kesim sırasında küçük parçalar haline getirilmesi zor nitelikte,  $33-36^{\circ}\text{C}$  'ler arasında elde edilenler ise sert ve lastiksi özelliktedir (Scott, 1981). Mayalama sıcaklığına getirilen süte bazı maddeler ilave edilmektedir. Bunlar içerisinde özellikle kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) ve 'starter' kültürleri önemlidir. Peynir mayasından önce süte katılan kalsiyum klorür pıhtılaşmayı kolaylaştırmaktadır. Fazla miktarda kullanılan kalsiyum klorür ise pıhtılaşma açısından bir yarar sağlamadığı gibi, acı tat oluşmasına da neden olmaktadır. Starter kültürünün mayalama aşamasındaki temel işlevi ise asid oluşturmasıdır. Sütün mayalama sıcaklığına soğutulmasından hemen sonra ilave edilen starter kültürleri, öngörülen süre içinde sütün asidliğini belirli bir düzeye yükselterek ön olgunlaşmasını gerçekleştirirler. PH 'nın düşürülmesi pıhtı oluşum süresini ve pıhtı formasyonunu olumlu yönde etkilemektedir. Ancak belirli bir değerin altına düşmemesi gerekir. Çünkü, mayalanma sırasında ortamın asid düzeyi yükseldikçe, elde edilen pıhtı da asid pıhtı niteliğini almaktadır. Enzimlerin etkisiyle sütün koagülasyonu sonucu oluşan pıhtı peynir çeşidine uygun büyüklüklerde kesildikten sonra karıştırılıp tuzlanarak kalıplara aktarılmakta, burada belirli bir süre kendi halinde süzülükten sonra baskıya alınarak süzme tamamlanmaktadır.

Peynir elde edildikten sonra tüketimine kadar geçen sürede peynirin tadı, kokusu, rengi, ve yapısında değişimler meydana gelmektedir ve bu aşama peynirin olgunlaşması olarak adlandırılmaktadır. Bu aşamada enzimlerin ve mikroorganizmaların (bakteri, küf, mayaların) faaliyetleri sonucu su kaybı, laktozun fermentasyonu, proteinlerin ve süt yağının parçalanması gibi olaylar meydana gelmektedir ve sonuçta peynir kendine özgü nitelikleri kazanmaktadır (Demirci, 1996).

### 2.3.1.3 Peynir Üretiminde Kullanılan Proteazlar

Peynir elde edilmesinde kullanılan proteazlar (proteinazlar) aspartik proteinaz (EC .3.4.23) olarak bilinen enzim sınıfına girmektedirler. Bu enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri pH aralığı 1.5-5.0 olup, aktif merkezleri iki aspartik asid artığı bulundurmaktadır. (Voynick ve

Fruton, 1971 ; Dalglish , 1982) Aspartik proteinaz enzimlerinin çoğu yapı ve sekans homologudurlar ( Smith ve Yada , 1991).

Bu enzimlerin peynir yapımında başarılı sonuç vermesi, sadece sütü pıhtılaştırma özelliklerine bağlı değildir. Peynir üretiminde yer alan enzimlerin proteolitik özellikleri de önem taşımaktadır. (Dalglish 1982) .Aspartik proteazlar bu konu edilen aktiviteleri ile ilgili olarak farklılıklar göstermektedirler. Örneğin kimozinin proteolitik aktivitesine oranla sütü pıhtılaştırma aktivitesi (MCA/PA) daha yüksek iken , domuz(porcine) pepsininde bu oran daha düşük değerdedir. Aktif merkezlerinde aspartik asid içermeyen tripsin,  $\alpha$ -kimotripsin, papain gibi proteazların sütü pıhtılaştırma aktiviteleri, proteolitik aktivitelerine oranla oldukça düşüktür. Aynı grupta yer alan bu enzimlerin aktiviteleri arasındaki farklılıklar konformasyonlarındaki değişikliklerden ileri gelmektedir (Yada ve Nakai, 1986).

Aspartik proteinazlar, sütte bulunan kazein misellerinin dış yüzeyinde yer alan kappa-kazein moleküllerindeki fenil alanin(105)-metiyonin (106) bağımlı hidrolizleyerek pıhtı oluşumuna yol açarlar. Kimozin çok spesifik olarak kapa kazeinin bu bağımlı hidrolizlemektedir (Visser vd., 1987; Abdel Malak, 1992 ;Turhan ve Mutlu, 1997) . Örneğin mikrobial rennetlerin kazein hidrolizindeki etkisi bu belirtilen bağa çok spesifik değildir ve bu da peynir eldesinde ürünün kalitesini etkilemektedir.

Carlson deneysel çalışmalarında, kappa-kazeinin %65'ten fazlası hidrolizlendiğinde pıhtı oluşumunun gerçekleştiğini göstermiştir. Green ve çalışma grubu da elektron mikroskobu ile yaptıkları incelemelerde benzer sonucu elde etmişlerdir (Van Hooydonk ve Walstra, 1987).

#### **2.4 Enzim-Polielektrolit Kompleksleri**

Kimyasal enzimolojinin en önemli sorunlarından birisi enzimlerin stabilleşmesinin prensiplerinin araştırılmasıdır. Bu problemin çözülmesi tıpta, kimyasal teknolojide, gıda sanayiinde, analitik amaçlar v.b. gibi geniş pratik uygulaması olan stabil enzim preparatlar oluşturma açısından oldukça önemlidir. Enzimlerin stabil hale getirilmesinde polimerlerden yararlanılmaktadır. Sentetik polimerler protein partikülleriyle kompleks oluşturarak enzim molekülü yüzeyinde tek başlarına mikro örtü oluşturabilirler (Mustafaev.M.I, 1996)

Enzimlerin stabilleşme yönteminin bulunması biyoorganik katalizörler yapmak için de güncel problemdir. Bu sahadaki araştırmaların çoğu, termostabil proteinler (enzimler) sentezlemek için yönlendirilmiştir. Ancak yapısında -SH grubu olan bazı enzimlerin (formik dehidrogenazlar-FDH, alkol-dehidrogenaz-ADH v.b.) aktifleşmesi, havanın oksijeni ile gerçekleşir. Bu enzimlerin aşırı değişkenliği, bunların pratik uygulama imkanlarını sınırlar.

Buna göre -SH gruplarının oksitlenmesinin, oksitlenen sülfidril grupları ile kompleks oluşturan geçiş metal iyonlarının karışımı ile katalizlendiği bilinmektedir. Bu durumda, konu edilen enzimlerin stabilleşmesi için metal iyonlarının bağlanması ve uygun indirgeme metodlarından yararlanılmaktadır. Bu metodlar etkilidir ancak uygulamaları evrensel değildir.

Enzimlerin stabilitesi ile ilgili problemlerin çözümü için polimerlerden yararlanılmaktadır. Sentetik polimerler protein partikülleri ile kompleks oluşturarak enzim molekülü yüzeyinde mikro örtü oluşturabilirler. Polikasyon, sülfhidril gruplarını havanın oksijeni ile oksitlenmekten korumaktadır. Enzimin polikompleks yapısında, kimyasal stabilitesine, polikasyon yükünün büyük etkisi vardır. Makromolekülün pozitif yükünün artması, PE'nin sabit uzunluğunda polinaktifleşme periyodunun iki kat artmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda polikasyonun yapısında negatif yüklerin oluşması da enzimin kararlılığını inaktifleşme şartlarına getirmektedir.

Polikompleksin yapısında asıl rolü, polielektrolitin pozitif yükleri oynamaktadır. Protein-PE çözünebilen polikomplekslerinin yapısına uygun olarak, enzimlerin kararlılık mekanizmasının, şu şekilde olduğunu söylemek mümkündür. Polikasyon molekülü enzim partikülleri yüzeyinde pozitif yüklü bir örtü meydana getirmektedir. Bu örtü ile aynı türde yüklenmiş metal iyonlarının, elektrostatik itme kuvveti etkisi nedeniyle protein molekülüne girmesini engellenir. Sonuçta -SH gruplarının oksijen ile katalitik oksitlenme prosesi de ortadan kalkar (Mustafaev, 1996).

UZUNEREN POLYMERLER  
DOKÜMANASYON MERKEZİ  
1000



## 2.5. HPLC sistemi

HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) analitik kimya alanında en hızlı gelişen tekniklerden birisidir. Yüksek basınç nedeniyle analiz süresinin azalması, kesin sonuca ulaşma, düşük oranlarda miktar saptama, analizlerin oda sıcaklığında yapılması sistemin avantajlarıdır ve geniş kullanım alanı kazandırır. En çok kullanıldığı yerlerden biri olan gıda biliminde, katkı maddeleri, bulaşma, bozulma, karbohidratlar, renklendiriciler, yağ ve yağ asitleri, tatlandırıcı ve uçucu bileşikler, inorganik maddeler, organik asitler, azotlu bileşikler ve vitaminlerin analizlerinde uygun kolon ve dedektör seçilerek kullanılabilir.

Kromatografi, çağdaş analitik kimya laboratuvarlarında en çok benimsenmiş olan bir "ayırma" tekniğidir. Karışımların ayrılması, bileşenlerin tanısı ve miktarları, hassas bir şekilde, kısa zamanda yapılabilmektedir.

### 2.5.1 Prensip

Analizlenecek örneğin, biri sabit, diğeri hareketli olmak üzere iki faz arasında "Paylaşım Katsayı" larının farklılığına göre bileşenlerine ayrılmasıdır. Sabit faz içeren bir kolon boyunca hareketli faz ile taşınan örnek, kolon içinde borular halinde değişik hızlarda yol alan bileşenlerine ayrılarak kolonu terketmektedir. "Alıkonma Süresi" olarak tanımlanan bu kavram bileşenlerin ayrılmasında etkin bir faktördür. Kolon çıkışında dedektörce algılanan sinyal, elektrik sinyaline dönüştürüldükten sonra yazıcı veya entegratörde sonuçlar "pik" olarak alınıp değerlendirilir. Bu prensip hem GC (Gaz kromatografisi) hem LC (Sıvı Kromatografisi) için aynıdır, ancak GC'de taşıyıcı faz gaz, LC de ise sıvıdır.

### 2.5.2 HPLC Sisteminin Teknik Özellikleri

Dizayn açısından sistem

- modüler
- entegre olmak üzere iki tür olabilir.

#### 2.5.2.1 Modüler Sistem

Birbirinden ayrılabilen çok parçalı bir sistemdir ve daha avantajlıdır. Taşıma, yerleştirme, cihazı tanıma kolaylığı vardır. Laboratuvar bütçesine göre zamanla yeni parçalar ilave edilerek sistem geliştirilebilir.

### 2.5.2.2 Entegre Sistem

Bir veya iki parçadan ibarettir ve zamanla sistemi geliştirme şansı azdır.

Sistem çalışma tarzına göre iki türlü olabilir;

1. İsookratik sistem
2. Gradient sistem

**İsookratik Sistem:** En basit ve ucuz olanıdır. Tek pompalıdır ve kullanılan sıvı (taşıyıcı faz) analiz boyunca aynı derişimde tutulur. Cihazın dengeye gelme süresi kısa, kullanılan kolon ömrü uzundur. Rutin analiz yapan laboratuvarlara önerilebilir.

**Gradient Sistem :** Birden fazla solvent karışımı kullanılır ve zamanla solvent oranlarının değiştirilebilme olanağı vardır. Bileşenlerine zor ayrılan örnekler için idealdir. İkinci bir pompa (hatta üçüncü), solventleri karıştırıcı ünite, karışım oranlarını kontrol eden bir programlayıcı ünite vardır. Ayrıca isokratik olarak da çalışabilir.

**Bunların dışında bir de otomatik sistem vardır** ki gradient sistem ünitelerine ilave olarak Otomatik Enjeksiyon Mekanizması bulunur.

### 2.5.3 HPLC Sistemi Üniteleri

- solvent besleme ünitesi,
- pompa(lar),
- enjeksiyon bloku,
- kolon,
- dedektör,
- yazıcı olarak sıralanmaktadır.

#### 2.5.3.1 Solvent Besleme Ünitesi

Sistemde taşıyıcı faz olarak kullanılan

- solventleri içeren şişe(ler)
- pompa(lar)
- Gaz giderici: yeni sistemlerde solvent içerisinde kalabilecek hava kabarcıklarının akış yoluna gitmesini önlemek için bu sistem (degasser) bulunmaktadır.

Solvent cihaza pompa yardımıyla verilir, belirli zamanda belirli hacimde solvent geçecek şekilde (ml/dak.) akış hızı ayarlanabilir. Birbirinden bağımsız olarak çalışan 1, 2 veya 3 pompa olabilir.

### 2.5.3.2 Enjeksiyon Bloku

Analizlenen örneğin sisteme verildiği yerdir. Değişik firma ürünlerinde

- septumlu (manual),
- septumsuz otomatik enjeksiyon donanımlı olanları vardır.

### 2.5.3.3 Kolon

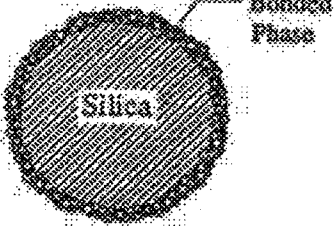
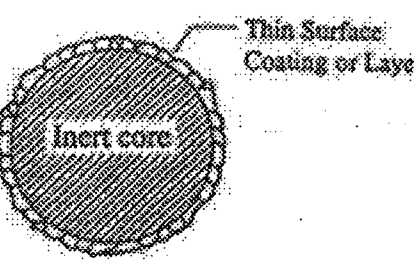
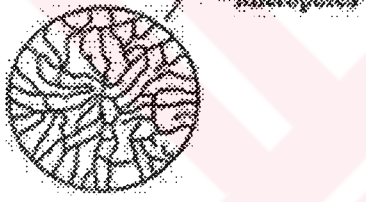
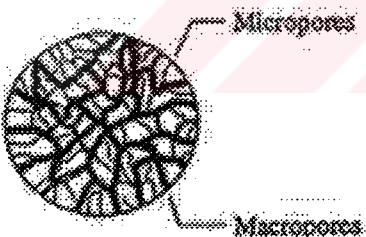
- Cihazın “kalbi” sayılır.
- Genellikle paslanmaz çelikten yapılır.
- Değişik boy ve çapta olabilir.
- Fiyatları genellikle 300.000.000 TL – 1.500.000.000 TL arasında değişir. Genelde kullanılan kolon özelliği:
- 10-30cm boy
- 4,6-5mm iç çap
- 5 veya 10 $\mu$ m dolgu maddesi partikül büyüklüğü

Son zamanlarda iç çapı 1-4,6mm arasında değişen, yüksek çözünürlükte ve daha kısa zamanda, daha az solvent harcayarak sonuç verebilme özelliği olan kolonlar geliştirilmiştir.

### Kolon Dolgu Maddesi

Tipik bir dolgu maddesi

- iyi belirlenmiş partikül büyüklüğüne
- basınca karşı uygun mekanik kuvvete
- yüksek kimyasal stabiliteye sahip olmalıdır.

	<p><b>Yüzeğe bağlanmış silis fazı</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- hidrokarbon grupları ile bağlı silanol (Si-OH) içeren silis</li> <li>- Bağlı faz'ın doğası kromatografik davranışı belirler</li> </ul>
	<p><b>İnce yüzey kaplaması</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- İnert bir tabaka fiziksel desteği sağlar</li> <li>- İnert tabaka üzerindeki ince tabaka ayrılmayı sağlayan fonksiyonel grupları içerir.</li> </ul>
	<p><b>Mikrogözenekli</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Çapraz bağlı polimerler içeren gel-tipinde reçineden yapılmıştır.</li> </ul>
	<p><b>Makrogözenekli</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Yüksek derecede çapraz bağlı (&gt;50%) reçine içerir.</li> <li>- pH 1 – 14 arasında stabildir.</li> <li>- Çeşitli partiküller ve gözenekler içerebilir</li> </ul>

Şekil 2.5 Kolon dolgu maddeleri

### 2.5.3.4 Dedektör

HPLC dedektörleri 2 ana başlık altında toplanabilir;

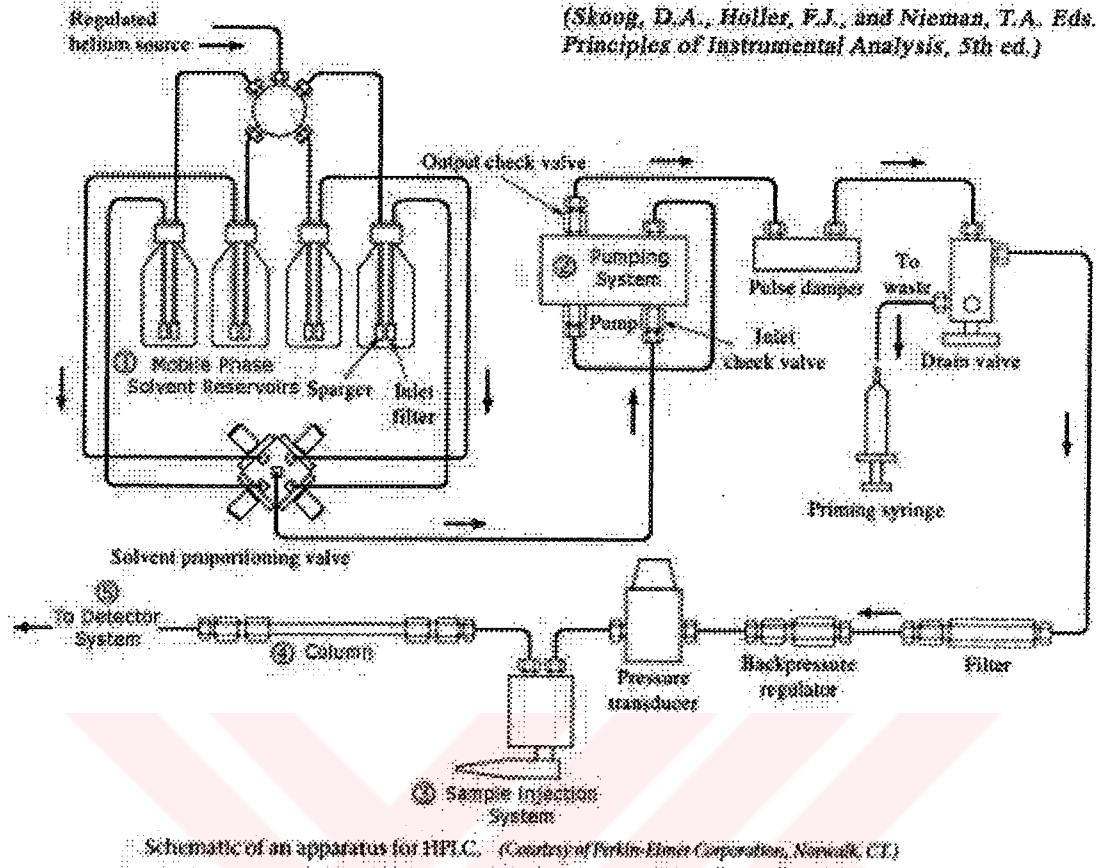
- *Mobil faz dedektörleri:* Analiz edilmek istenen maddenin varlığı nedeniyle mobil fazda meydana gelen değişikliklere cevap veren dedektörler
  - Refraktif İndeks
  - Dielektrik Sabiti
  - Yoğunluk dedektörleri
- *Analiz edilmek istenen madde dedektörleri:* Analiz edilmek istenen maddenin varlığına cevap veren dedektörler
  - UV absorbans
  - Floresans dedektörler

Dedektörlerin seçimi

- Analiz edilecek maddeye
- Maddenin Konsantrasyonuna bağlıdır.

Hassasiyeti arttırmak için light scattering dedektör, radyoaktif dedektör, vizkozite dedektörleri gibi dedektörler geliştirilmiştir.

Ayrıca spesifikliğı ve hassasiyeti arttırmak için birden fazla çeşit dedektör kullanılabilir.



Şekil 2.6 Genel HPLC sistemi

1. Mobil faz / Solvent kapları
2. Pompa sistemi
3. Örnek enjeksiyon sistemi
4. Kolon
5. Deteksiyon sistemi

### 3. DENEYSEL KISIM

#### 3.1 Kullanılan Cihazlar

Terazi

HPLC (Shimadzu LC 10AT VP)

*HPLC Koşulları*

UV dedektör: 280nm

Refraktif indeks dedektör

Kolon: DIOL 300 (7.9mm x 50cm)

Ön kolon: DIOL 300

Mobil faz: 0,01M Fosfat Tamponu (pH 7.0) + 0,2M Sodyum sülfat + %0,01 Sodyum Azid

Akış hızı: 1ml/dak

Çalışma Sıcaklığı: Oda sıcaklığında

pH metre

#### 3.2 Kullanılan kimyasallar

Saf Su: HPLC saflıkta

Sodyum dihidrojen fosfat: 1,77g / 1lt

Sodyum sülfat: 28,4g / 1 lt

Sodyum azide: 0,1g/1lt

BSA: Bovin Serum Albumin

alfa-Amilaz

Mucor Miehei Rennet

Polimer (Dekstran sülfat aldehit): Dekstran sülfatın sudaki çözeltisine  $\text{NaIO}_4$  eklendikten sonra karışım  $20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 5 saat karıştırıldı. Elde edilen yükseltgenmiş ürün 24 saat dializ işlemine bırakıldı. Soğutarak kurutma ile (liyofilizatör) aldehid grupları bulunduran polimer elde edildi.

#### 3.3 Kullanılan sarf malzemeler

Balon joje: 1000ml – 100ml – 50ml – 25ml

Beher: Çeşitli hacimlerde

Erlen: Çeşitli hacimlerde

Otomatik pipet: 0-100 $\mu\text{l}$ , 100-1000 $\mu\text{l}$

### 3.4 Örnek Hazırlama ve Enjeksiyon

HPLC’de incelenmek üzere aşağıdaki çözeltiler hazırlandı:

BSA çözeltileri

Saf  $\alpha$ -Amilaz çözeltileri

Saf Rennet çözeltileri

$\alpha$ -Amilaz-Polimer konjugat çözeltileri

Rennet-Polimer konjugat çözeltileri

#### 3.4.1 Bovin Serum Albumin

Aşağıda verilen konsantrasyonlarda BSA çözeltileri hazırlandı:

%0,01’lik BSA: 0,0050g BSA tartıldı mobil faz ile 50ml’ye tamamlandı= 0,01g/100mL

%0,05’lik BSA: 0,0125g BSA tartıldı mobil faz ile 25mL’ye tamamlandı=0,05g/100mL

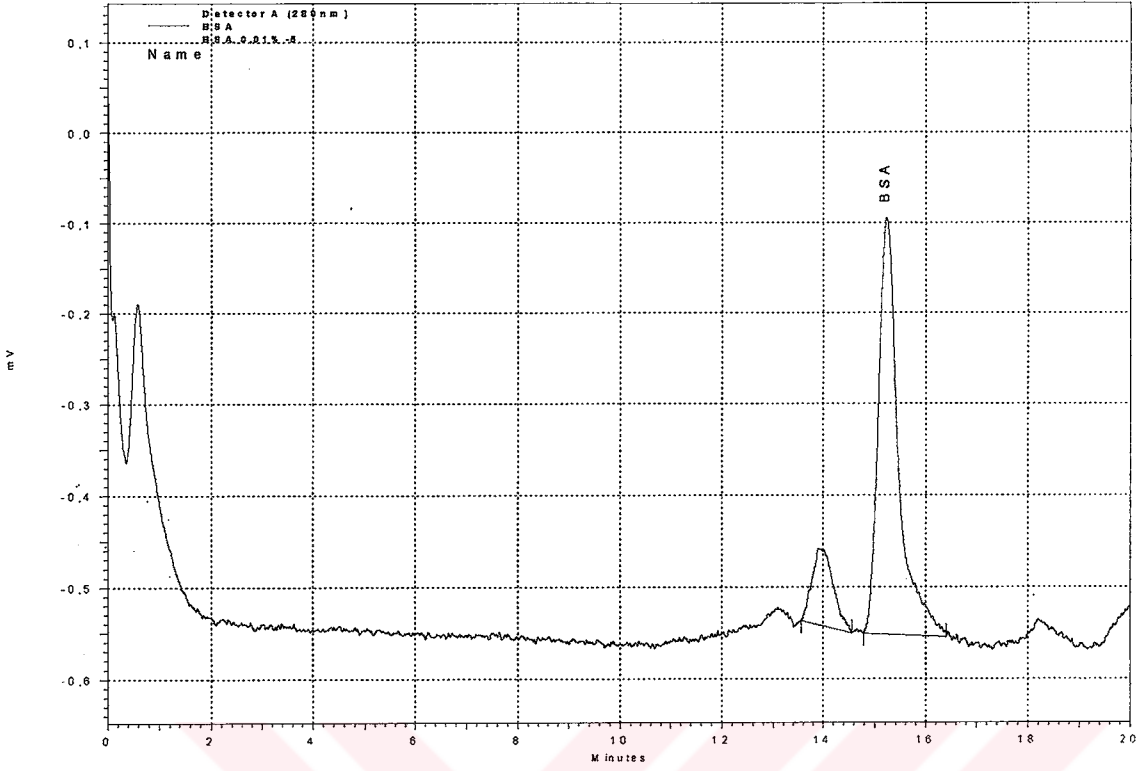
%0,1’lik BSA: 0,0250g BSA tartıldı mobil faz ile 25 mL’ye tamamlandı=0,1g/100mL

##### 3.4.1.1 BSA enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi

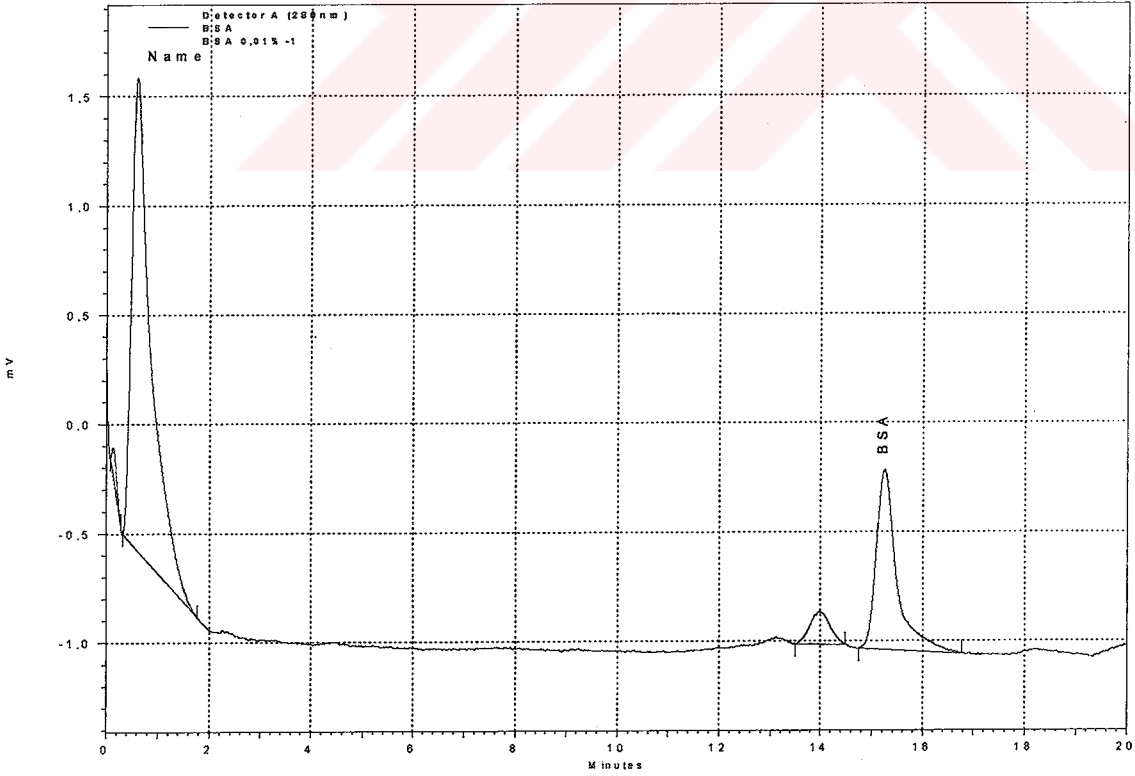
Hazırlanan BSA çözeltilerinden 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 40 $\mu$ L, 100 $\mu$ L’lik enjeksiyonlar yapıldı.

UV dedektör kullanılarak 280nm’de kromatogramlar alındı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

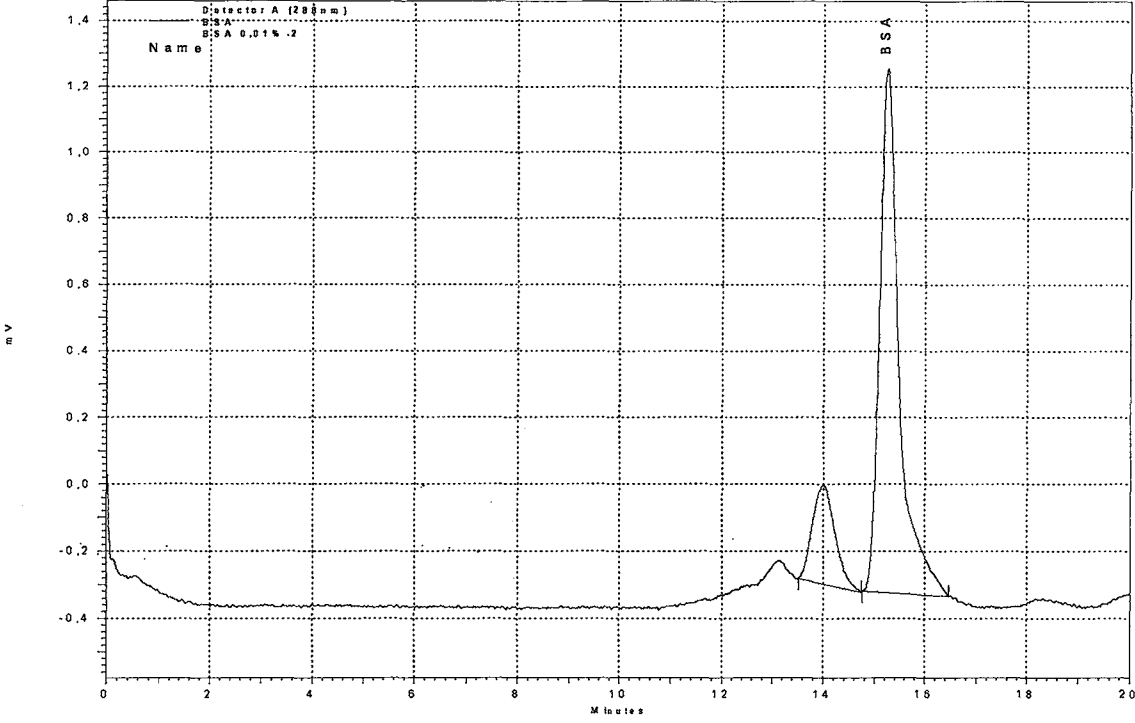




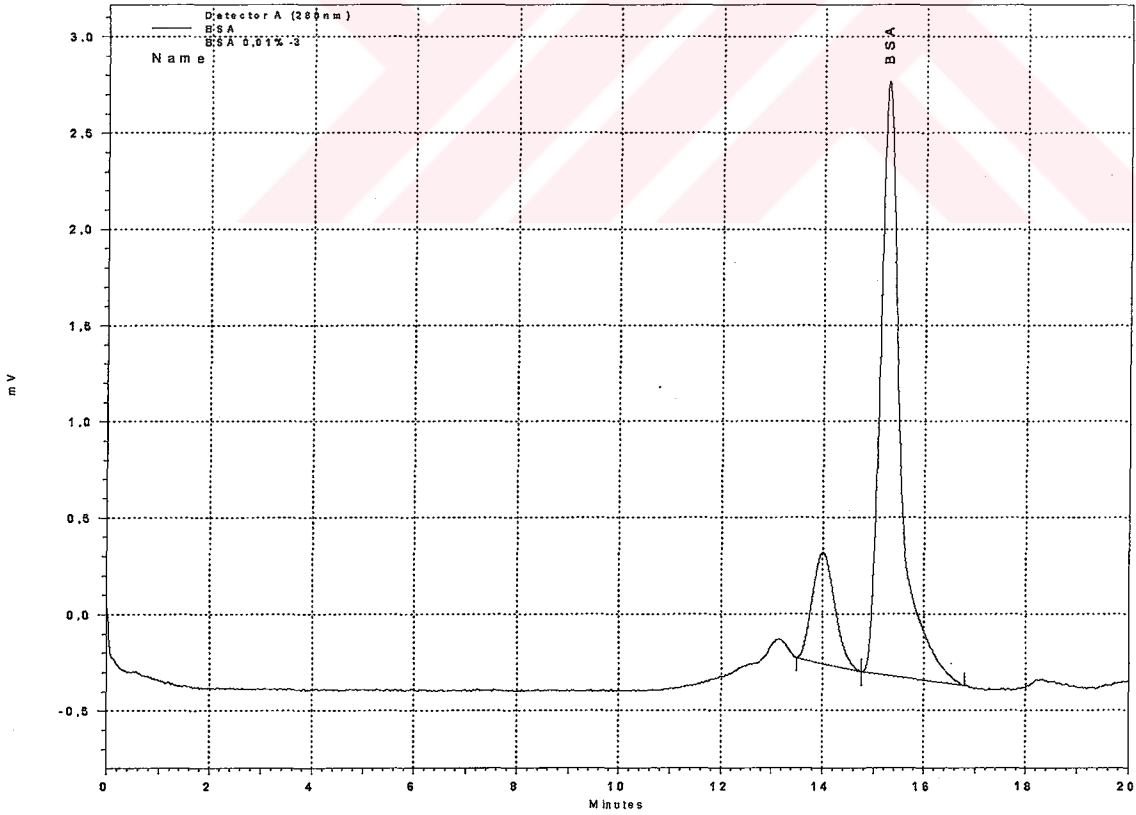
Şekil 3.1 UV dedektör ile 280 nm'de %0,01'lik BSA çözeltisinin 5µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



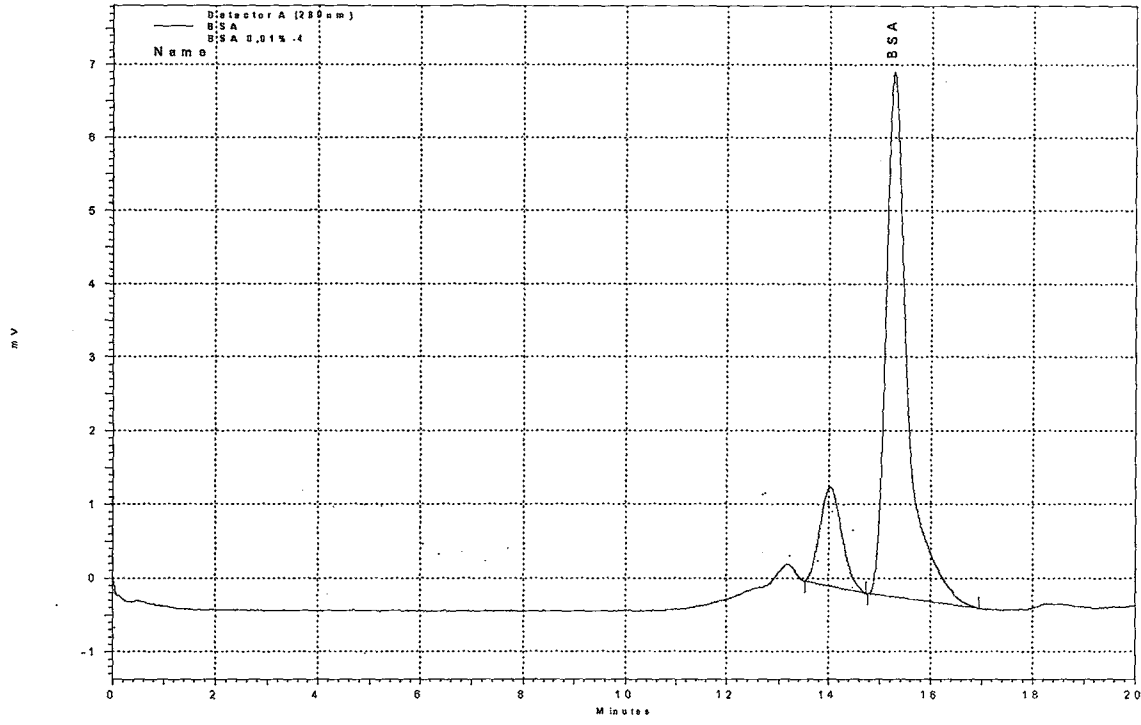
Şekil 3.2 UV dedektör ile 280 nm'de %0,01'lik BSA çözeltisinin 10µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



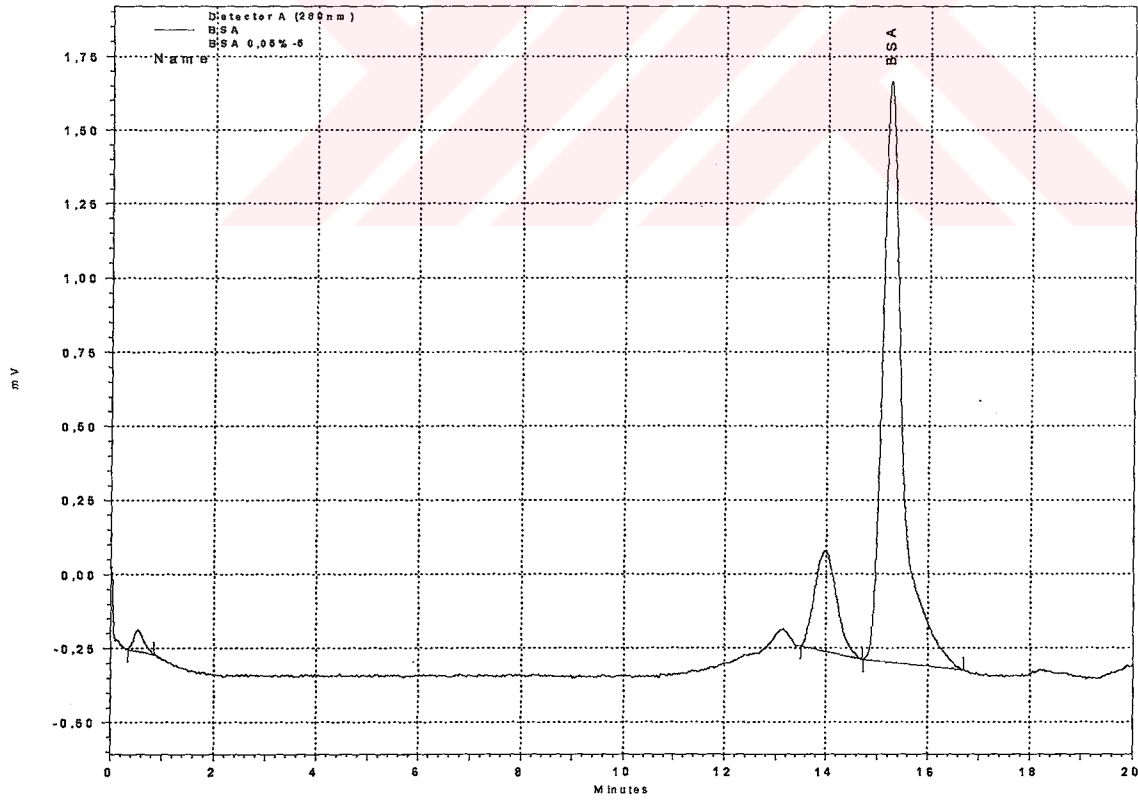
Şekil 3.3 UV dedektör ile 280 nm'de %0,01'lik BSA çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



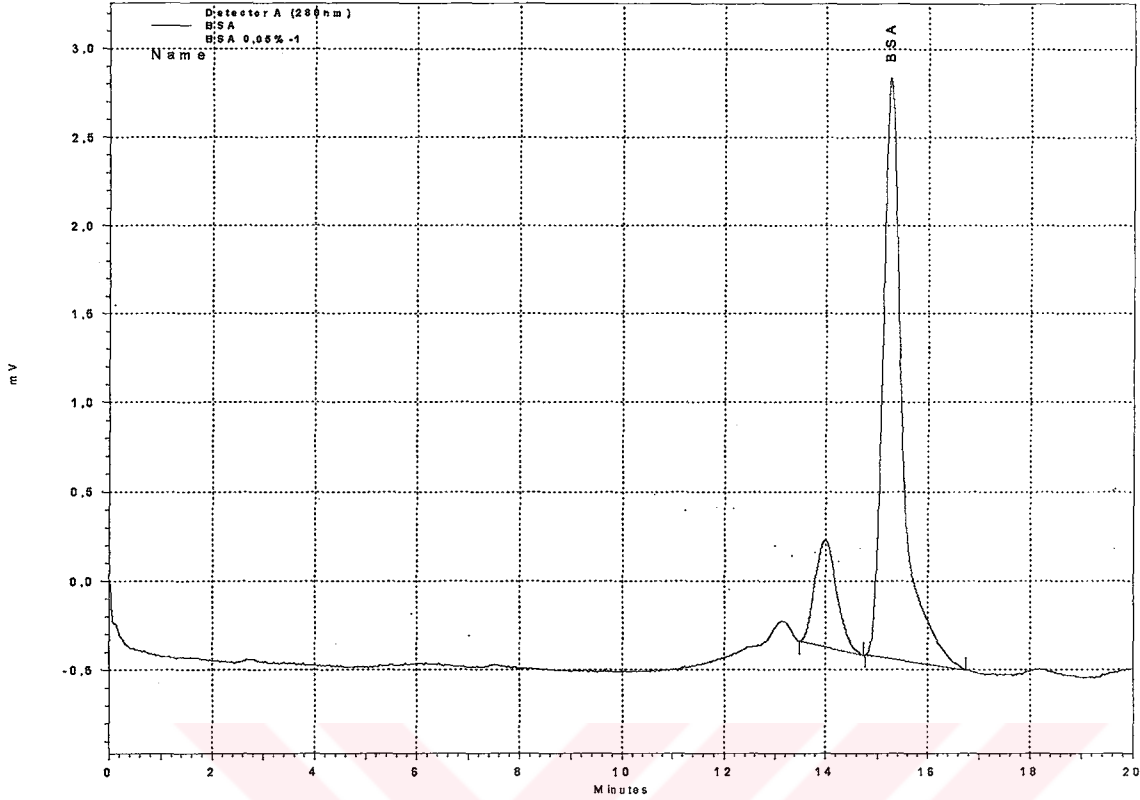
Şekil 3.4 UV dedektör ile 280 nm'de %0,01'lik BSA çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



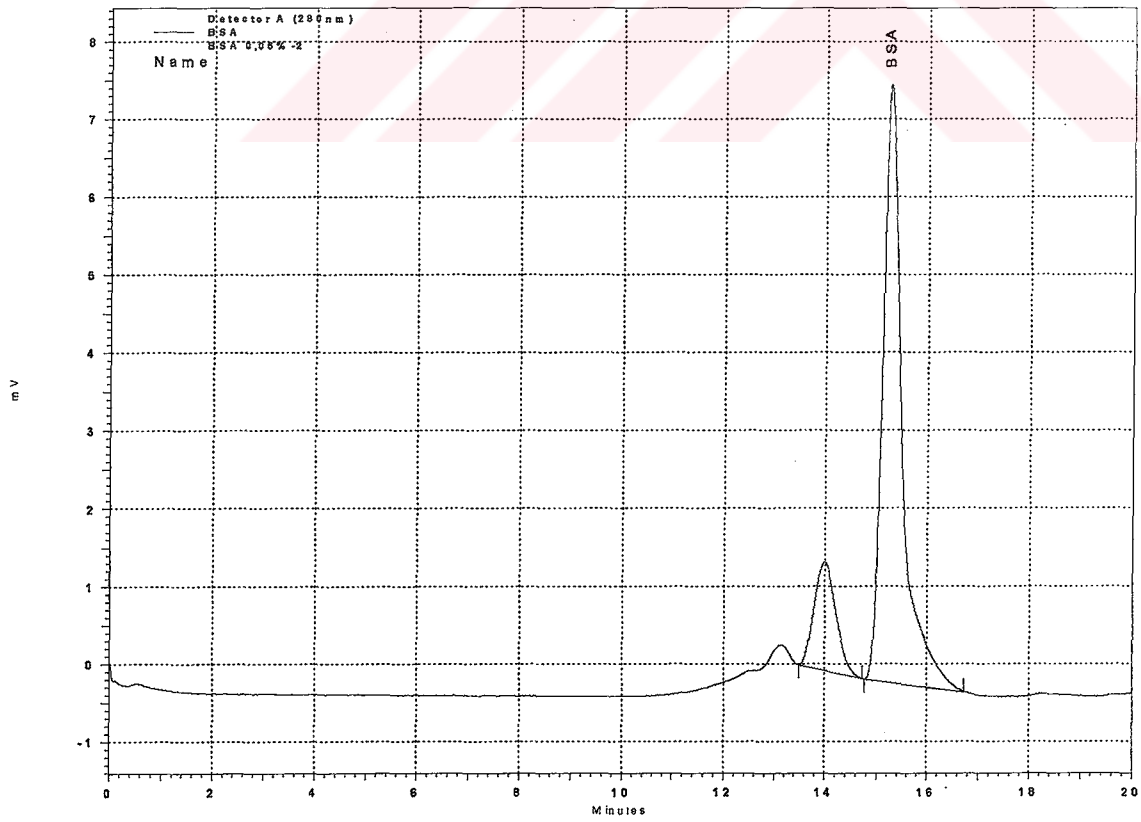
Şekil 3.5 UV dedektör ile 280 nm'de %0,01'lik BSA çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



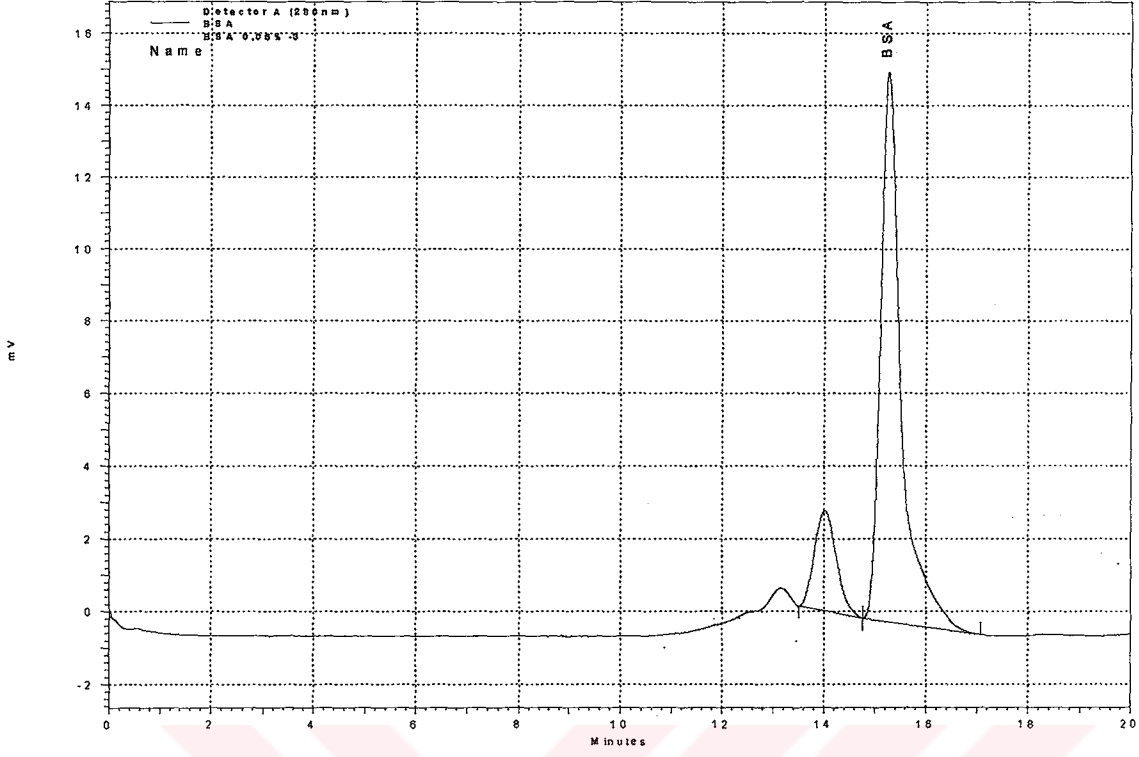
Şekil 3.6 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik BSA çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



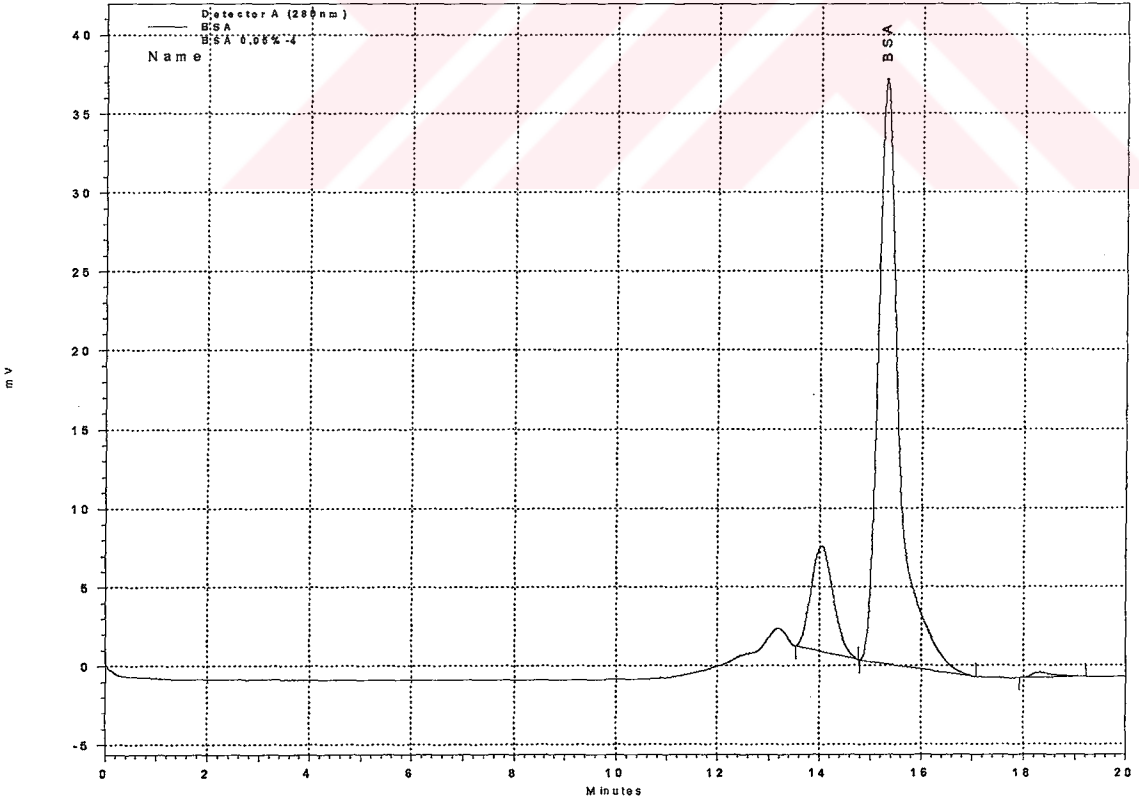
Şekil 3.7 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik BSA çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



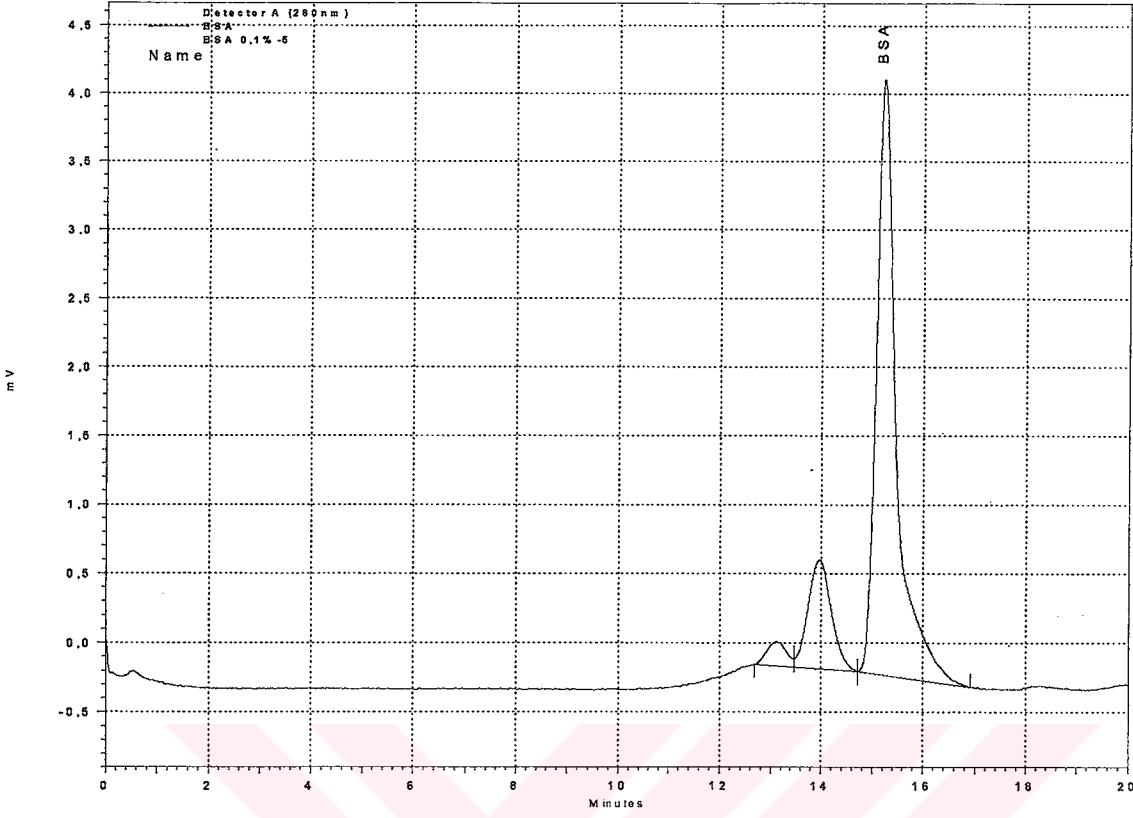
Şekil 3.8 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik BSA çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



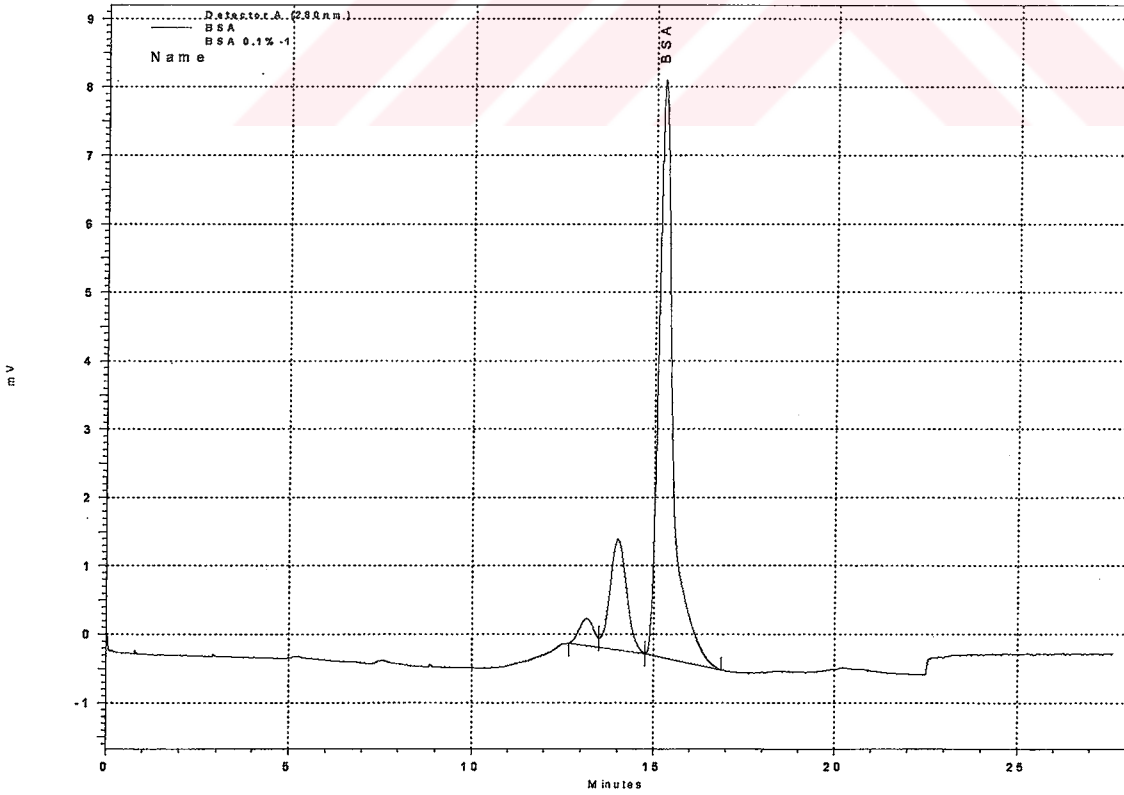
Şekil 3.9 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik BSA çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



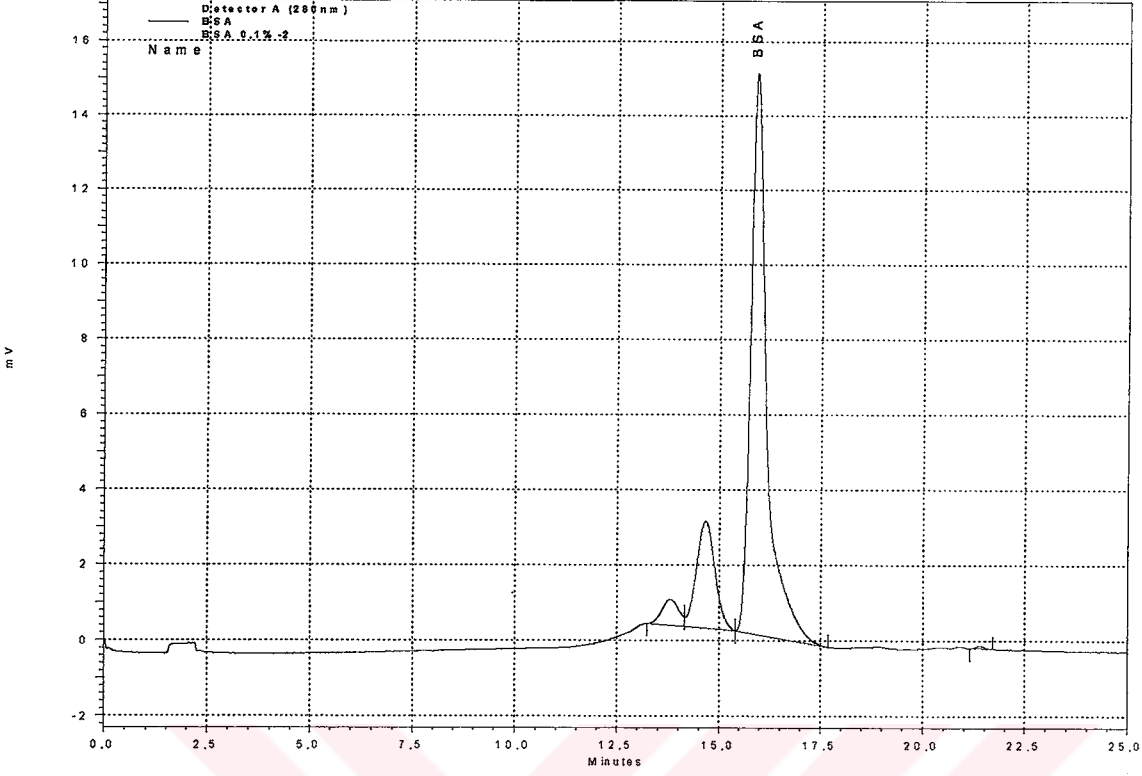
Şekil 3.10 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik BSA çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



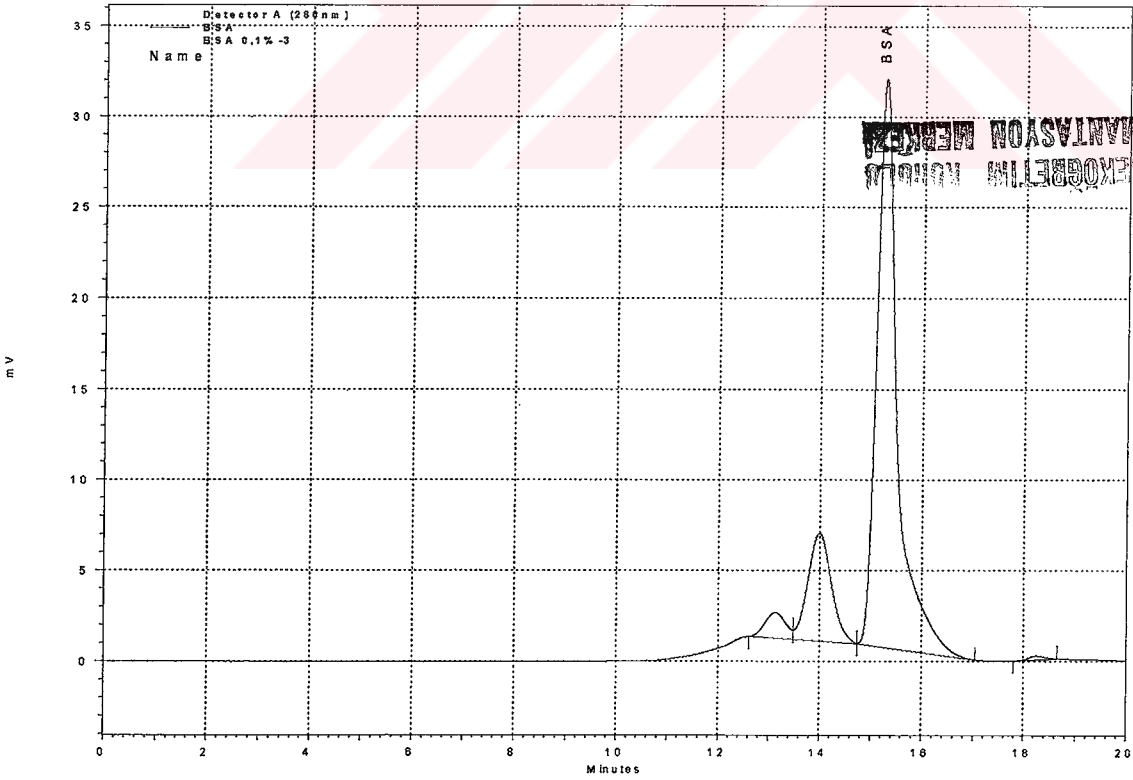
Şekil 3.11 UV dedektör ile 280 nm'de %0,1'lik BSA çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



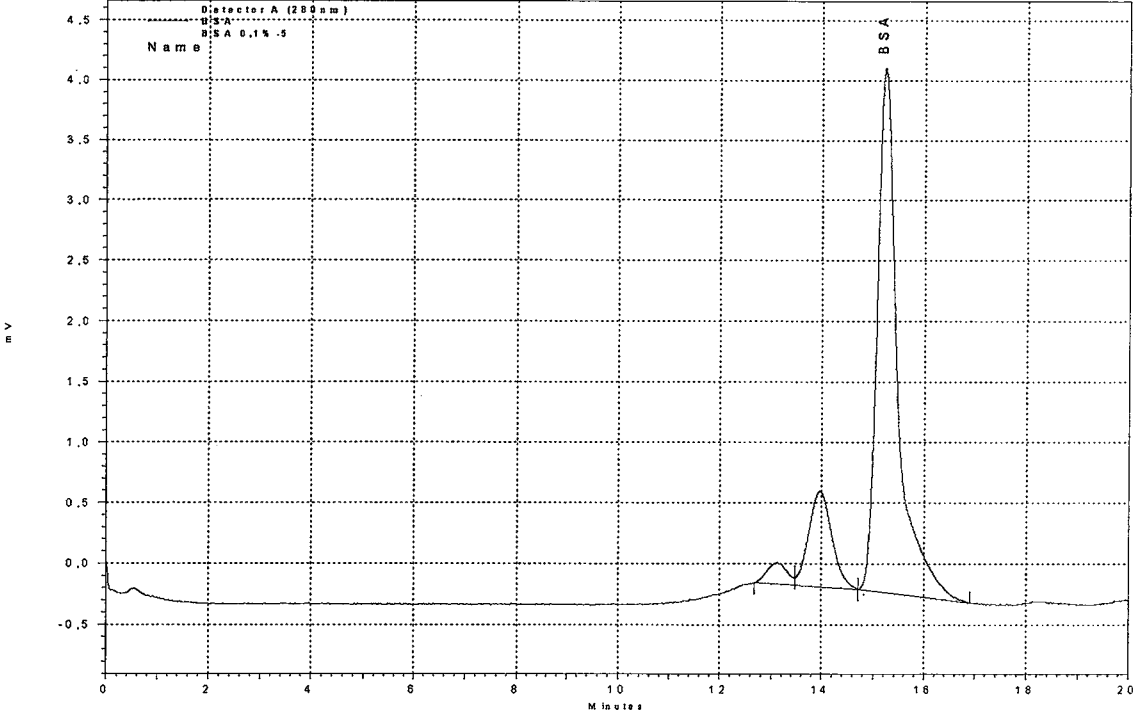
Şekil 3.12 UV dedektör ile 280 nm'de %0,1'lik BSA çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.13 UV dedektör ile 280 nm'de %0,1'lik BSA çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.14 UV dedektör ile 280 nm'de %0,1'lik BSA çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.15 UV dedektör ile 280 nm’de %0,1’lik BSA çözeltisinin 100µL’lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram

UV dedektörle 280nm’de BSA çözeltilerinin enjeksiyonlar ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

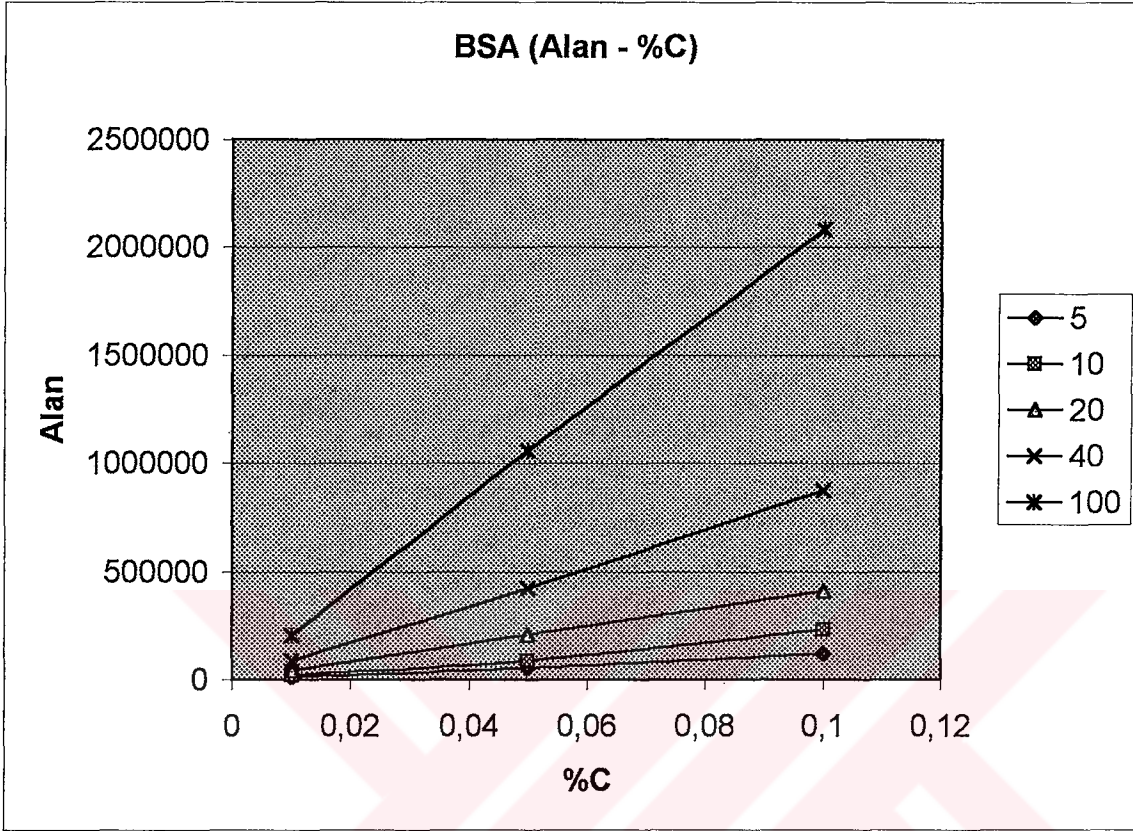
Çizelge 3.1 UV dedektörle 280nm’de farklı konsantrasyondaki BSA çözeltileri ile elde edilen kromatogramlardan okunan değerler

Konsantrasyon (g/100mL)	Enjeksiyon hacmi (µL)	Alıkönme Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,01	5	15,220	12232	457
0,01	10	15,239	22525	820
0,01	20	15,244	42404	1580
0,01	40	15,255	85689	3087
0,01	100	15,273	205370	7150
0,05	5	15,225	53422	1963
0,05	10	15,244	88059	3274
0,05	20	15,243	206370	7685
0,05	40	15,260	424749	15210
0,05	100	15,290	1057402	37083
0,1	5	15,214	119606	4340
0,1	10	15,248	230749	8447
0,1	20	15,908	410165	14990
0,1	40	15,241	872935	31332
0,1	100	15,278	2082584	72346

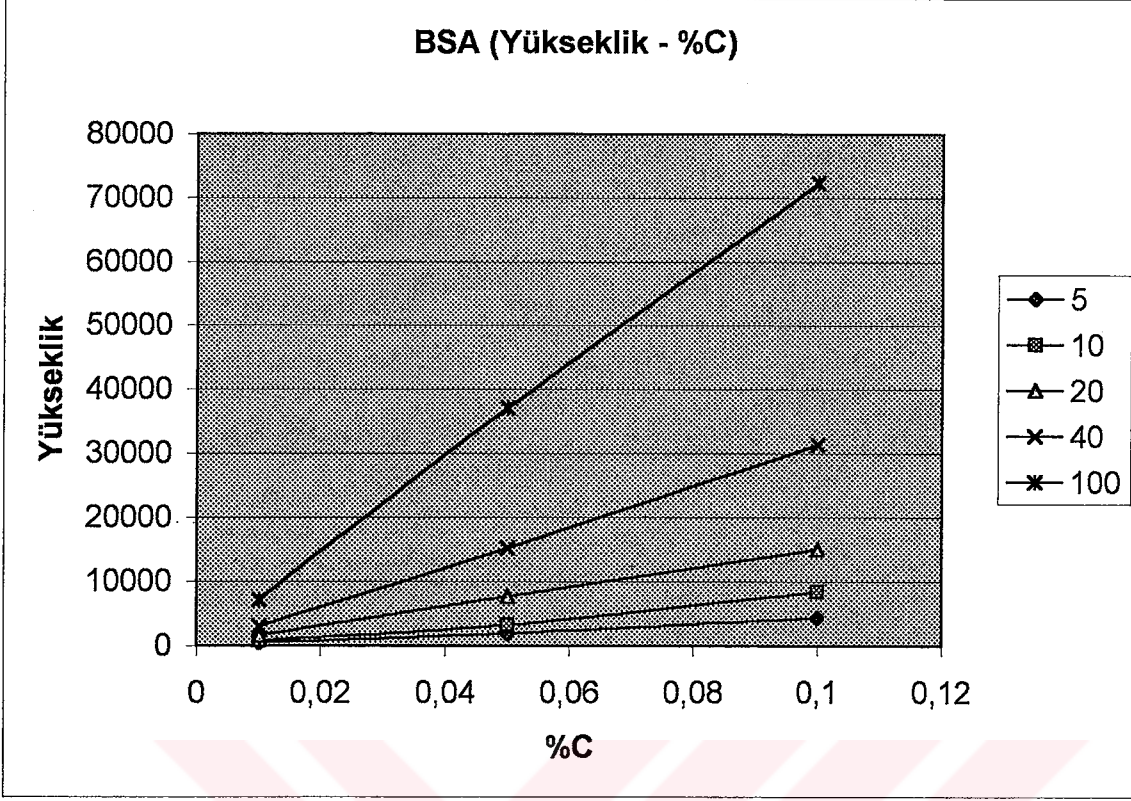
Alınan sonuçlardan faydalanarak her enjeksiyon hacmine ait konsantrasyona karşı alan grafiği (Şekil 3.16) ve konsantrasyona karşı yükseklik grafiği (Şekil 3.17) elde edildi. Ayrıca her



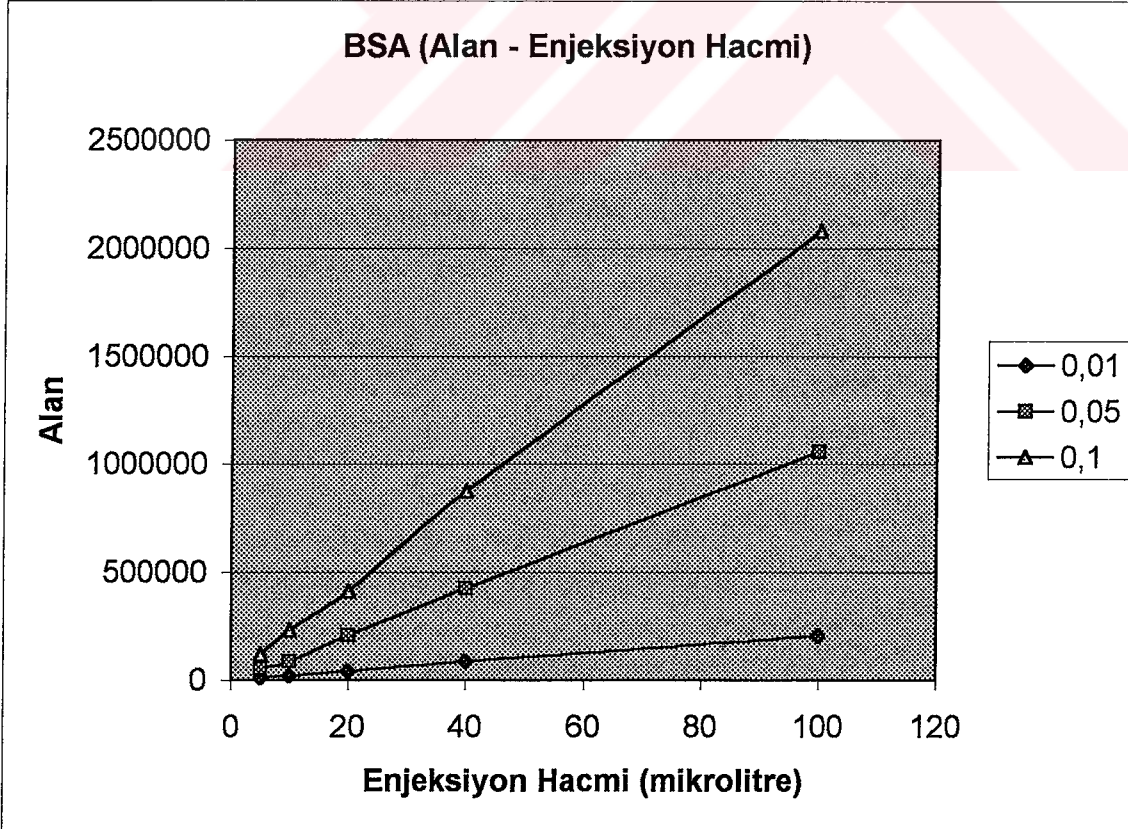
konsantrasyona ait enjeksiyon hacmine karşı alan grafiği (Şekil 3.18) ve enjeksiyon hacmine karşı yükseklik grafiği (Şekil 3.19) çizildi.



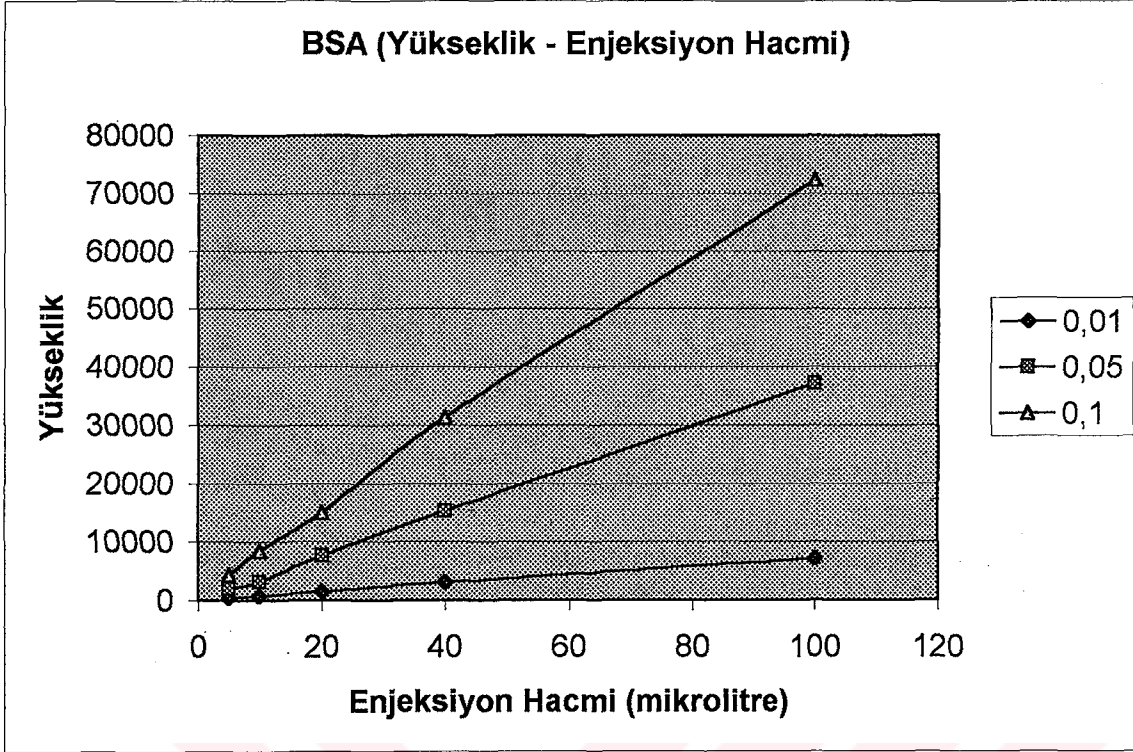
Şekil 3.16 %0,01,%0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltileri için 5,10,20,40,100 µl enjeksiyonlarda UV dedektör ile 280nm'de elde edilen alan değerleri



Şekil 3.17 %0,01,%0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltileri için 5,10,20,40,100 µl enjeksiyonlarda UV dedektör ile 280nm'de elde edilen yükseklik değerleri



Şekil 3.18 %0,01, %0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltilerinin farklı hacimlerde enjeksiyonu ile UV dedektörden 280nm'de elde edilen alan değerleri

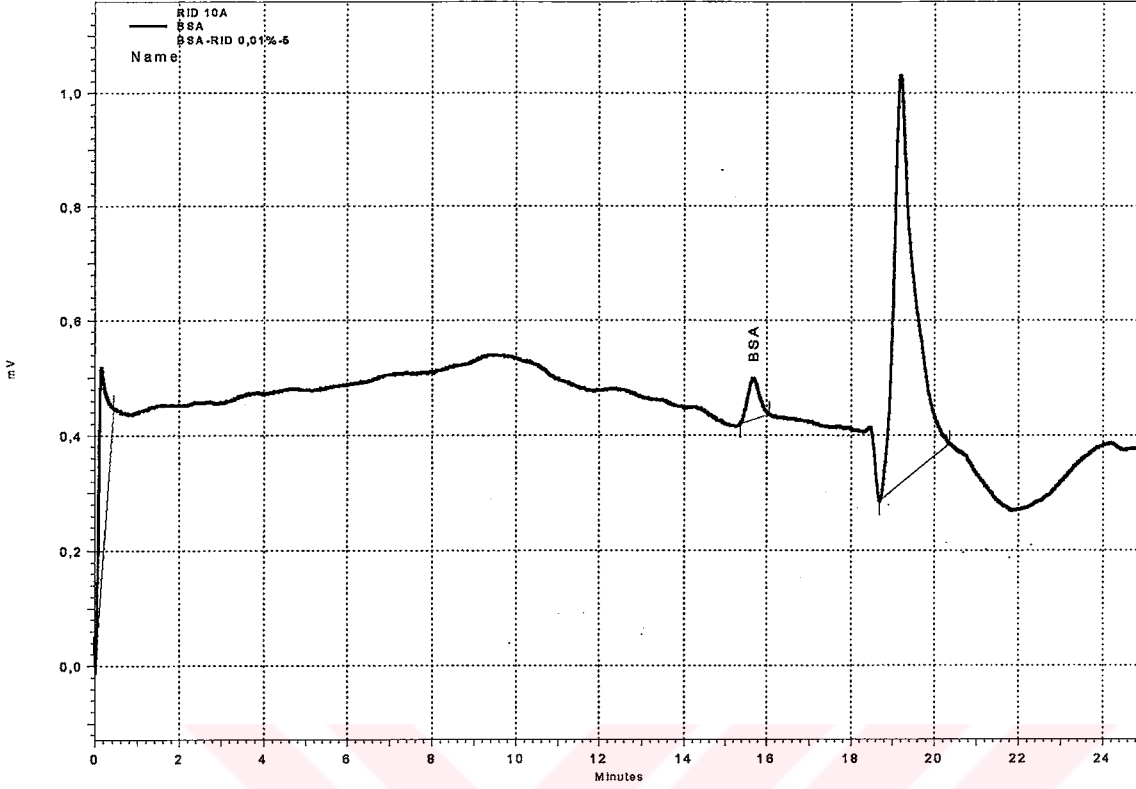


Şekil 3.19 %0,01, %0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltilerinin farklı hacimlerde enjeksiyonu ile UV dedektörden 280nm’de elde edilen yükseklik değerleri

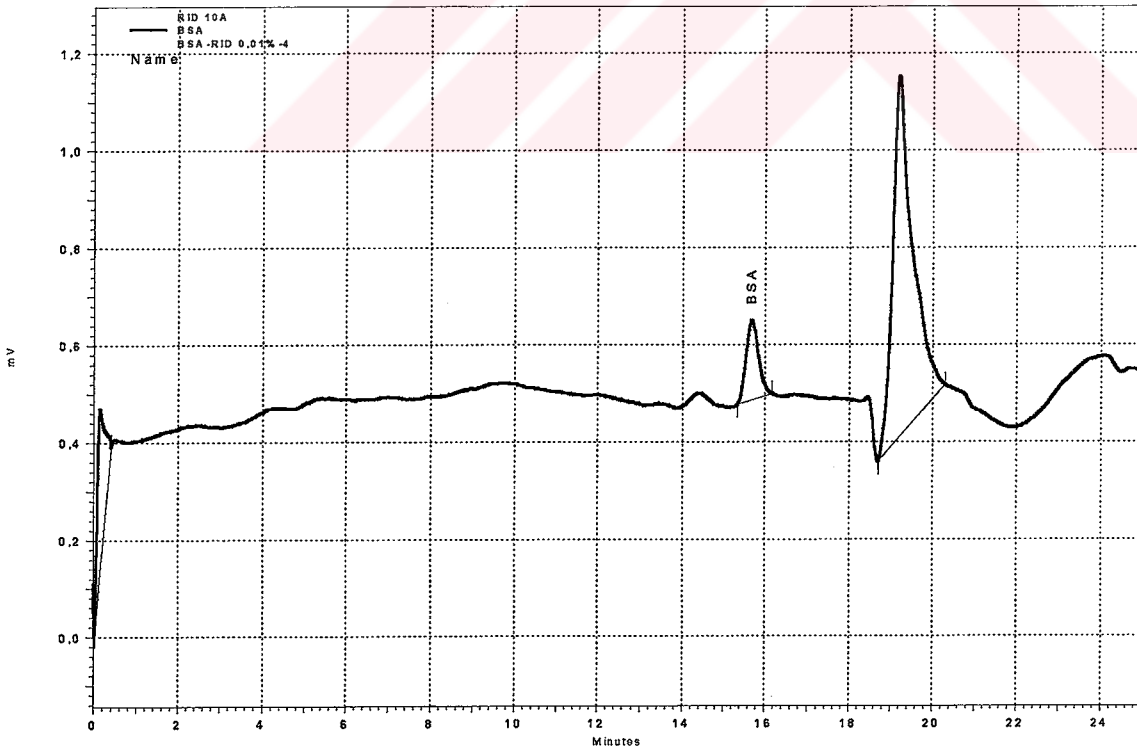
Şekil 3.16 – 3.17 – 3.18 ve 3.19’da yer alan grafiklerden görüldüğü gibi seçmiş olduğumuz kolon protein ile bir etkileşime girmemektedir. Dolayısıyla kolon çalışmalarımızda kullanmak için uygun bir kolondur.

#### 3.4.1.2 BSA enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi

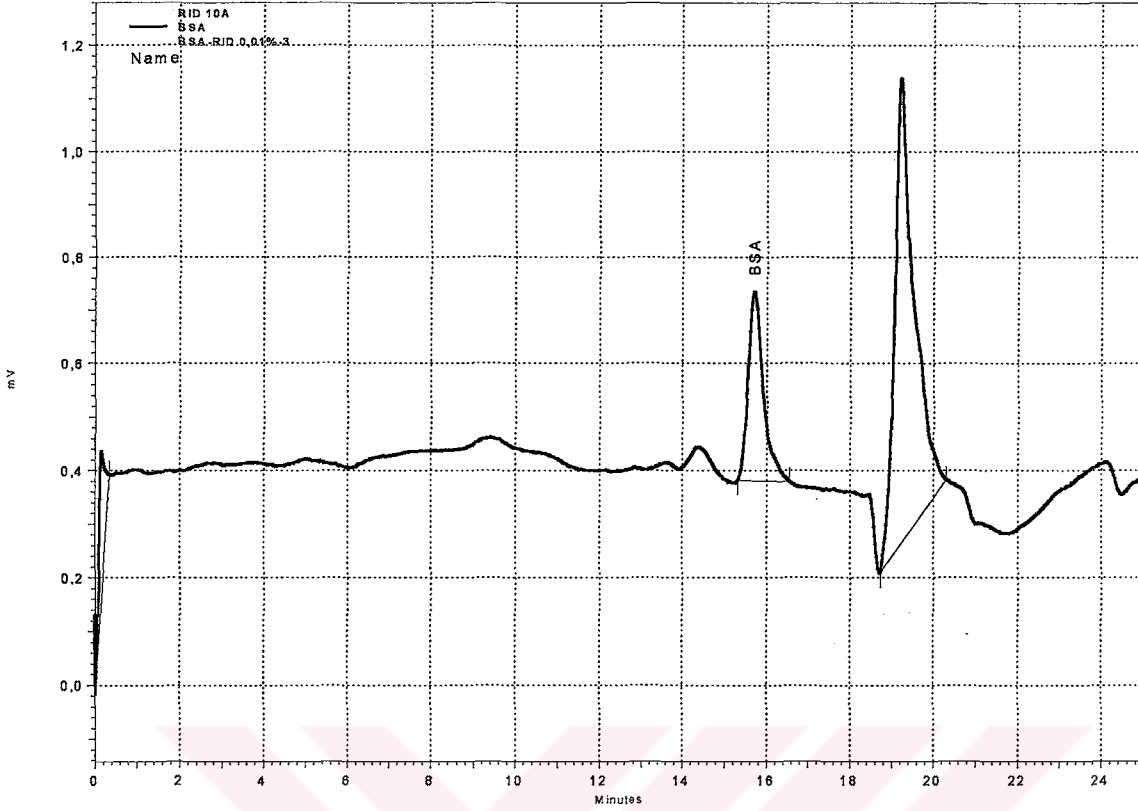
Hazırlanan BSA çözeltilerinden 5µL, 10µL, 20µL, 40µL, 100µL’lik enjeksiyonlar yapıldı ve RI dedektör kullanılarak kromatogramlar alındı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi:



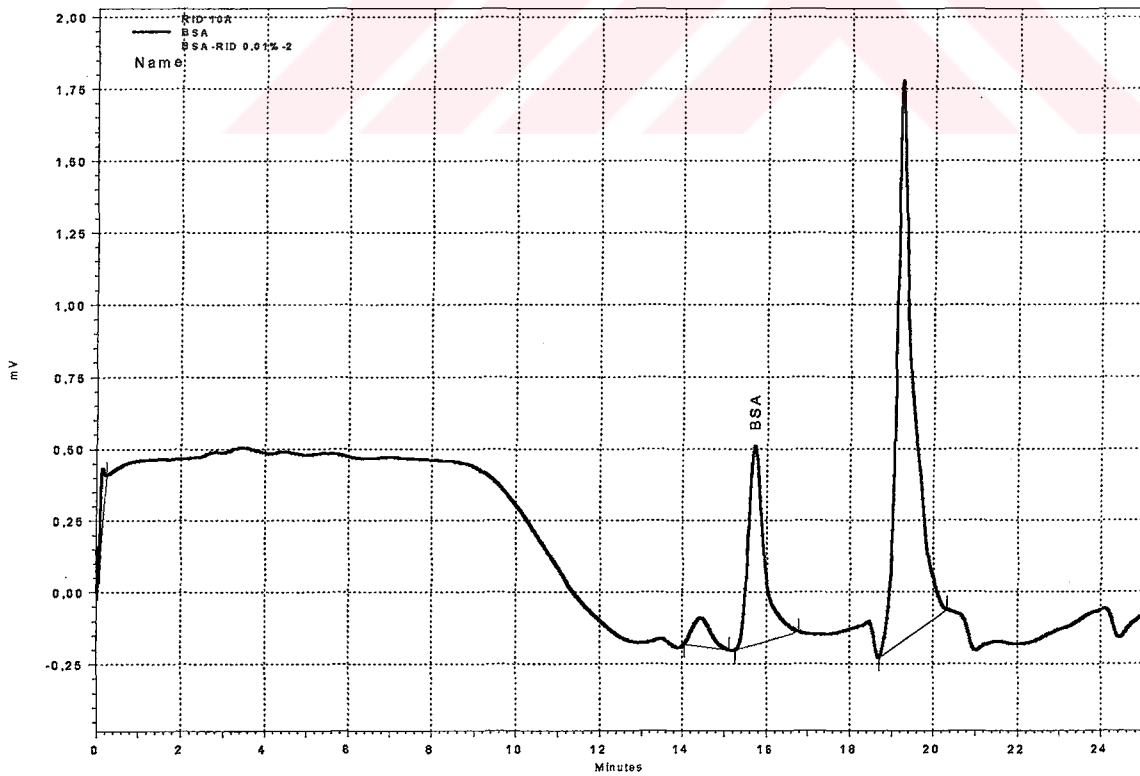
Şekil 3.20 RI dedektör ile %0,01'lik BSA çözeltisinin 5µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



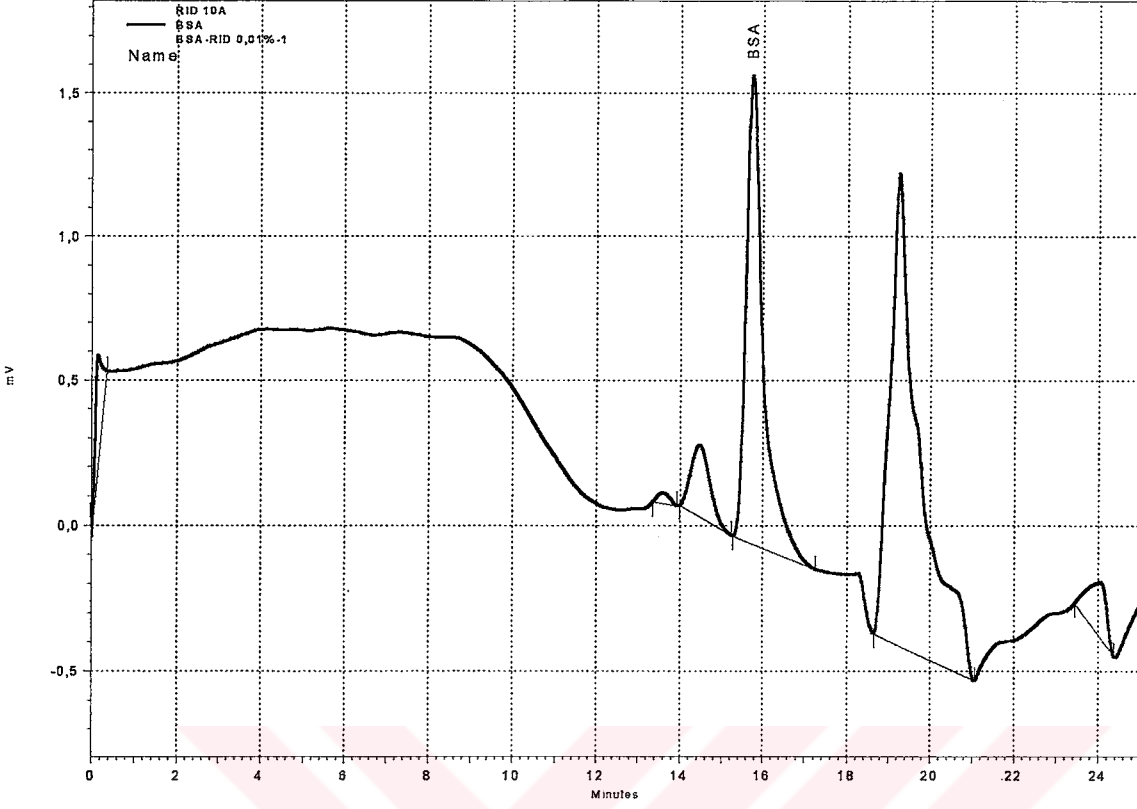
Şekil 3.20b RI dedektör ile %0,01'lik BSA çözeltisinin 10µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



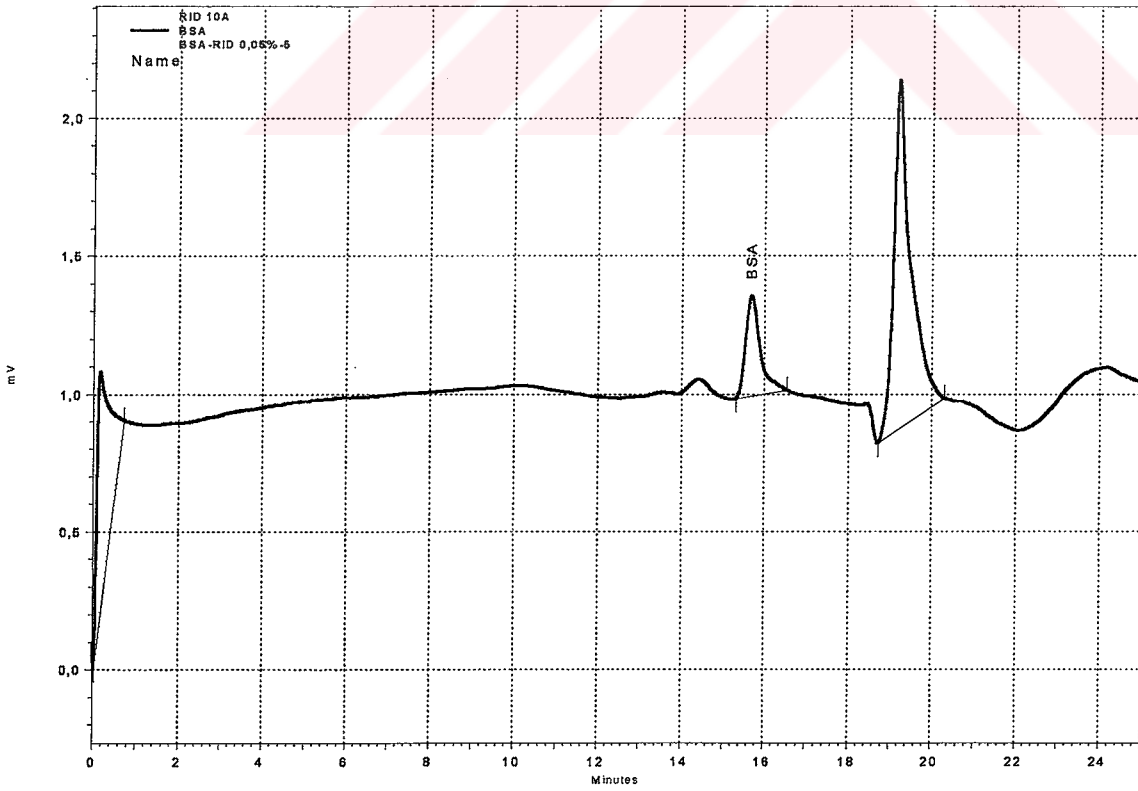
Şekil 3.21 RI dedektör ile %0,01'lik BSA çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



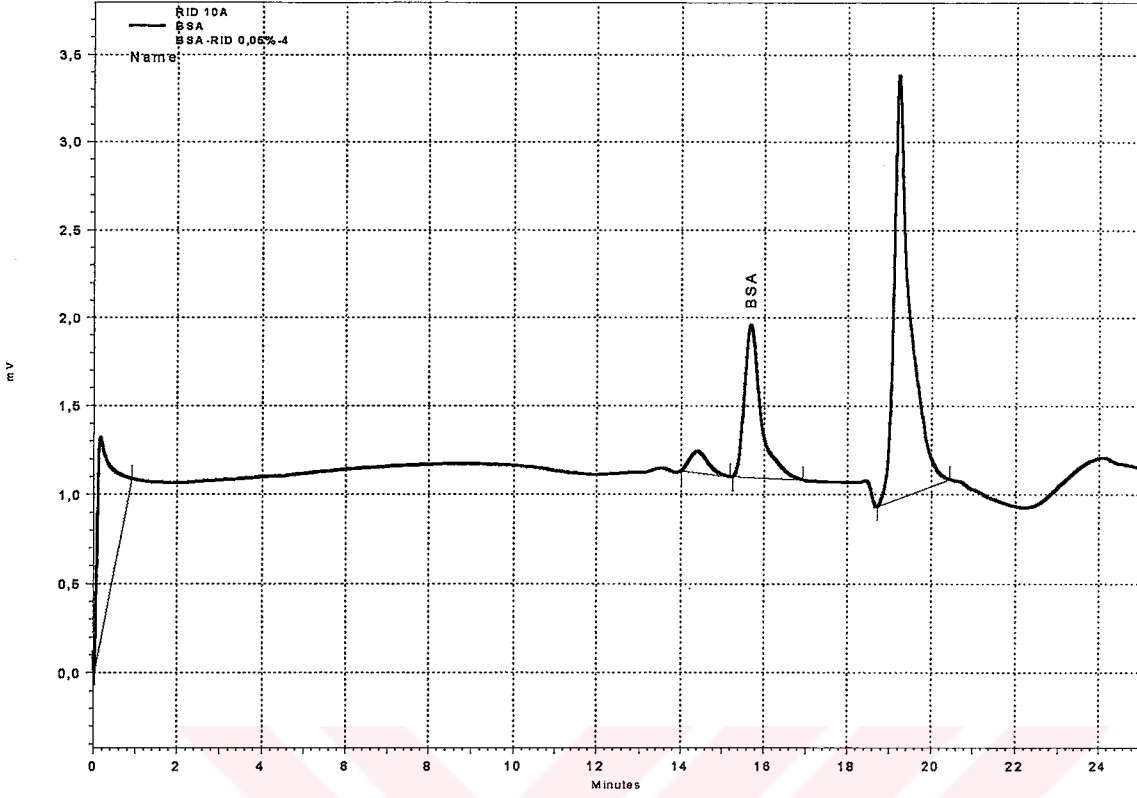
Şekil 3.22 RI dedektör ile %0,01'lik BSA çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



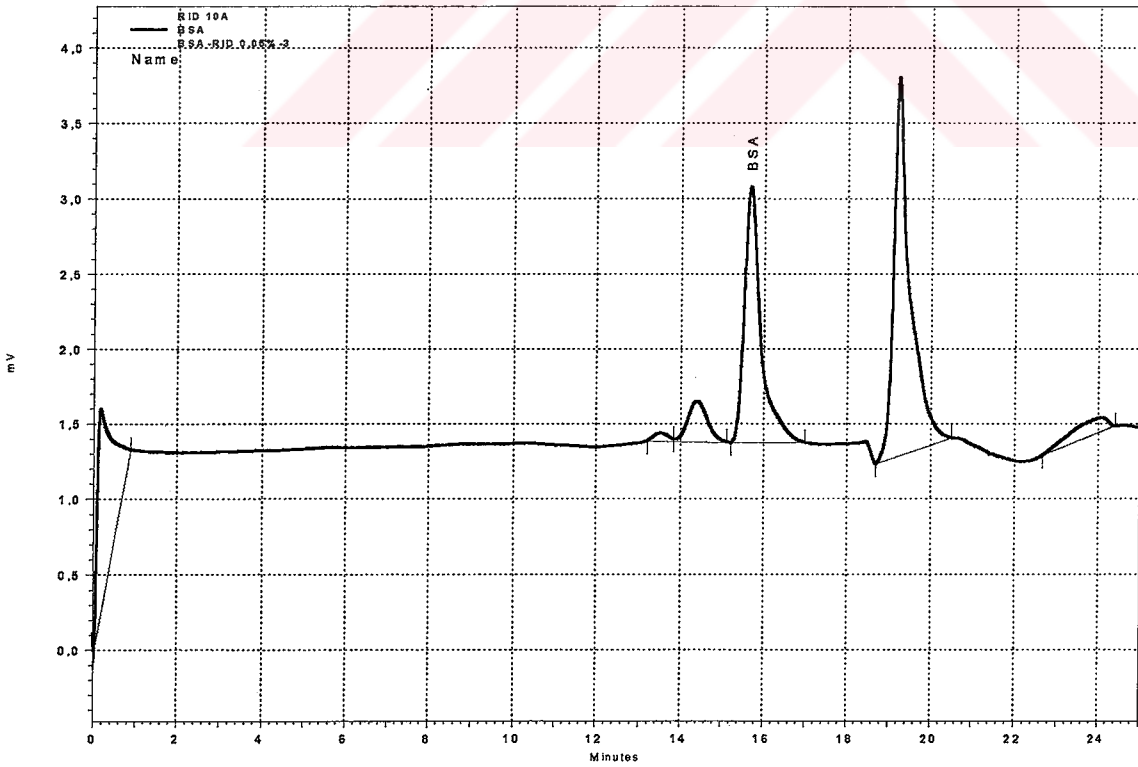
Şekil 3.23 RI dedektör ile %0,01'lik BSA çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



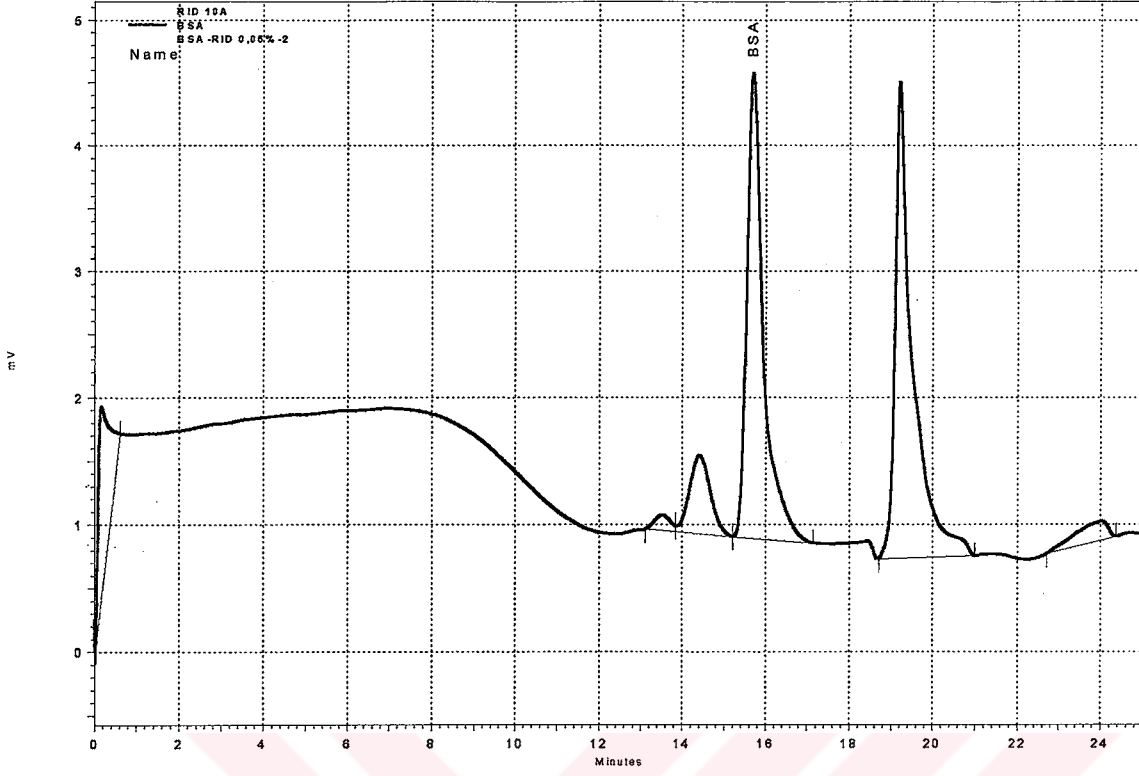
Şekil 3.24 RI dedektör ile %0,05'lik BSA çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



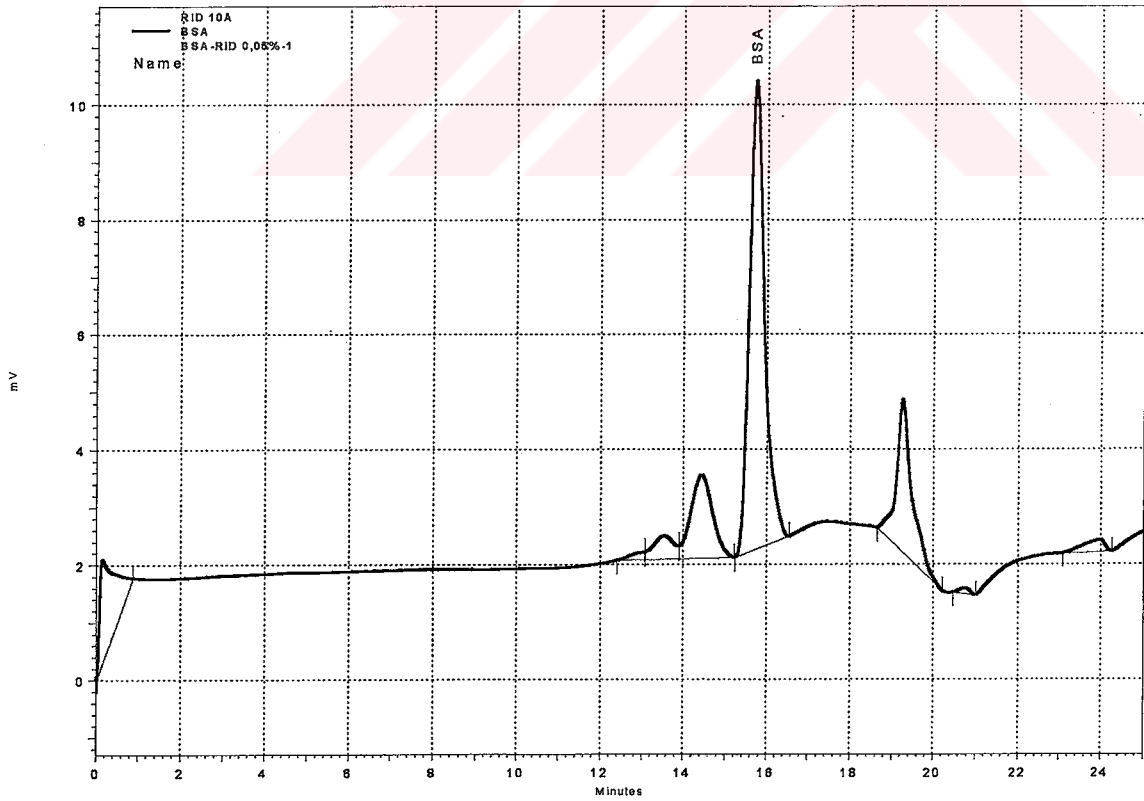
Şekil 3.25 RI dedektör ile %0,05'lik BSA çözeltisinin 10µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.26 RI dedektör ile %0,05'lik BSA çözeltisinin 20µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram

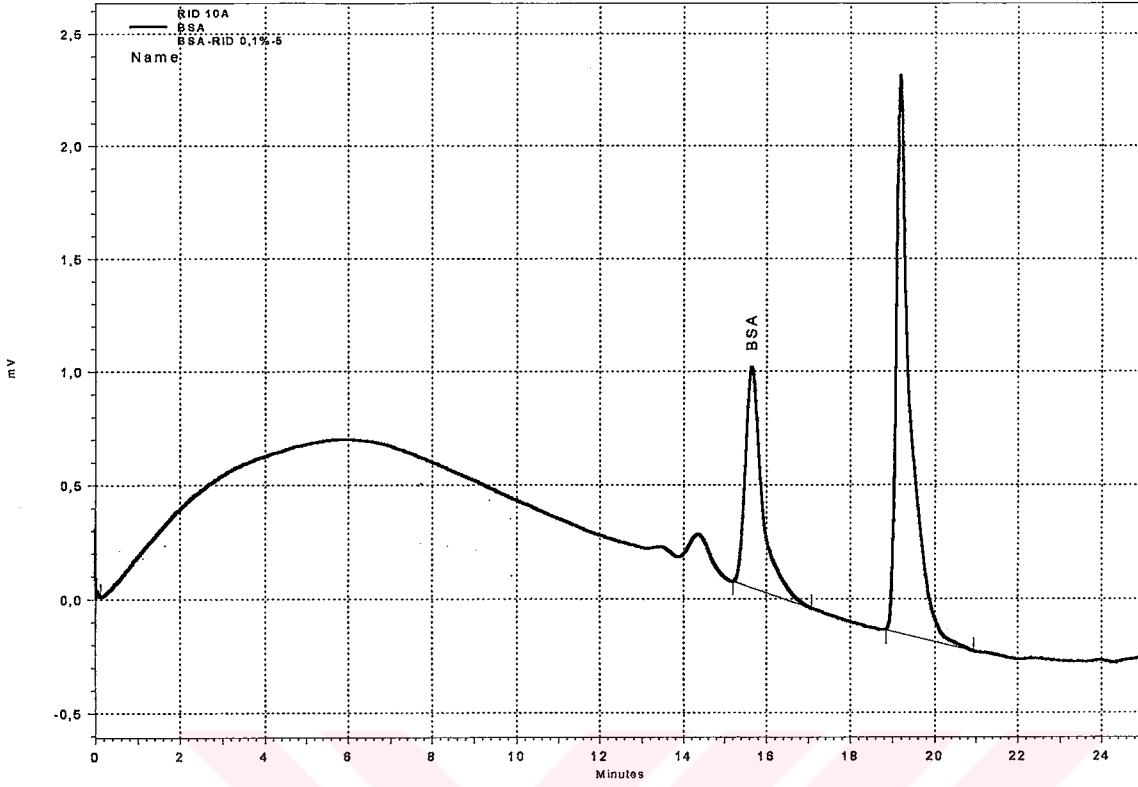


Şekil 3.27 RID dedektör ile %0,05'lik BSA çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram

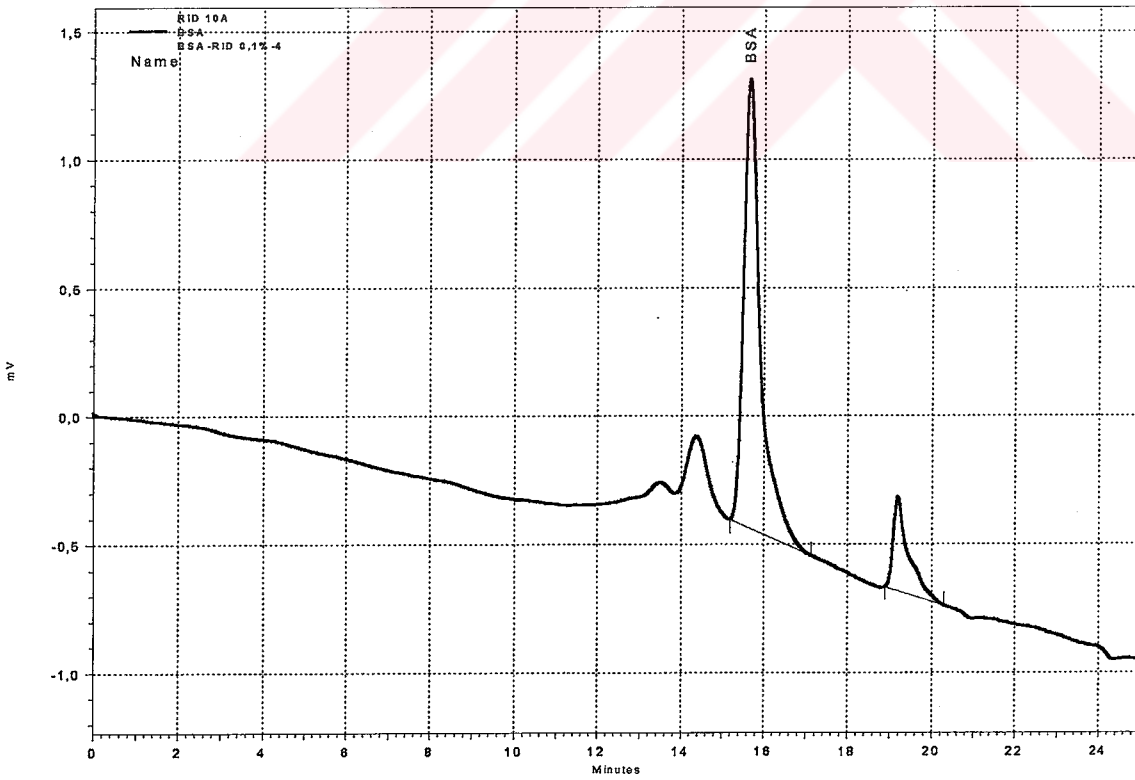


Şekil 3.28 RI dedektör ile %0,05'lik BSA çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram

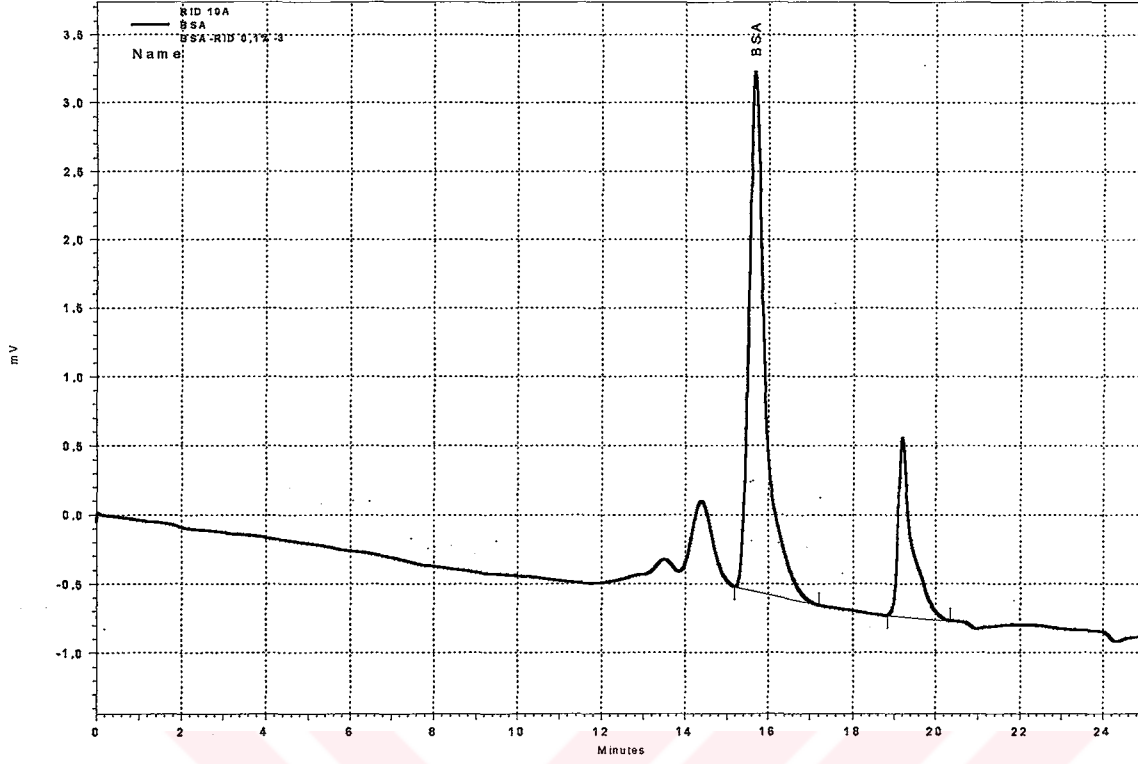




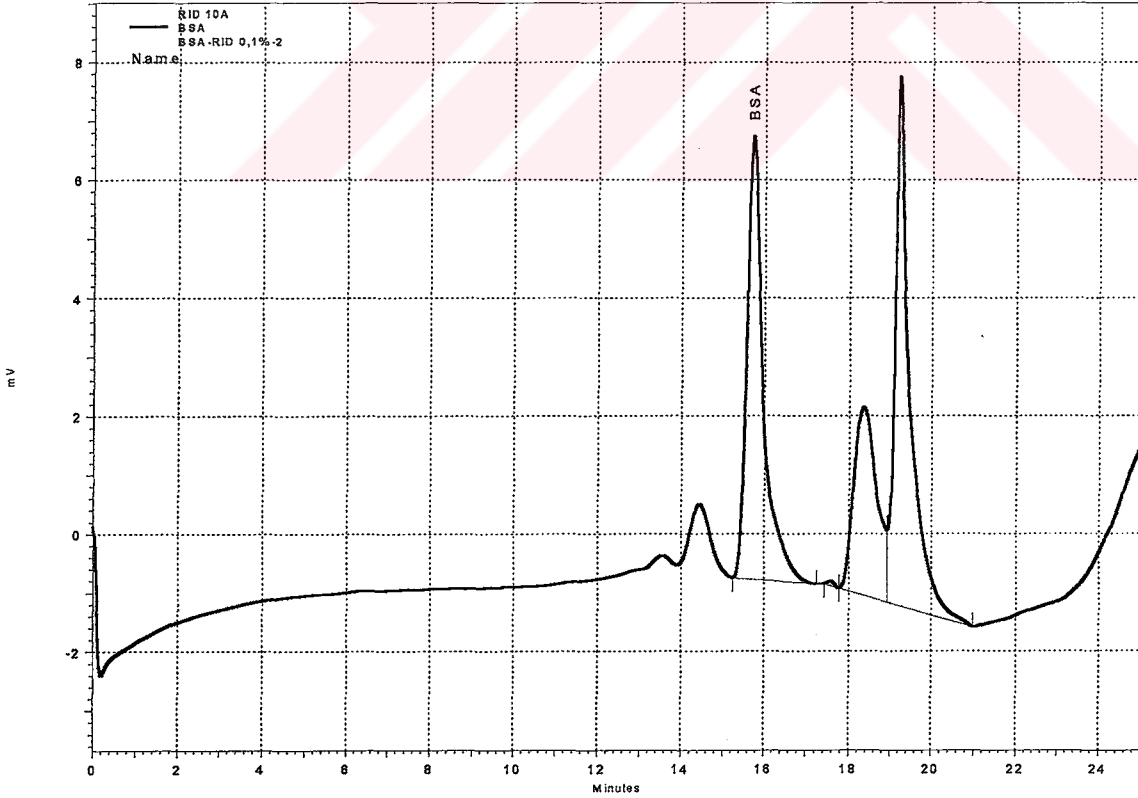
Şekil 3.29 RI dedektör ile %0,1'lik BSA çözeltisinin 5µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



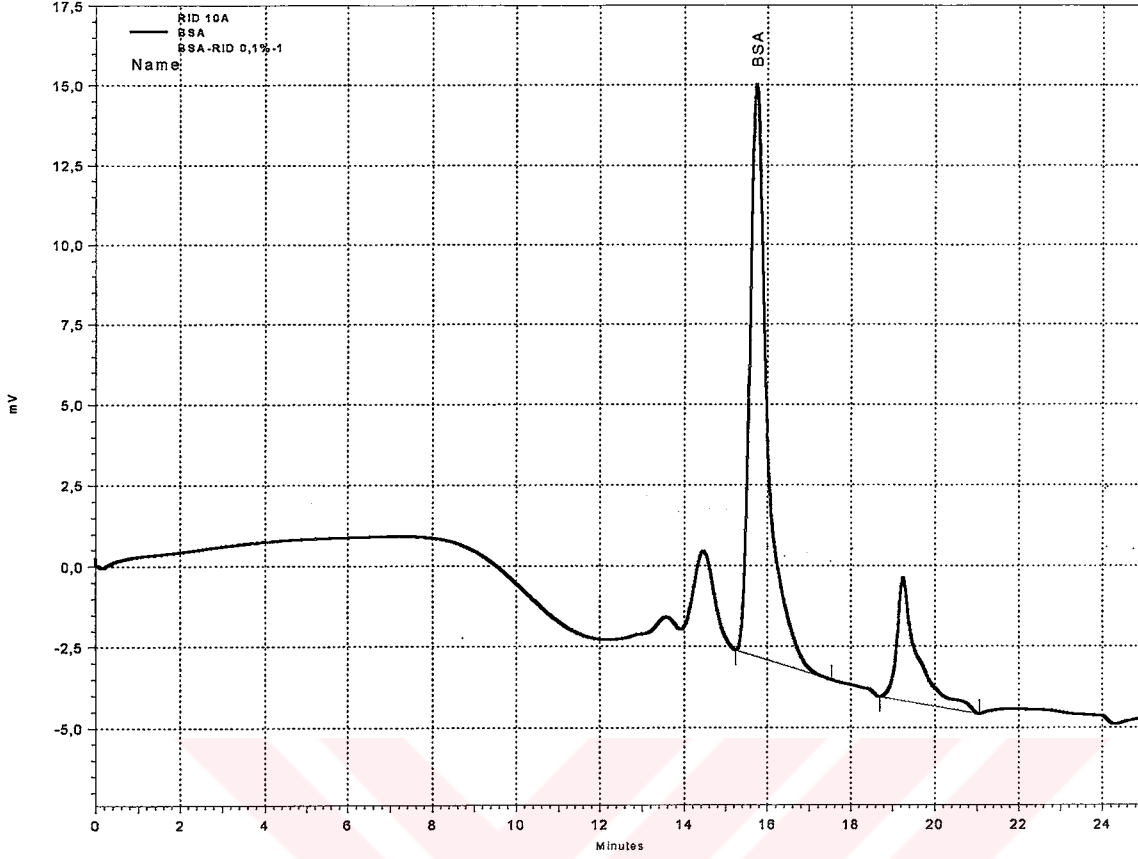
Şekil 3.30 RI dedektör ile %0,1'lik BSA çözeltisinin 10µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.31 RI dedektör ile %0,1'lik BSA çözeltisinin 20µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.32 RI dedektör ile %0,1'lik BSA çözeltisinin 40µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.33 RI dedektör ile %0,1'lik BSA çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram

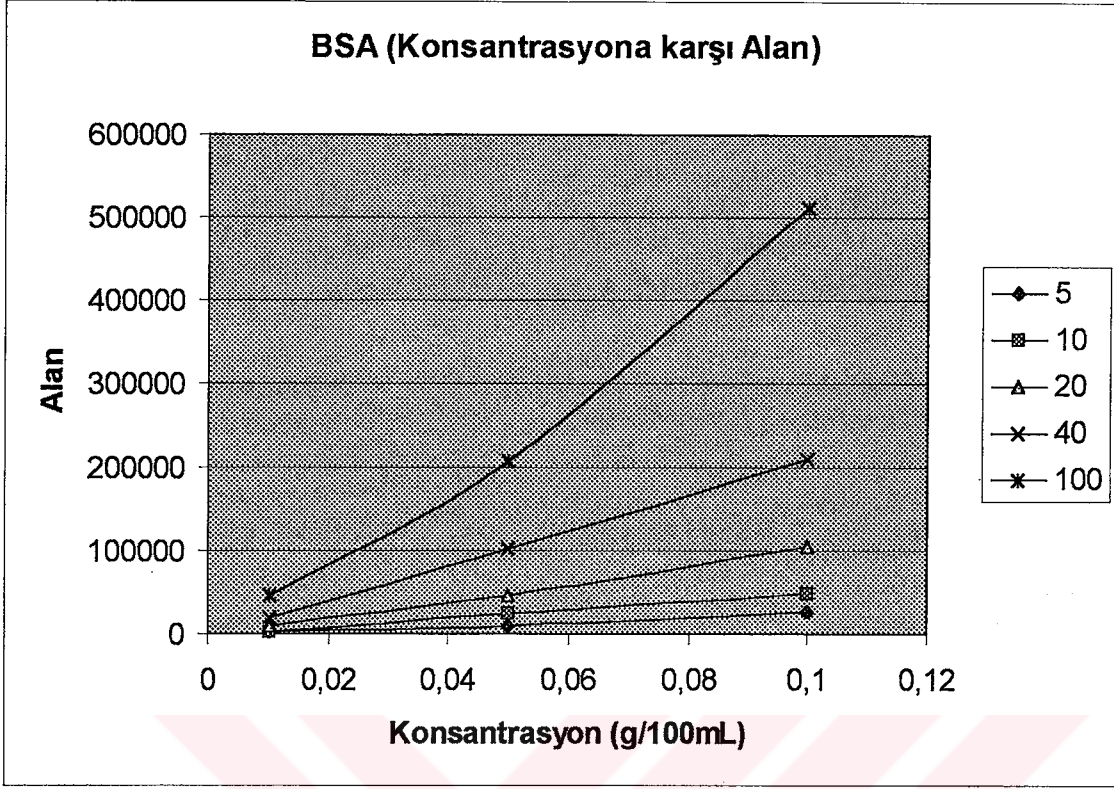
RI dedektörle 280nm'de BSA çözeltilerinin enjeksiyonları ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 RI dedektör ile elde edilen farklı konsantrasyondaki BSA kromatogramlarının sonuçları

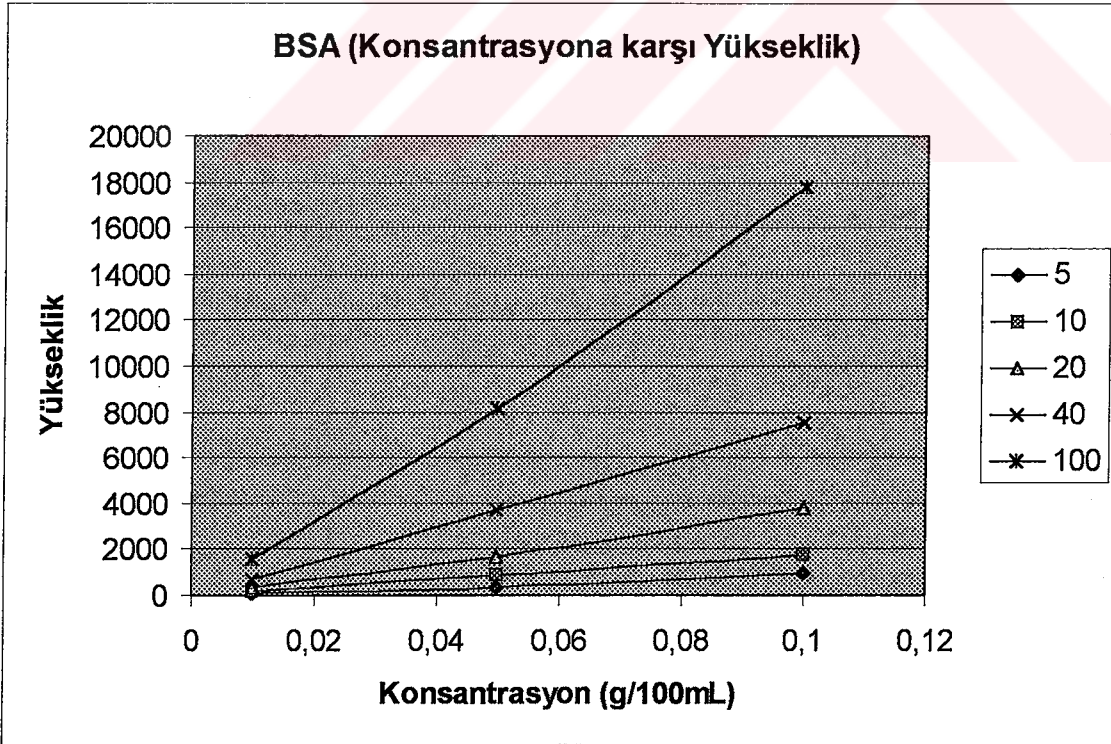
Konsantrasyon (g/100mL)	Enjeksiyon hacmi ( $\mu$ L)	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,01	5	15,702	1410	71
0,01	10	15,677	3467	164
0,01	20	15,692	8873	353
0,01	40	15,711	18365	692
0,01	100	15,740	46967	1626
0,05	5	15,683	9024	362
0,05	10	15,684	23260	864
0,05	20	15,686	45996	1705
0,05	40	15,693	101954	3684
0,05	100	15,716	208034	8157
0,1	5	15,652	26941	970
0,1	10	15,659	48614	1751
0,1	20	15,669	105323	3780
0,1	40	15,718	208900	7500
0,1	100	15,742	511611	17818

Alınan sonuçlardan faydalanarak her enjeksiyon hacmine ait konsantrasyona karşı alan grafiği (Şekil 3.34) ve konsantrasyona karşı yükseklik grafiği (Şekil 3.35) elde edildi. Ayrıca her konsantrasyona ait enjeksiyon hacmine karşı alan grafiği (Şekil 3.36) ve enjeksiyon hacmine karşı yükseklik grafiği (Şekil 3.37) çizildi.

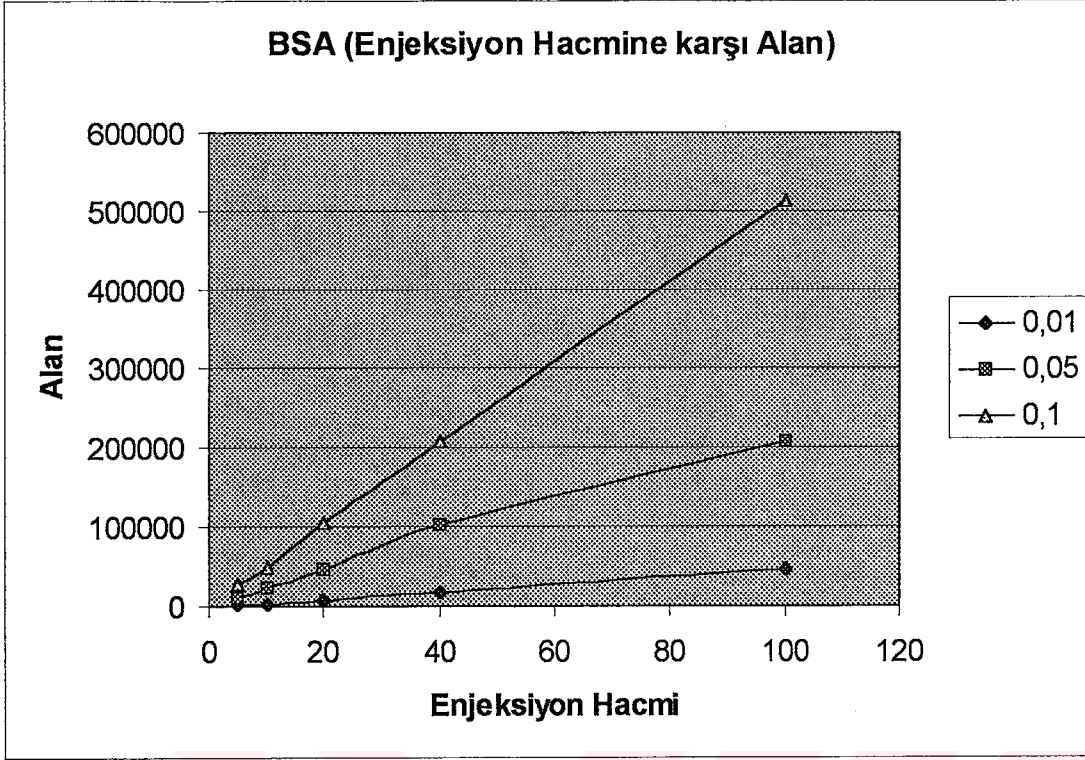




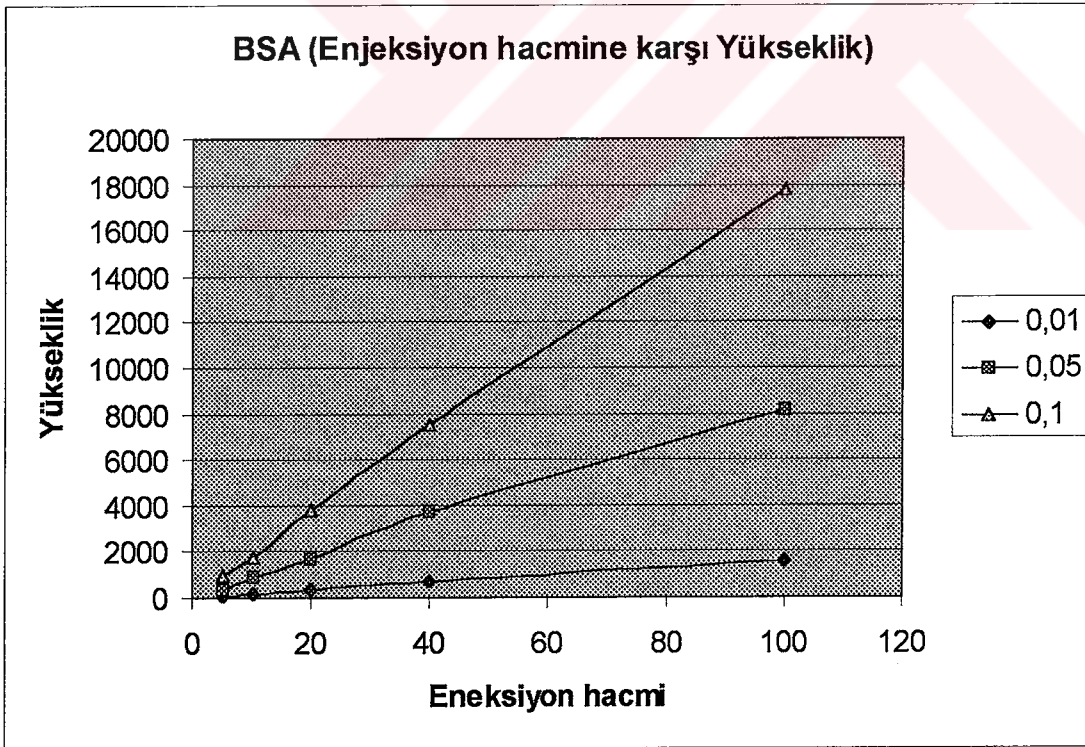
Şekil 3.34 %0,01,%0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltileri için 5,10,20,40,100 µl enjeksiyonlarda RI dedektör ile elde edilen alan değerleri



Şekil 3.35 %0,01,%0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltileri için 5,10,20,40,100 µl enjeksiyonlarda RI dedektör ile elde edilen yükseklik değerleri



Şekil 3.36 %0,01, %0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltilerinin farklı hacimlerde enjeksiyonu ile RI dedektörden elde edilen alan değerleri



Şekil 3.37 %0,01, %0,05, %0,1 konsantrasyonlarda BSA çözeltilerinin farklı hacimlerde enjeksiyonu ile RI dedektörden elde edilen yükseklik değerleri

### 3.4.2 $\alpha$ -Amilaz enzimi

Önce saf  $\alpha$ -Amilaz enzimi çözeltisi hazırlandı, daha sonra polimer ile konjugat çözeltisi hazırlandı.

$\alpha$ -Amilaz enziminden %0,05 konsantrasyonunda çözelti hazırlandı:

%0,05'lik  $\alpha$ -Amilaz:

0,0250g  $\alpha$ -Amilaz tartıldı mobil faz ile 50mL'ye tamamlandı =0,05g/100mL

Polimer sabit tutulup aşağıdaki oranlarda  $\alpha$ -Amilaz-Polimer konjugat çözeltileri hazırlandı.

$n_A/n_{DSA}$

0,5	: 0,606mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 1,212mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
1	: 1,212mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 1,212mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
3	: 3,636mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 1,212mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
5	: 6,06mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 1,212mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
10	: 12,12mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 1,212mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
20	: 24,24mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 1,212mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
30	: 36,36mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 1,212mg/ml polimer çözeltisinden 1ml

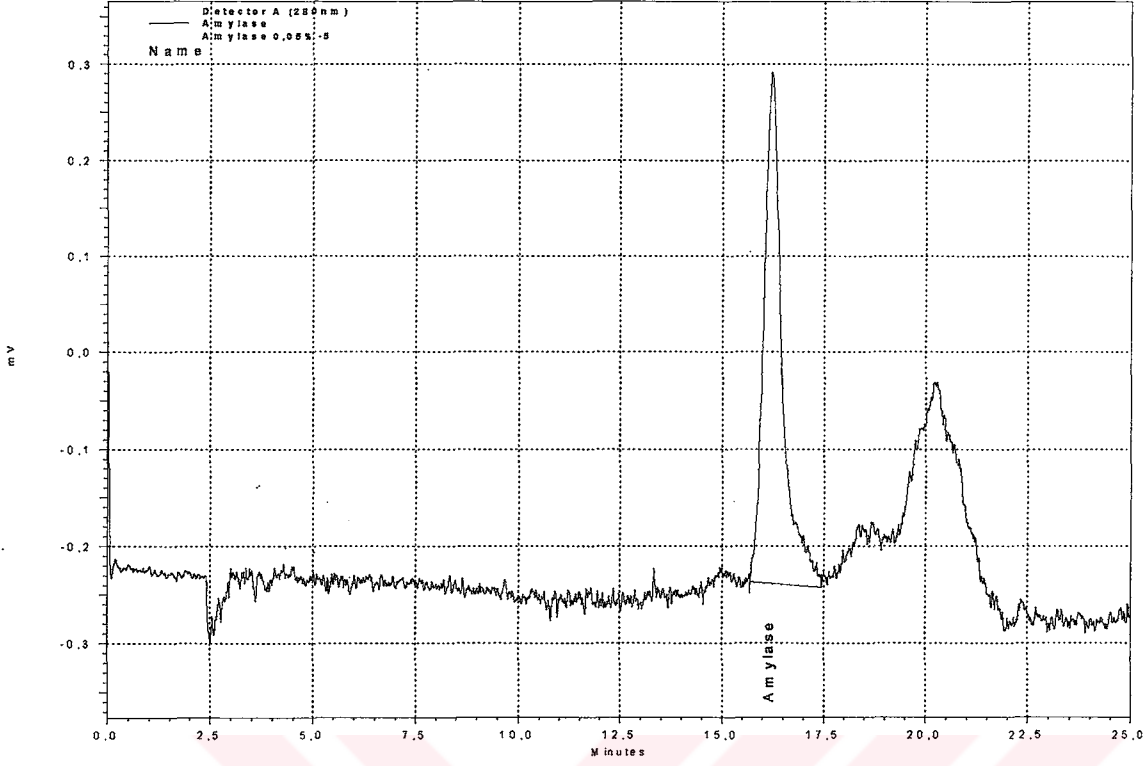
$\alpha$ -Amilaz sabit tutulup aşağıdaki oranlarda  $\alpha$ -Amilaz-Polimer konjugat çözeltileri hazırlandı.

$n_{DSA}/n_A$

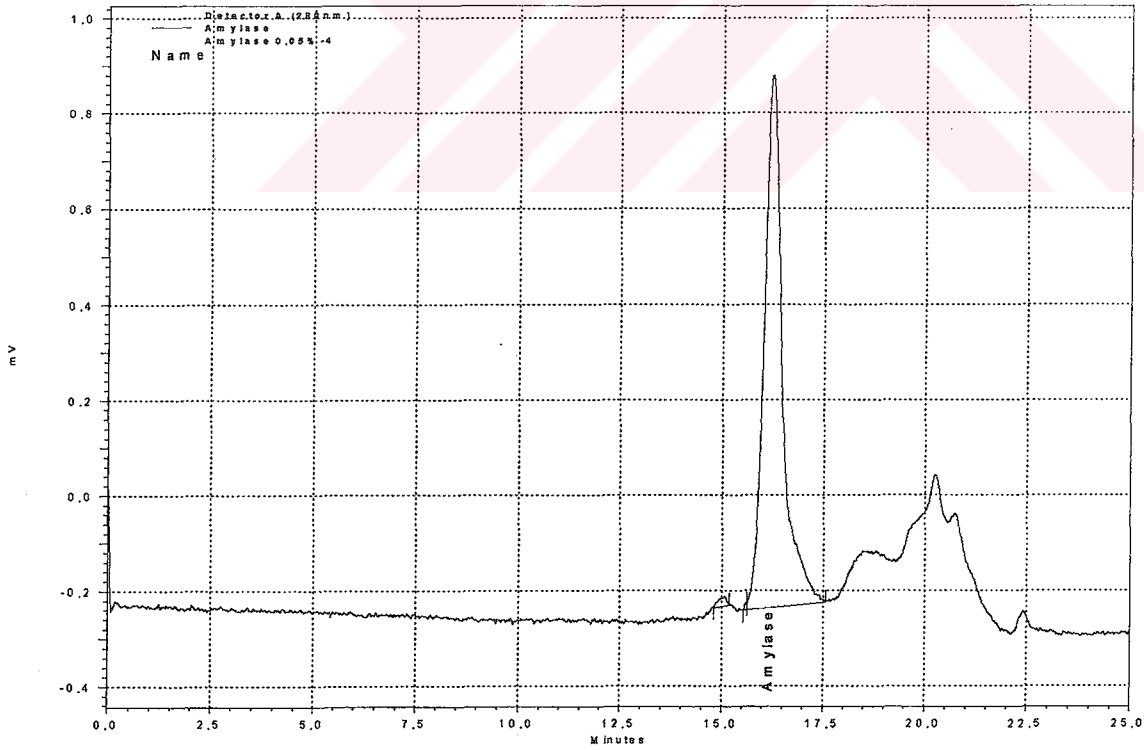
0,5	: 2mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 1mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
1	: 2mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 2mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
3	: 2mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 6mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
5	: 2mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 10mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
10	: 2mg/ml $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 1 mL + 20mg/ml polimer çözeltisinden 1ml

#### 3.4.2.1 Saf $\alpha$ -Amilaz enzimi enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi

Hazırlanan %0,05 konsantrasyondaki saf  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinden 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 40 $\mu$ L, 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonlar yapıldı ve UV dedektör kullanılarak 280nm'deki kromatogramları alındı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

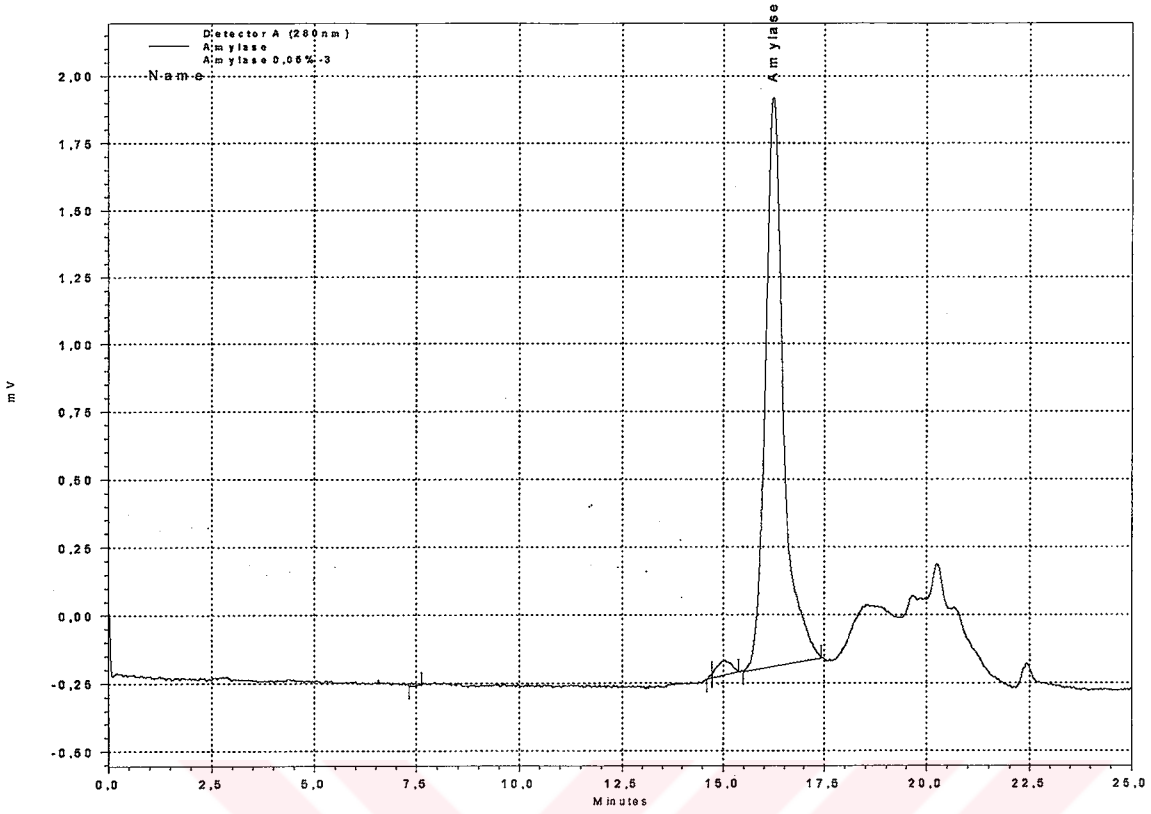


Şekil 3.38 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram

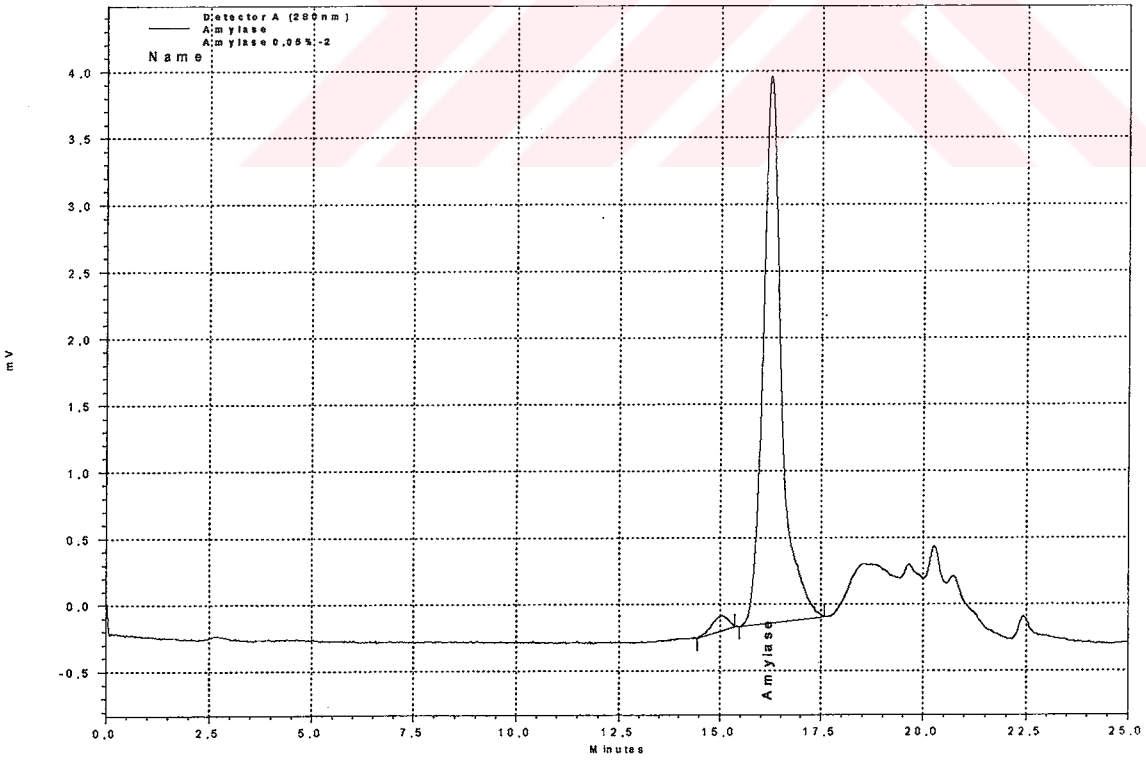


Şekil 3.39 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram

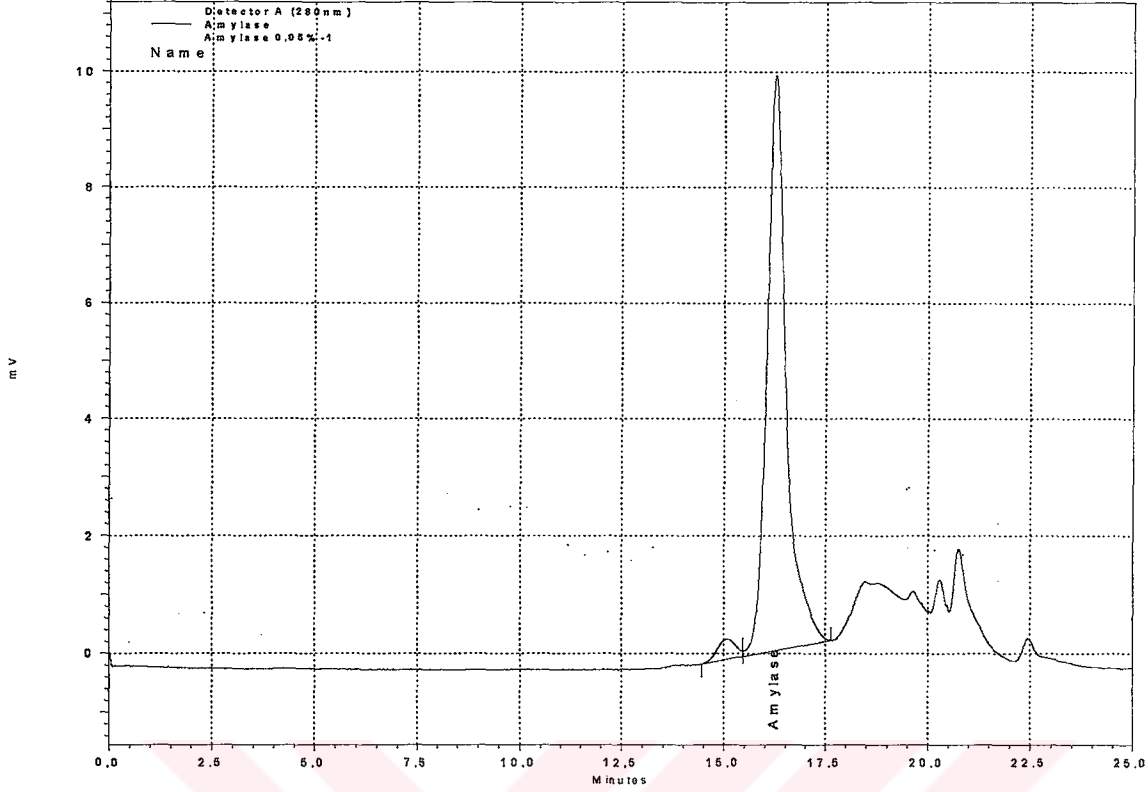




Şekil 3.40 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.41 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



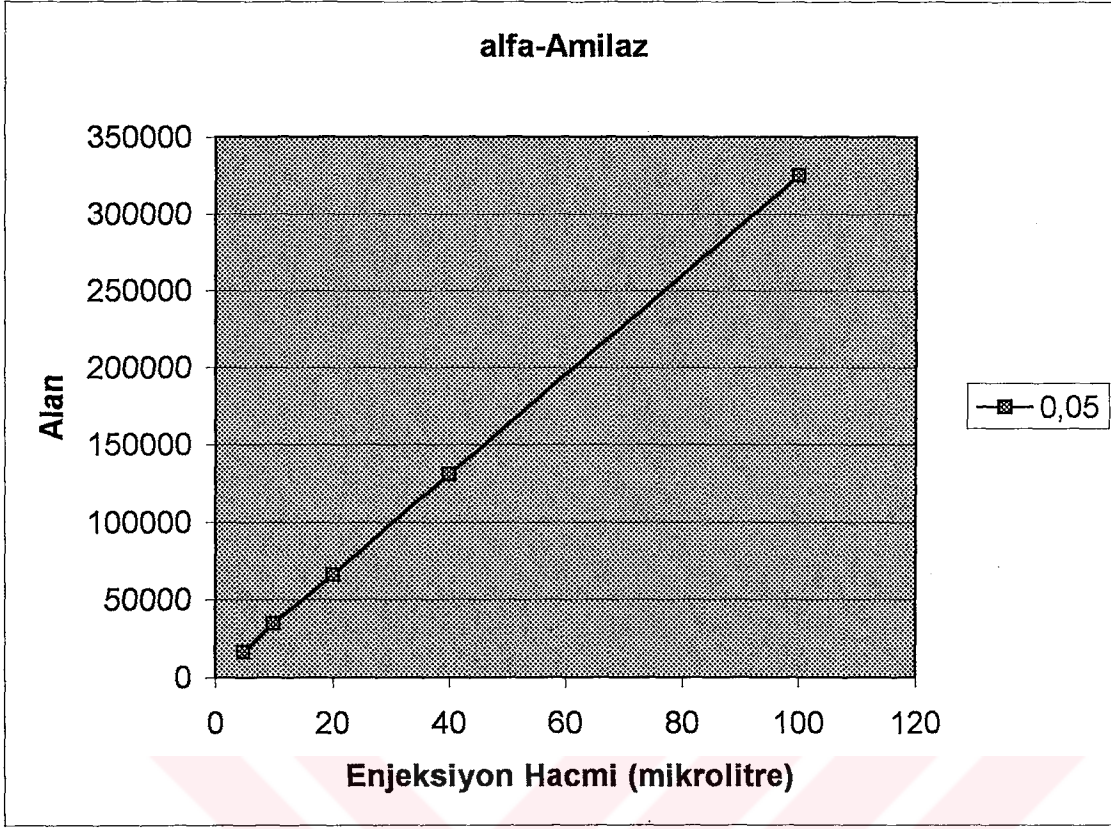
Şekil 3.42 UV dedektör ile 280 nm’de %0,05’lik  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 100 $\mu$ L’lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram

UV dedektörle 280nm’de  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin enjeksiyonları sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3’de verilmiştir.

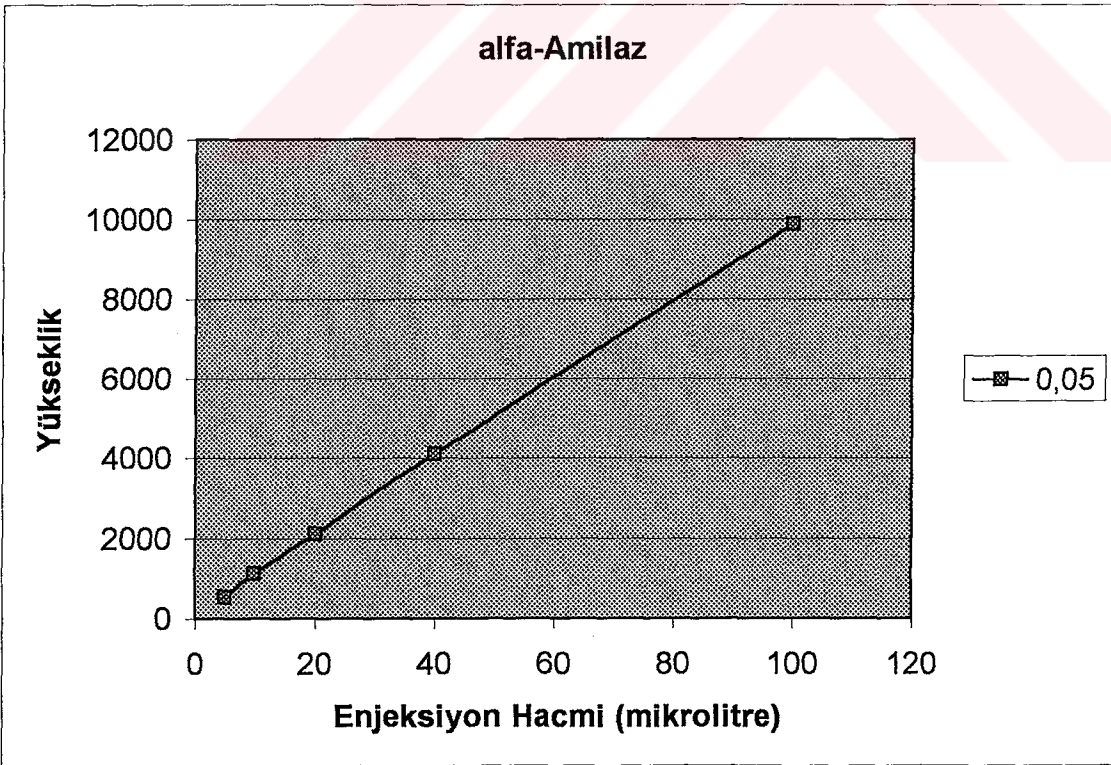
Çizelge 3.3 UV dedektörle 280nm’de elde edilen  $\alpha$ -Amilaz kromatogramlarının sonuçları

Konsantrasyon (g/100mL)	Enjeksiyon hacmi ( $\mu$ L)	Alınma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,05	5	16,204	16469	531
0,05	10	16,220	34864	1117
0,05	20	16,228	65897	2111
0,05	40	16,231	130730	4101
0,05	100	16,242	324803	9893

Alınan sonuçlardan faydalanarak 0,05g/100mL’lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı alan grafiği (Şekil 3.43) ve enjeksiyon hacmine karşı yükseklik grafiği (Şekil 3.44) elde edildi.



Şekil 3.43  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı UV 280nm'de elde edilen alan grafiği



Şekil 3.44  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı UV 280nm'de elde edilen yükseklik grafiği

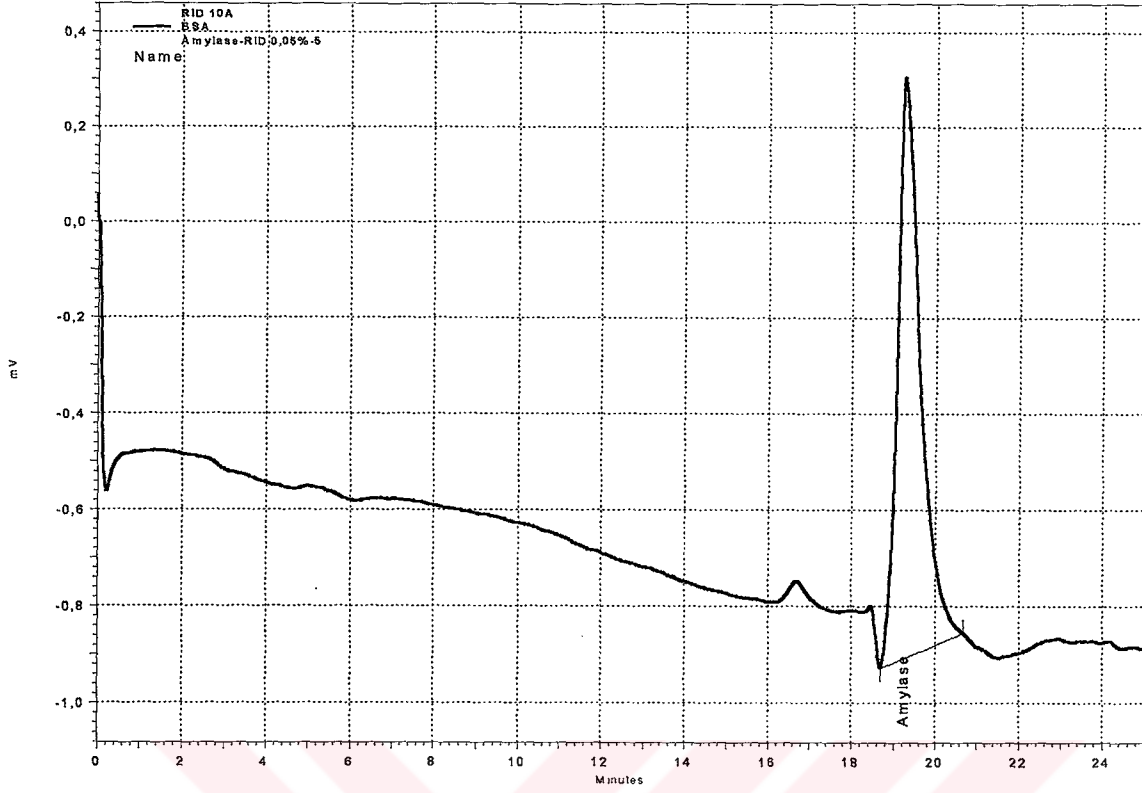
### 3.4.2.2 Saf $\alpha$ -Amilaz enzimi enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi

$\alpha$ -Amilaz'dan %0,05 konsantrasyonunda çözelti hazırlandı:

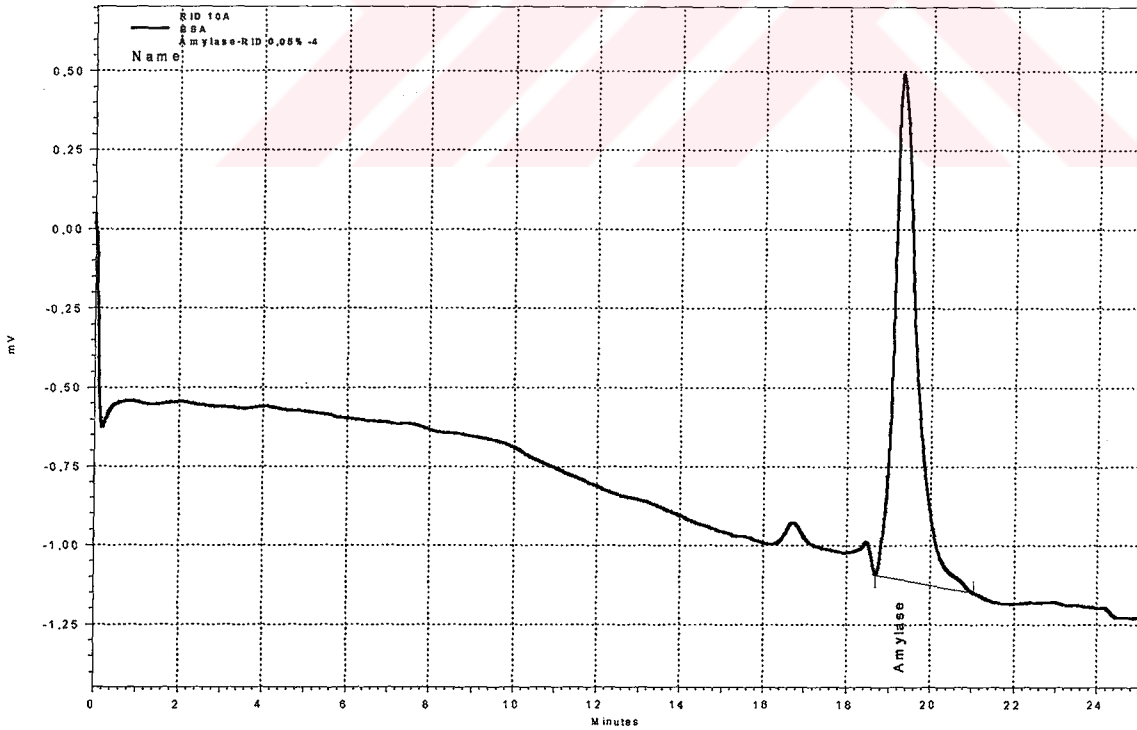
%0,05'lik  $\alpha$ -Amilaz:

0,0250g  $\alpha$ -Amilaz tartıldı mobil faz ile 50mL'ye tamamlandı = 0,05g/100mL

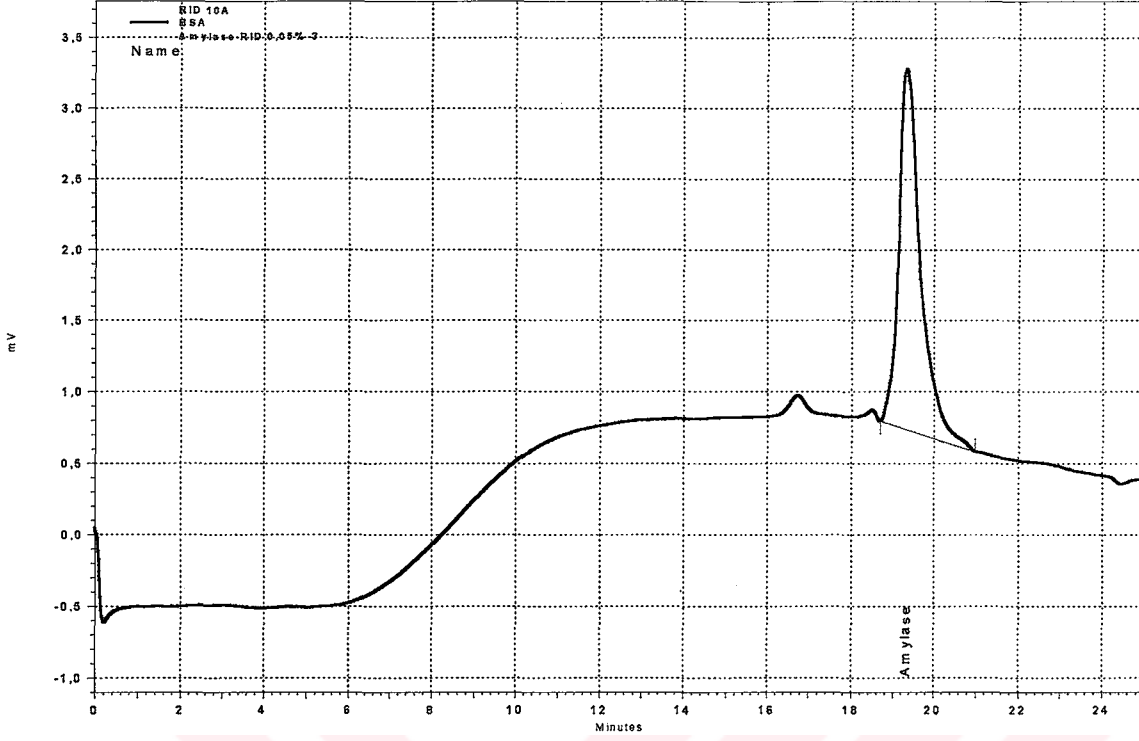
Elde edilen çözülden 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 40 $\mu$ L, 100 $\mu$ Llik enjeksiyonlar yapıldı, Refraktif İndeks Dedektörü kullanılarak kromatogramları alındı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi:



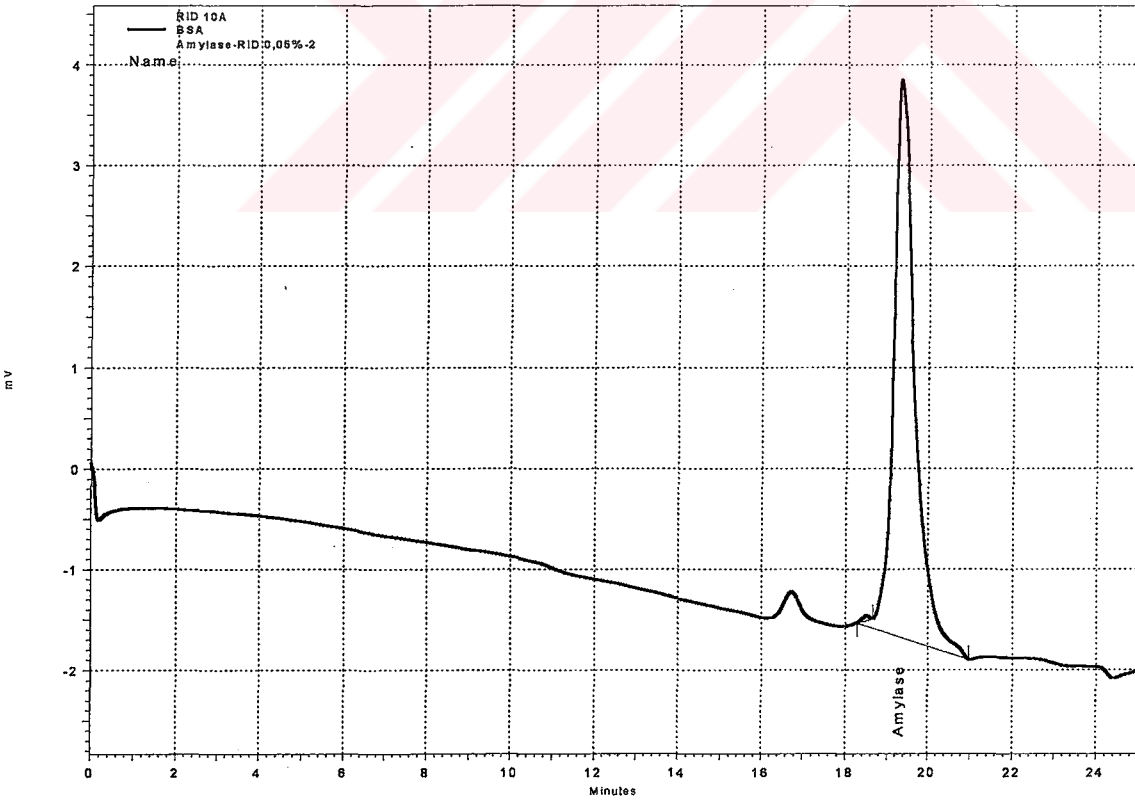
Şekil 3.45 Refraktif İndeks Dedektör'de %0,05'lik  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



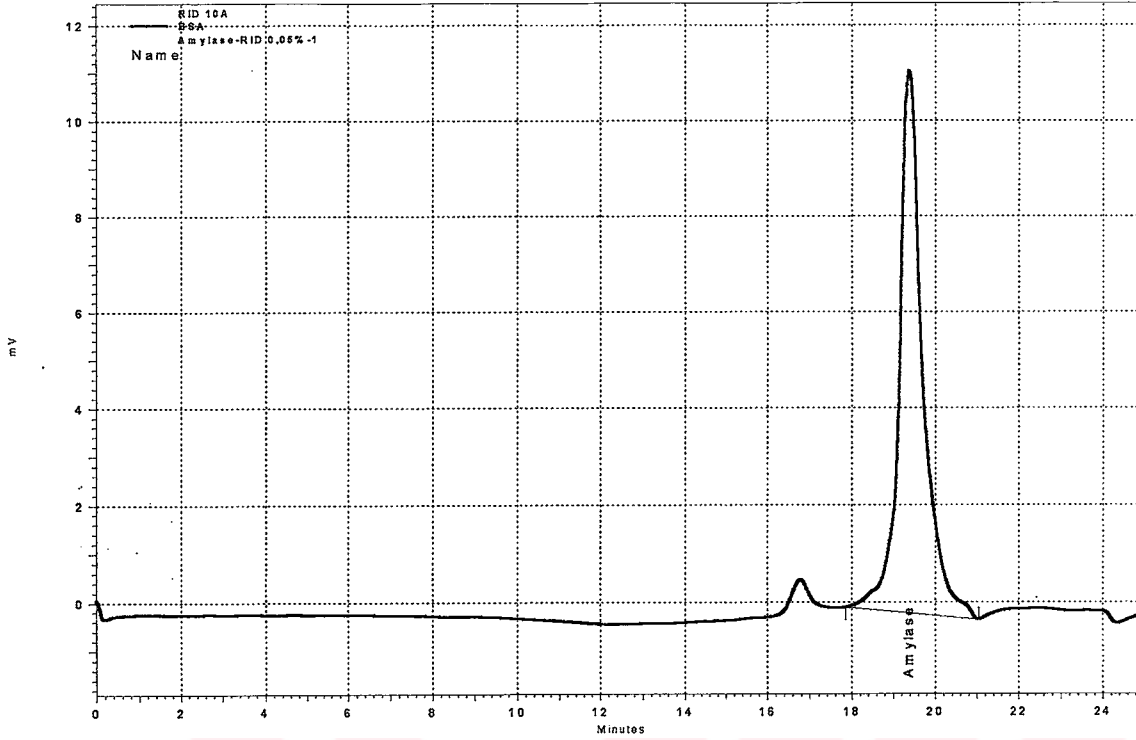
Şekil 3.46 Refraktif İndeks Dedektör'de %0,05'lik  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.47 Refraktif İndeks Dedektör'de %0,05'lik  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.48 Refraktif İndeks Dedektör'de %0,05'lik  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



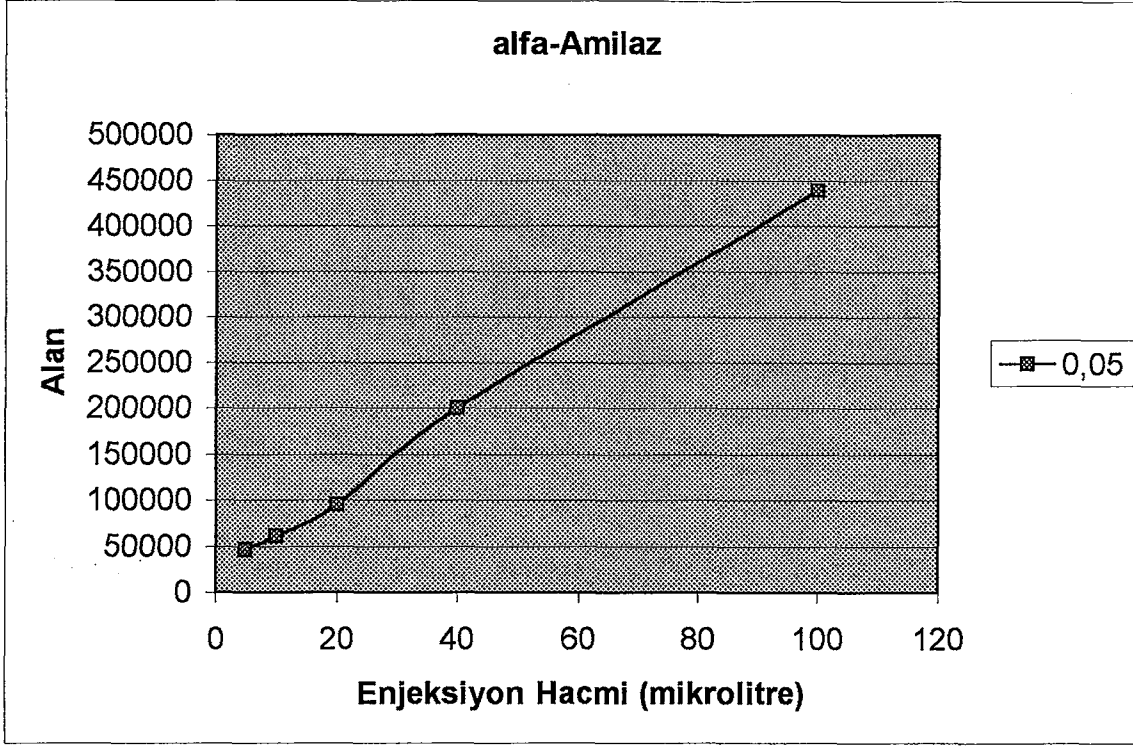
Şekil 3.49 Refraktif İndeks Dedektör'de %0,05'lik  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram

Refraktif İndeks Dedektörü'nde  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin enjeksiyonları sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4'de verildi.

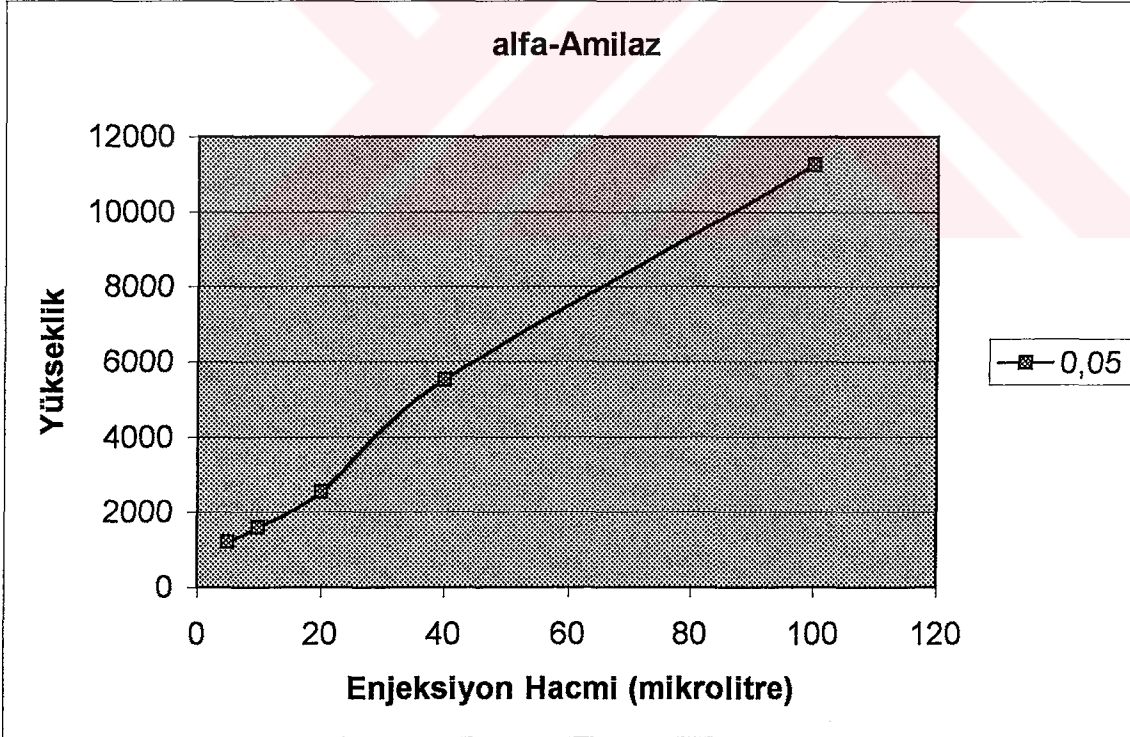
Çizelge 3.4 RID ile elde edilen  $\alpha$ -Amilaz kromatogramlarının değerleri

Konsantrasyon (g/100mL)	Enjeksiyon hacmi ( $\mu$ L)	Alınma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,05	5	19,242	45858	1215
0,05	10	19,273	60815	1596
0,05	20	19,324	94905	2541
0,05	40	19,299	200284	5520
0,05	100	19,375	439303	11262

Alınan sonuçlardan faydalanarak 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı alan grafiği (Şekil 3.50) ve enjeksiyon hacmine karşı yükseklik grafiği (Şekil 3.51) elde edildi.



Şekil 3.50  $\alpha$ -Amilaz çözeltisinin 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı RID'de elde edilen alan grafiği



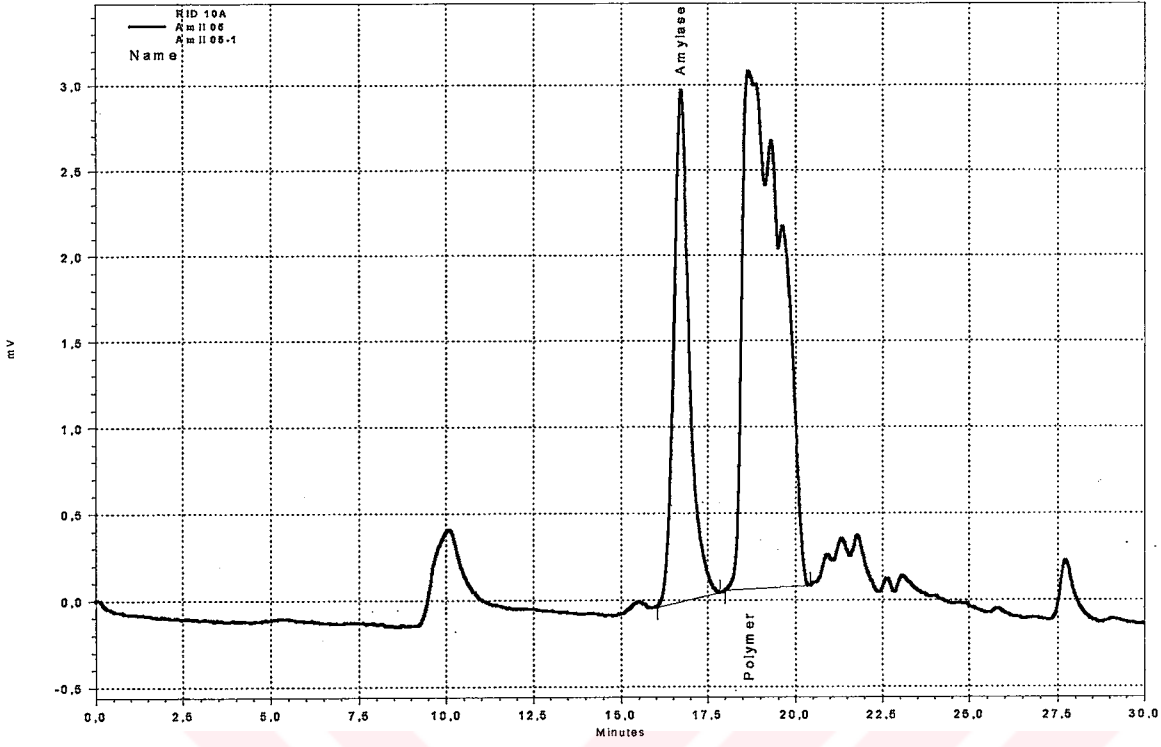
Şekil 3.51  $\alpha$ -Amilaz için 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı RID'de elde edilen yükseklik grafiği



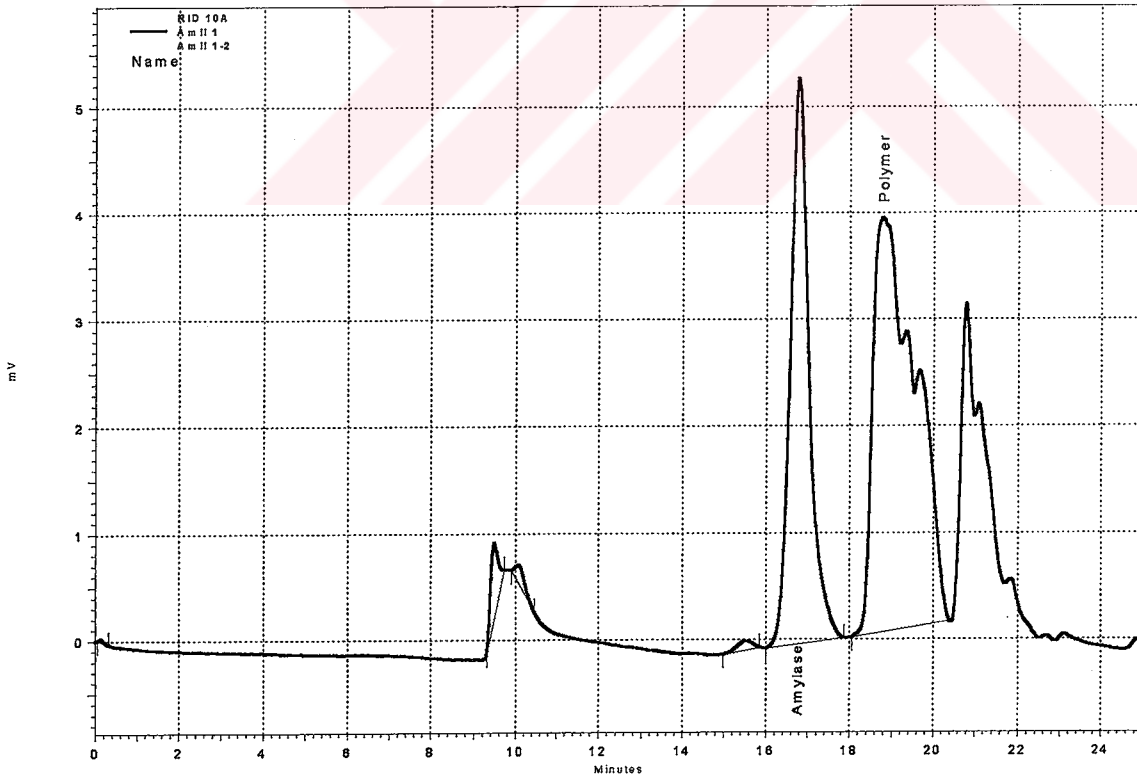
### 3.4.2.3 Polimer miktarı sabit olan $\alpha$ -Amilaz – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi

Polimer miktarı sabit, Amilaz : Polimer oranı 0,5 – 1 – 3 – 5 – 10 – 20 – 30 olan çözeltilerin UV 280nm’de enjeksiyonları yapılarak kromatogramları elde edildi.

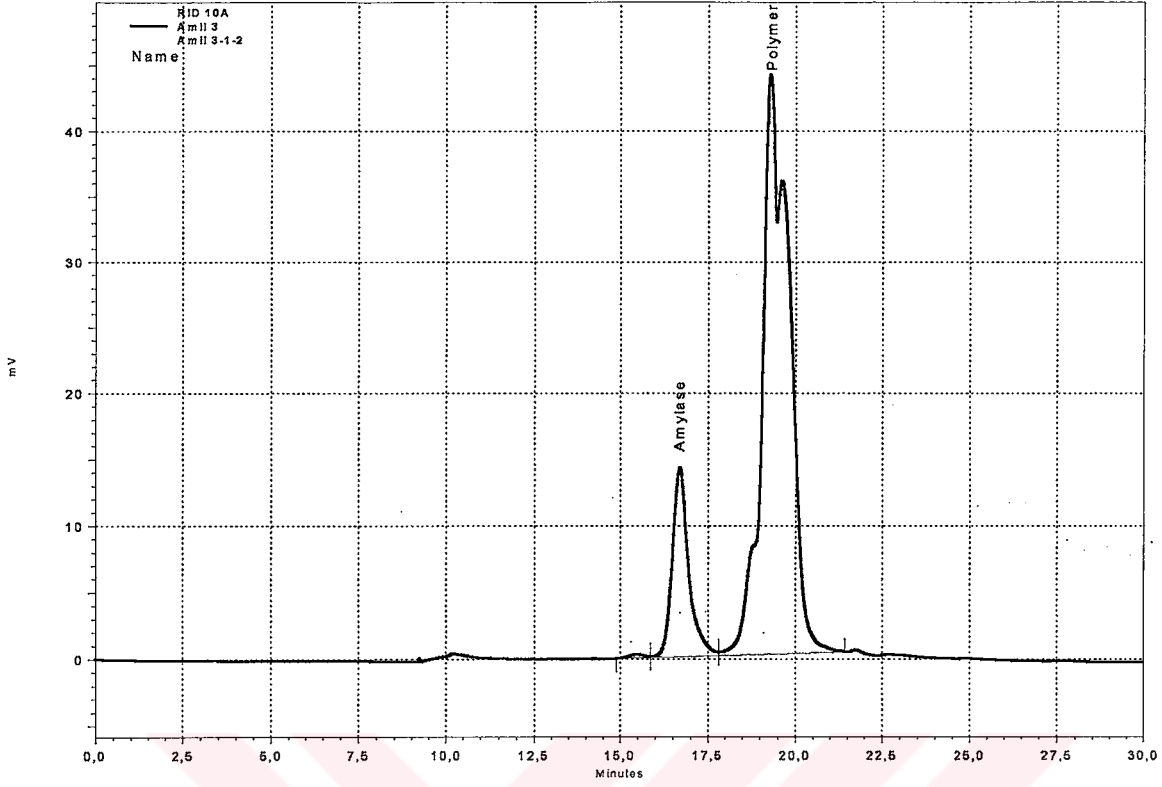




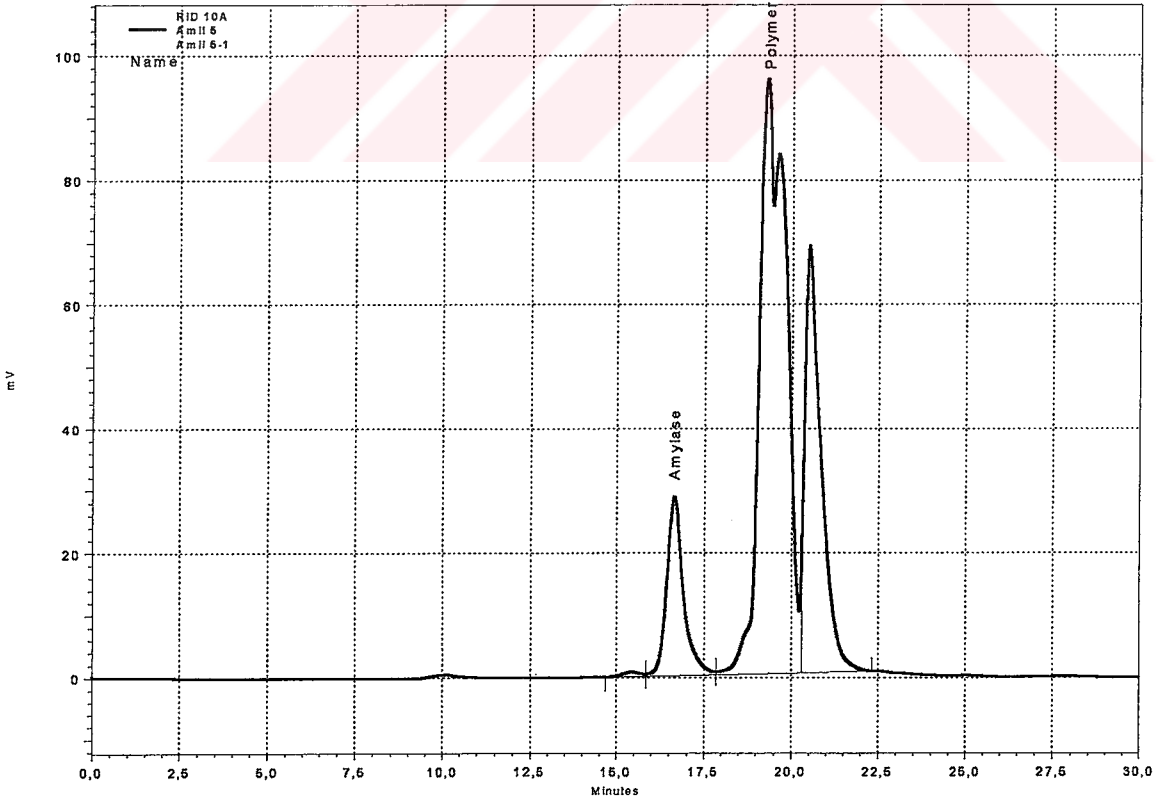
Şekil 3.52 Amilaz : Polimer oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı



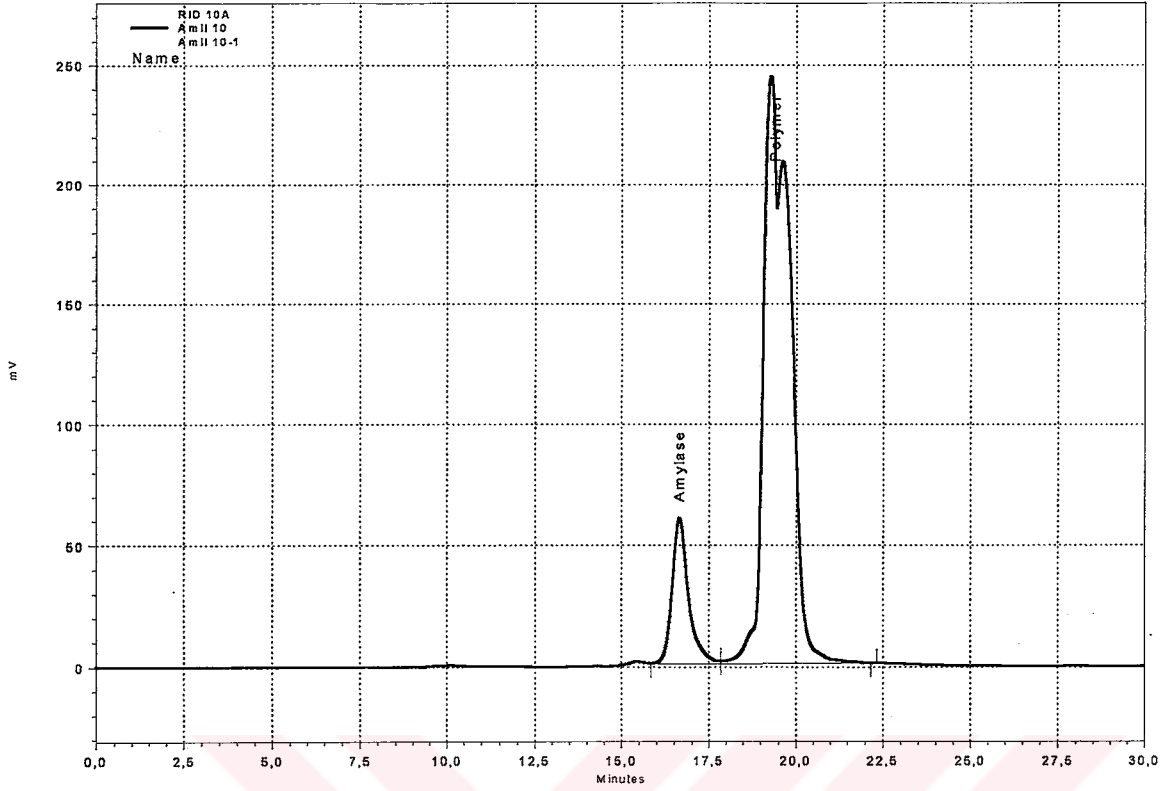
Şekil 3.53 Amilaz : Polimer oranı 1 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı



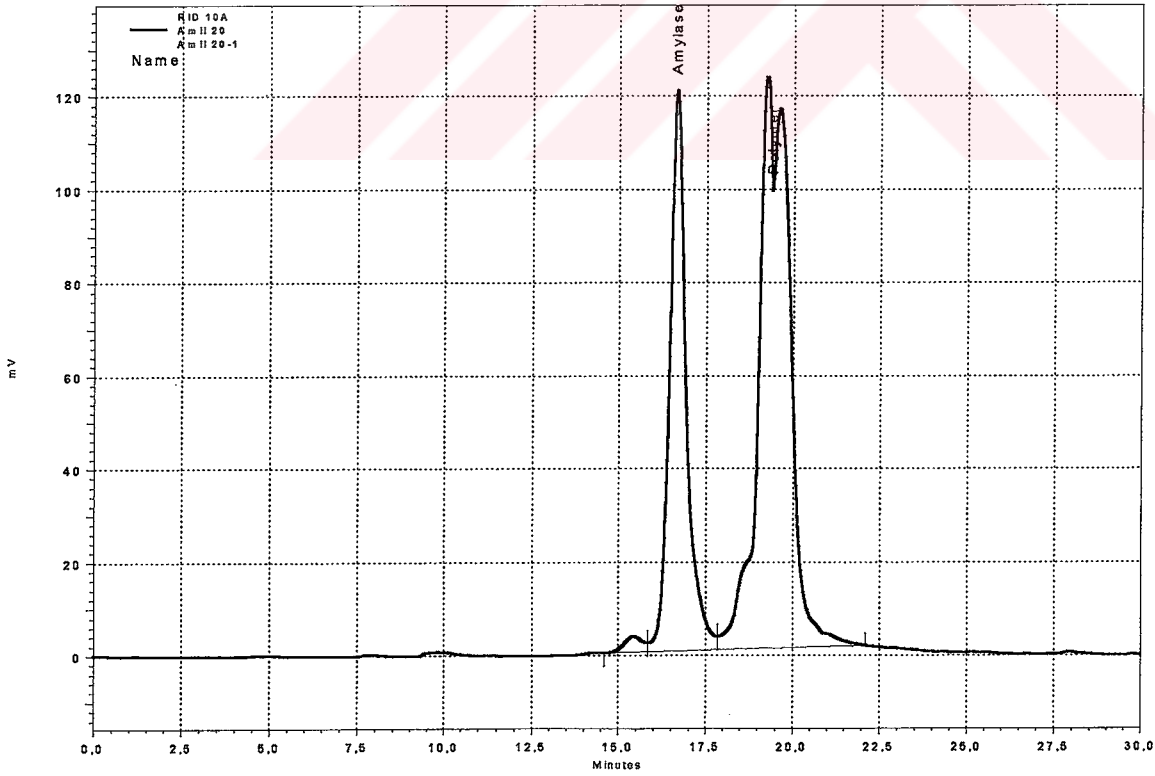
Şekil 3.54 Amilaz : Polimer oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı



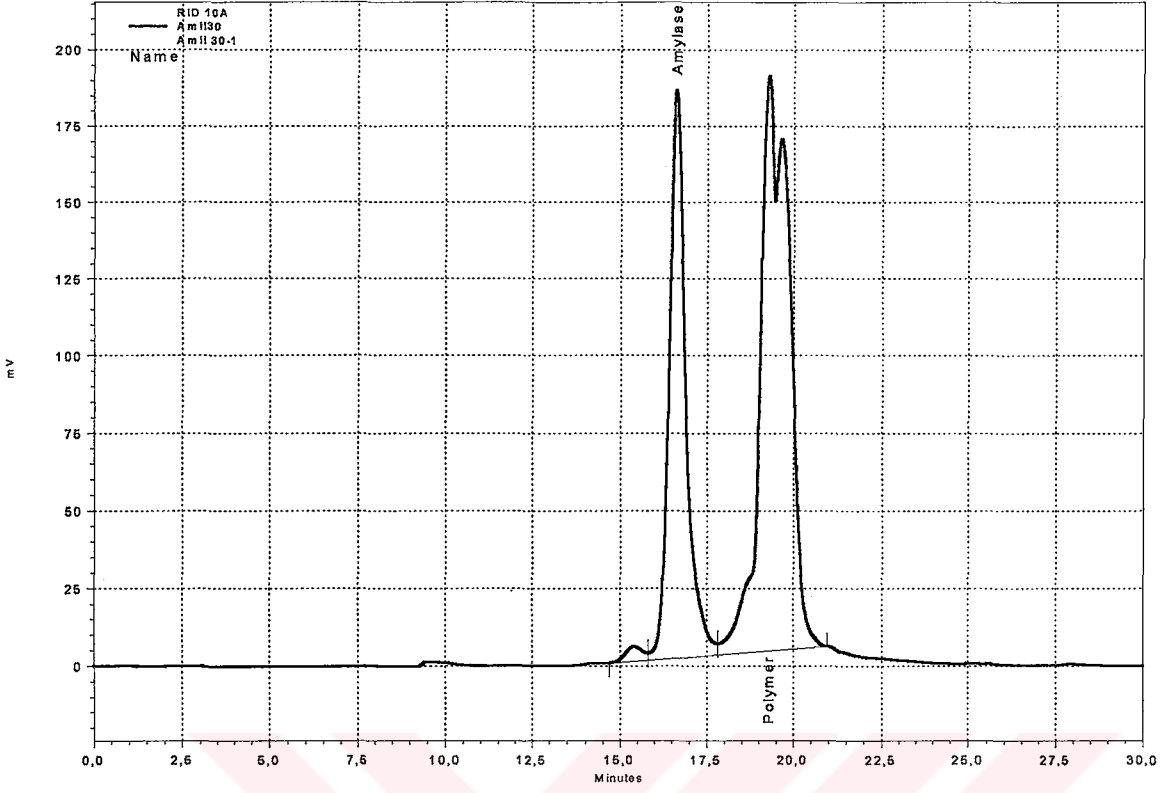
Şekil 3.55 Amilaz : Polimer oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.56 Amilaz : Polimer oranı 10 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.57 Amilaz : Polimer oranı 20 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.58 Amilaz : Polimer oranı 30 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm’de elde edilen kromatogramı

UV Dedektörle 280nm’de farklı oranlardaki Amilaz – Polimer çözeltilerinin enjeksiyonları sonucu elde edilen değerler Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6’da verilmiştir.

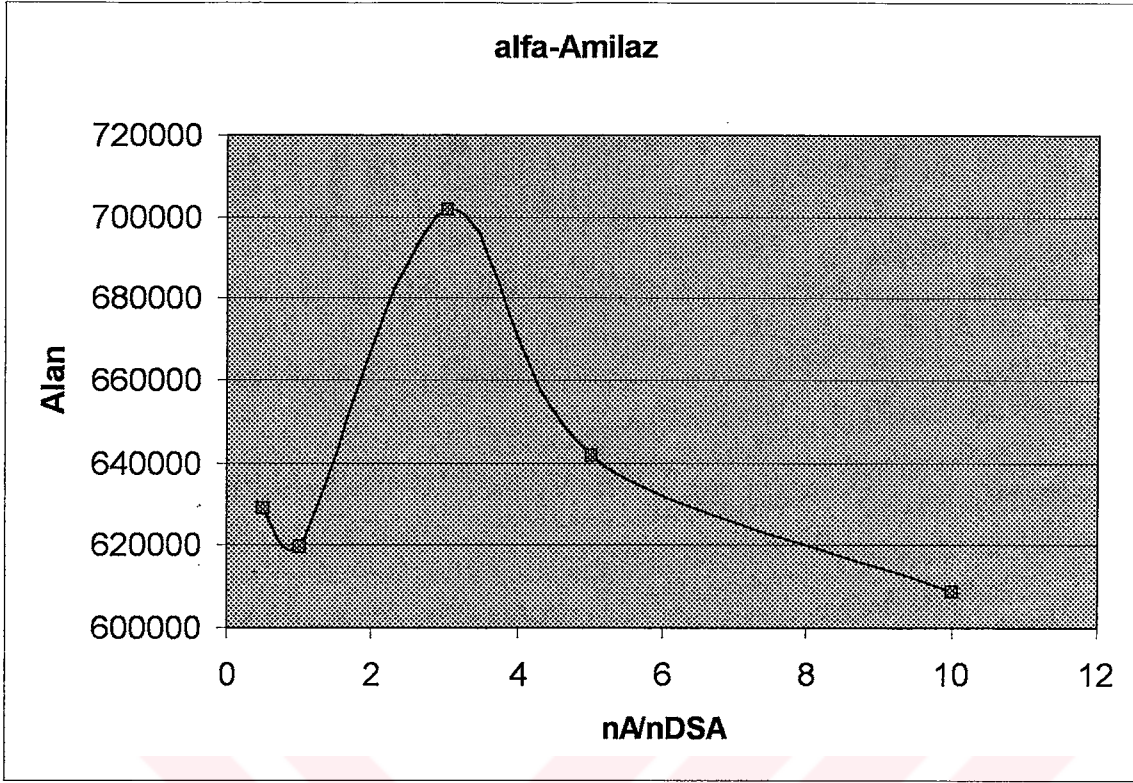
Çizelge 3.5 UV 280nm'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının  $\alpha$ -Amilaz'a ait sonuçları

Amilaz – Polimer oranı ( $n_A/n_{DSA}$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Ablkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	16,719	93533	2976
1	100	16,771	167885	5314
3	100	16,689	461456	14173
5	100	16,647	944752	28602
10	100	16,649	1964276	59810
20	100	16,646	4067012	120259
30	100	16,626	6107249	183961

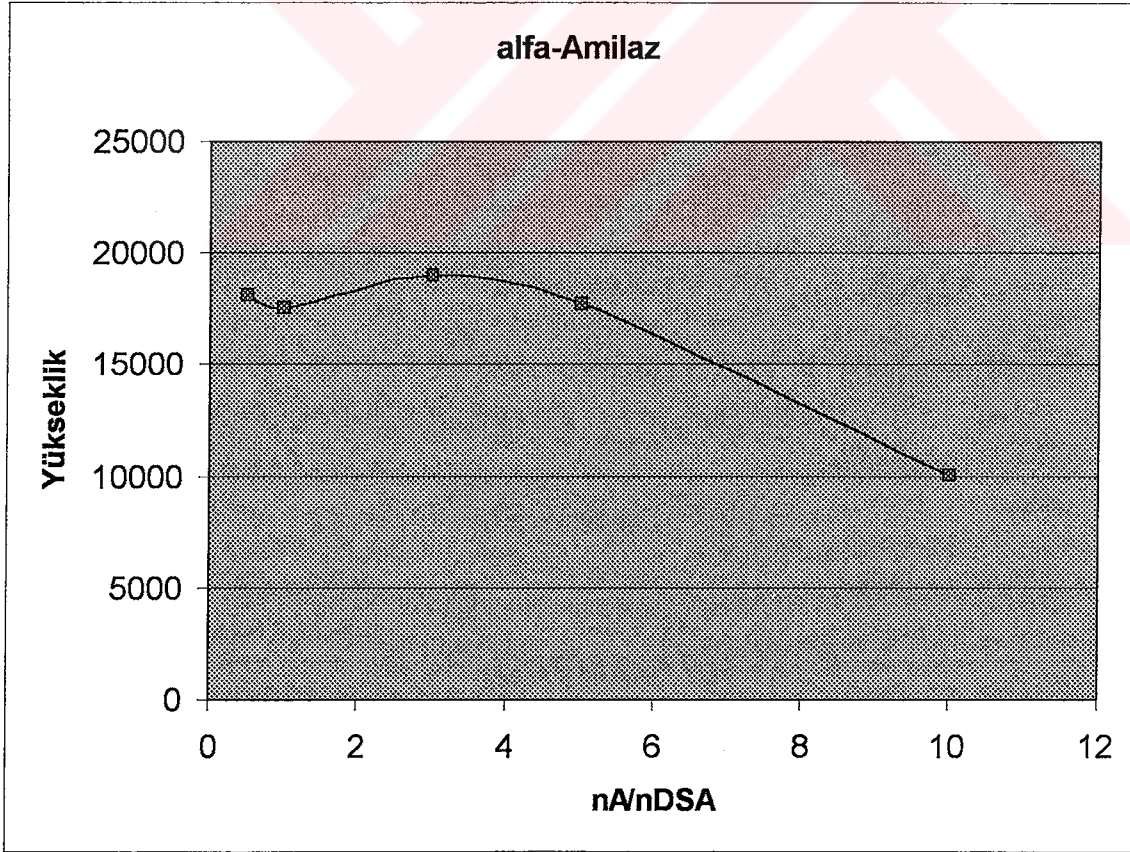
Çizelge 3.6 UV 280nm'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları

Amilaz – Polimer oranı ( $n_A/n_{DSA}$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Ablkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	18,683	230769	3007
1	100	18,825	272104	3868
3	100	19,342	2344399	42581
5	100	19,342	5065933	93683
10	100	19,417	12875450	201234
20	100	19,417	7688135	98118
30	100	19,308	11141394	186420

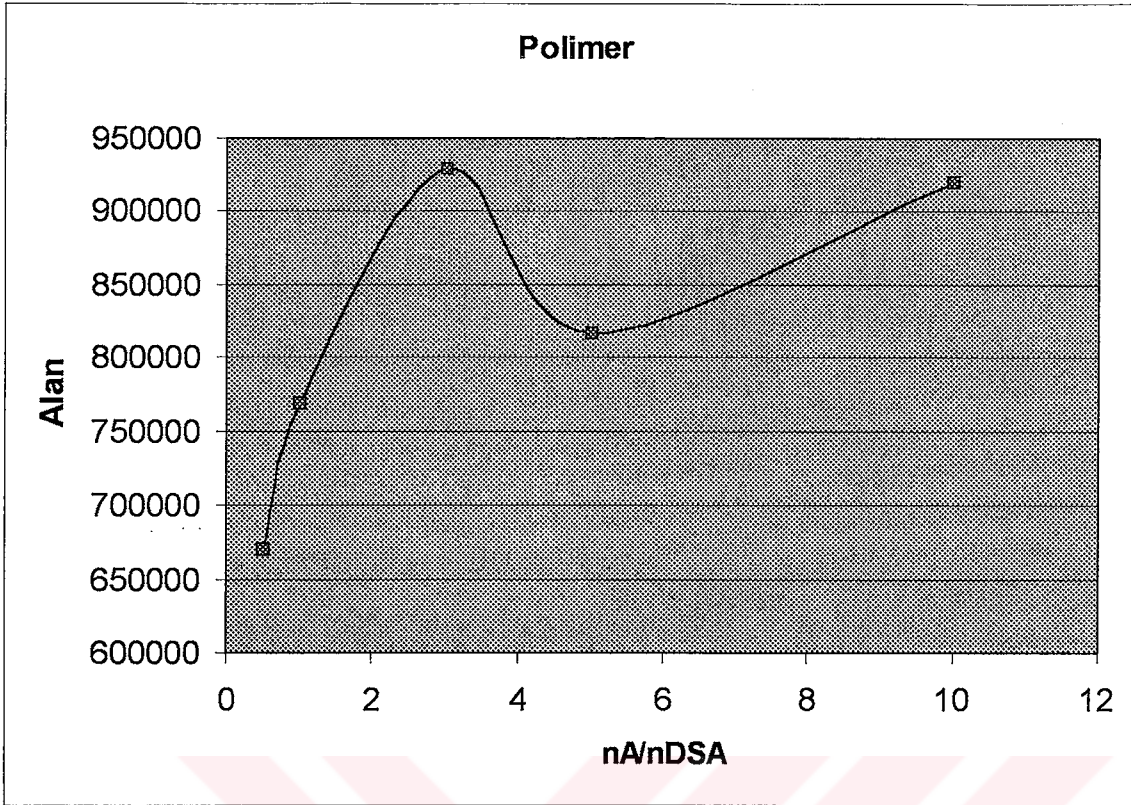
Elde edilen sonuçlardan faydalanarak Amilaz-Polimer oranına karşı  $\alpha$ -Amilaz alanı grafiği (Şekil 3.59), Amilaz-Polimer oranına karşı  $\alpha$ -Amilaz yüksekliği grafiği (Şekil 3.60), Amilaz-Polimer oranına karşı Polimer alanı grafiği (Şekil 3.61) ve Amilaz-Polimer oranına karşı Polimer yüksekliği grafiği (Şekil 3.62) elde edildi.



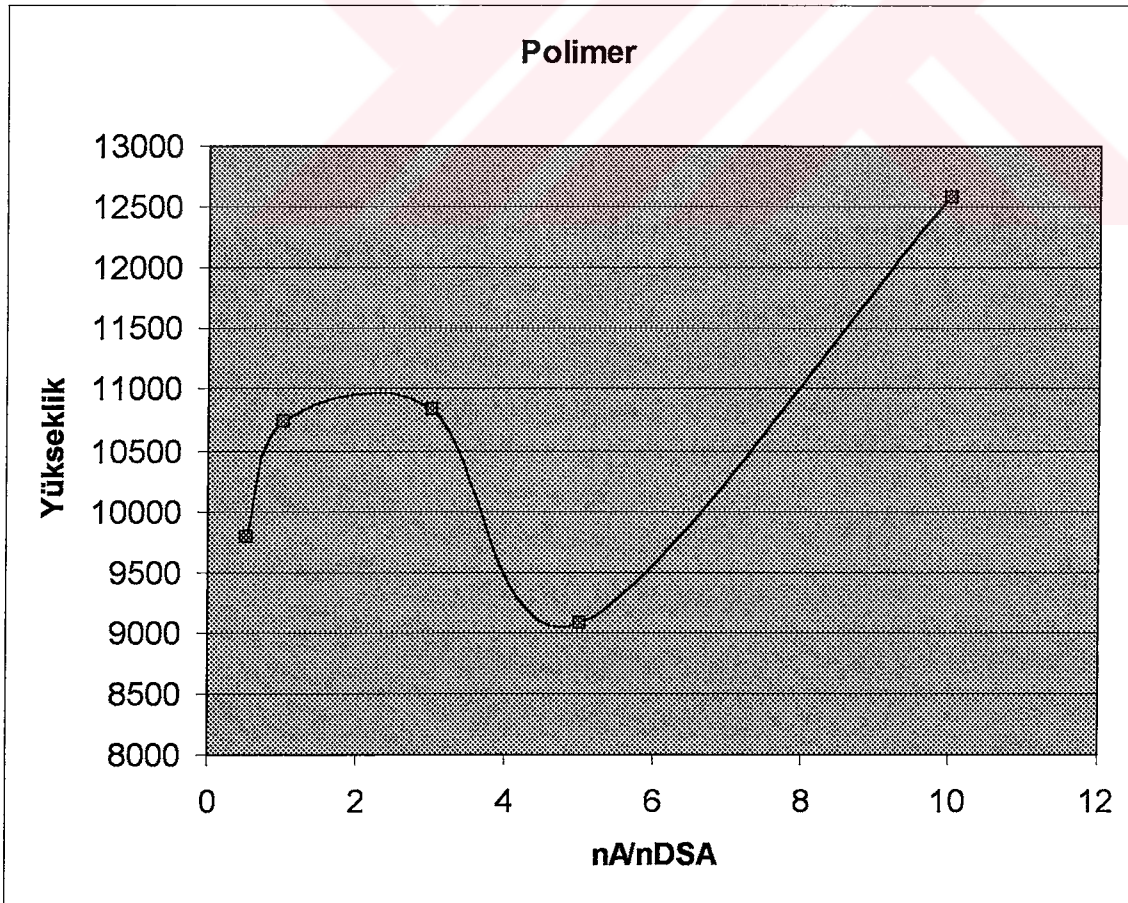
Şekil 3.59 Amilaz : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen  $\alpha$ -Amilaz alanı grafiği



Şekil 3.60 Amilaz : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen  $\alpha$ -Amilaz yüksekliği grafiği



Şekil 3.61 Amilaz : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer alanı grafiği



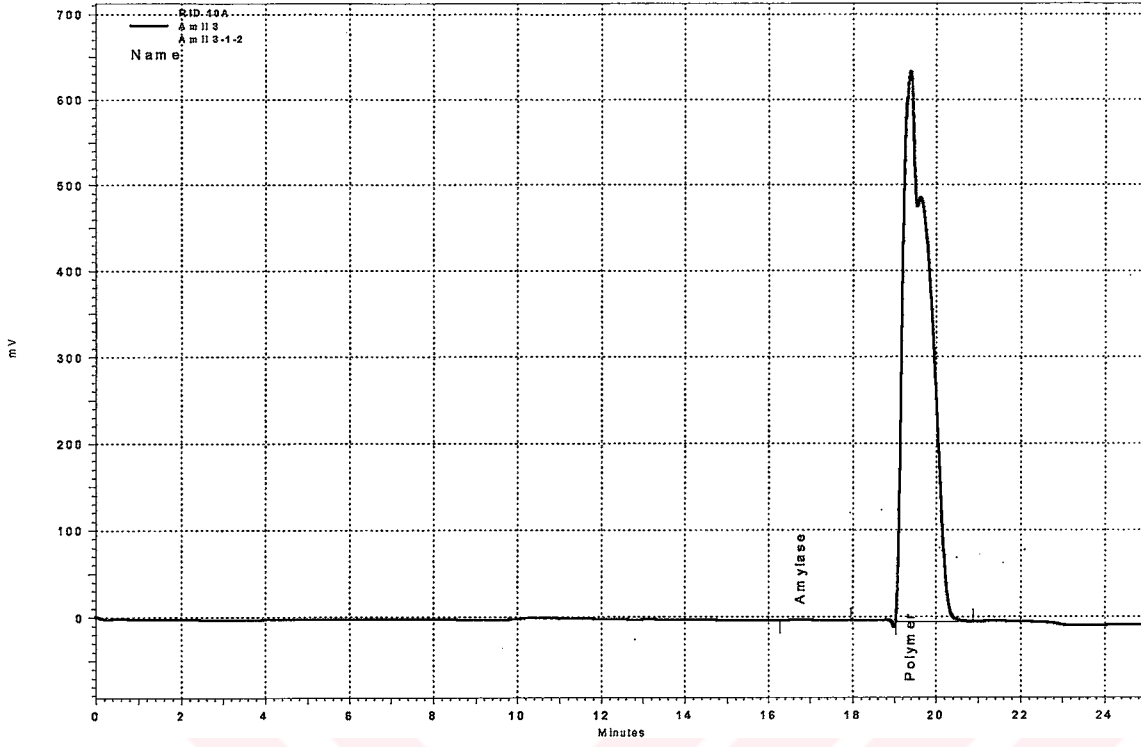
Şekil 3.62 Amilaz : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer Yüksekliği grafiği



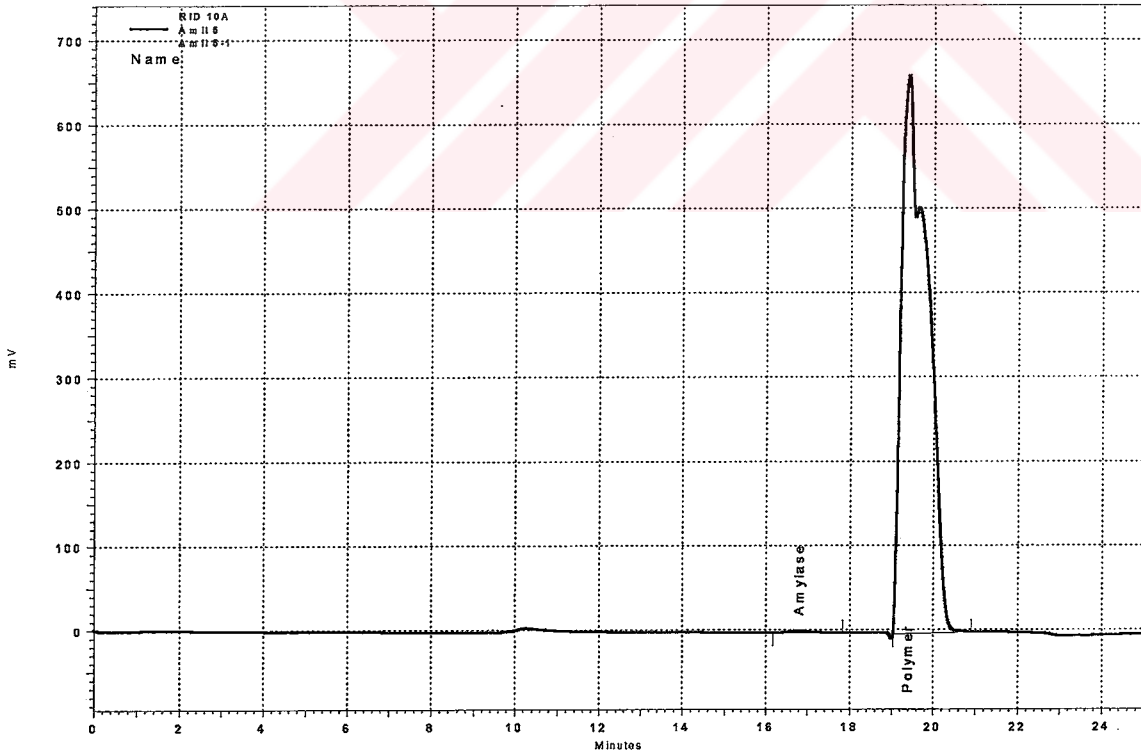
#### **3.4.2.4 Polimer miktarı sabit olan $\alpha$ -Amilaz – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi**

Amilaz : Polimer oranı 3 – 5 – 10 – 20 – 30 olan çözeltilerin RI dedektörde enjeksiyonları yapılarak kromatogramları elde edildi.

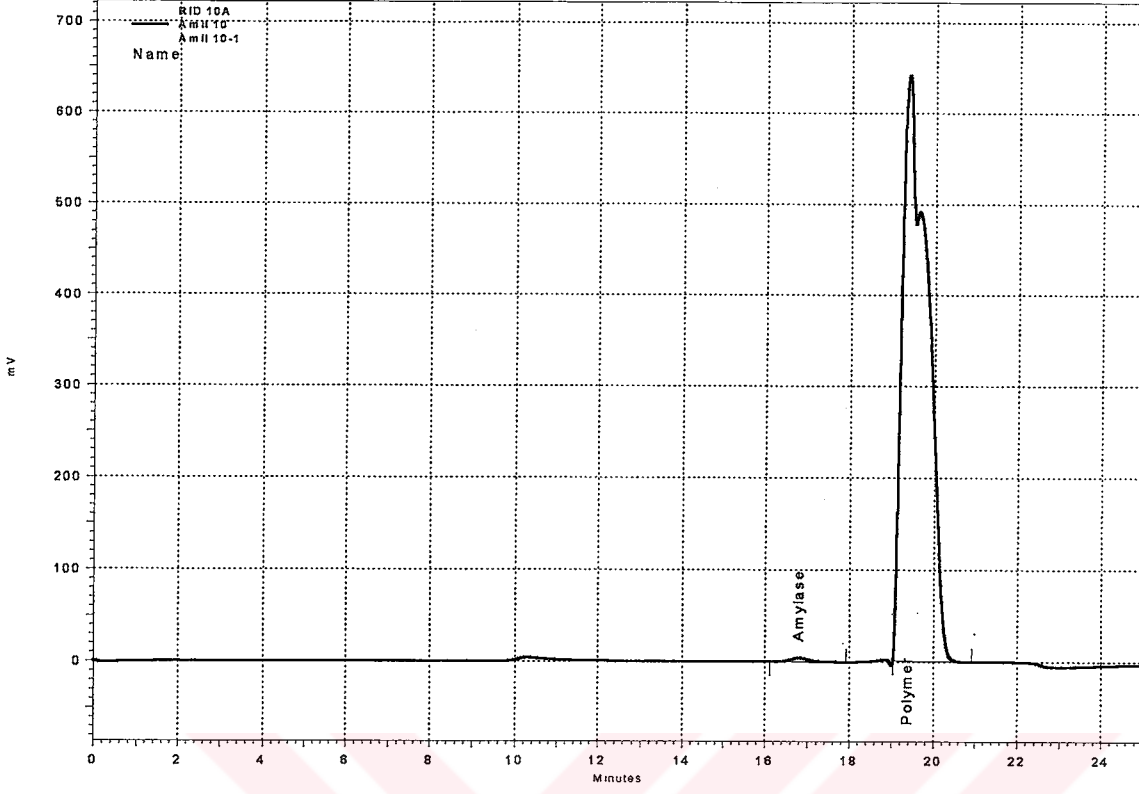




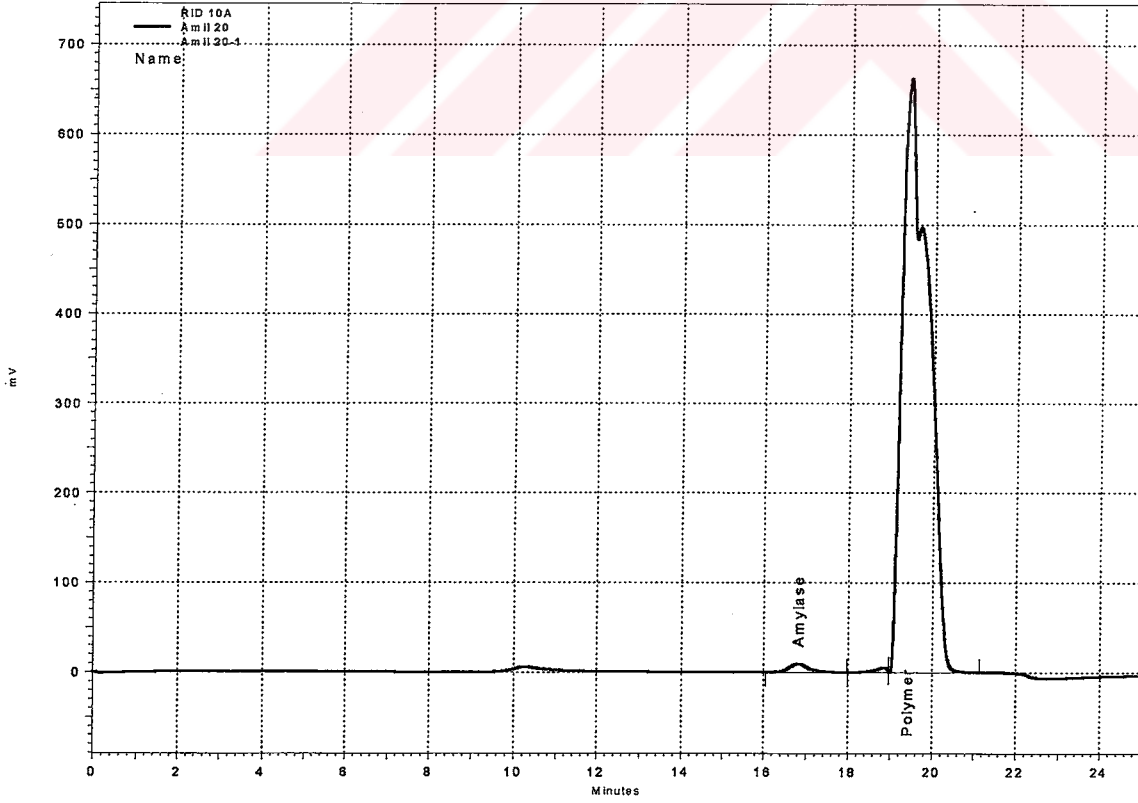
Şekil 3.63 Amilaz : Polimer oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı



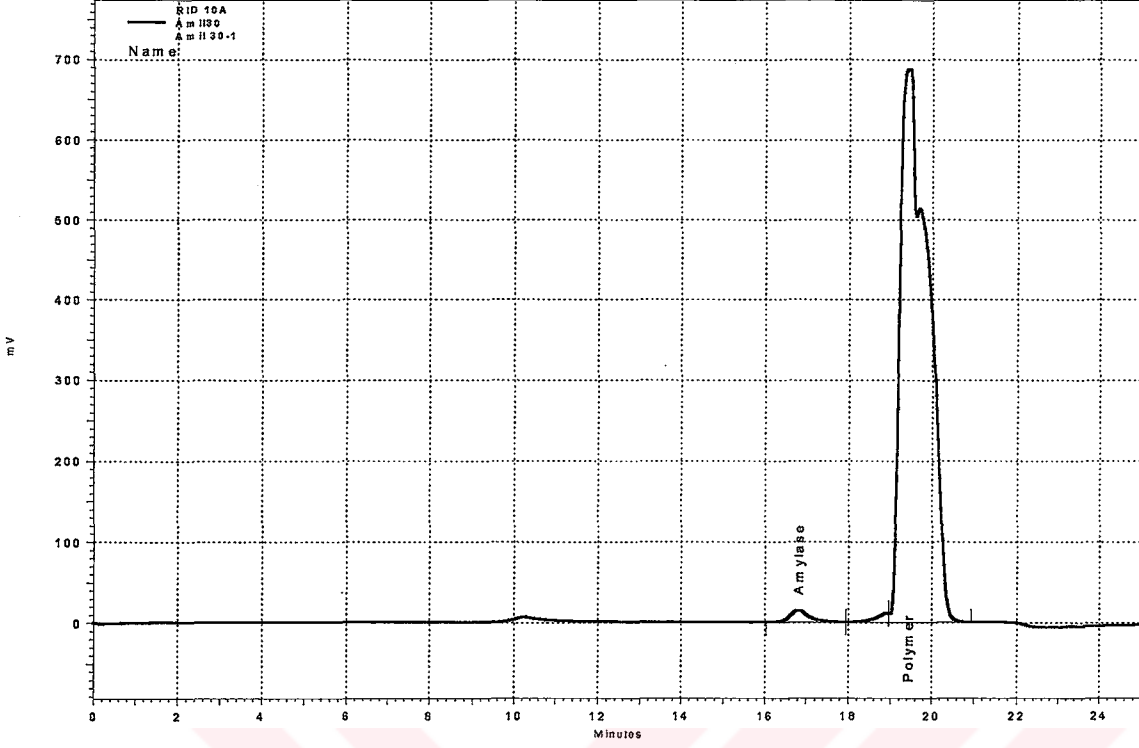
Şekil 3.64 Amilaz : Polimer oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.65 Amilaz : Polimer oranı 10 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.66 Amilaz : Polimer oranı 20 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.67 Amilaz : Polimer oranı 30 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı

RID’de farklı oranlardaki Amilaz – Polimer çözeltilerinin enjeksiyonları ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8’de verilmiştir.

UZAKTAN EĞİTİM MERKEZİ  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ  
T.C. MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI

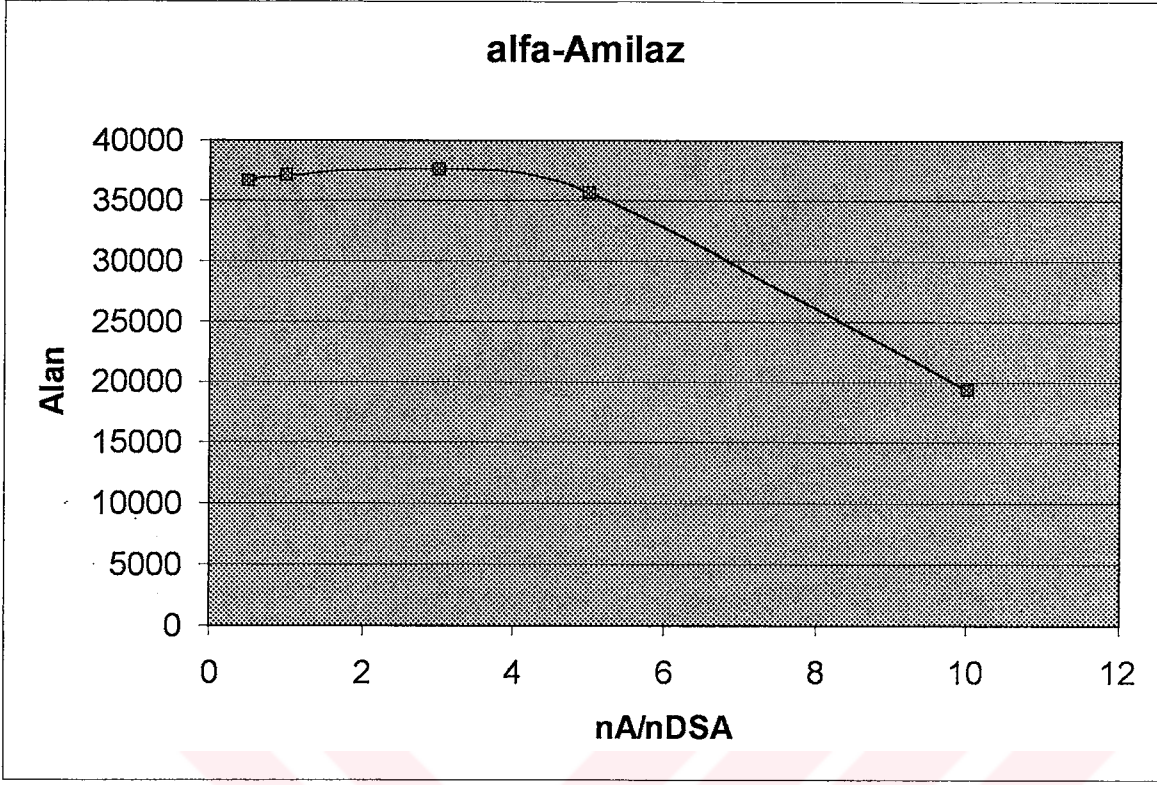
Çizelge 3.7 RID’de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının  $\alpha$ -Amilaz’a ait sonuçları

Amilaz – Polimer oranı ( $n_A/n_{DSA}$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alınma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
3	100	16,768	33966	1081
5	100	16,800	70075	2234
10	100	16,796	141179	4432
20	100	16,806	295301	9337
30	100	16,819	454551	14256

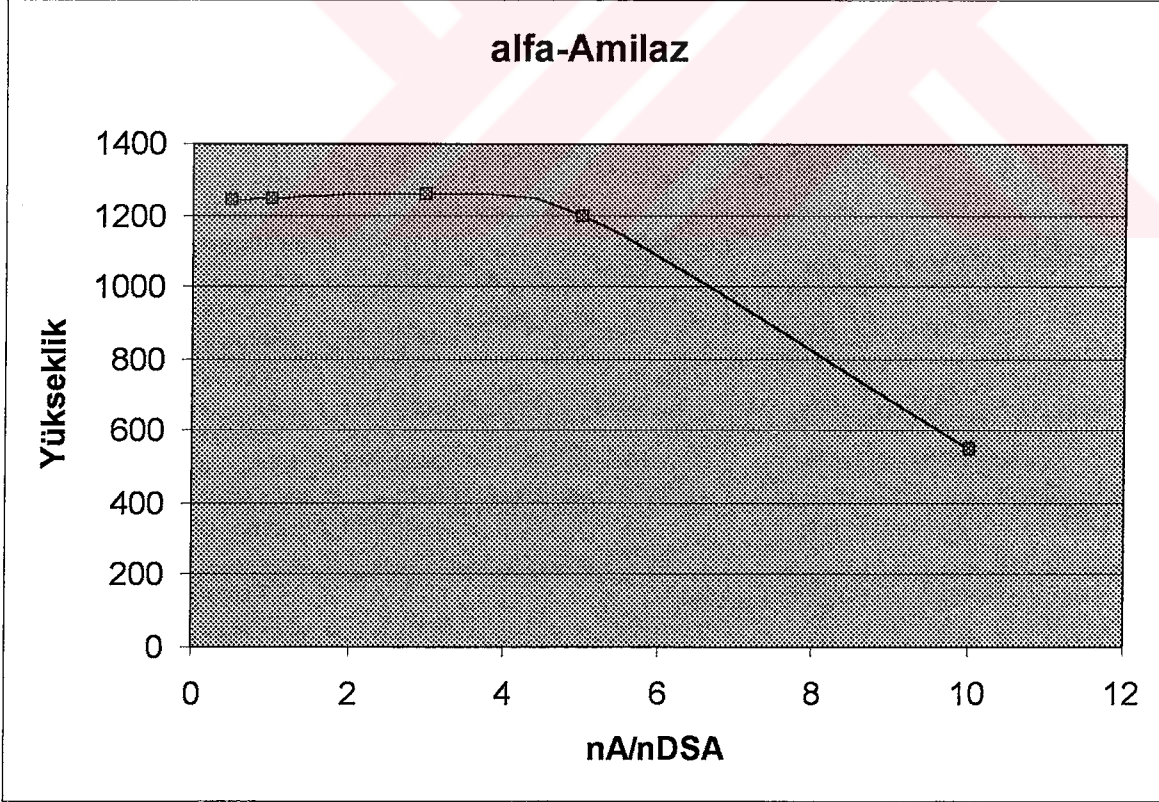
Çizelge 3.8 RID’de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Polimer’e ait sonuçları

Amilaz – Polimer oranı ( $n_A/n_{DSA}$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alınma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
3	100	19,392	27051182	637713
5	100	19,400	28688261	662003
10	100	19,383	26397706	638337
20	100	19,417	28539857	658582
30	100	19,442	32176442	686988

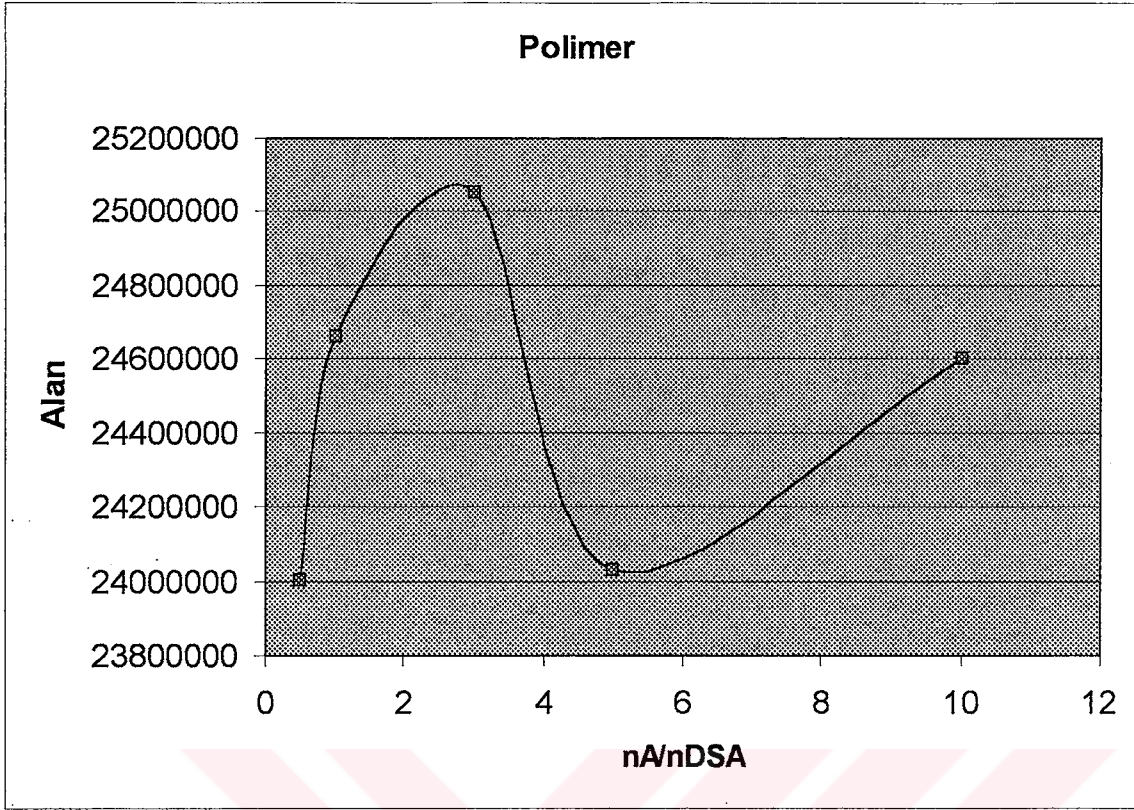
Alınan sonuçlardan faydalanarak Amilaz-Polimer oranına karşı  $\alpha$ -Amilaz alanı grafiği (Şekil 3.68), Amilaz-Polimer oranına karşı  $\alpha$ -Amilaz yüksekliği grafiği (Şekil 3.69), Amilaz-Polimer oranına karşı Polimer alanı grafiği (Şekil 3.70) ve Amilaz-Polimer oranına karşı Polimer yüksekliği grafiği (Şekil 3.71) elde edildi.



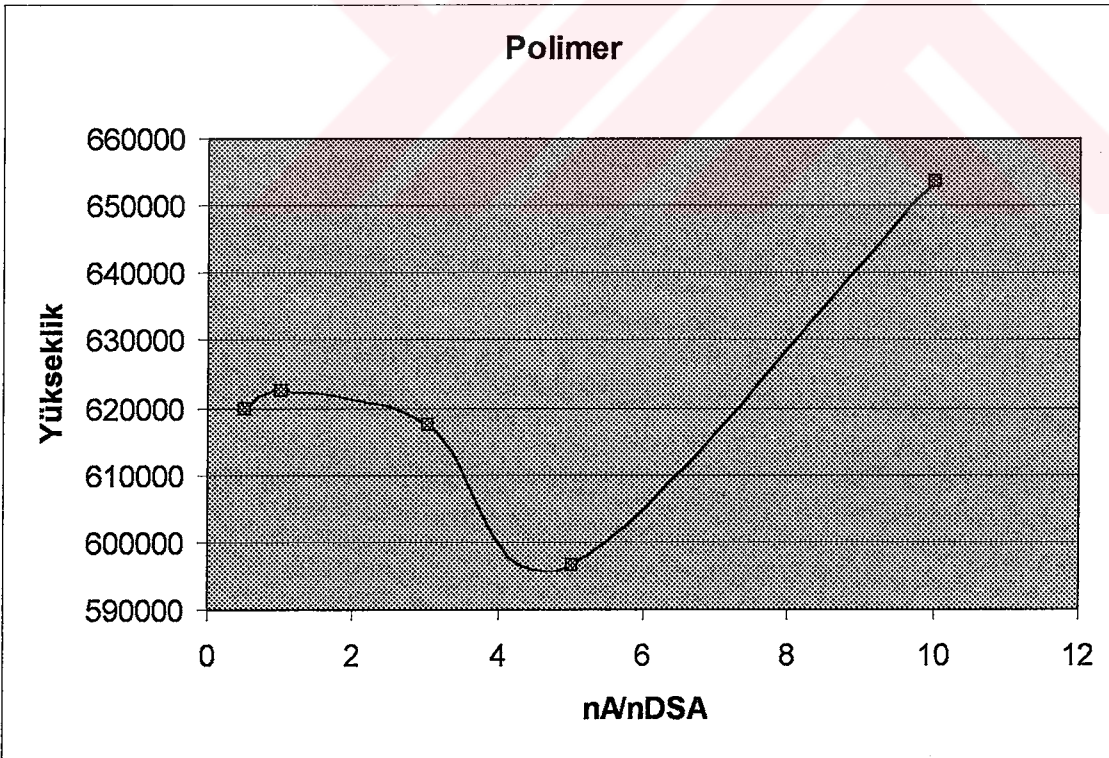
Şekil 3.68 Amilaz : Polimer oranı'na karşı RID'de elde edilen  $\alpha$ -Amilaz alanı grafiği



Şekil 3.69 Amilaz : Polimer oranı'na karşı RID'de elde edilen  $\alpha$ -Amilaz yüksekliği grafiği



Şekil 3.70 Amilaz : Polimer oranı'na karşı RID'de elde edilen Polimer alanı grafiği



Şekil 3.71 Amilaz : Polimer oranı'na karşı RID'de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği

### 3.4.2.5 UV dedektörde $\alpha$ -Amilaz-polimer çözeltisindeki $\alpha$ -Amilaz ile saf $\alpha$ -Amilaz arasında karşılaştırma

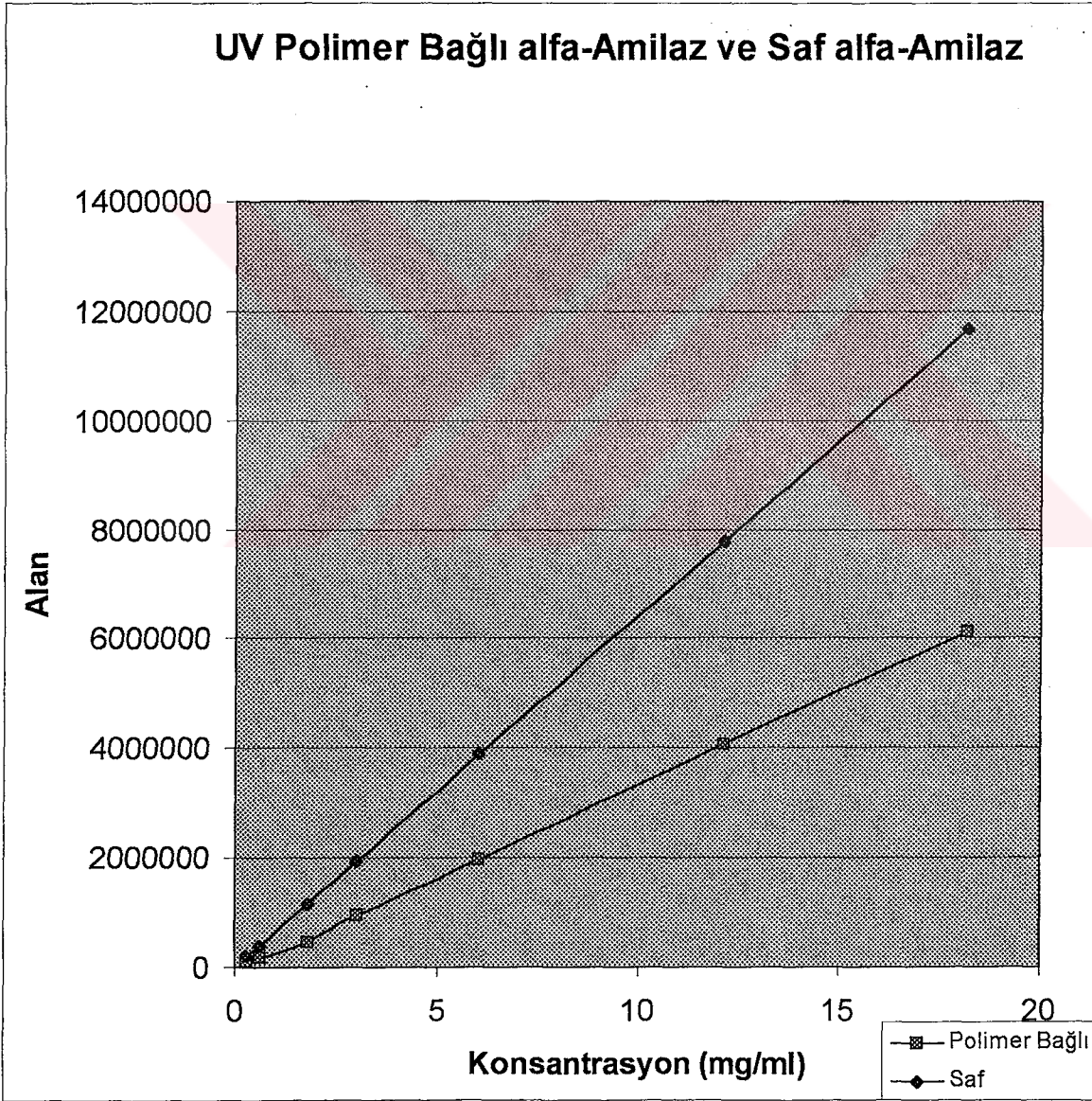
Elde Edilen verilerden faydalanarak Bağlı  $\alpha$ -Amilaz ile saf  $\alpha$ -Amilaz arasındaki ilişki Çizelge 3.9'da gösterildi.

$\alpha$ -Amilaz çözeltisi 0,5mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. Karışımdaki konsantrasyona oransal olarak hesaplanarak varıldı.



Çizelge 3.9 UV dedektörde Amilaz-Polimer karışımı çözeltisi ile  $\alpha$ -Amilaz çözeltisi alan sonuçları

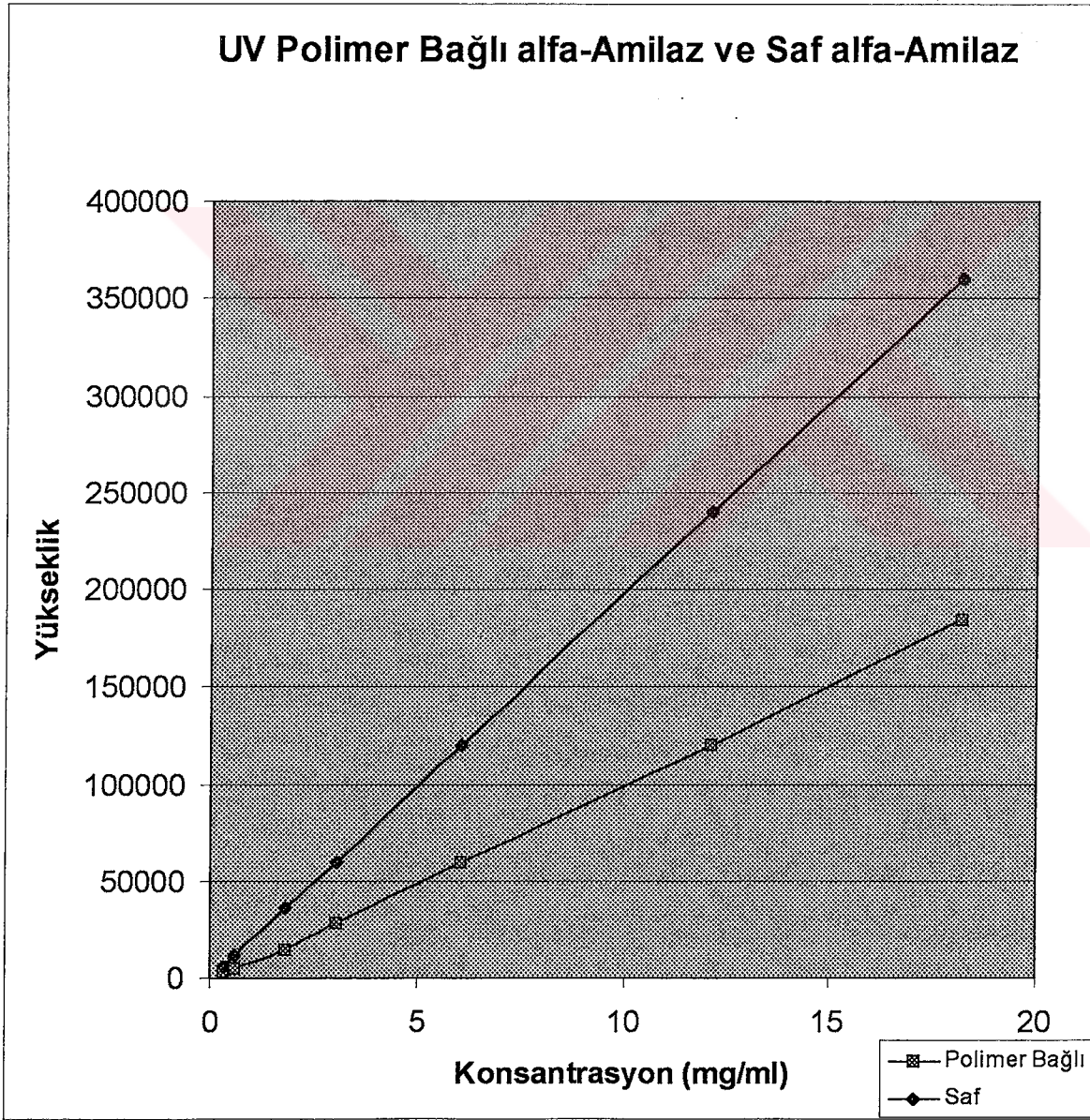
Amilaz-Polimer çözeltisinin karışım oranı	Amilaz-Polimer karışımındaki amilaz konsantrasyonu (mg/ml)	Amilaz-Polimer karışımındaki $\alpha$ -Amilaz alanı	$\alpha$ -Amilaz çözeltisinin alanı
0,5	0,303	93533	194759
1	0,606	167885	389517
3	1,81	461456	1163410
5	3,03	944752	1947587
10	6,06	1964276	3895174
20	12,12	4067012	7790348
30	18,18	6107249	11685522



Şekil 3.72 UV dedektörde Amilaz-Polimer karışımındaki  $\alpha$ -Amilaz'ın ve polimersiz çözeltideki  $\alpha$ -Amilaz'ın konsantrasyona karşı alan grafiği

Çizelge 3.10 UV dedektörde Amilaz-Polimer karışımı çözeltisi ile  $\alpha$ -Amilaz çözeltisi yükseklik sonuçları

Amilaz-Polimer çözeltisinin karışım oranı	Amilaz-Polimer karışımındaki amilaz konsantrasyonu (mg/ml)	Amilaz-Polimer karışımındaki $\alpha$ -Amilaz yüksekliği	$\alpha$ -Amilaz çözeltisinin yüksekliği
0,5	0,303	2976	5995
1	0,606	5314	11990
3	1,81	14173	35813
5	3,03	28602	59952
10	6,06	59810	119903
20	12,12	120259	239806
30	18,18	183961	359709



Şekil 3.73 UV dedektörde Amilaz-Polimer karışımındaki  $\alpha$ -Amilaz'ın ve polimersiz çözeltideki  $\alpha$ -Amilaz'ın konsantrasyona karşı yükseklik grafiği

### 3.4.2.6 RI dedektörde $\alpha$ -Amilaz-polimer çözeltilisindeki $\alpha$ -Amilaz ile saf $\alpha$ -Amilaz arasında karşılaştırma

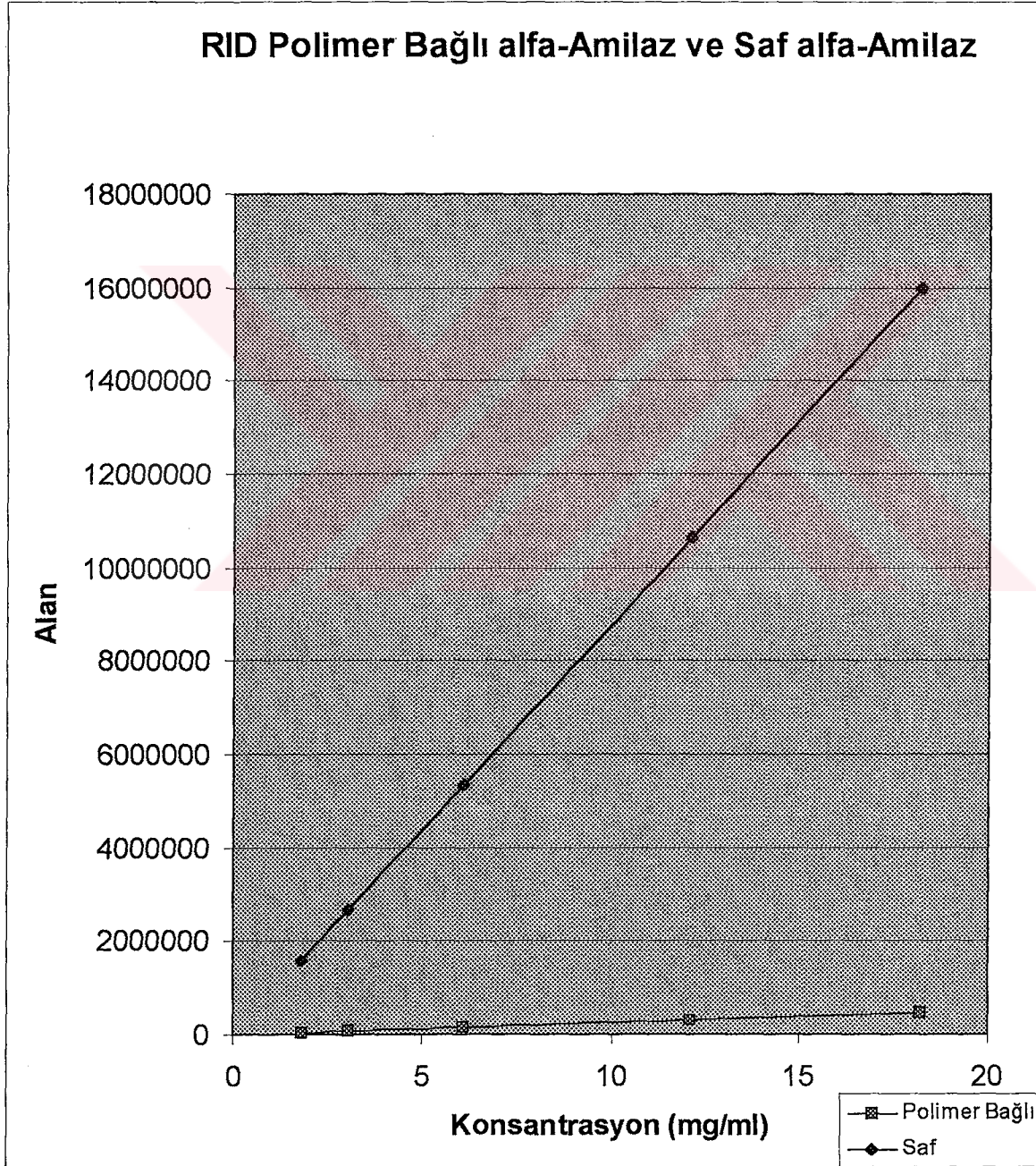
Elde Edilen verilerden faydalanarak Bağlı  $\alpha$ -Amilaz ile saf  $\alpha$ -Amilaz arasındaki ilişki aşağıdaki Çizelge 3.11’de gösterildi.

$\alpha$ -Amilaz çözeltisi 0,5mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. Karışımdaki konsantrasyona oransal olarak hesaplanarak varıldı.



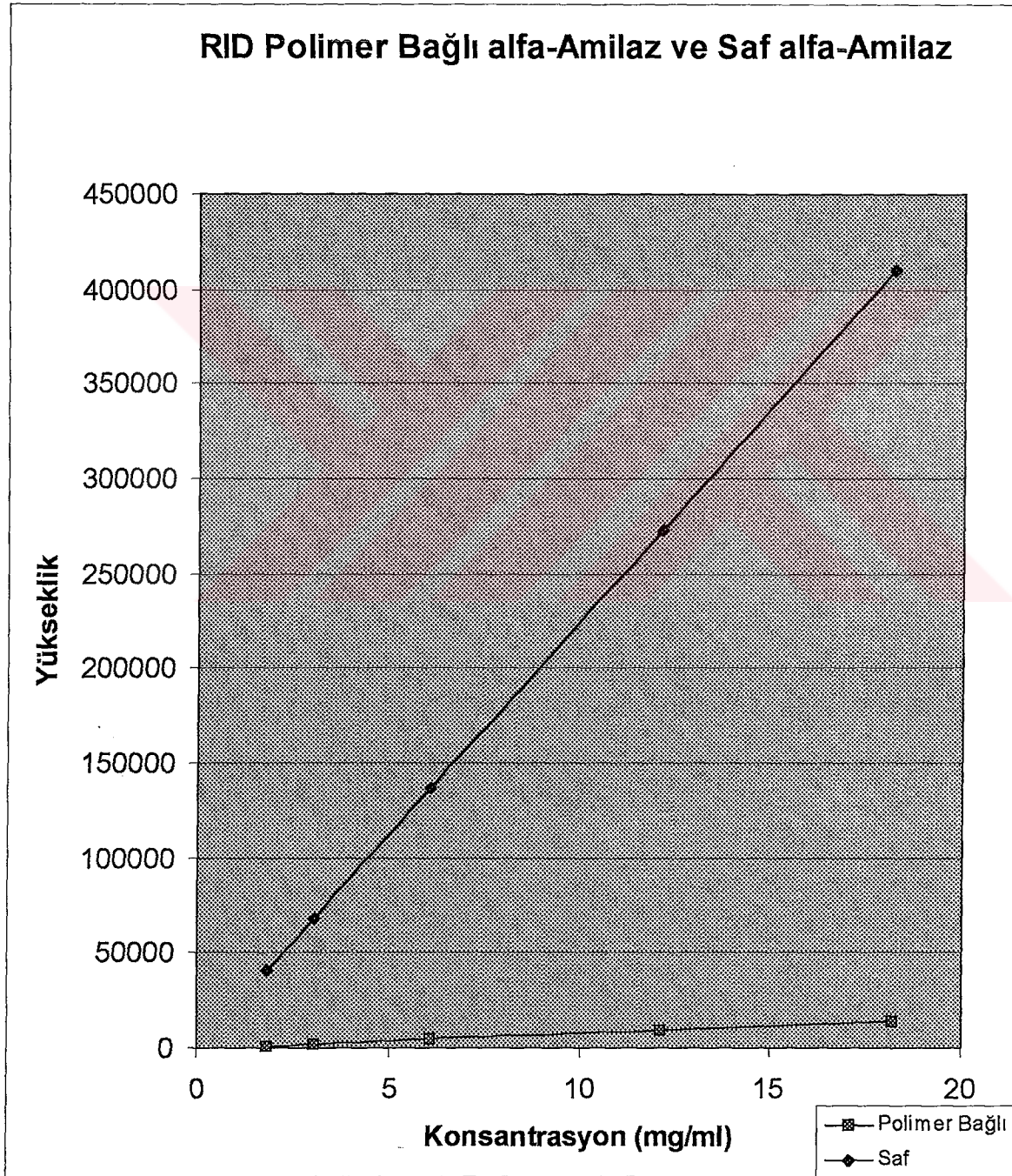
Çizelge 3.11 RID'de Amilaz-Polimer karışımı çözeltisi ile  $\alpha$ -Amilaz çözeltisi alan sonuçları

Amilaz-Polimer çözeltisinin karışım oranı	Amilaz-Polimer karışımındaki amilaz konsantrasyonu (mg/ml)	Amilaz-Polimer karışımındaki $\alpha$ -Amilaz alanı	$\alpha$ -Amilaz çözeltisinin alanı
3	1,81	33966	1590277
5	3,03	70075	2662176
10	6,06	141179	5324352
20	12,12	295301	10648705
30	18,18	454551	15973057

Şekil 3.74 RID'de Amilaz-Polimer karışımındaki  $\alpha$ -Amilaz'ın ve polimersiz çözeltideki  $\alpha$ -Amilaz'ın konsantrasyona karşı alan grafiği

Çizelge 3.12 RID’de Amilaz-Polimer karışımı çözeltisi ile  $\alpha$ -Amilaz çözeltisi yükseklik sonuçları

Amilaz-Polimer çözeltisinin karışım oranı	Amilaz-Polimer karışımındaki amilaz konsantrasyonu (mg/ml)	Amilaz-Polimer karışımındaki $\alpha$ -Amilaz yüksekliği	$\alpha$ -Amilaz çözeltisinin yüksekliği
3	1,81	1081	40768
5	3,03	2234	68248
10	6,06	4432	136495
20	12,12	9337	272991
30	18,18	14256	409486

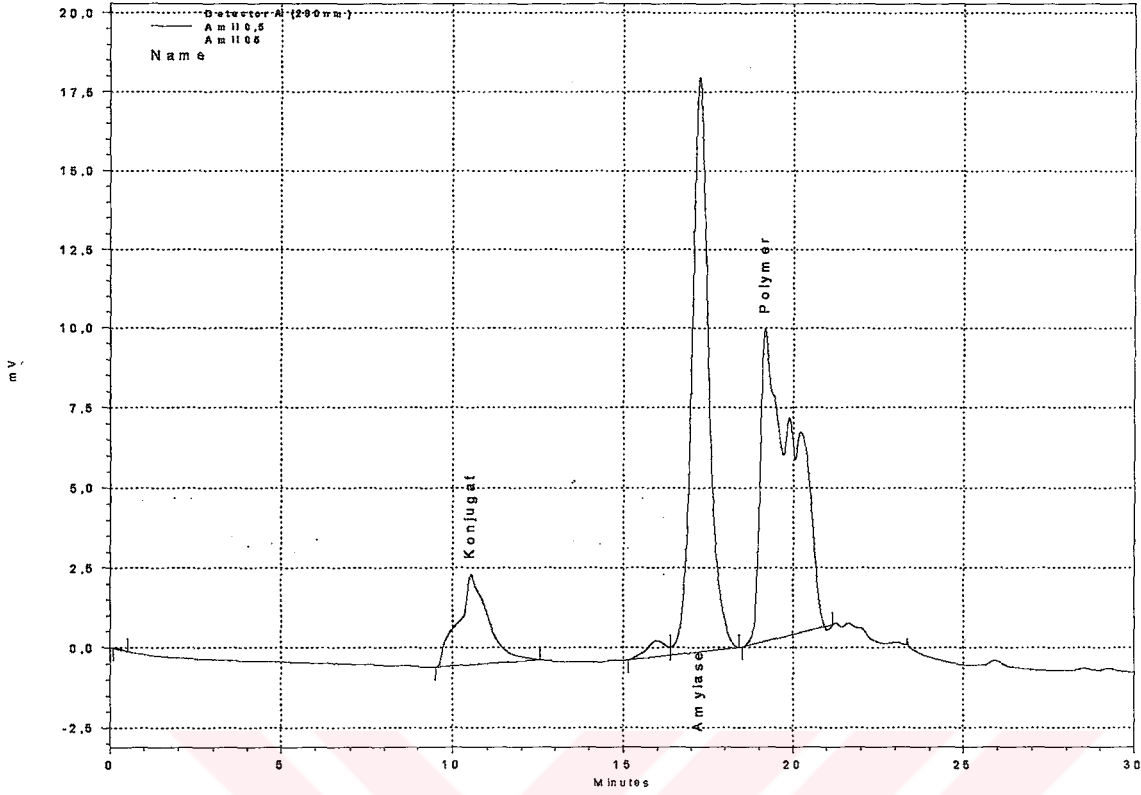


Şekil 3.75 RID’de Amilaz-Polimer karışımındaki  $\alpha$ -Amilaz’ın ve polimersiz çözeltideki  $\alpha$ -Amilaz’ın konsantrasyona karşı yükseklik grafiği

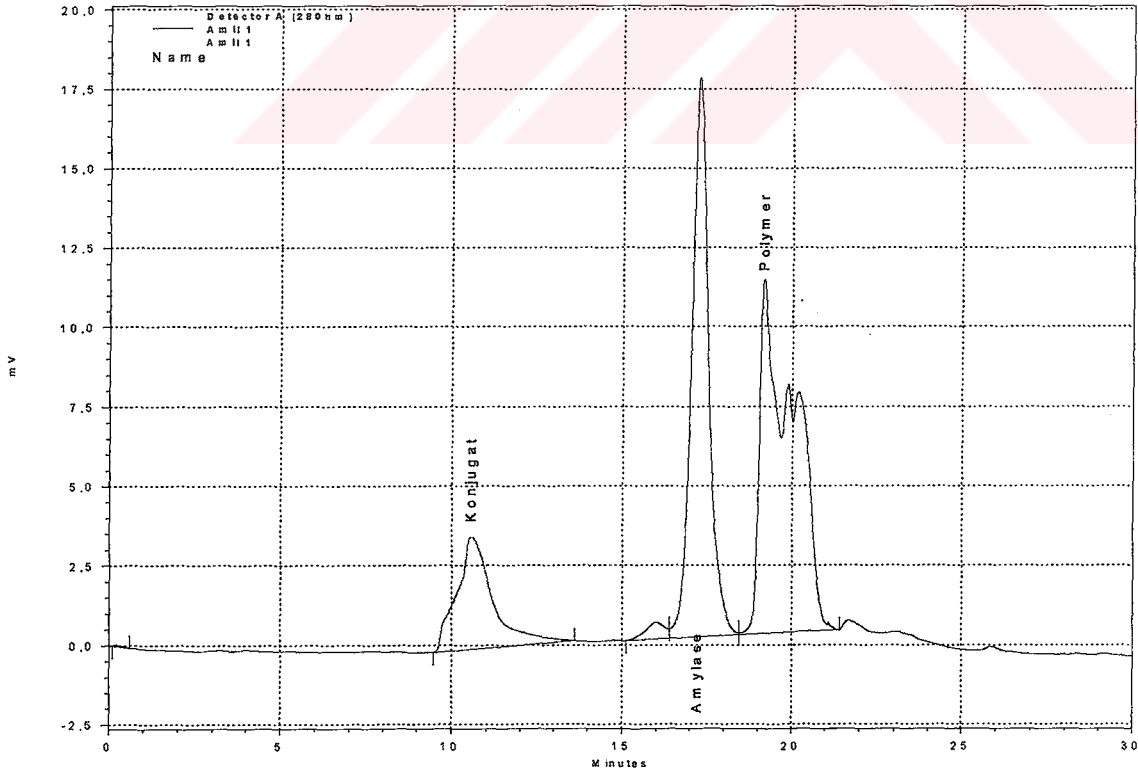
### **3.4.2.7 $\alpha$ -Amilaz miktarı sabit olan $\alpha$ -Amilaz – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi**

Polimer : Amilaz oranı 0,5 – 1 – 3 – 5 – 10 olan çözeltilerin UV 280nm’de enjeksiyonları yapılarak kromatogramları elde edildi.

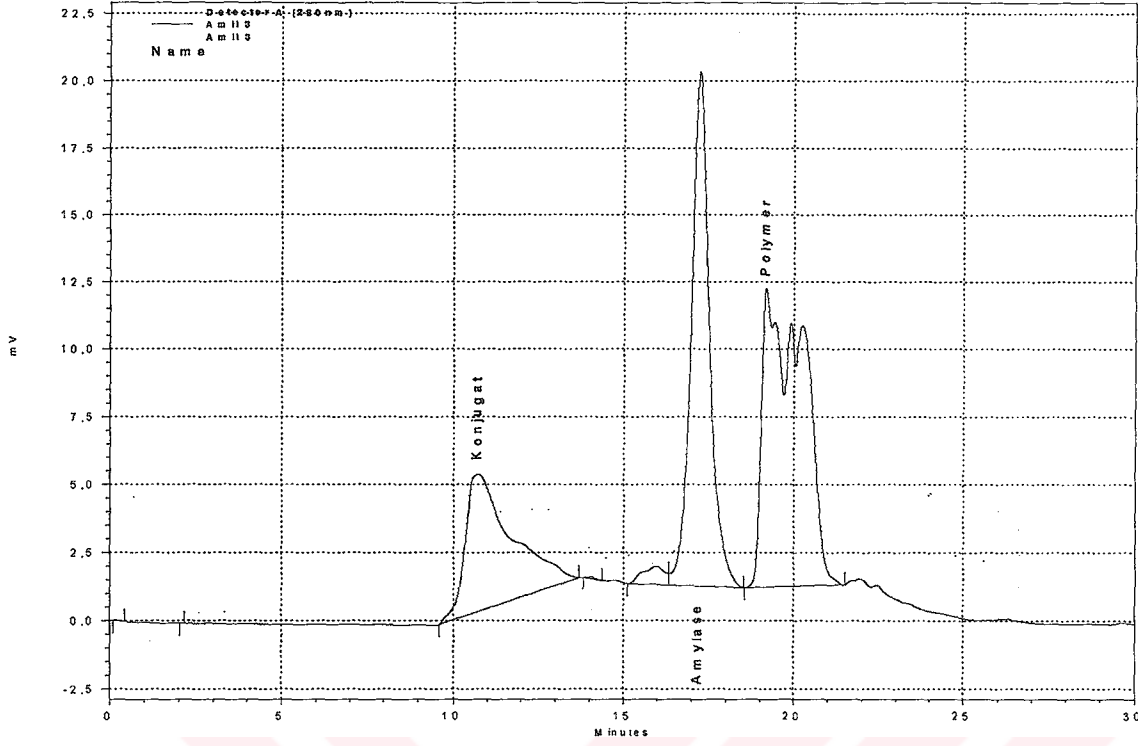




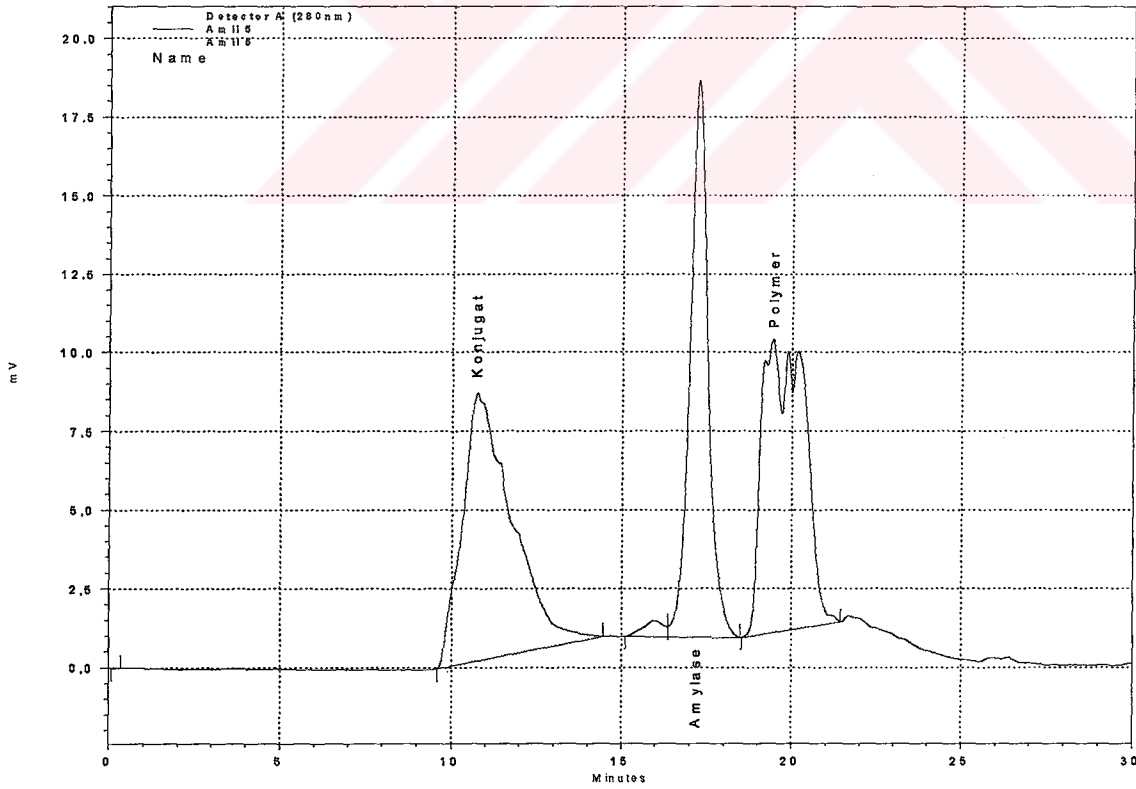
Şekil 3.76 Polimer : Amilaz oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.77 Polimer : Amilaz oranı 1 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı

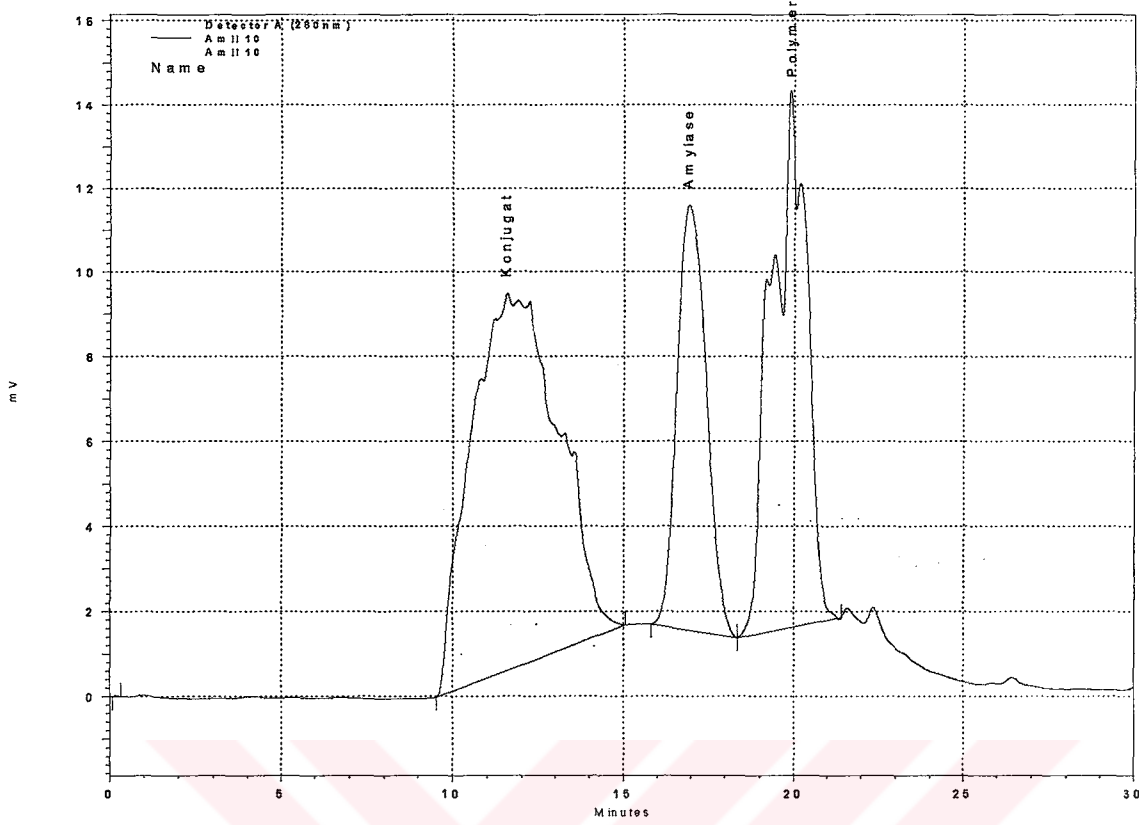


Şekil 3.78 Polimer : Amilaz oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.79 Polimer : Amilaz oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı





Şekil 3.80 Polimer : Amilaz oranı 10 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı

UV Dedektörle 280nm'de farklı oranlardaki Amilaz – Polimer çözeltilerinin enjeksiyonları sonucu elde edilen değerler Çizelge 3.13, Çizelge 3.14 ve Çizelge 15'de verilmiştir.

Çizelge 3.13 UV 280nm'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının  $\alpha$ -Amilaz'a ait sonuçları

Polimer - Amilaz oranı ( $n_{\text{DSA}}/n_{\text{A}}$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	17,227	629005	18094
1	100	17,248	619813	17596
3	100	17,227	702044	19056
5	100	17,224	641619	17712
10	100	16,924	608850	10048

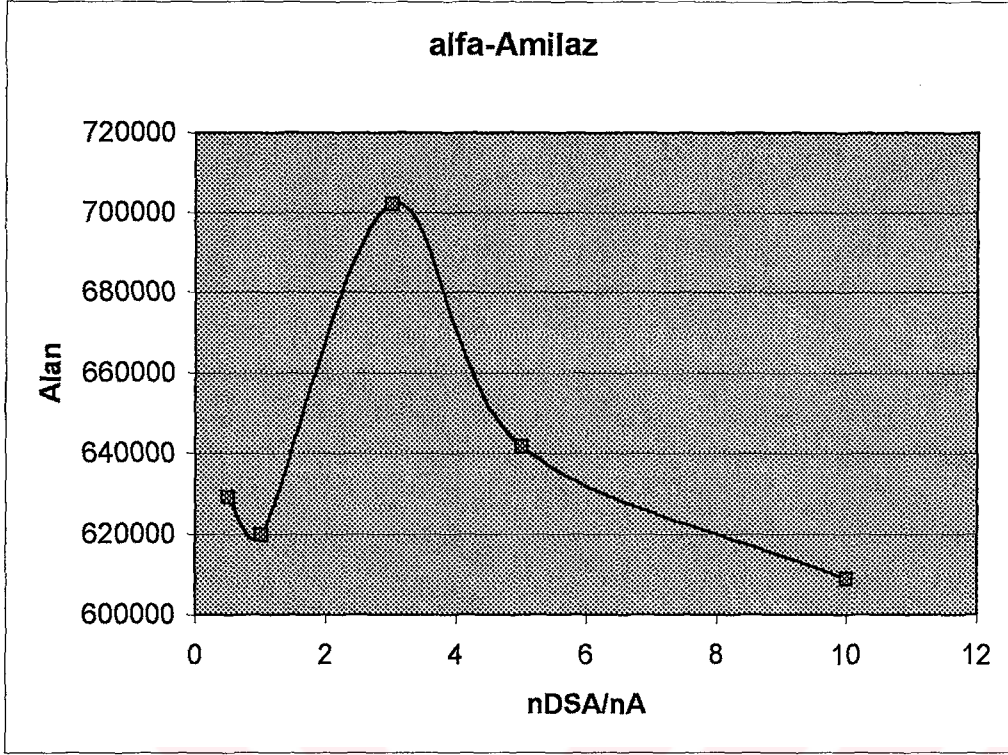
Çizelge 3.14 UV 280nm'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları

Polimer - Amilaz oranı ( $n_{\text{DSA}}/n_{\text{A}}$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	19,153	669431	9790
1	100	19,192	769260	107,43
3	100	19,192	928818	10834
5	100	19,475	816337	9087
10	100	19,917	920148	12587

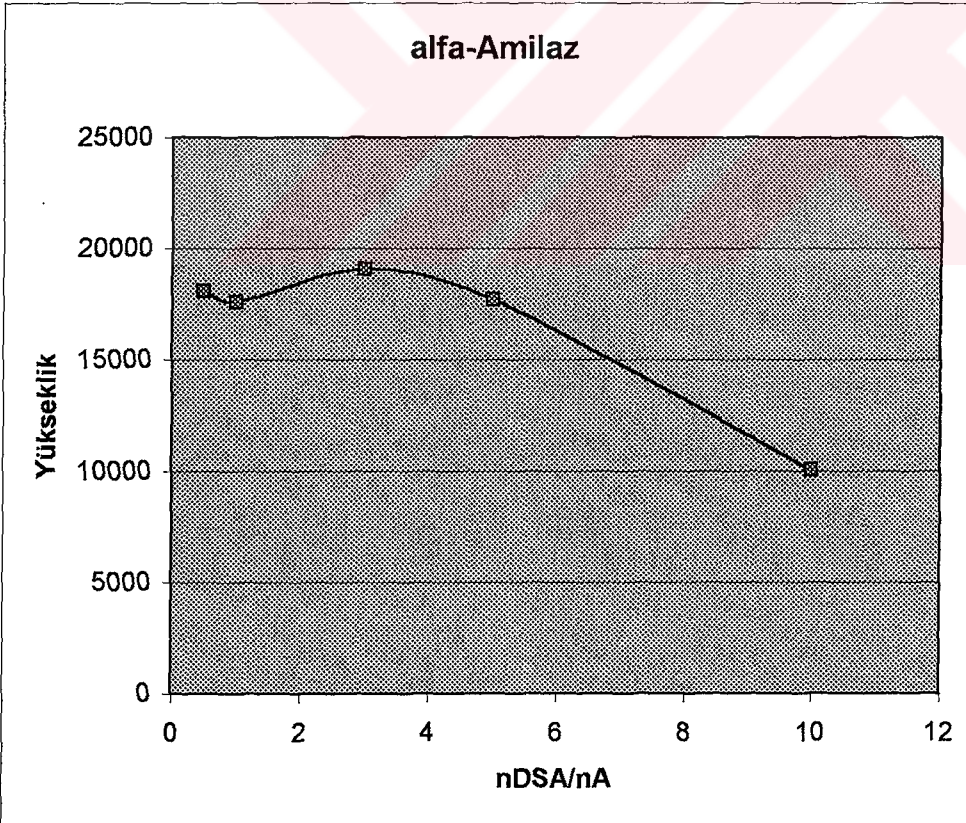
Çizelge 3.15 UV 280nm'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Konjugat'a ait sonuçları

Polimer - Amilaz oranı ( $n_{\text{DSA}}/n_{\text{A}}$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	10,532	167507	2834
1	100	10,600	254197	3519
3	100	10,736	475440	5040
5	100	10,758	867417	8467
10	100	11,550	1564557	8884

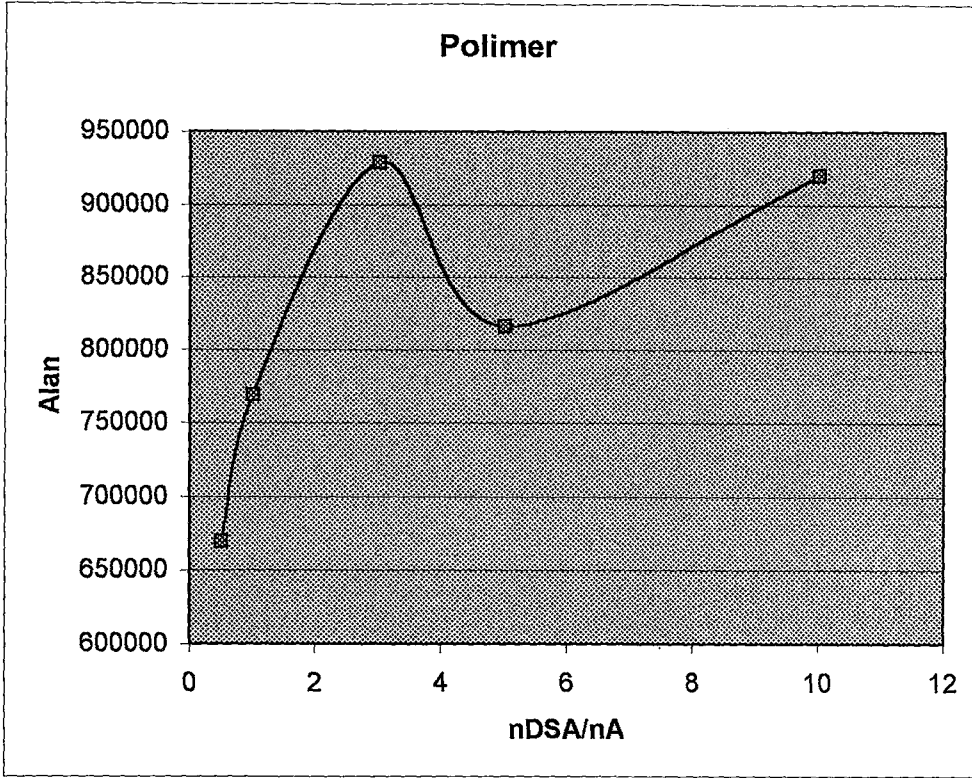
Elde edilen sonuçlardan faydalanarak Polimer-Amilaz oranına karşı  $\alpha$ -Amilaz alanı grafiği (Şekil 3.81), Polimer-Amilaz oranına karşı  $\alpha$ -Amilaz yüksekliği grafiği (Şekil 3.82), Polimer-Amilaz oranına karşı Polimer alanı grafiği (Şekil 3.83), Polimer-Amilaz oranına karşı Polimer yüksekliği grafiği (Şekil 3.84), Polimer-Amilaz oranına karşı Konjugat alanı grafiği (Şekil 3.85), Polimer-Amilaz oranına karşı Konjugat yüksekliği grafiği (Şekil 3.86) elde edildi.



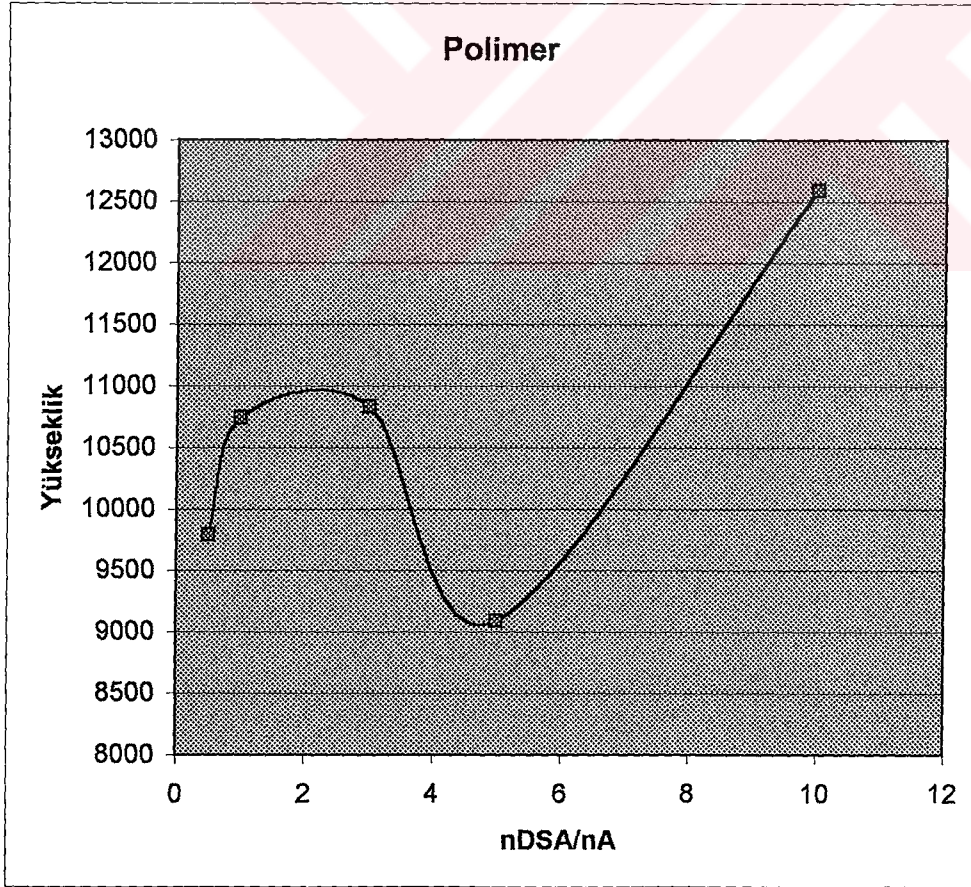
Şekil 3.81 Polimer : Amilaz oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Amilaz alanı grafiği



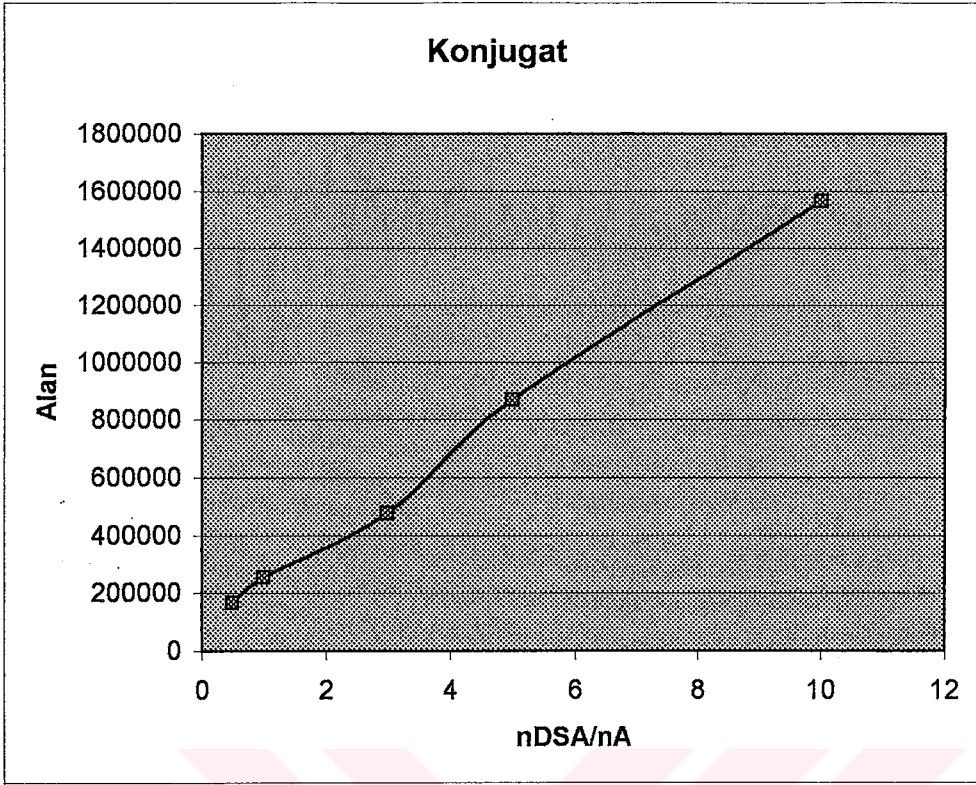
Şekil 3.82 Polimer : Amilaz oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Amilaz yüksekliği grafiği



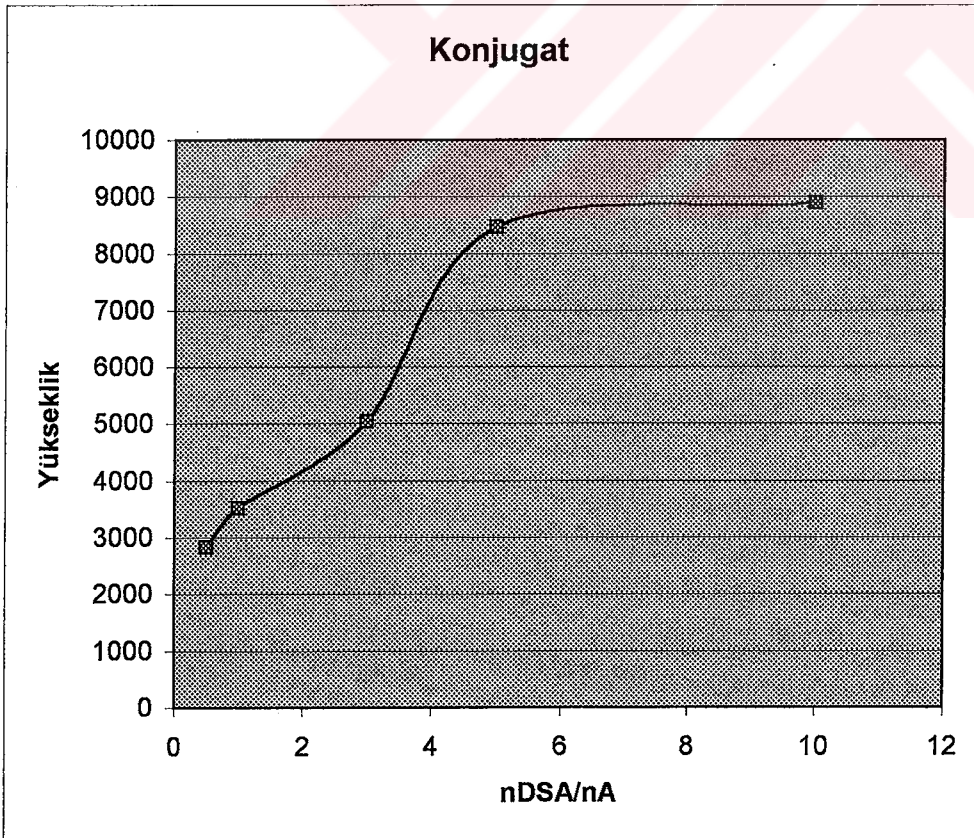
Şekil 3.83 Polimer : Amilaz oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer alanı grafiği



Şekil 3.84 Polimer : Amilaz oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği



Şekil 3.85 Polimer : Amilaz oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Konjugat alanı grafiği

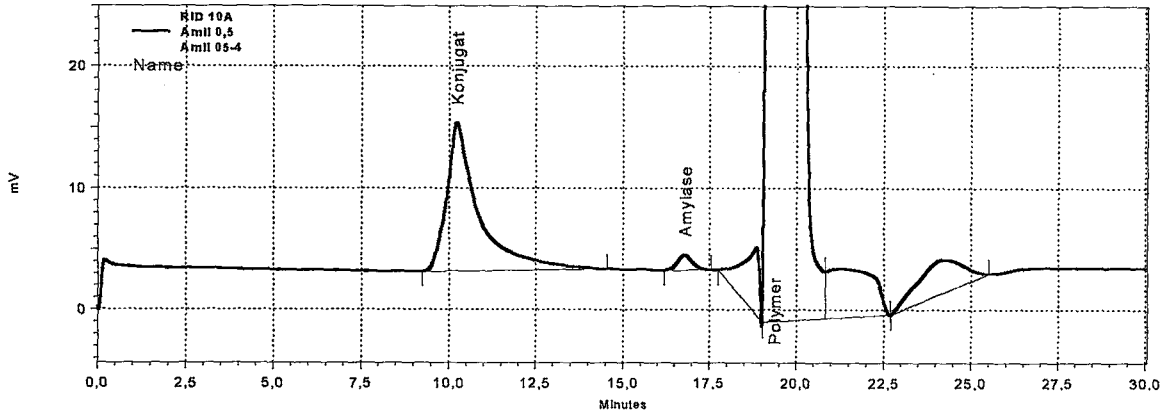


Şekil 3.86 Polimer : Amilaz oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Konjugat yüksekliği grafiği

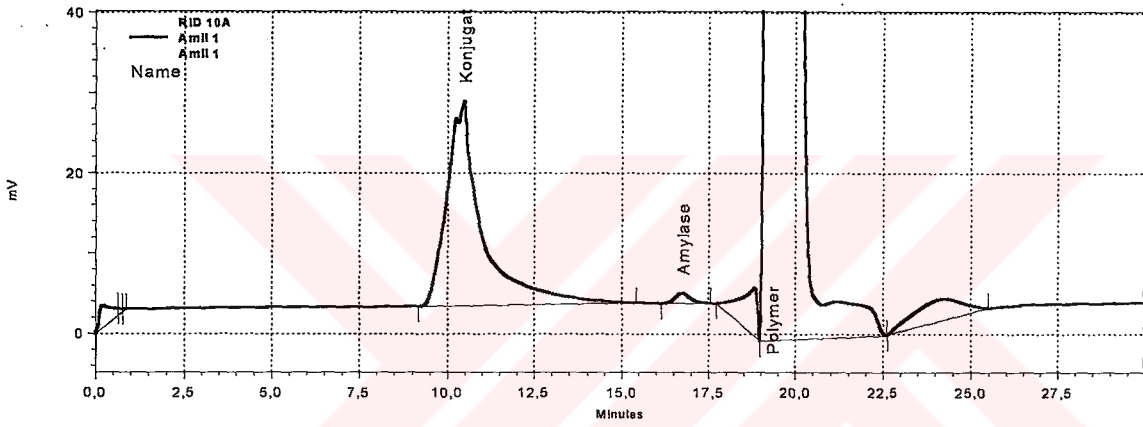
### **3.4.2.8 $\alpha$ -Amilaz miktarı sabit olan $\alpha$ -Amilaz – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi**

Polimer : Amilaz oranı 0,5 – 1 – 3 – 5 – 10 olan çözeltilerin RI dedektörde enjeksiyonları yapılarak kromatogramları elde edildi. Konjugat ve enzim piklerinin iyi görünebilmesi için kromatogramın skalası konjugat pikine göre ayarlandı.

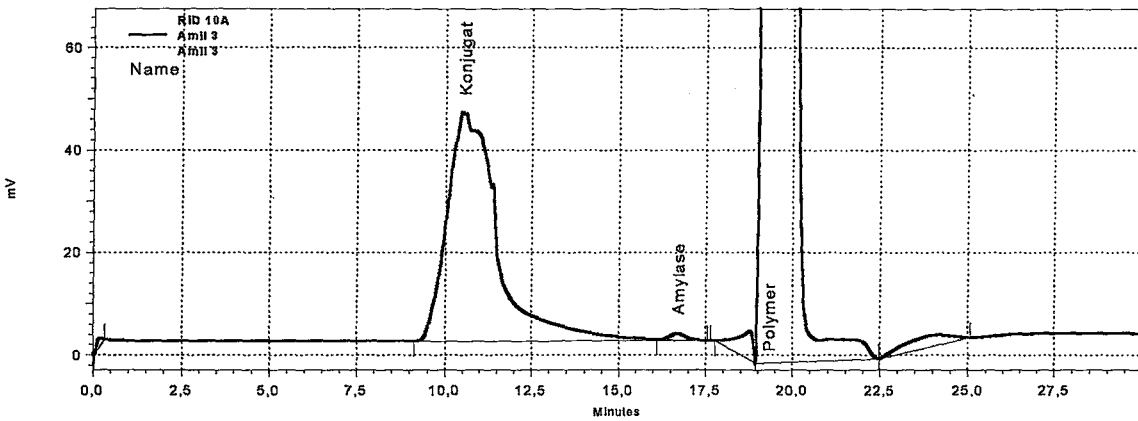




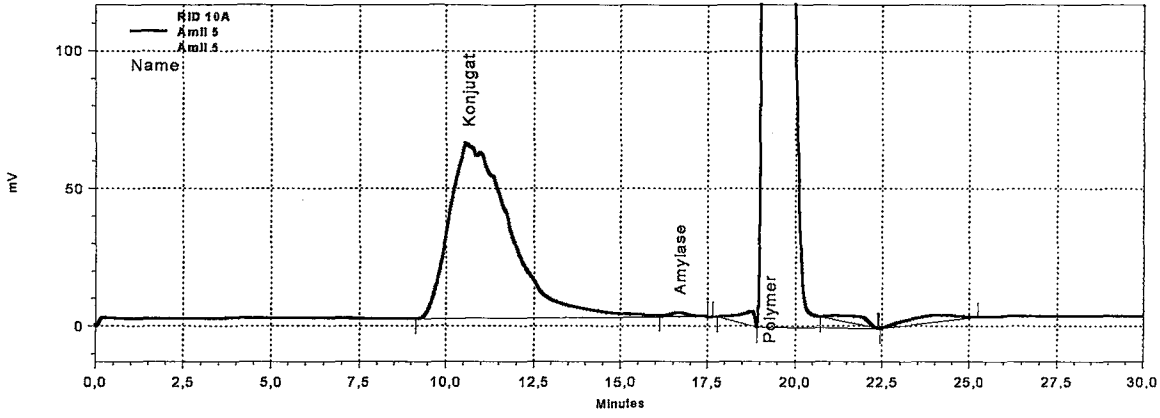
Şekil 3.87 Polimer : Amilaz oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektörde elde edilen kromatogramı



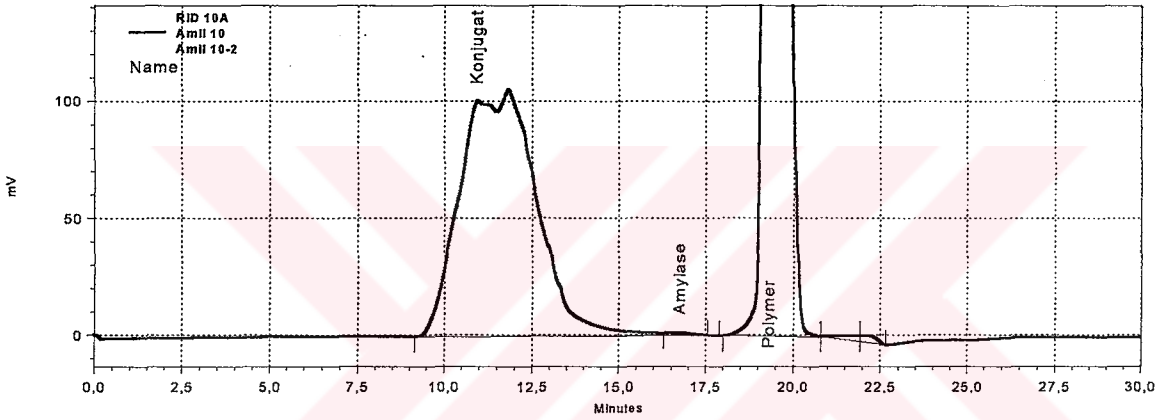
Şekil 3.88 Polimer : Amilaz oranı 1 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektörde elde edilen kromatogramı



Şekil 3.89 Polimer : Amilaz oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektörde elde edilen kromatogramı



Şekil 3.90 Polimer : Amilaz oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektörde elde edilen kromatogramı



Şekil 3.91 Polimer : Amilaz oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektörde elde edilen kromatogramı

RID'de farklı oranlardaki Amilaz – Polimer çözeltilerinin enjeksiyonları ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.16, Çizelge 17 ve Çizelge 3.18'de verilmiştir.



Çizelge 3.16 RID'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının  $\alpha$ -Amilaz'a ait sonuçları

Polimer - Amilaz oranı ( $n_{DSA}/n_A$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	16,793	36643	1240
1	100	16,761	37240	1250
3	100	16,711	37737	1261
5	100	16,664	35604	1197
10	100	16,711	19343	550

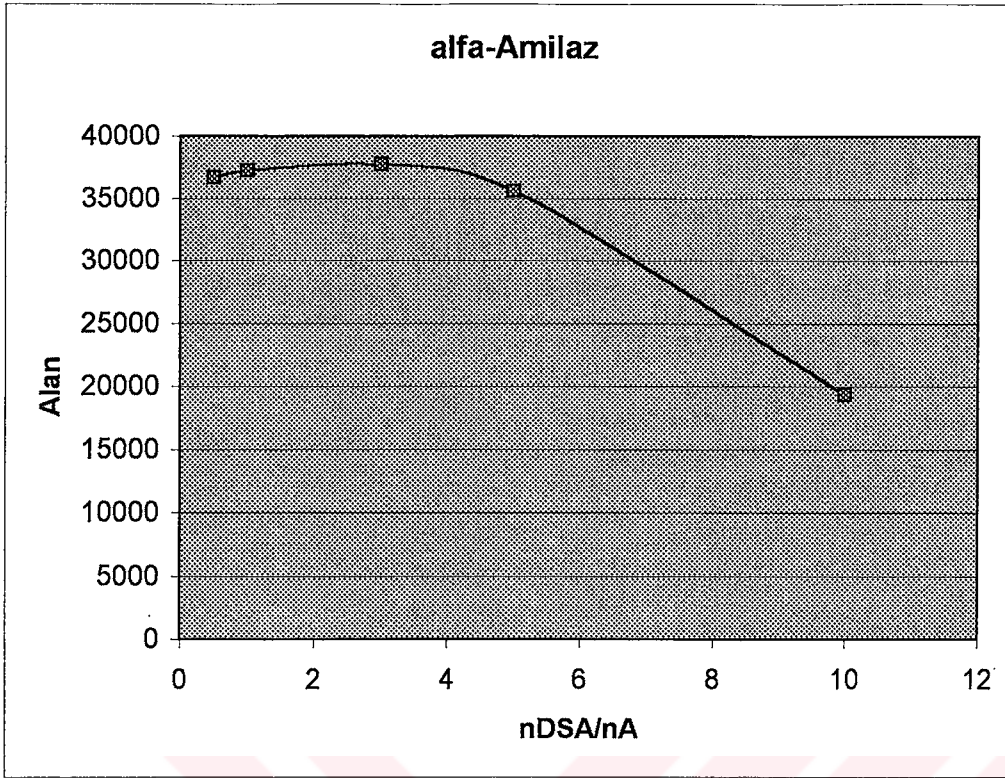
Çizelge 3.17 RID'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları

Polimer - Amilaz oranı ( $n_{DSA}/n_A$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	19,358	24005523	619891
1	100	19,325	24659533	622620
3	100	19,325	25050285	617447
5	100	19,245	24030308	596640
10	100	19,264	24601219	653555

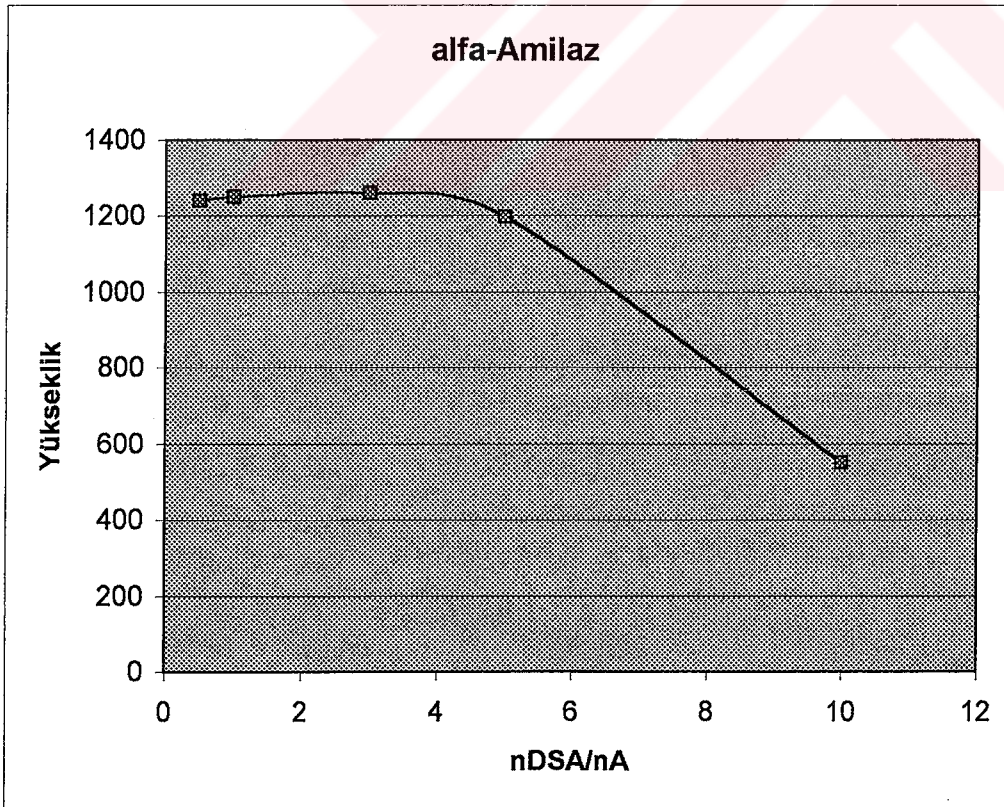
Çizelge 3.18 RID'de elde edilen Amilaz - Polimer kromatogramlarının Konjugat'a ait sonuçları

Polimer - Amilaz oranı ( $n_{DSA}/n_A$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	10,221	774600	12152
1	100	10,483	1776415	25239
3	100	10,542	4540686	44353
5	100	10,625	7632034	62935
10	100	10,908	15921438	100067

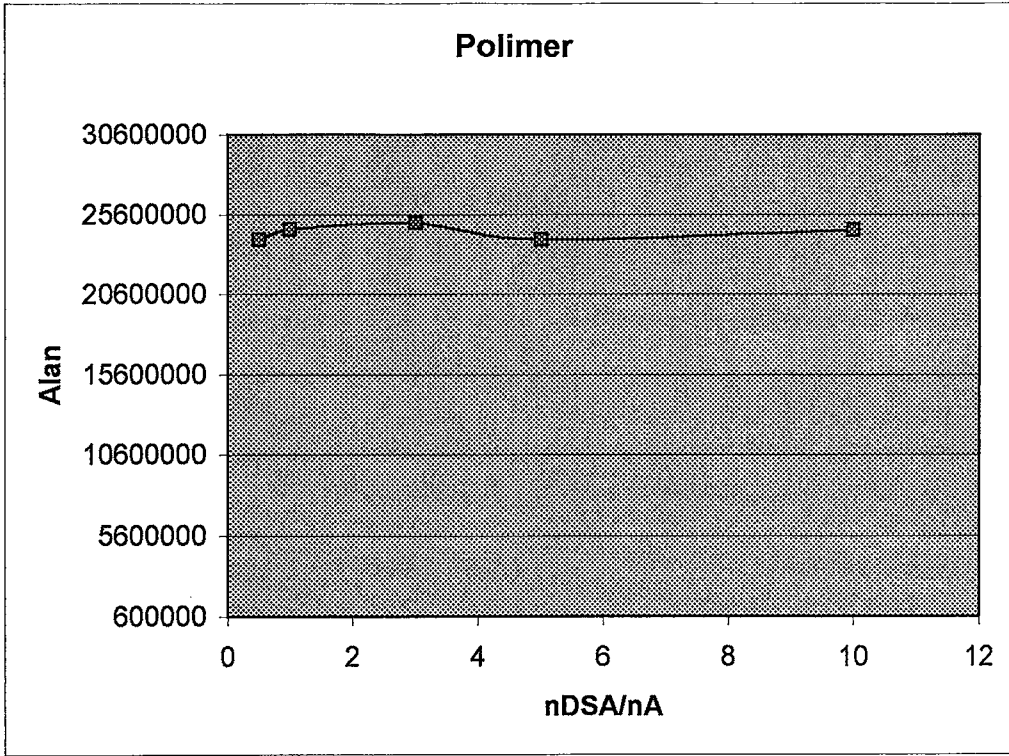
Elde edilen sonuçlardan faydalanarak Polimer-Amilaz oranına karşı  $\alpha$ -Amilaz alanı grafiği (Şekil 3.92), Polimer-Amilaz oranına karşı  $\alpha$ -Amilaz yüksekliği grafiği (Şekil 3.93), Polimer-Amilaz oranına karşı Polimer alanı grafiği (Şekil 3.94), Polimer-Amilaz oranına karşı Polimer yüksekliği grafiği (Şekil 3.95), Polimer-Amilaz oranına karşı Konjugat alanı grafiği (Şekil 3.96), Polimer-Amilaz oranına karşı Konjugat yüksekliği grafiği (Şekil 3.97) elde edildi.



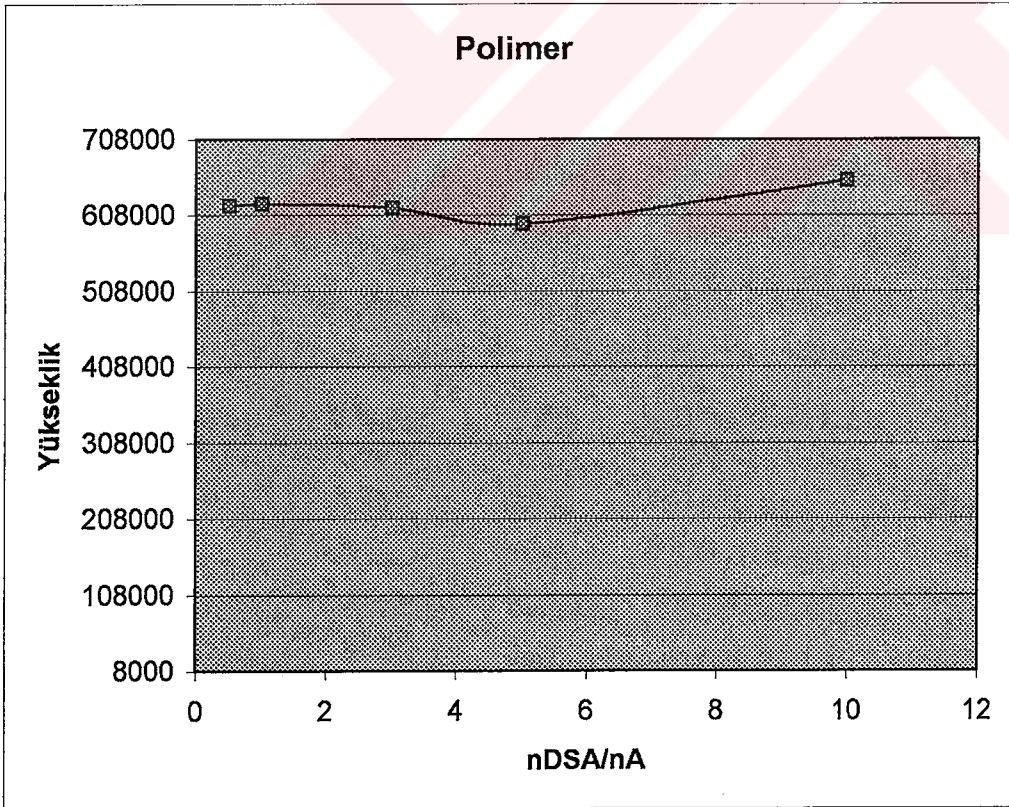
Şekil 3.92 Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektörde' de elde edilen  $\alpha$ -Amilaz alanı grafiği



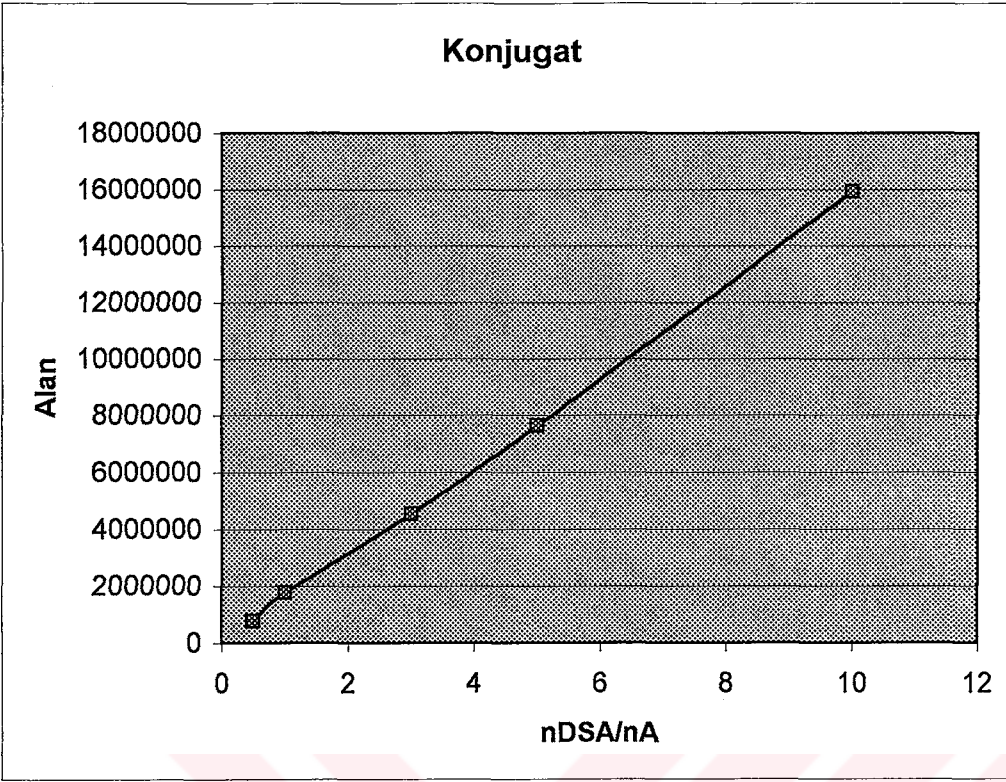
Şekil 3.93 Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektör' de elde edilen  $\alpha$ -Amilaz yüksekliği grafiği



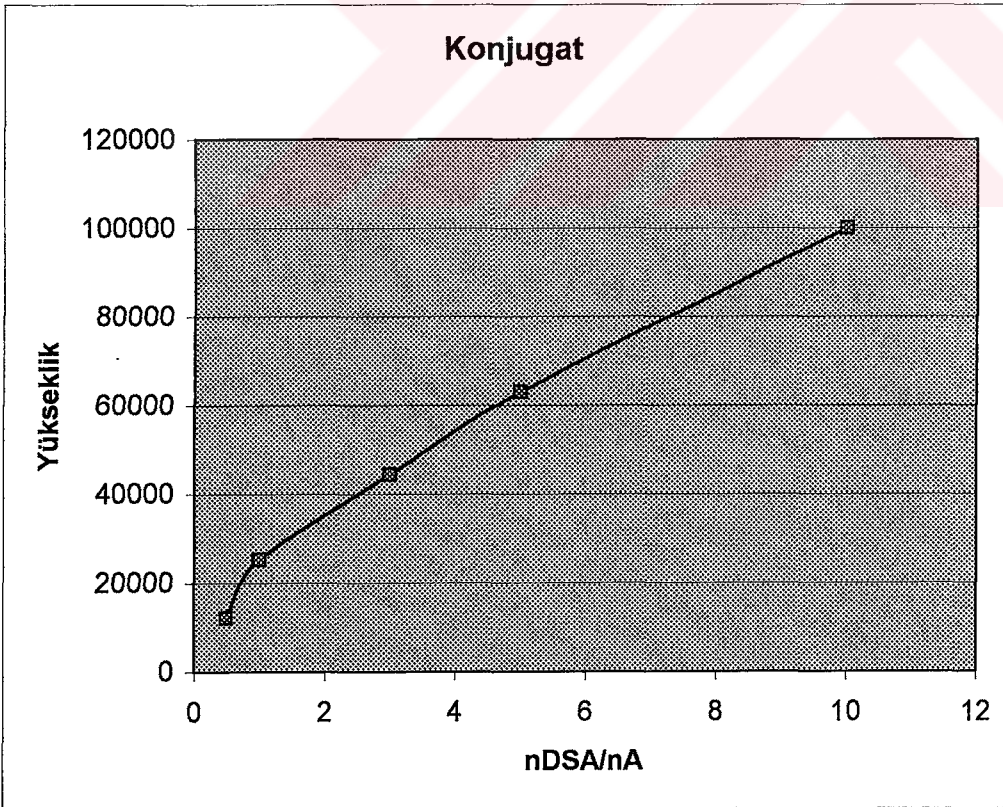
Şekil 3.94 Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektörde elde edilen Polimer alanı grafiği



Şekil 3.95 Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği



Şekil 3.96 Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Konjugat alanı grafiği



Şekil 3.97 Polimer : Amilaz oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Konjugat yüksekliği grafiği

### 3.4.3 Rennet enzimi

Önce saf rennet enzimi çözeltisi hazırlandı, daha sonra polimer ile konjugat çözeltisi hazırlandı.

Rennet enziminden %0,05 konsantrasyonunda çözelti hazırlandı:

%0,05'lik rennet:

0,0250g rennet tartıldı mobil faz ile 50mL'ye tamamlandı =0,05g/100mL

Polimer miktarı sabit olan aşağıdaki oranlarda Rennet-Polimer konjugat çözeltileri hazırlandı.

$n_R/n_{DSA}$

0,5	: 1,0352mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 2,0704mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
1	: 2,0704mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 2,0704mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
3	: 6,21mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 2,0704mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
5	: 10,352mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 2,0704mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
10	: 20,70mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 2,0704mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
20	: 41,40mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 2,0704mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
30	: 62,10mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 2,0704mg/ml polimer çözeltisinden 1ml

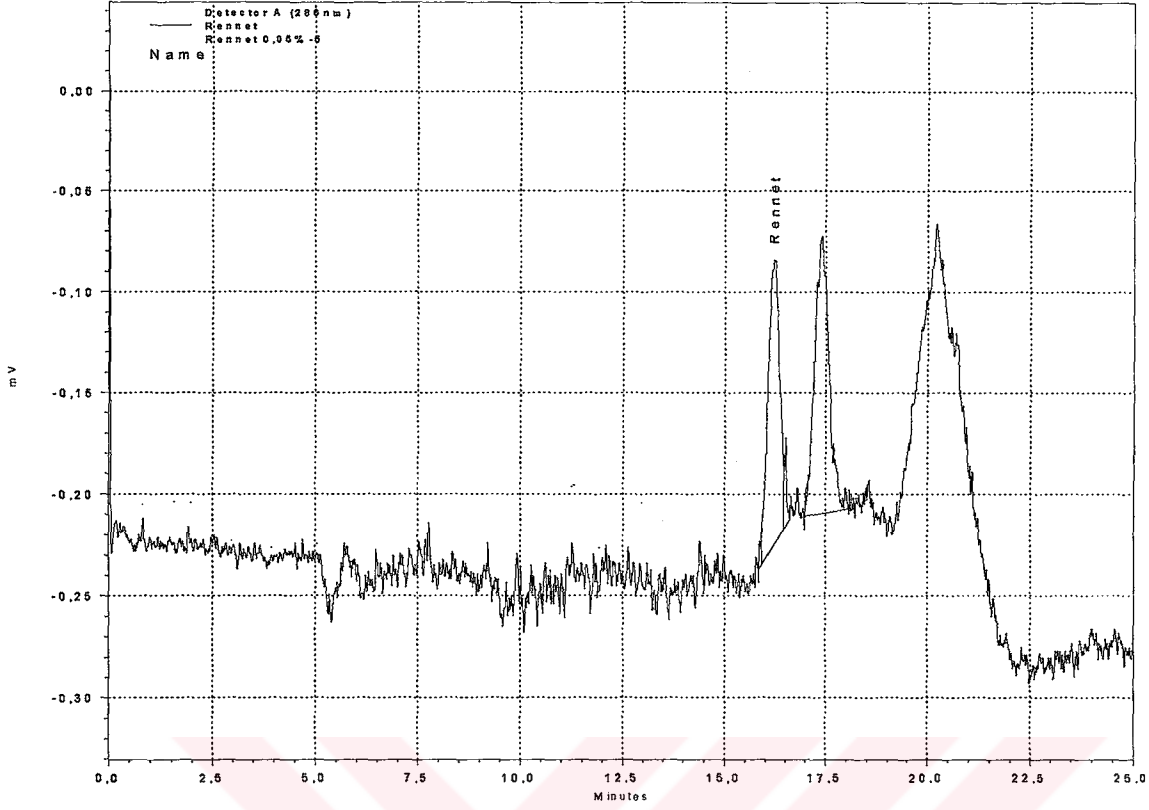
Rennet miktarı sabit olan aşağıdaki oranlarda Rennet-Polimer konjugat çözeltileri hazırlandı.

$n_{DSA}/n_R$

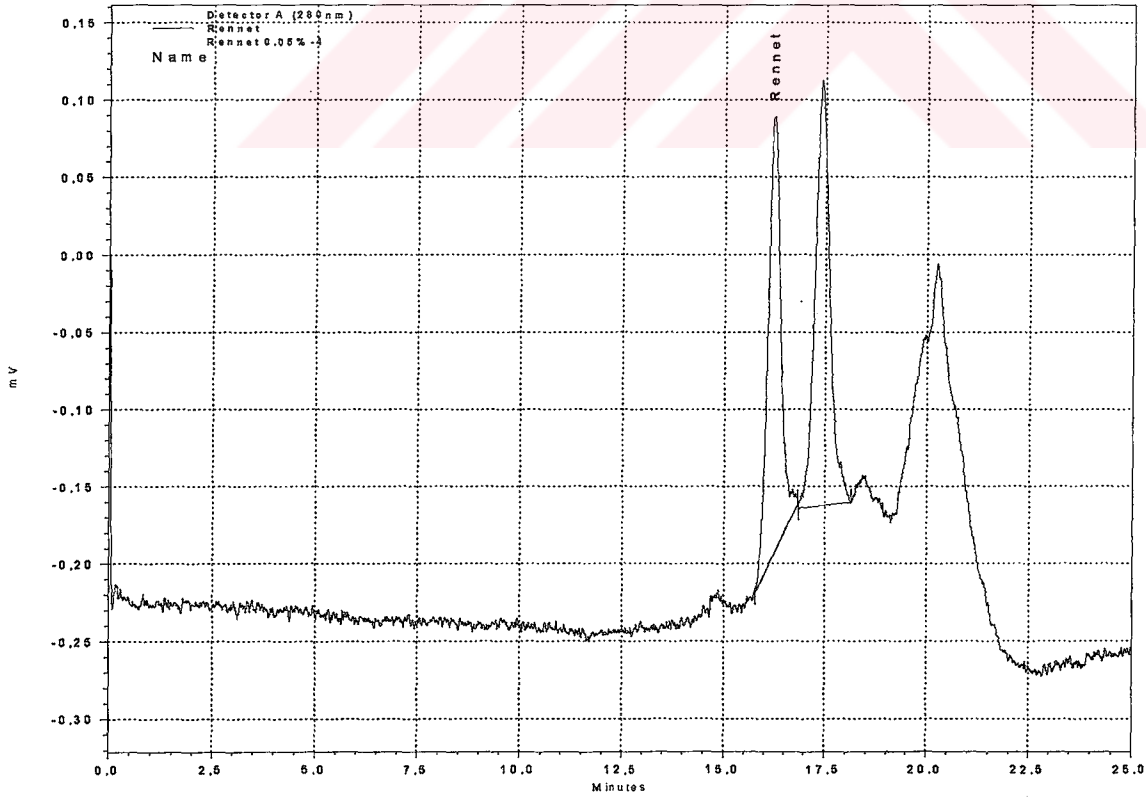
0,5	: 2 mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 1 mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
1	: 2 mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 2 mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
3	: 2 mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 6 mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
5	: 2 mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 10 mg/ml polimer çözeltisinden 1ml
10	: 2 mg/ml rennet çözeltisinden 1 mL + 20 mg/ml polimer çözeltisinden 1ml

#### 3.4.3.1 Saf rennet enzimi enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi

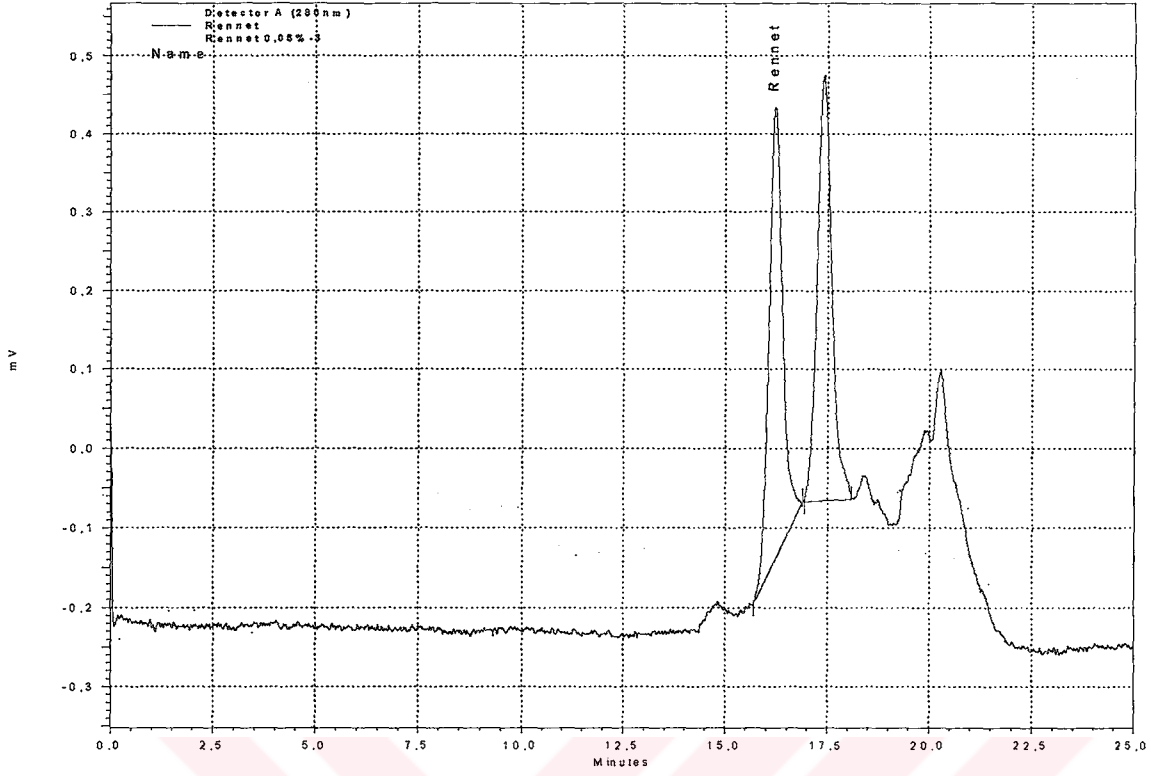
Hazırlanan %0,05 konsantrasyondaki saf rennet çözeltisinden 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 40 $\mu$ L, 100 $\mu$ Llik enjeksiyonlar yapıldı ve UV dedektör kullanılarak 280nm'deki kromatogramları alındı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi:



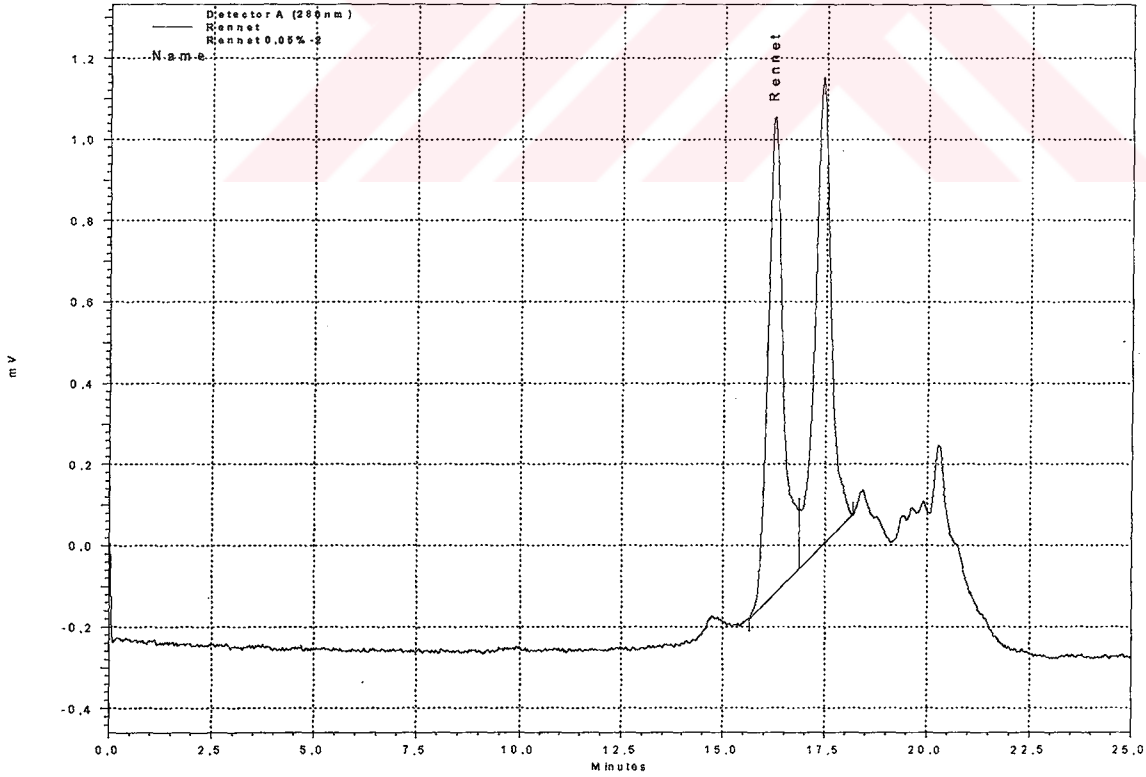
Şekil 3.98 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



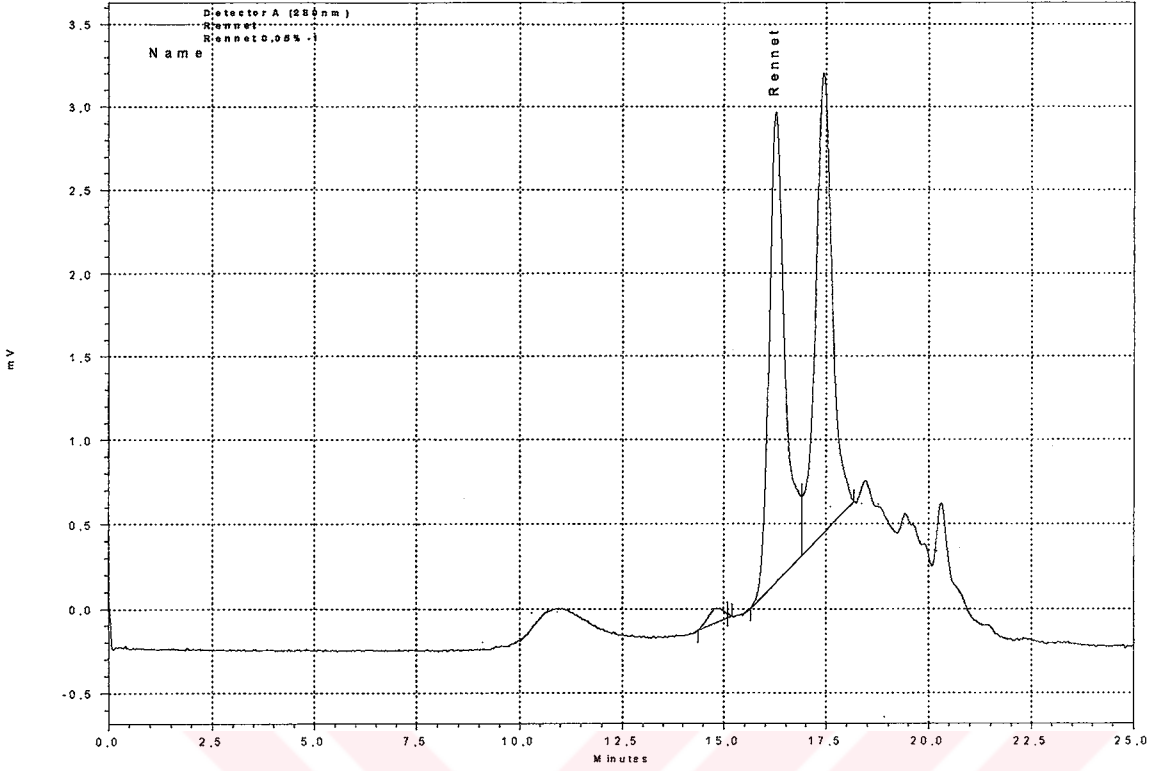
Şekil 3.99 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.100 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.101 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.102 UV dedektör ile 280 nm'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 100µL'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram

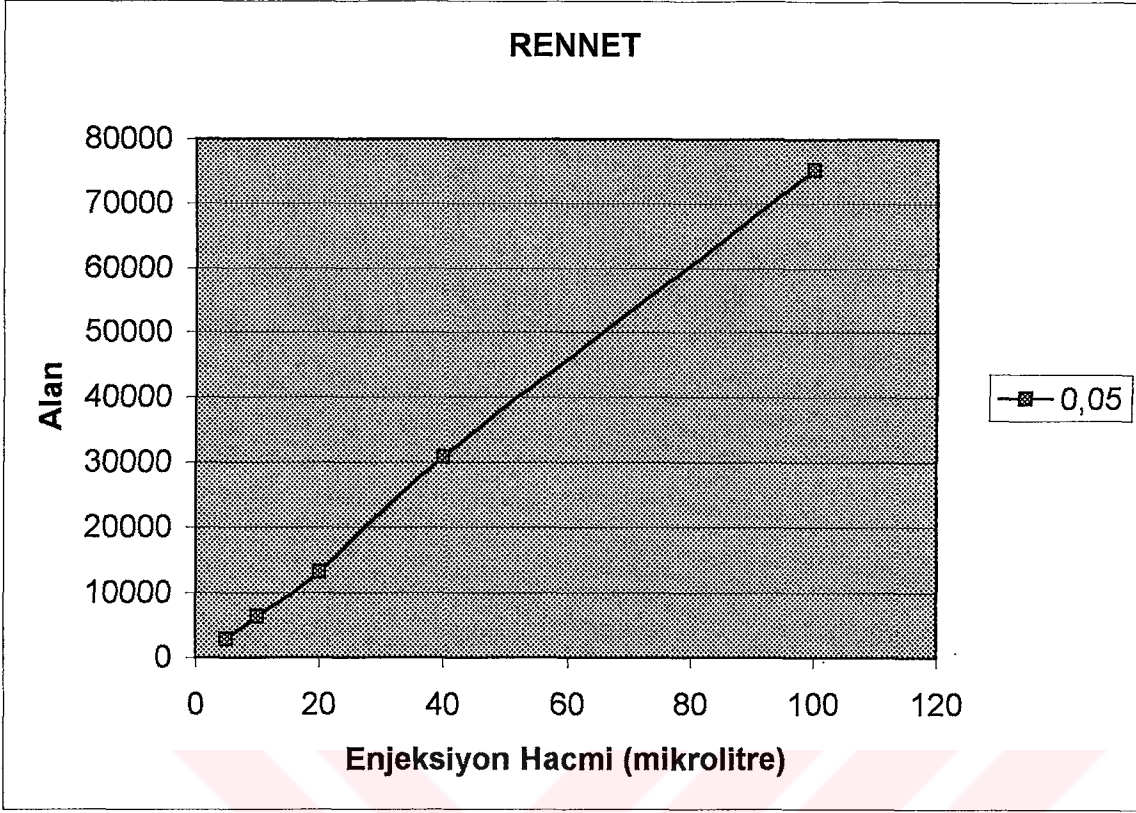
UV dedektörle 280nm'de Rennet çözeltisinin enjeksiyonları ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.19'da verilmiştir.

Çizelge 3.19 UV dedektörle 280nm'de elde edilen Rennet kromatogramlarının değerleri

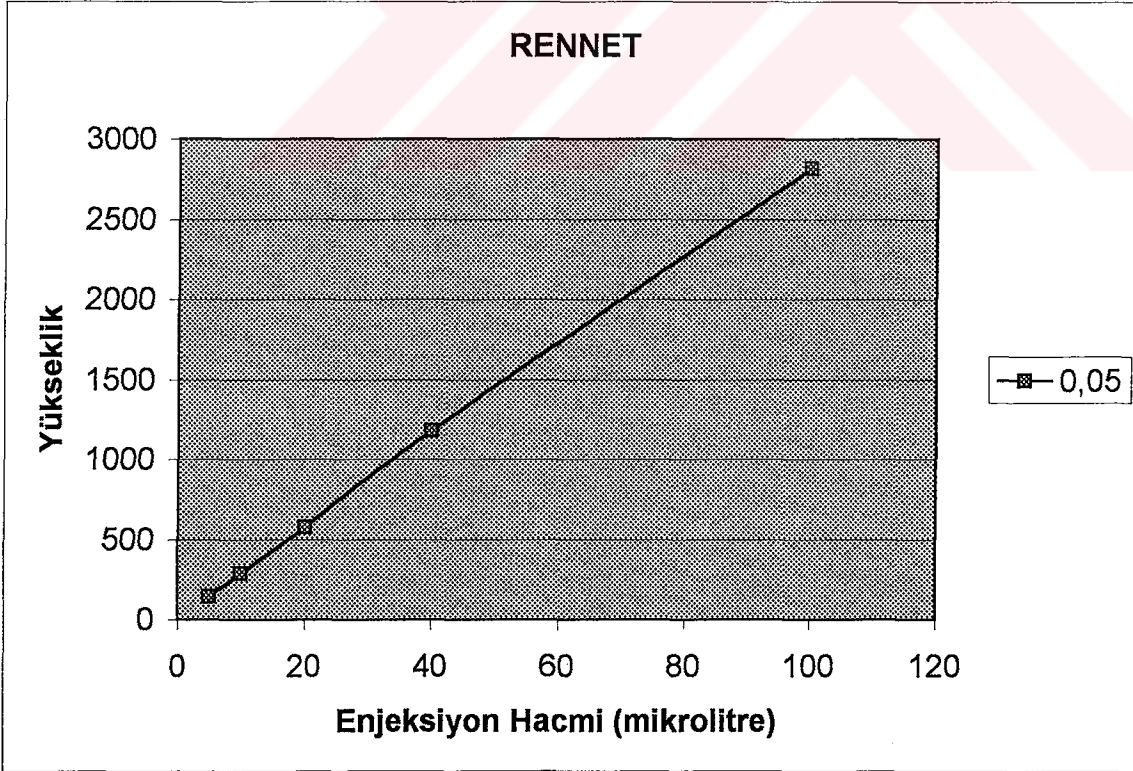
Konsantrasyon (g/100mL)	Enjeksiyon hacmi (µL)	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,05	5	16,235	2839	141
0,05	10	16,226	6354	284
0,05	20	16,213	13144	575
0,05	40	16,225	30746	1178
0,05	100	16,255	75301	2817

Alınan sonuçlardan faydalanarak 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı alan grafiği (Şekil 3.103) ve enjeksiyon hacmine karşı yükseklik grafiği (Şekil 3.104) elde edildi.





Şekil 3.103 Rennet için 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı UV 280nm'de elde edilen alan grafiği

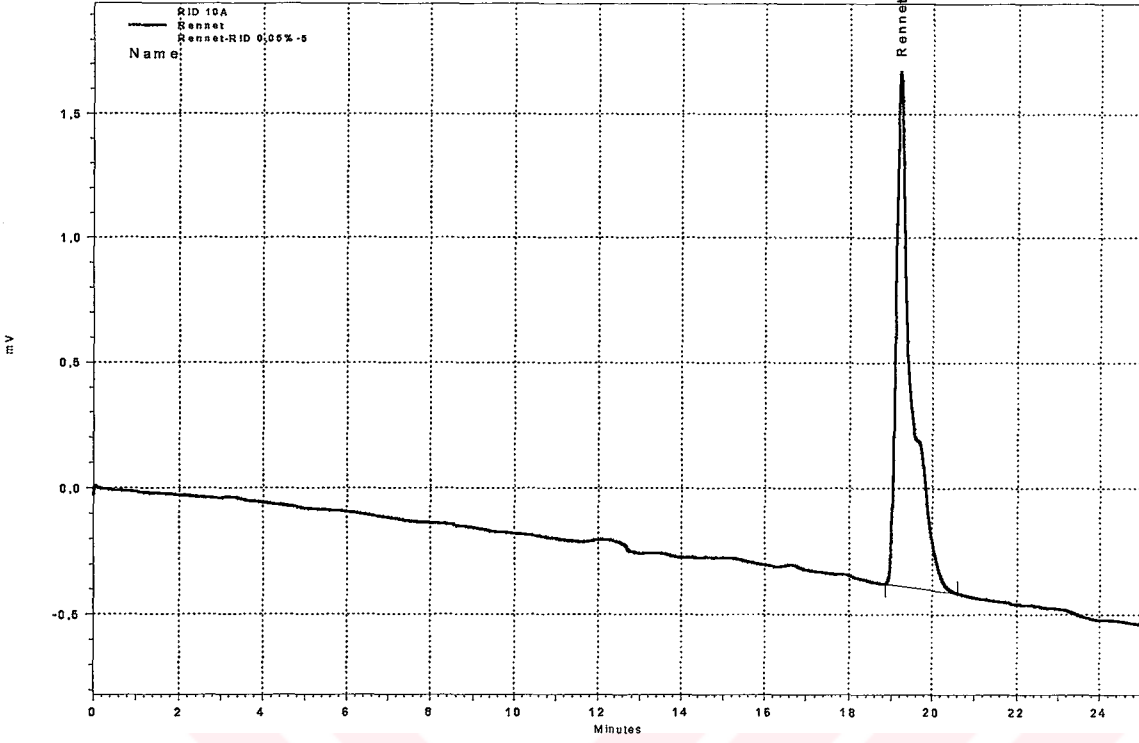


Şekil 3.104 Rennet için 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı UV 280nm'de elde edilen yükseklik grafiği

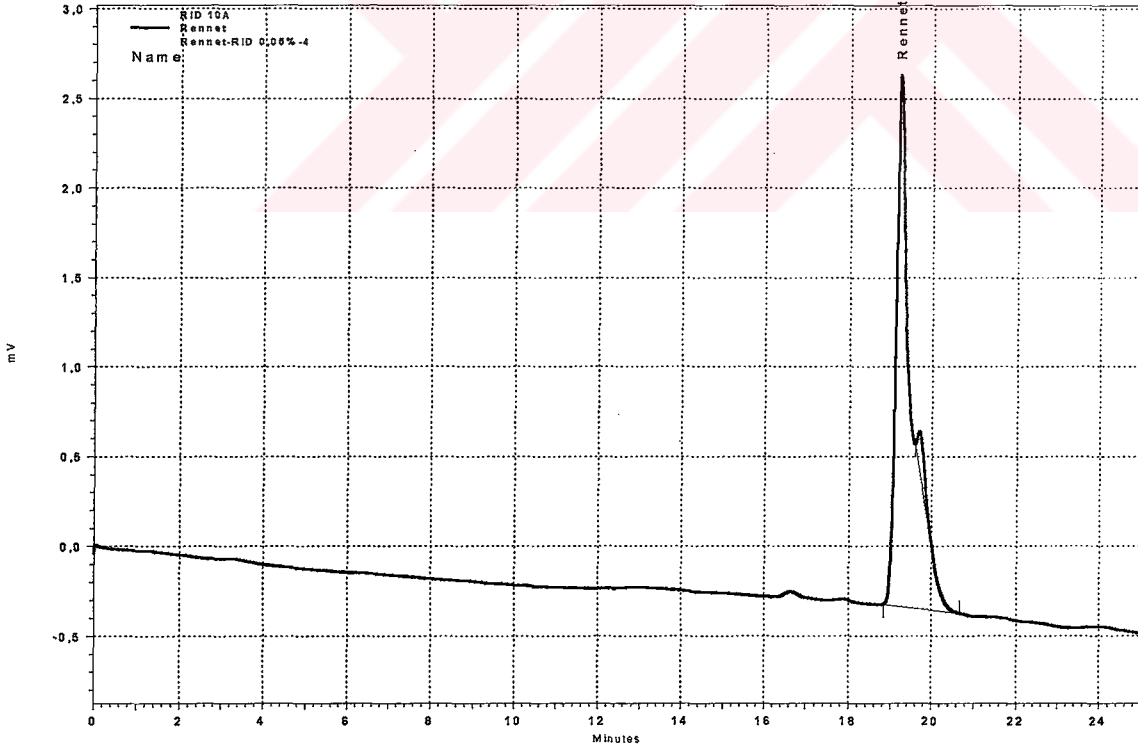
### 3.4.3.2 Saf rennet enzimi enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi

Hazırlanan %0,05 konsantrasyondaki saf rennet çözeltisinden 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 40 $\mu$ L, 100 $\mu$ Llik enjeksiyonlar yapıldı ve RI dedektör kullanılarak kromatogramları alındı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

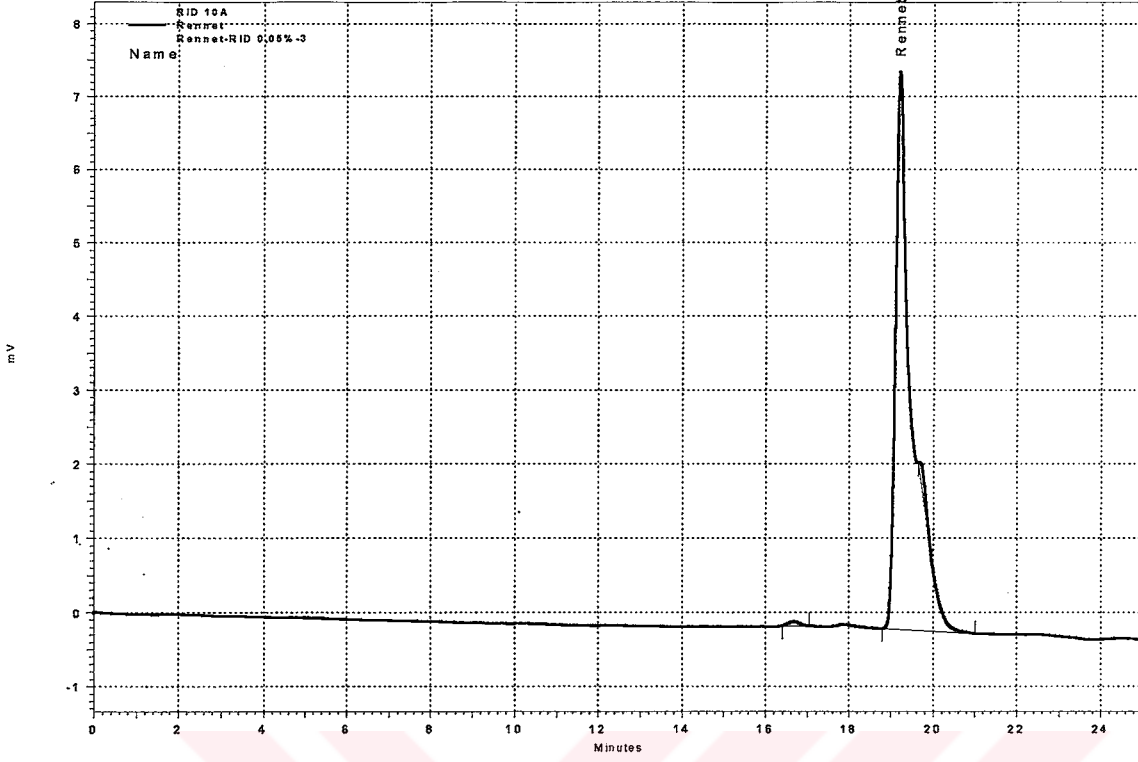




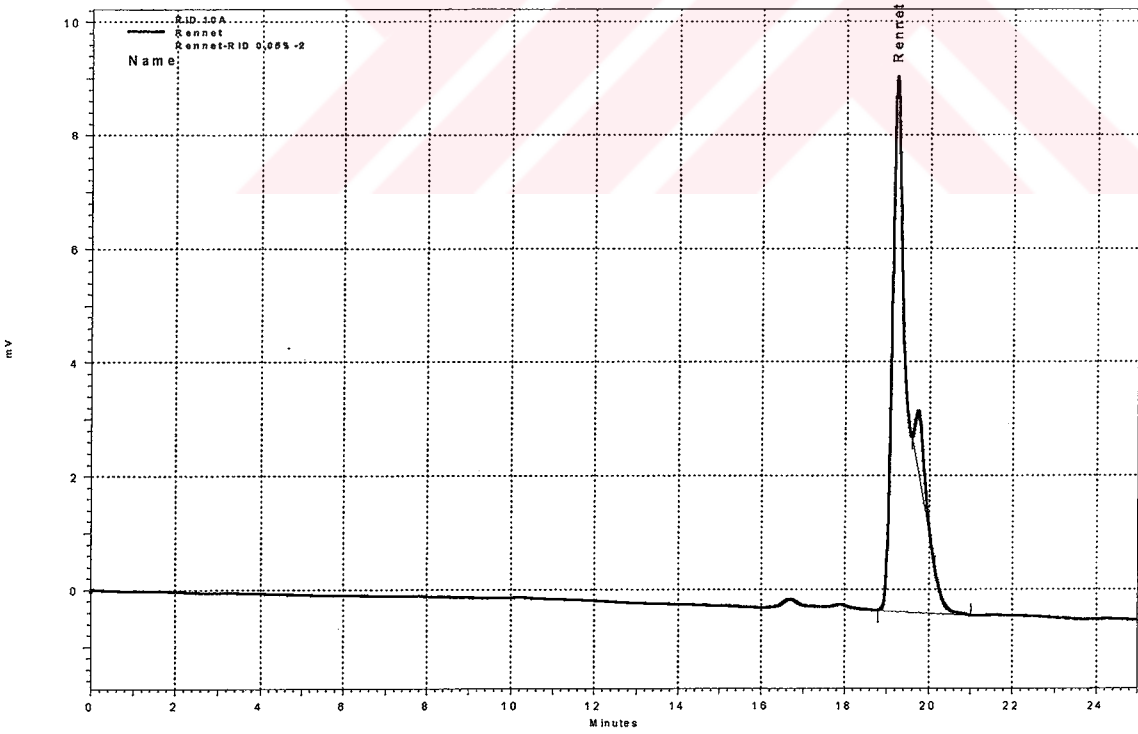
Şekil 3.105 RID'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 5 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



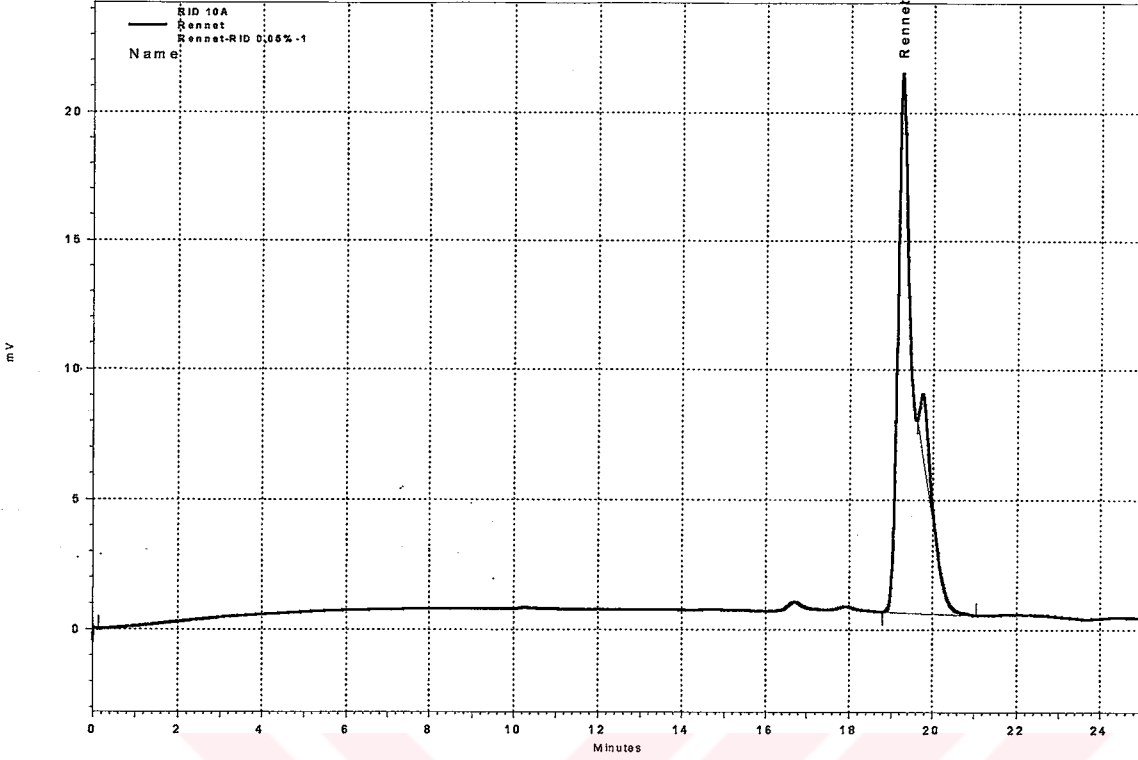
Şekil 3.106 RID'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 10 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.107 RID'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 20 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.108 RID'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 40 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



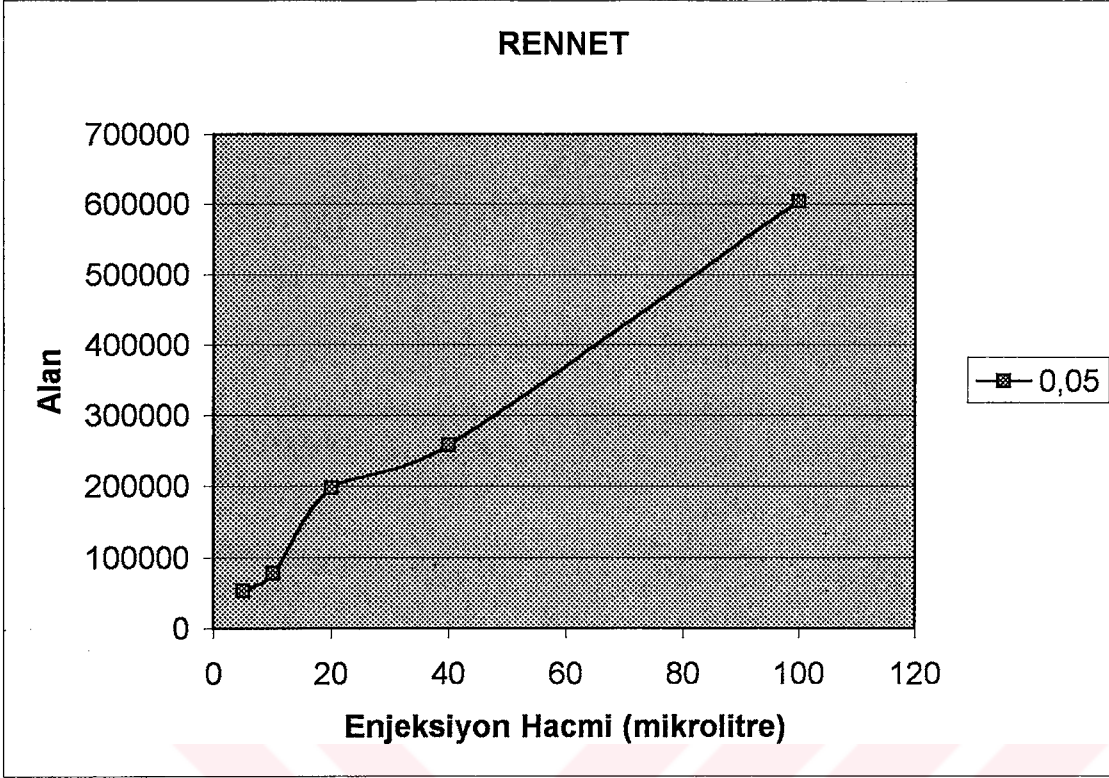
Şekil 3.109 RID'de %0,05'lik Rennet çözeltisinin 100 $\mu$ L'lik enjeksiyonundan elde edilen kromatogram

Refraktif İndeks Dedektör'de Rennet çözeltisinin enjeksiyonları ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.20'de verilmiştir.

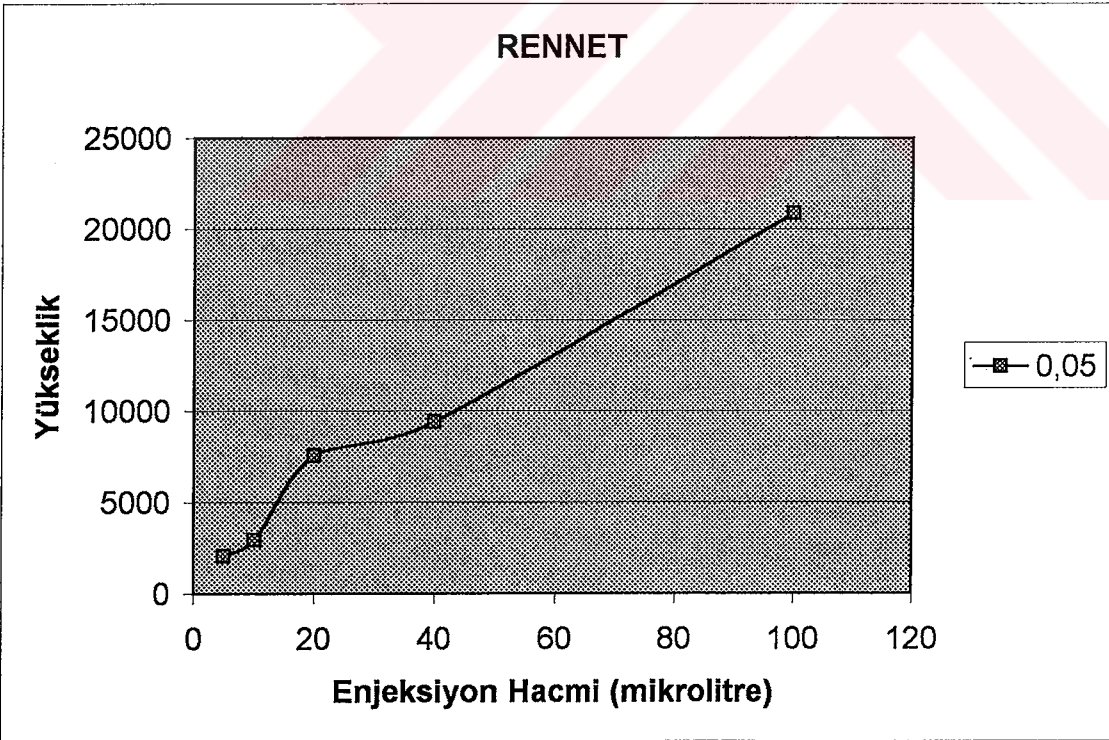
Çizelge 3.20 RID'de elde edilen Rennet kromatogramlarının değerleri

Konsantrasyon (g/100mL)	Enjeksiyon hacmi ( $\mu$ L)	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,05	5	19,197	52824	2057
0,05	10	19,200	77852	2963
0,05	20	19,207	197727	7571
0,05	40	19,220	257858	9419
0,05	100	19,250	603916	20852

Alınan sonuçlardan faydalanarak 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı alan grafiği (Şekil 3.110) ve enjeksiyon hacmine karşı yükseklik grafiği (Şekil 3.111) elde edildi.



Şekil 3.110 Rennet için 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı RID'de elde edilen alan grafiği

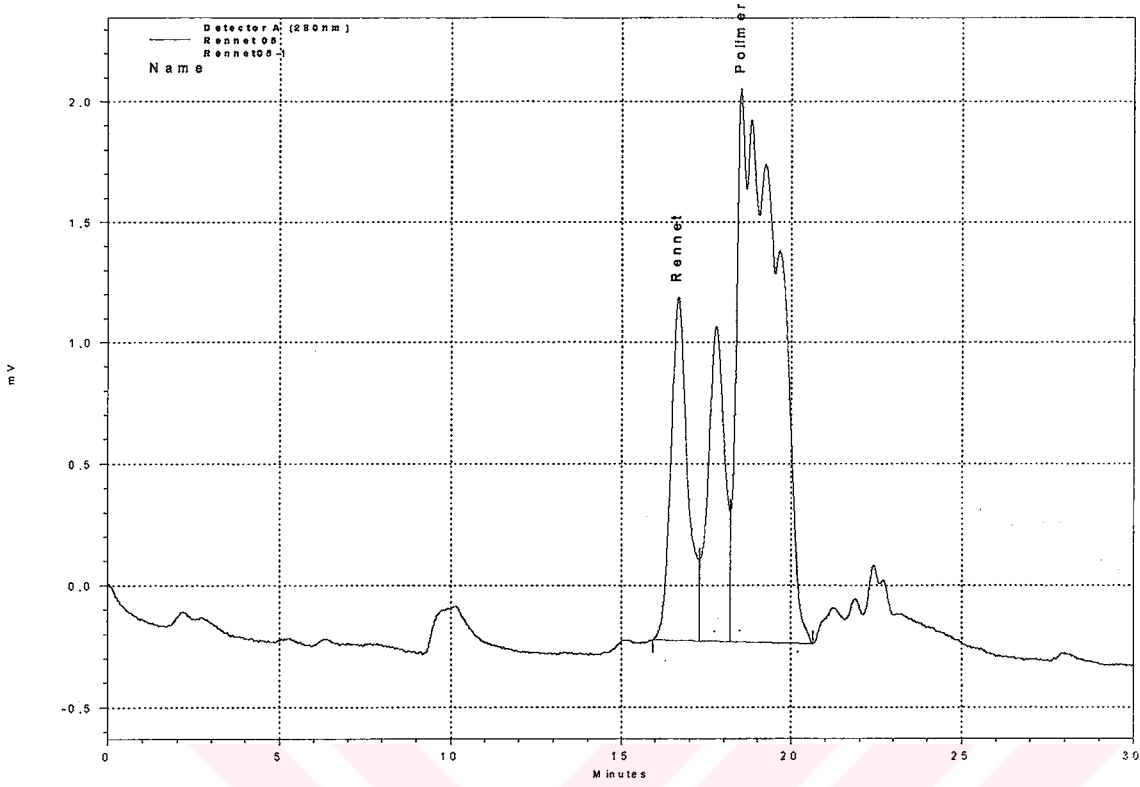


Şekil 3.111 Rennet için 0,05g/100mL'lik konsantrasyonda enjeksiyon hacmine karşı RID'de elde edilen yükseklik grafiği

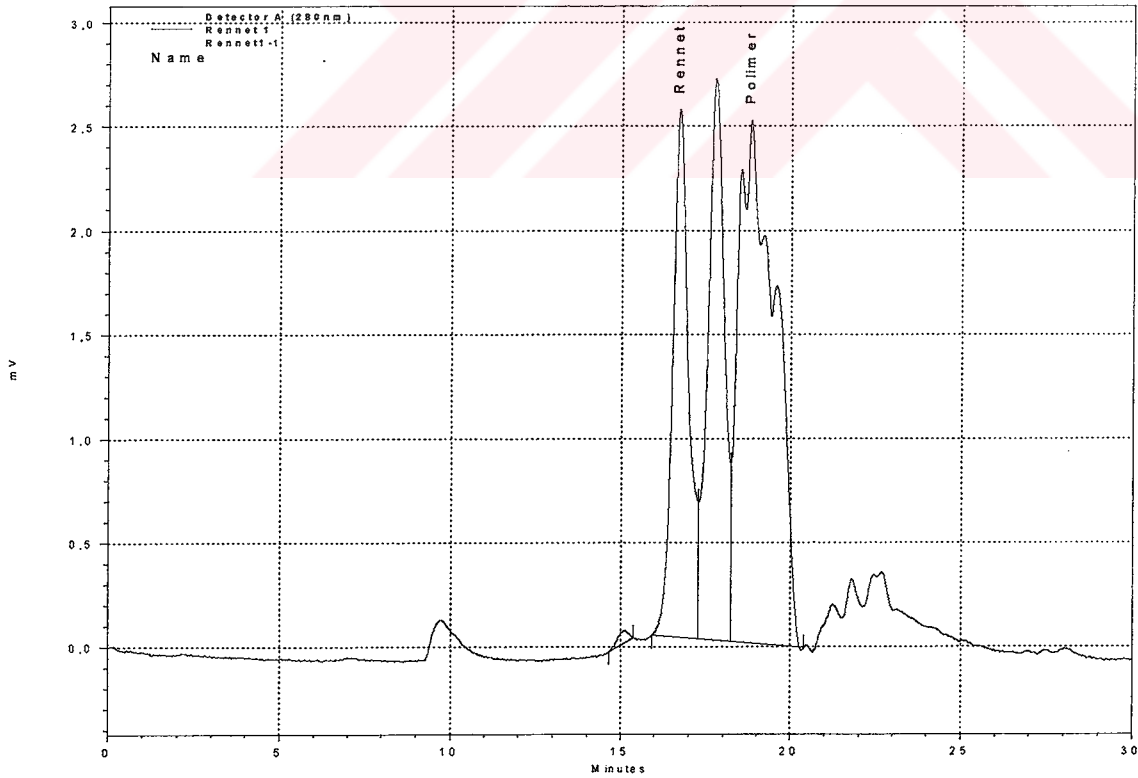
### **3.4.3.3 Polimer miktarı sabit olan Rennet – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi**

Rennet : Polimer oranı 0,5 – 1 – 3 – 5 – 10 – 20 – 30 olan çözeltilerin UV 280nm’de enjeksiyonları yapılarak kromatogramları elde edildi.



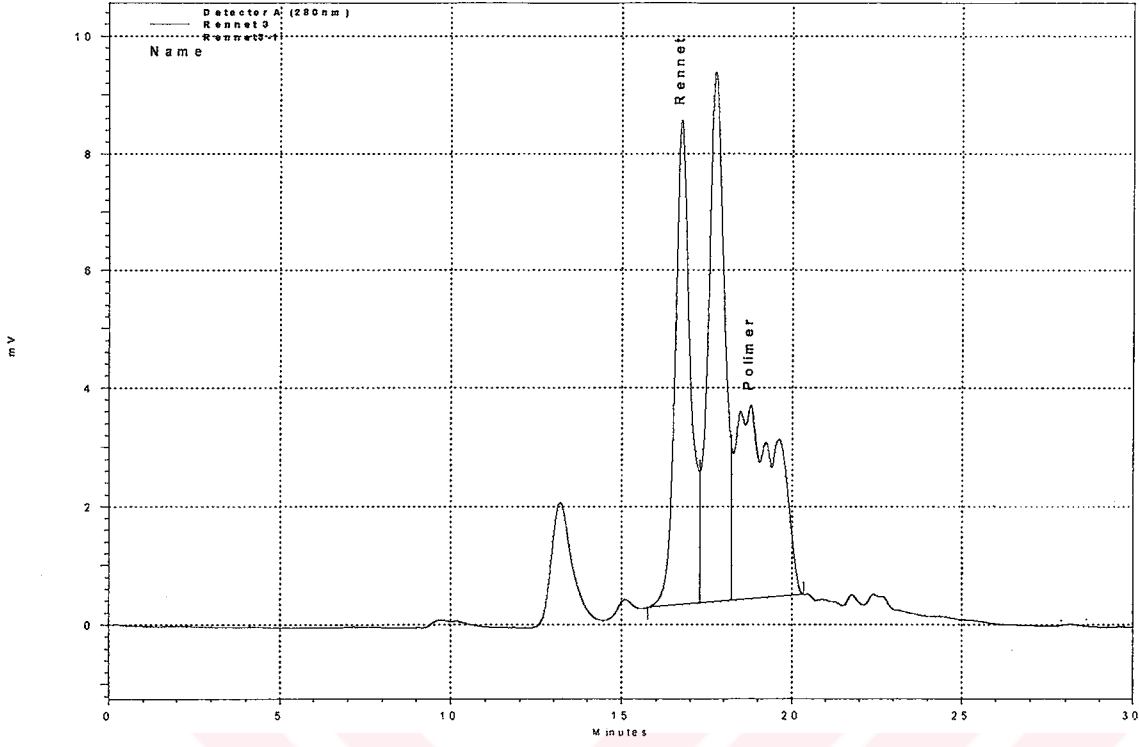


Şekil 3.112 Rennet : Polimer oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı

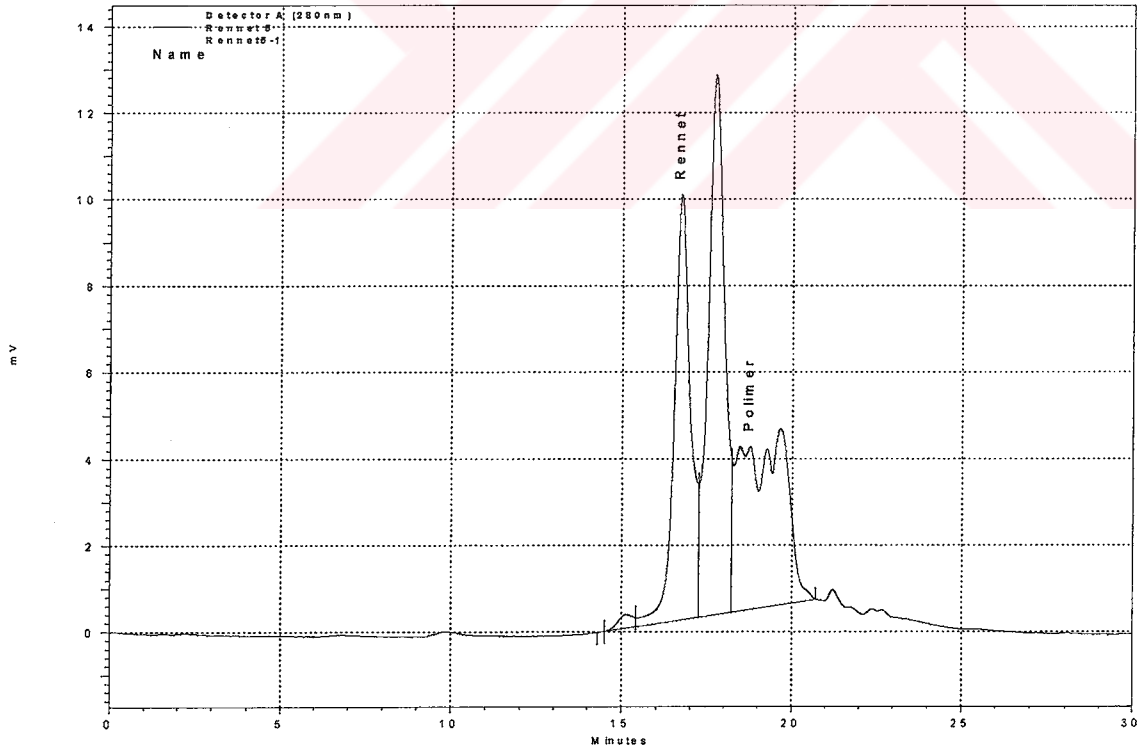


Şekil 3.113 Rennet : Polimer oranı 1 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı

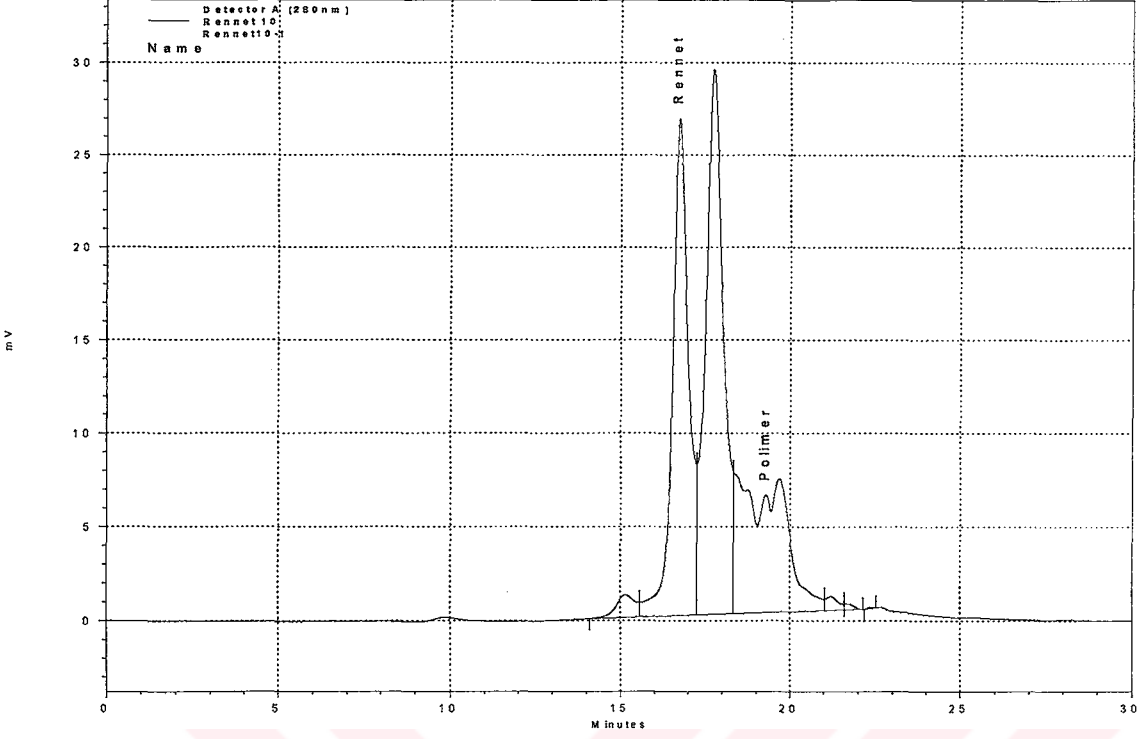




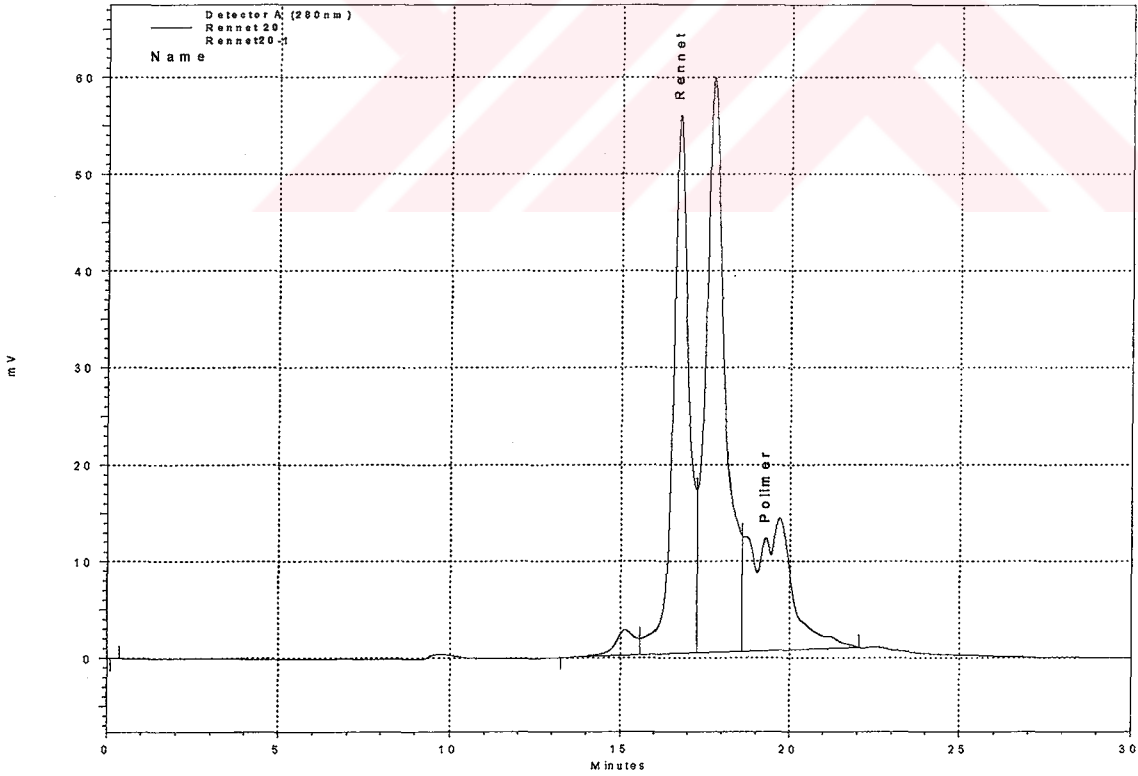
Şekil 3.114 Rennet : Polimer oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı



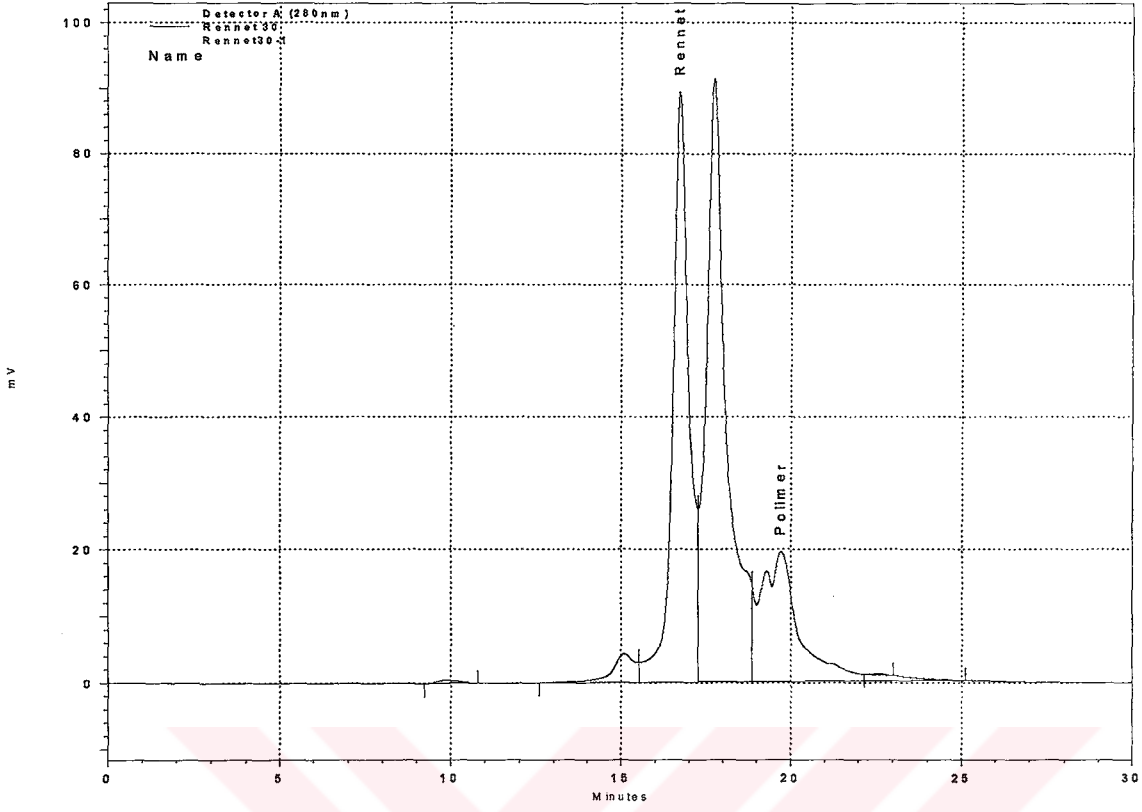
Şekil 3.115 Rennet : Polimer oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.116 Rennet : Polimer oranı 10 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.117 Rennet : Polimer oranı 20 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.118 Rennet : Polimer oranı 30 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı

UV Dedektörle 280nm’de Rennet – Polimer çözeltilerinin enjeksiyonları ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.21 ve Çizelge 3.22’de verilmiştir.

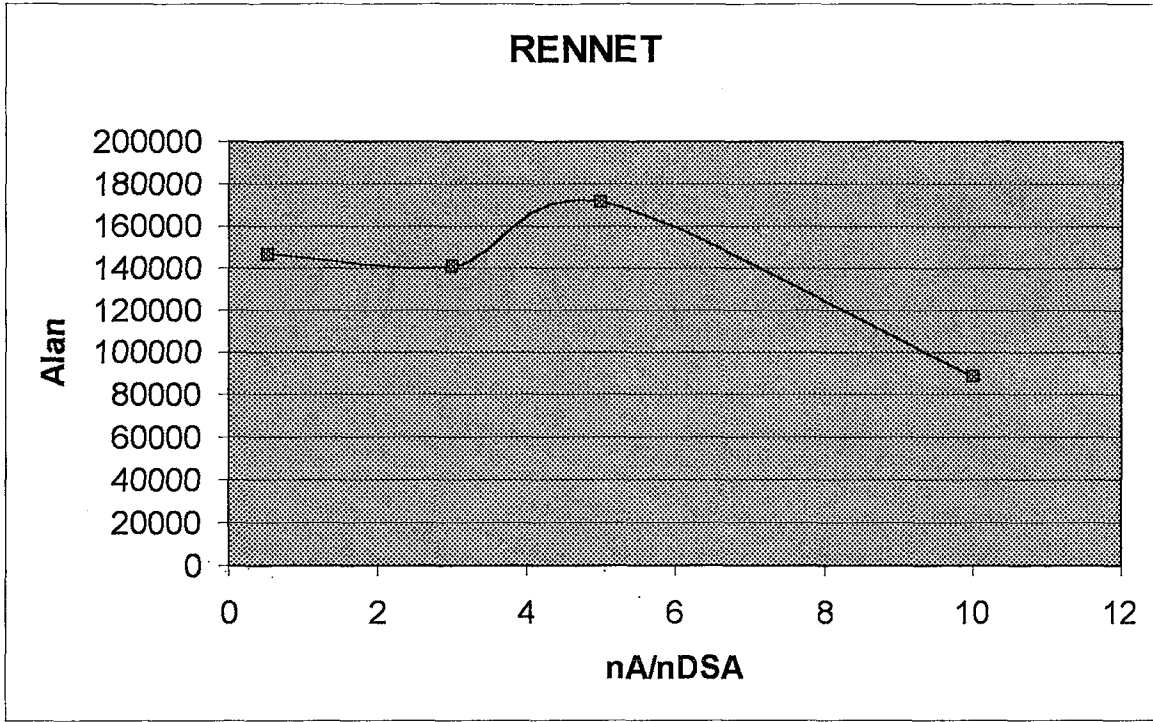
Çizelge 3.21 UV 280nm’de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Rennet’e ait sonuçları

Rennet – Polimer oranı ( $n_A/n_{DSA}$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	16,662	47430	1415
1	100	16,699	80446	2536
3	100	16,725	257233	8233
5	100	16,702	327960	9830
10	100	16,735	884066	26724
20	100	16,731	1841394	55611
30	100	16,706	3011908	89349

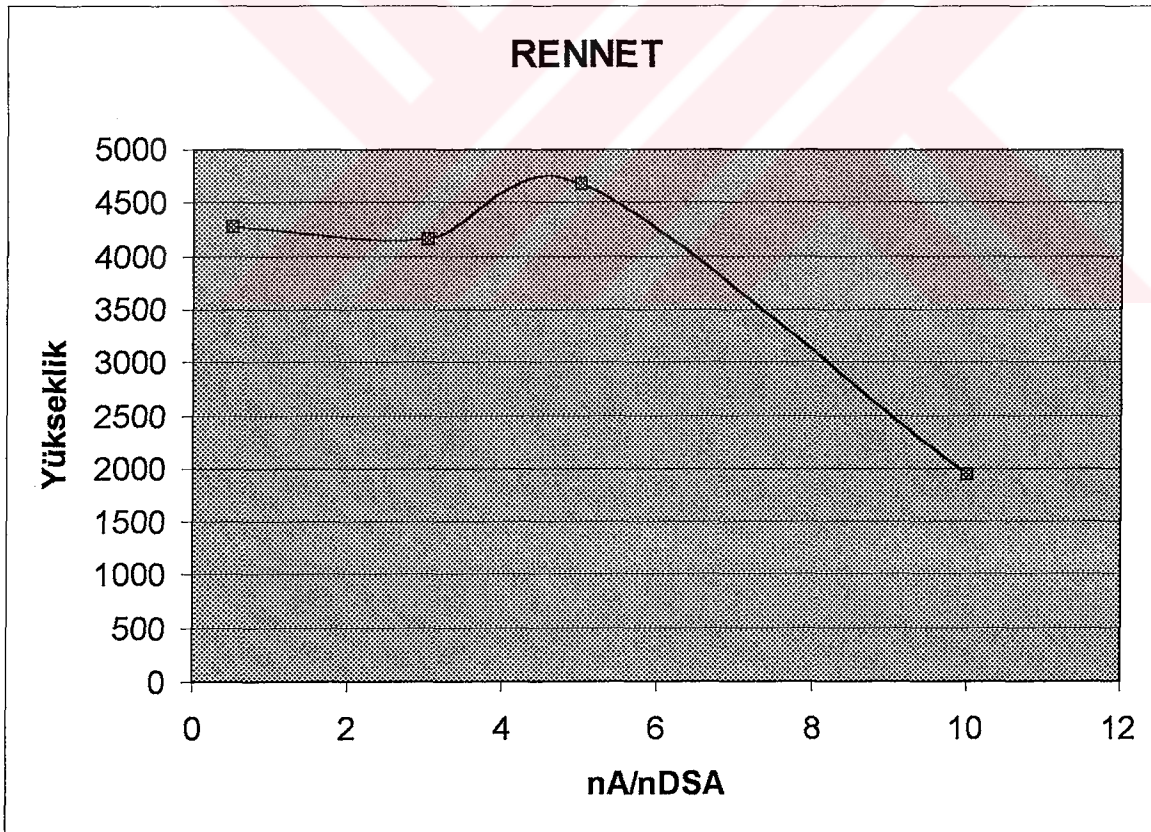
Çizelge 3.22 UV 280nm’de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Polimer’e ait sonuçları

Rennet – Polimer oranı ( $n_A/n_{DSA}$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	18,492	190251	2287
1	100	18,800	191437	2511
3	100	18,790	276282	3264
5	100	18,783	381359	3738
10	100	19,308	698637	6221
20	100	19,283	1139609	11566
30	100	19,705	1609516	19475

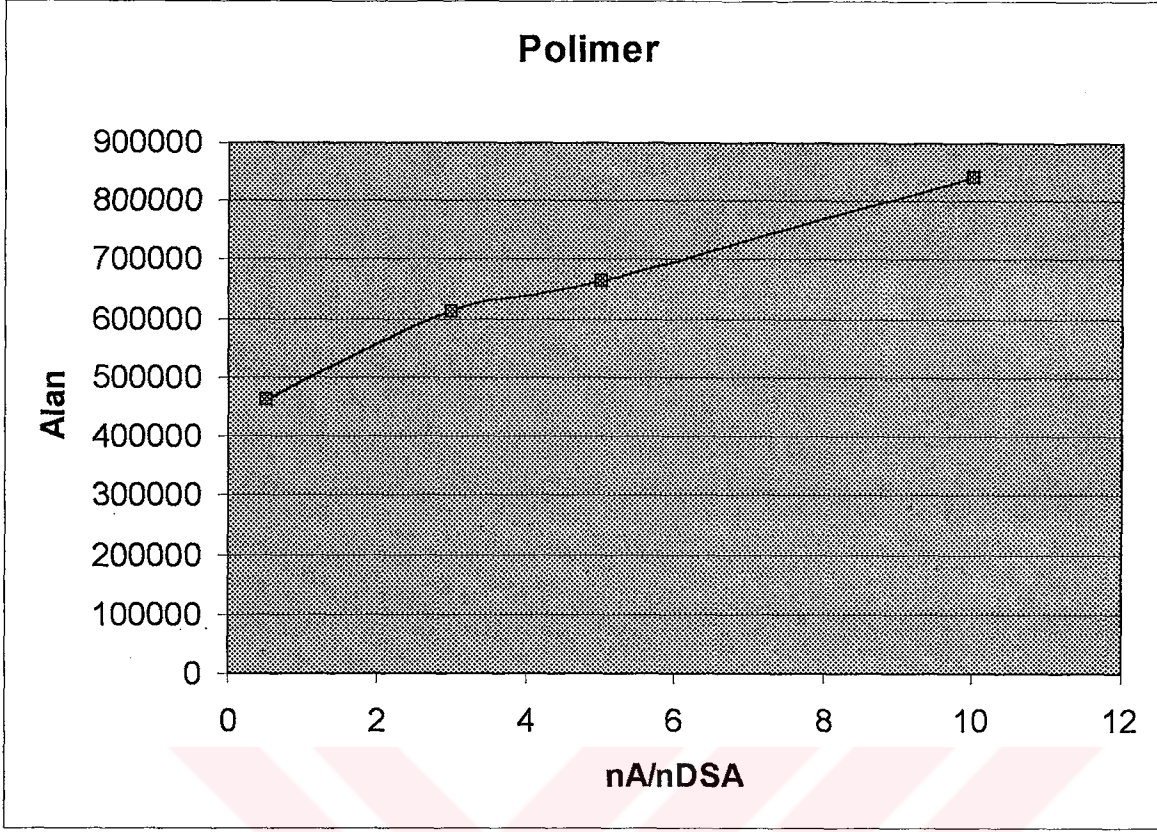
Alınan sonuçlardan faydalanarak Rennet-Polimer oranına karşı Rennet alanı grafiği (Şekil 3.119), Rennet-Polimer oranına karşı Rennet yüksekliği grafiği (Şekil 3.120), Rennet-Polimer oranına karşı Polimer alanı grafiği (Şekil 3.121) ve Rennet-Polimer oranına karşı Polimer yüksekliği grafiği (Şekil 3.122) elde edildi.



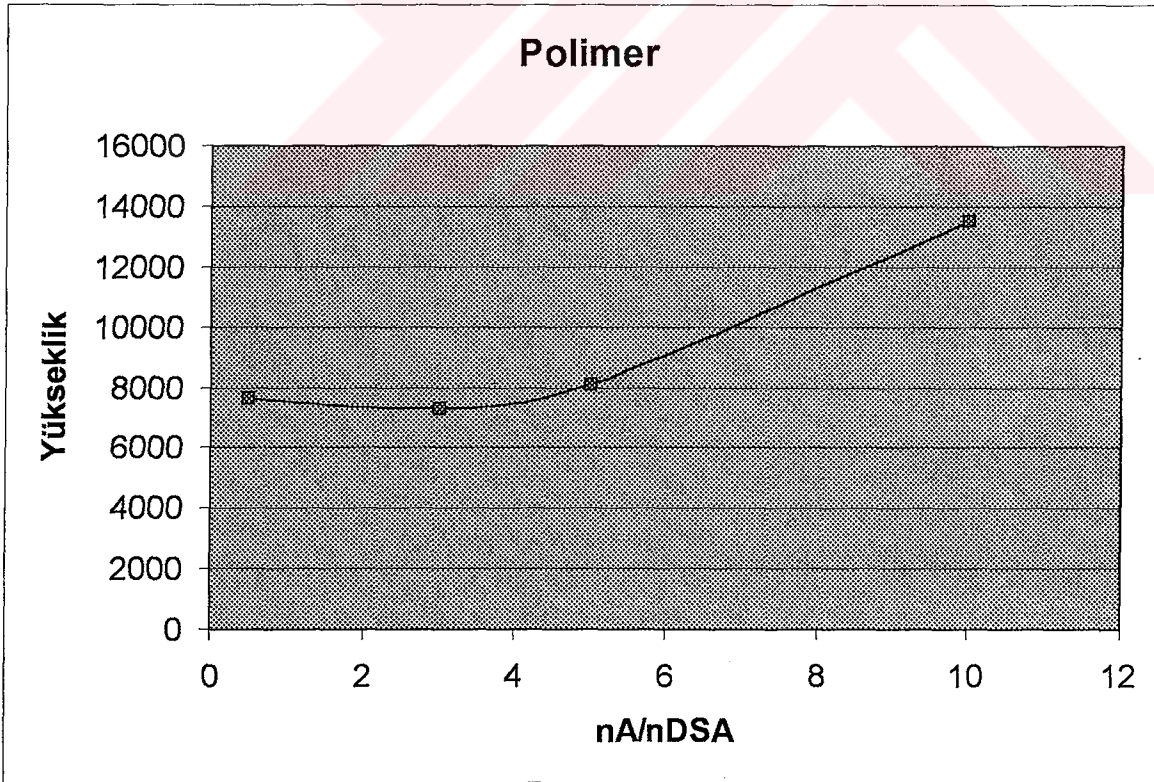
Şekil 3.119 Rennet : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Rennet alanı grafiği



Şekil 3.120 Rennet : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Rennet yüksekliği grafiği



Şekil 3.121 Rennet : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer alanı grafiği

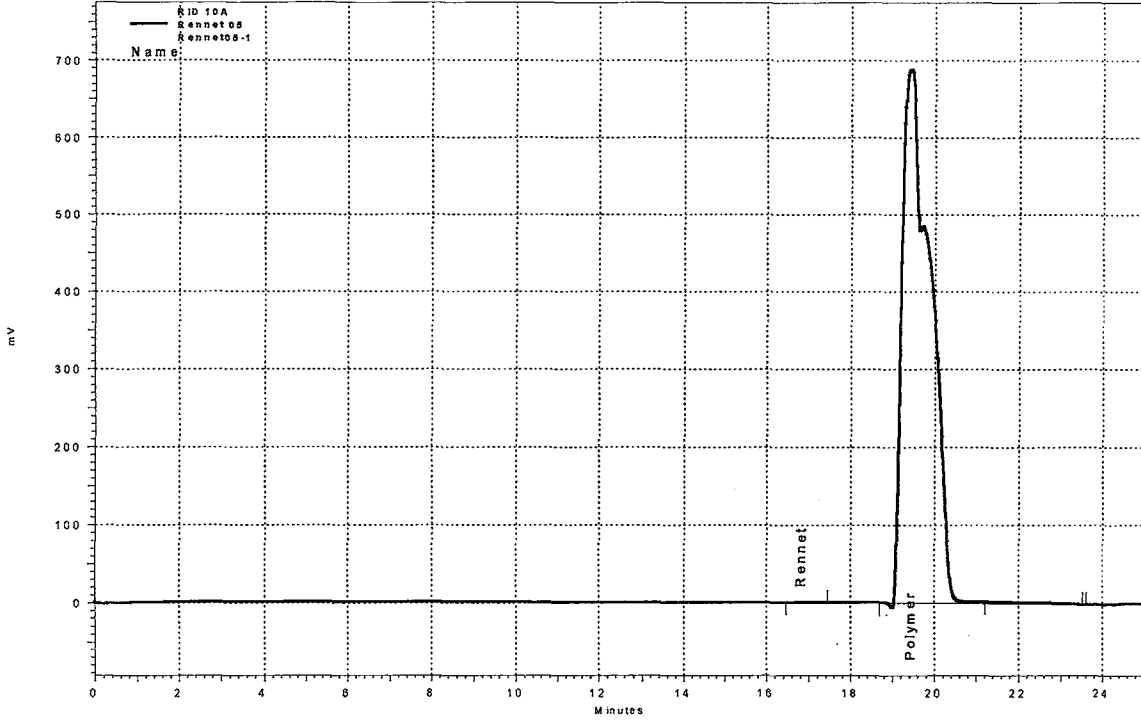


Şekil 3.122 Rennet : Polimer oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği

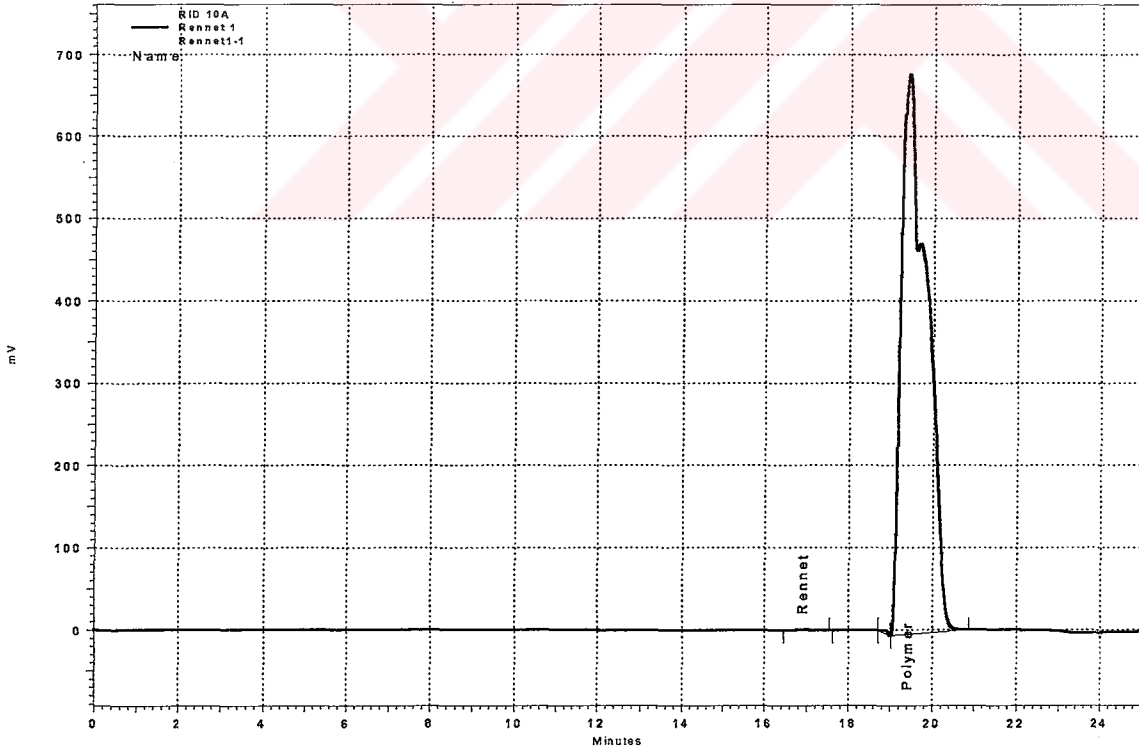
#### **3.4.3.4 Polimer miktarı sabit olan Rennet – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi**

Rennet : Polimer oranı 0,5 – 1 – 3 – 5 – 10 – 20 olan çözeltilerin RI dedektörde enjeksiyonları yapılarak kromatogramları elde edildi.



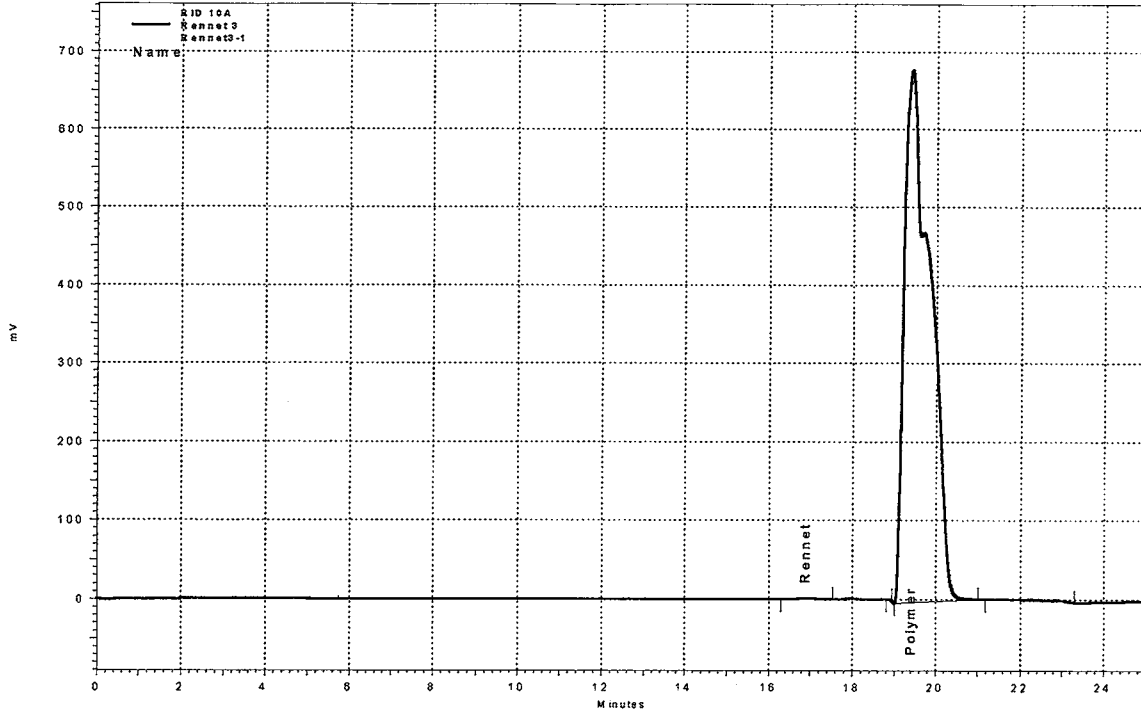


Şekil 3.123 Rennet : Polimer oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID'de elde edilen kromatogramı

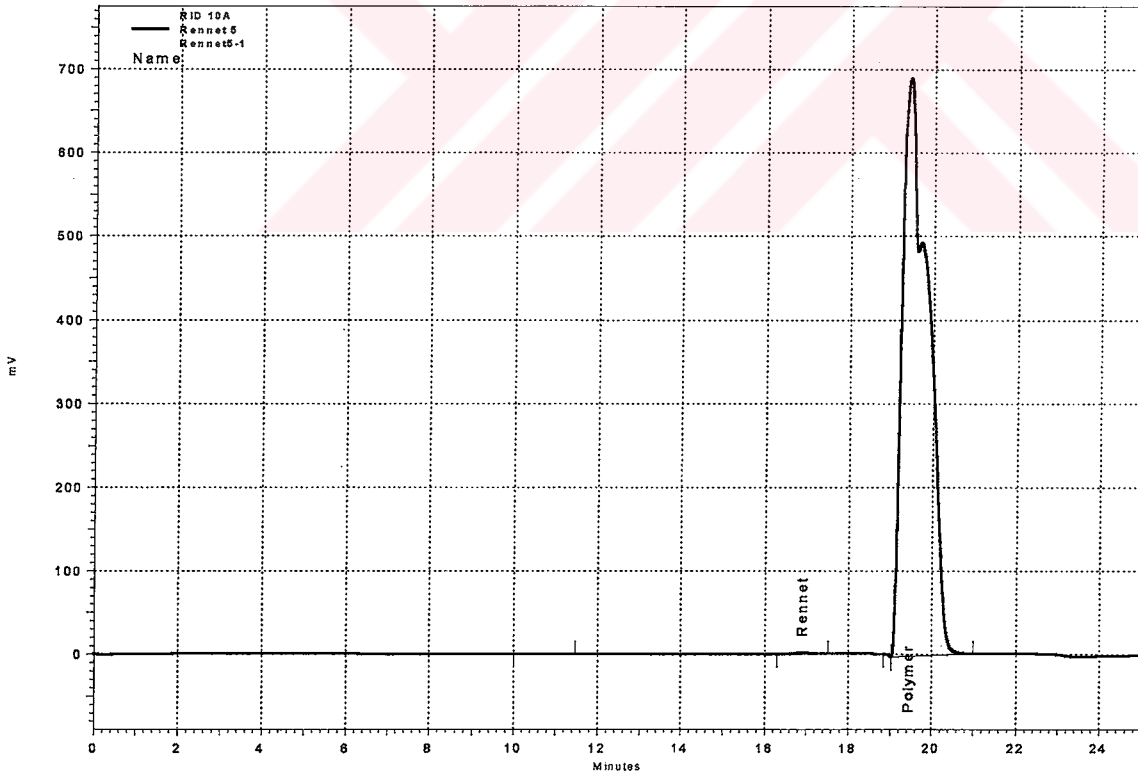


Şekil 3.124 Rennet : Polimer oranı 1 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID'de elde edilen kromatogramı

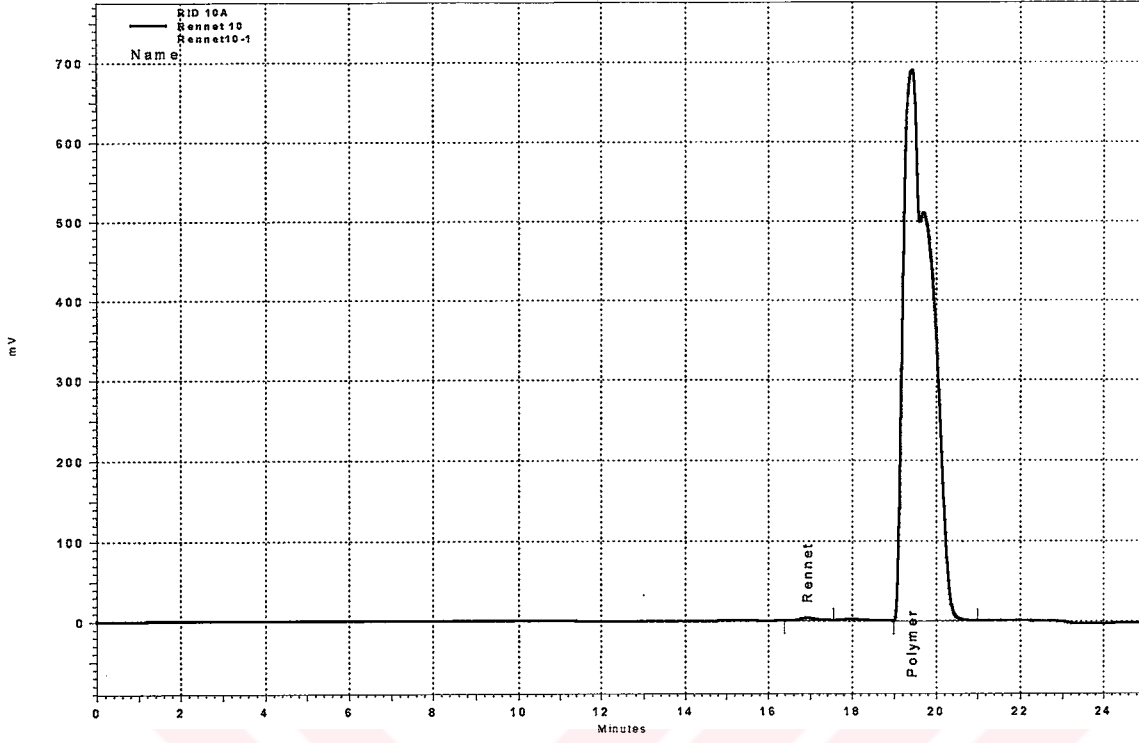




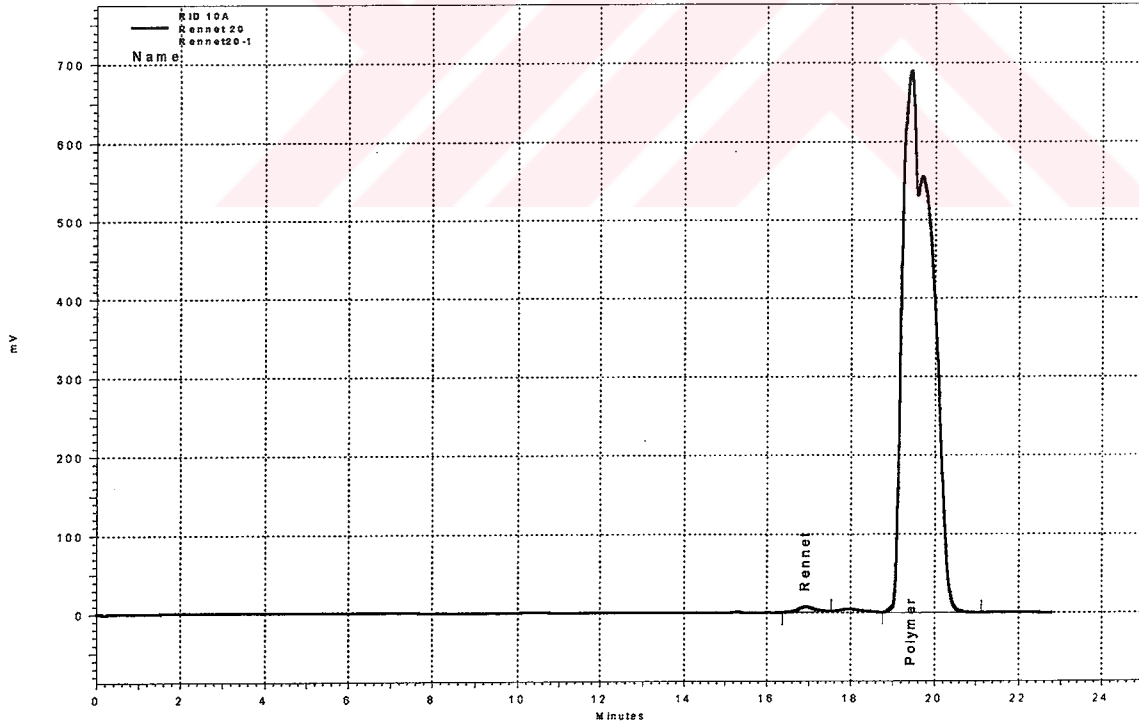
Şekil 3.125 Rennet : Polimer oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.126 Rennet : Polimer oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RID’de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.127 Rennet : Polimer oranı 10 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla RID'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.128 Rennet : Polimer oranı 20 olan çözeltinin 100 $\mu$ l enjeksiyonuyla RID'de elde edilen kromatogramı

RID’de Rennet – Polimer çözeltilerinin enjeksiyonları sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 3.23 ve Çizelge 3.24’de verilmiştir.

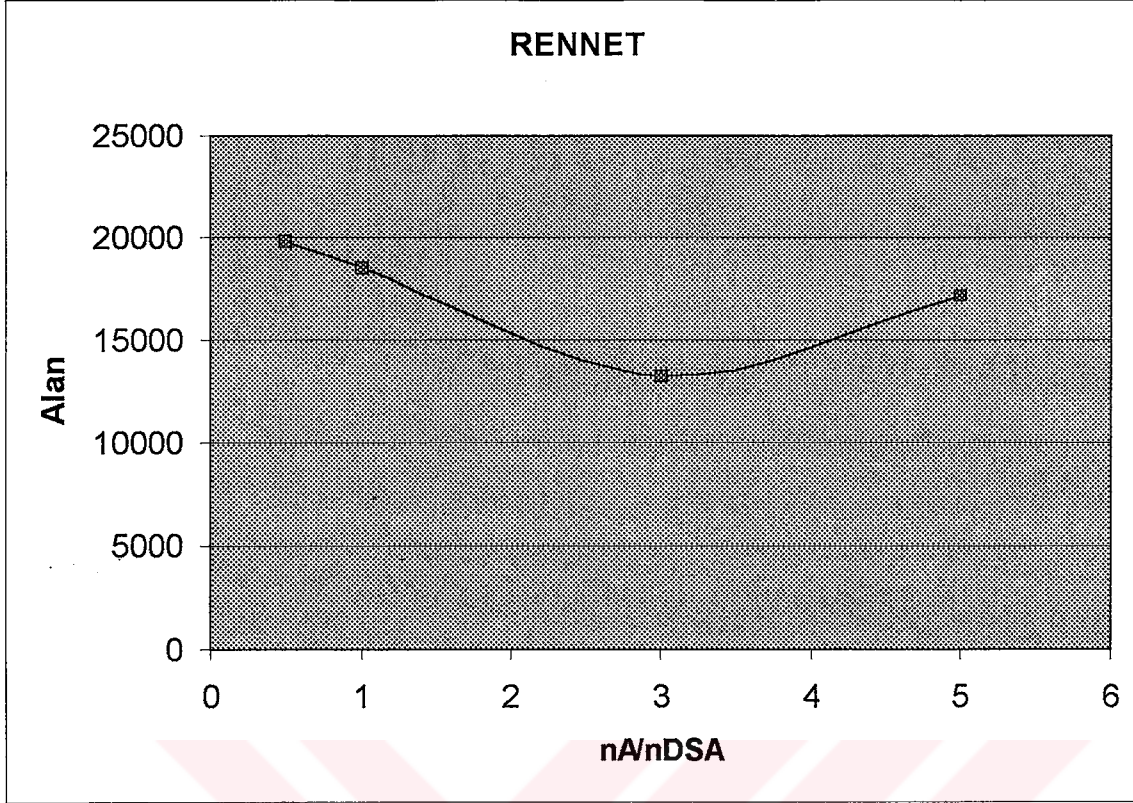
Çizelge 3.23 RID’de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Rennet’e ait sonuçları

Amilaz – Polimer oranı ( $n_A/n_{DSA}$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	16,828	3866	149
1	100	16,892	7879	307
3	100	16,895	26687	1038
5	100	16,912	28698	1118
10	100	16,930	76879	3031
20	100	16,919	155724	6149

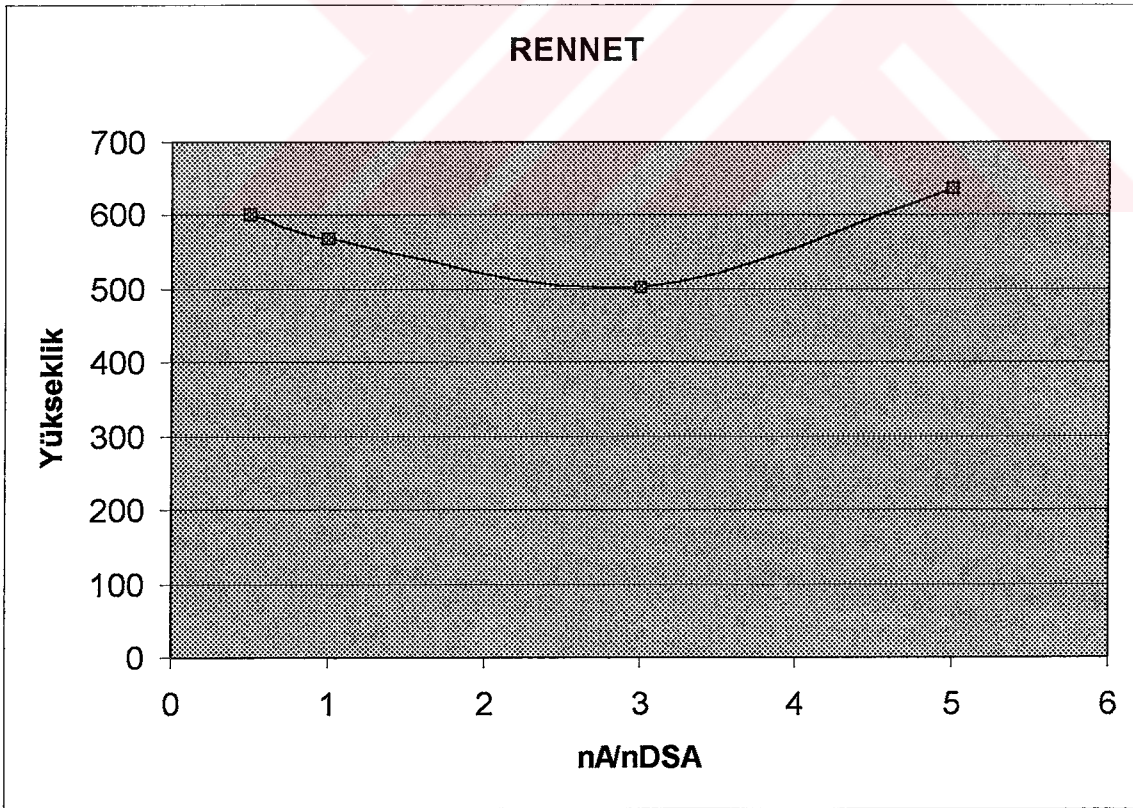
Çizelge 3.24 RID’de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Polimer’e ait sonuçları

Amilaz – Polimer oranı ( $n_A/n_{DSA}$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	19,442	31751503	688606
1	100	19,417	28614361	680798
3	100	19,417	29560184	678990
5	100	19,442	29866627	688636
10	100	19,427	30908989	689471
20	100	19,442	32500777	687844

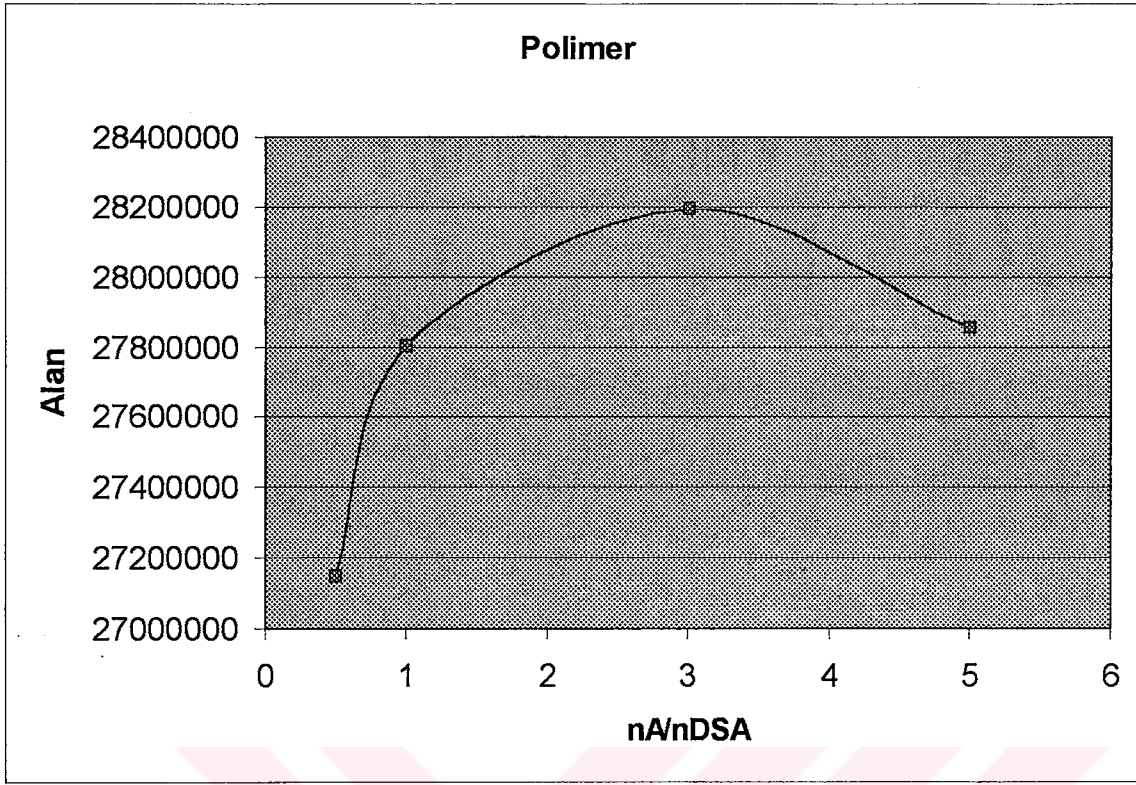
Alınan sonuçlardan faydalanarak Rennet-Polimer oranına karşı Rennet alanı grafiği (Şekil 3.129), Rennet-Polimer oranına karşı Rennet yüksekliği grafiği (Şekil 3.130), Rennet-Polimer oranına karşı Polimer alanı grafiği (Şekil 3.131) ve Rennet-Polimer oranına karşı Polimer yüksekliği grafiği (Şekil 3.132) elde edildi.



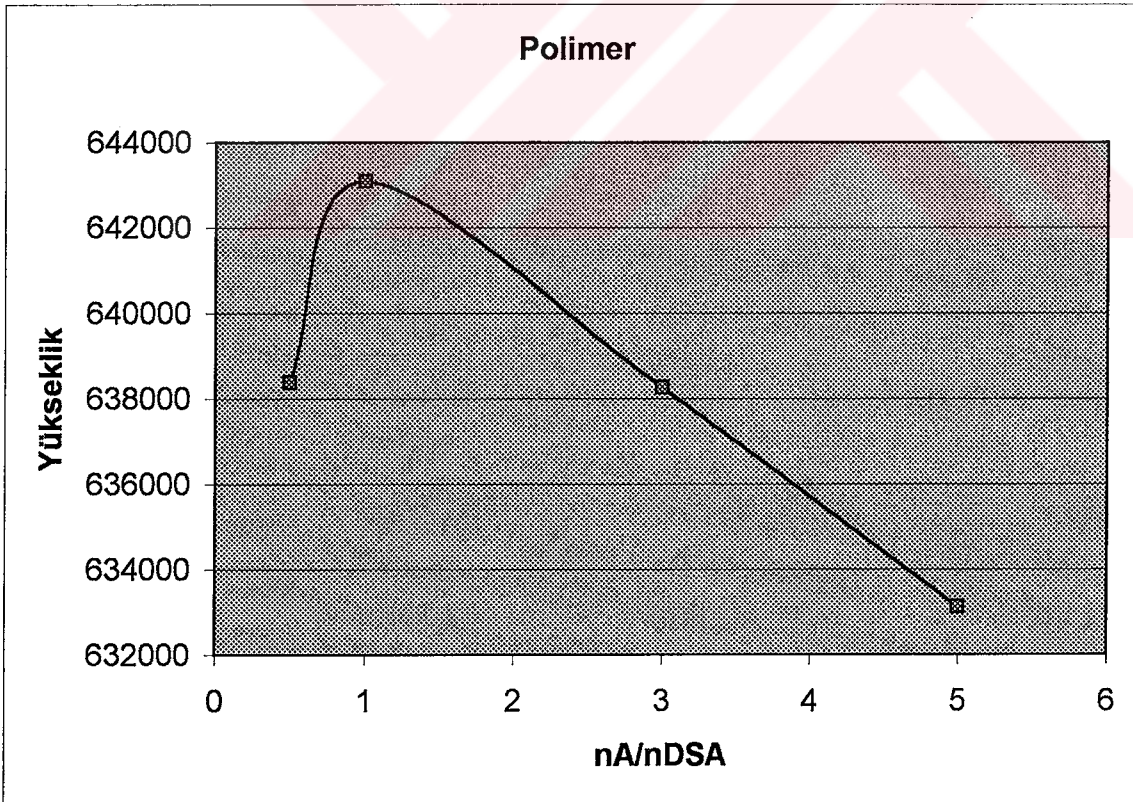
Şekil 3.129 Rennet : Polimer oranı'na karşı RID'de elde edilen Rennet alanı grafiği



Şekil 3.130 Rennet : Polimer oranı'na karşı RID'de elde edilen Rennet yüksekliği grafiği



Şekil 3.131 Rennet : Polimer oranı'na karşı RID'de elde edilen Polimer alanı grafiği



Şekil 3.132 Rennet : Polimer oranı'na karşı RID'de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği

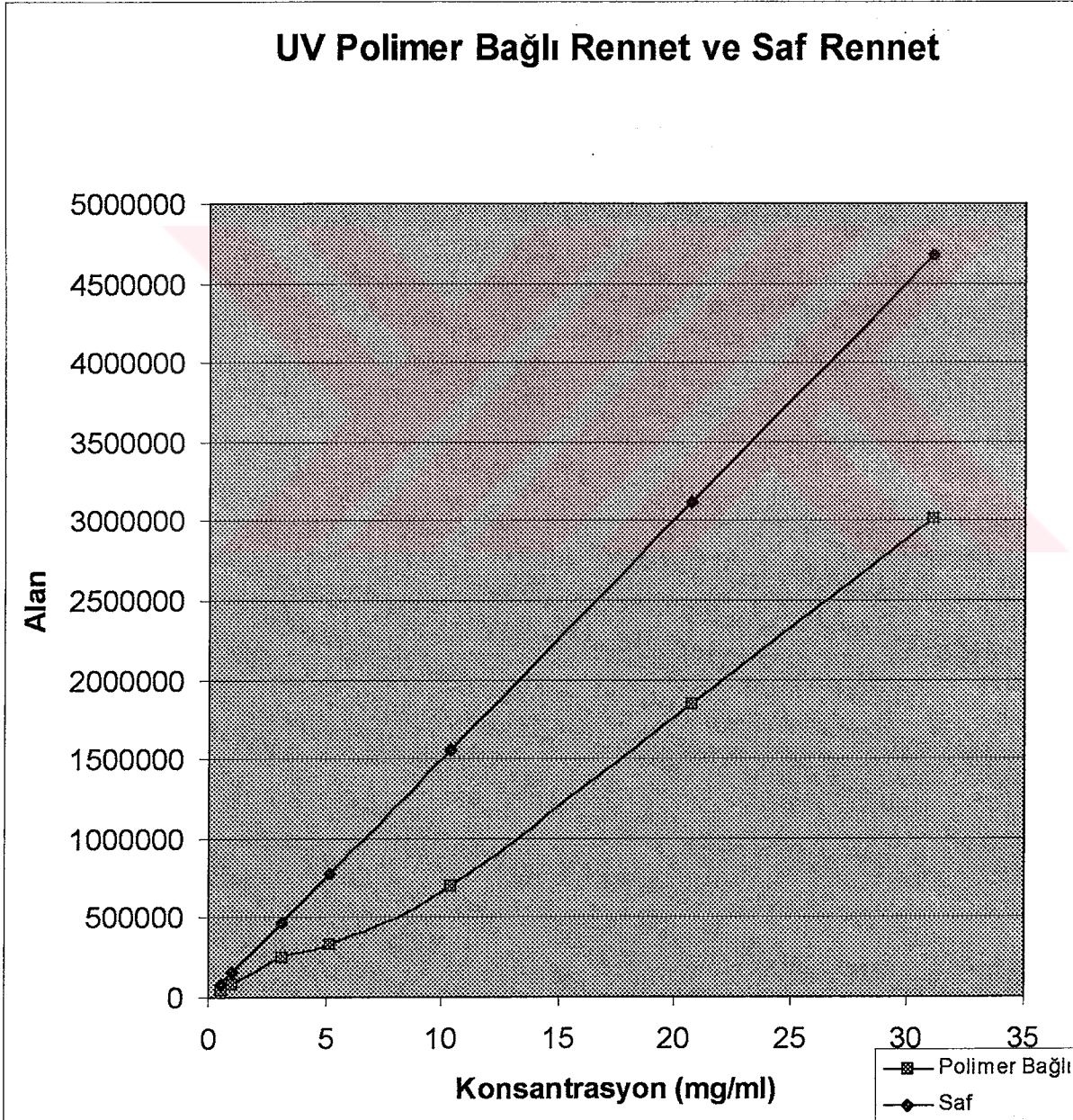
### **3.4.3.5 UV dedektörde Rennet-polimer çözeltilisindeki Rennet ile saf Rennet arasında karşılaştırma**

Elde Edilen verilerden faydalanarak Bağlı Rennet ile saf Rennet arasındaki ilişki Çizelge 25’de gösterildi.

Rennet çözeltilisi 0,5mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. Karışımdaki konsantrasyona oransal olarak hesaplanarak varıldı.

Çizelge 3.25 UV dedektörde Rennet-Polimer karışımı çözeltisi ile Rennet çözeltisi alan sonuçları

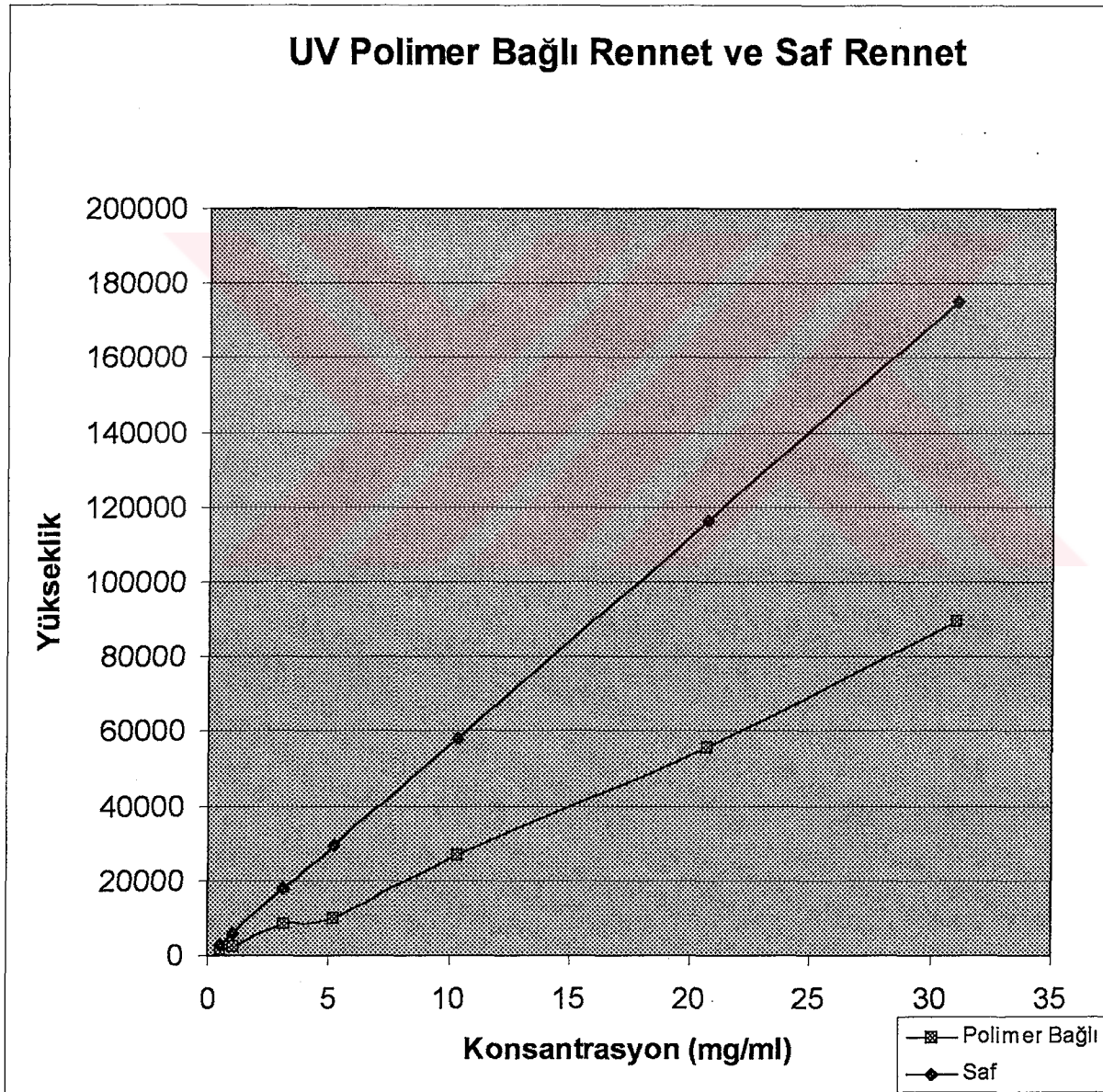
Rennet-Polimer çözeltisinin karışım oranı	Rennet-Polimer karışımındaki Rennet konsantrasyonu (mg/ml)	Rennet-Polimer karışımındaki Rennet alanı	Rennet çözeltisinin alanı
0,5	0,5176	47430	77952
1	1,035	80446	155873
3	3,15	257233	474396
5	5,176	327960	779516
10	10,35	698637	1558731
20	20,7	1841394	3117461
30	31,05	3011908	4676192



Şekil 3.133 UV dedektörde Rennet-Polimer karışımındaki Rennet'in ve polimersiz çözeltideki Rennet'in konsantrasyona karşı alan grafiği

Çizelge 3.26 UV dedektörde Rennet-Polimer karışımı çözeltisi ile Rennet çözeltisi yükseklik sonuçları

Rennet-Polimer çözeltisinin karışım oranı	Rennet-Polimer karışımındaki Rennet konsantrasyonu (mg/ml)	Rennet-Polimer karışımındaki Rennet yüksekliği	Rennet çözeltisinin yüksekliği
0,5	0,5176	1415	2916
1	1,035	2536	5831
3	3,15	8233	17747
5	5,176	9830	29162
10	10,35	26724	58312
20	20,7	55611	116624
30	31,05	89349	174936



Şekil 3.134 UV dedektörde Rennet-Polimer karışımındaki Rennet'in ve polimersiz çözeltideki Rennet'in konsantrasyona karşı yükseklik grafiği



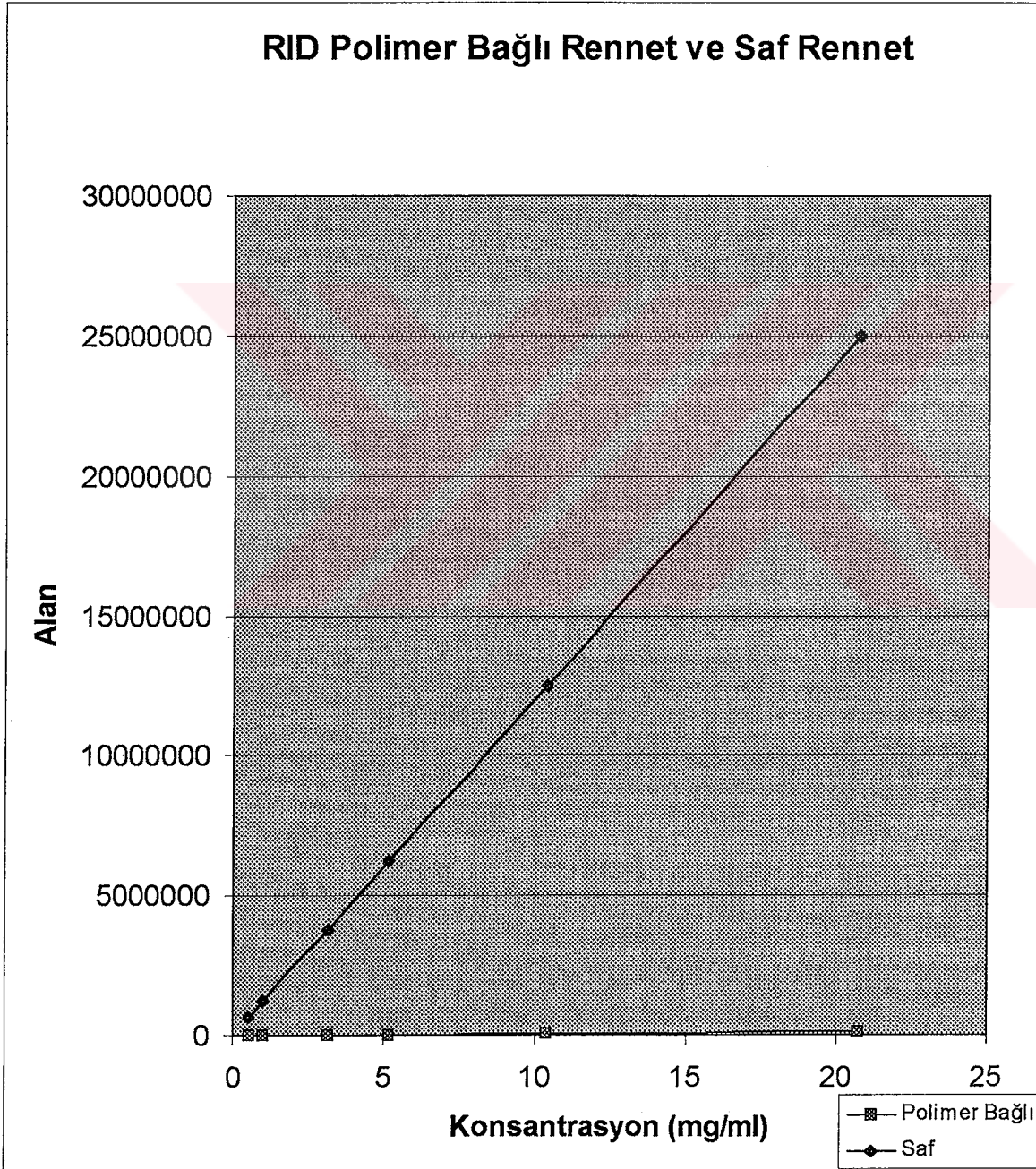
### **3.4.3.6 RI dedektörde Rennet-polimer çözeltilisindeki Rennet ile saf Rennet arasında karşılaştırma**

Elde Edilen verilerden faydalanarak Bağlı Rennet ile saf Rennet arasındaki ilişki Çizelge 27'de gösterildi.

Rennet çözeltilisi 0,5mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. Karışımdaki konsantrasyona oransal olarak hesaplanarak varıldı.

Çizelge 3.27 RID'de Rennet-Polimer karışımı çözeltisi ile Rennet çözeltisi alan sonuçları

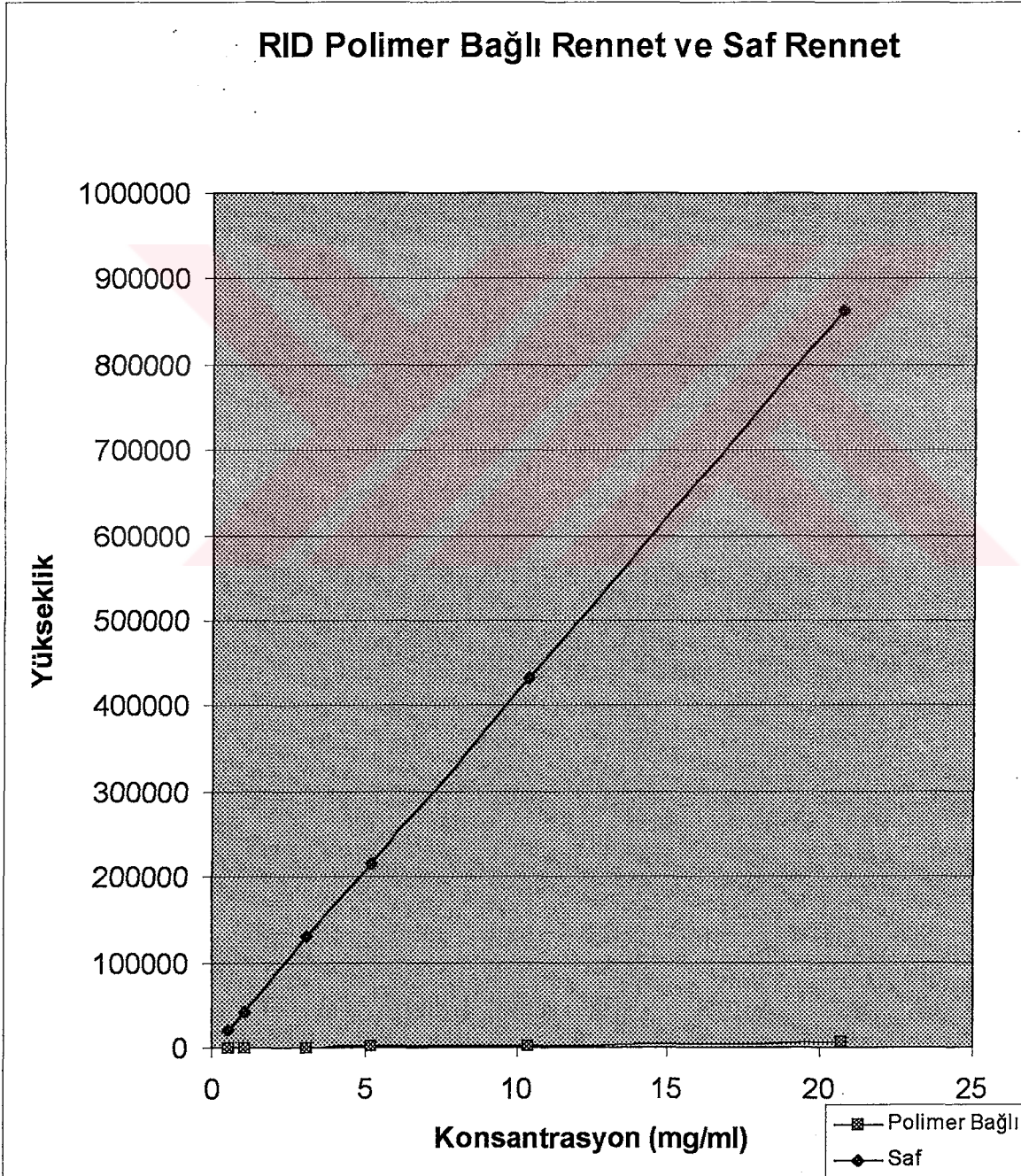
Rennet-Polimer çözeltisinin karışım oranı	Rennet-Polimer karışımındaki Rennet konsantrasyonu (mg/ml)	Rennet-Polimer karışımındaki Rennet alanı	Rennet çözeltisinin alanı
0,5	0,5176	3866	625174
1	1,035	7879	1250106
3	3,15	26687	3804671
5	5,176	28698	6251738
10	10,35	76879	12501061
20	20,7	155724	25002122



Şekil 3.135a RID'de Rennet-Polimer karışımındaki Rennet'in ve polimersiz çözeltideki Rennet'in konsantrasyona karşı alan grafiği

Çizelge 3.28 RID’de Rennet-Polimer karışımı çözeltisi ile Rennet çözeltisi yükseklik sonuçları

Rennet-Polimer çözeltisinin karışım oranı	Rennet-Polimer karışımındaki Rennet konsantrasyonu (mg/ml)	Rennet-Polimer karışımındaki Rennet yüksekliği	Rennet çözeltisinin yüksekliği
0,5	0,5176	149	21586
1	1,035	307	43164
3	3,15	1038	131368
5	5,176	1118	215860
10	10,35	3031	431636
20	20,7	6149	863273

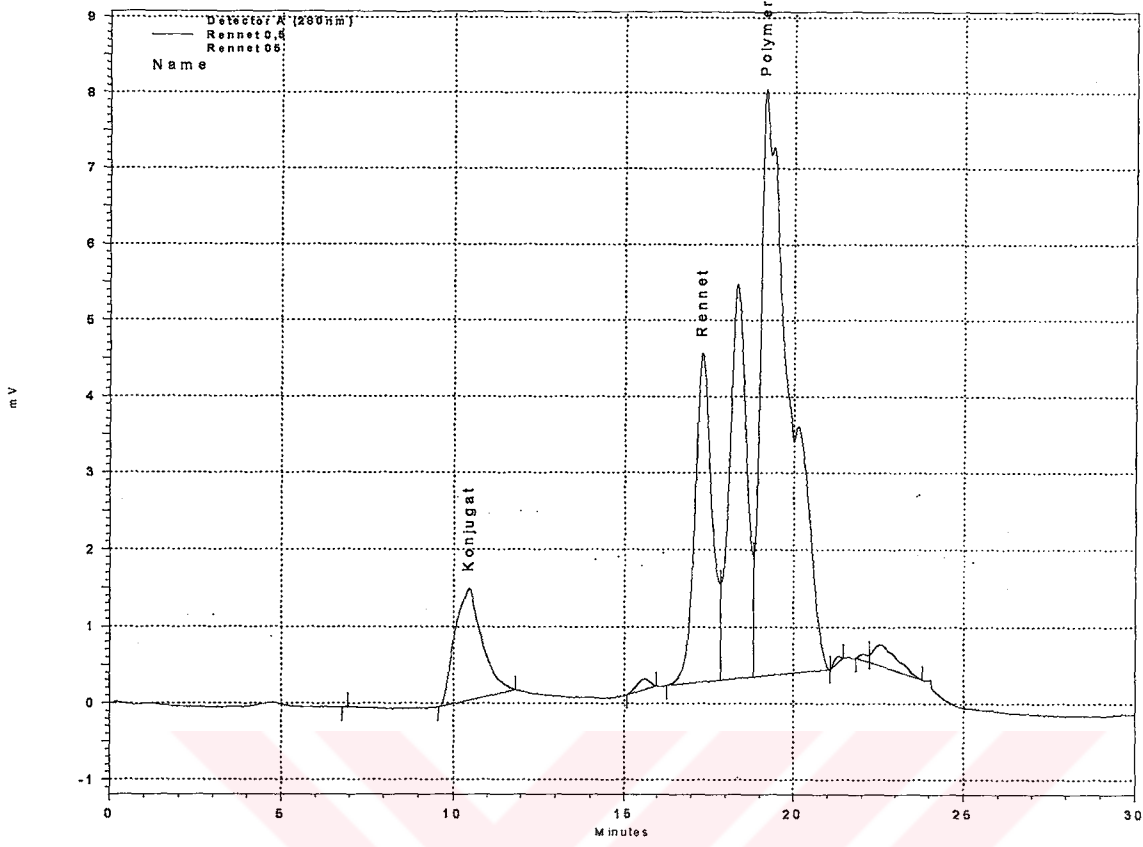


Şekil 3.135b RID’de Rennet-Polimer karışımındaki Rennet’in ve polimersiz çözeltideki Rennet’in konsantrasyona karşı yükseklik grafiği

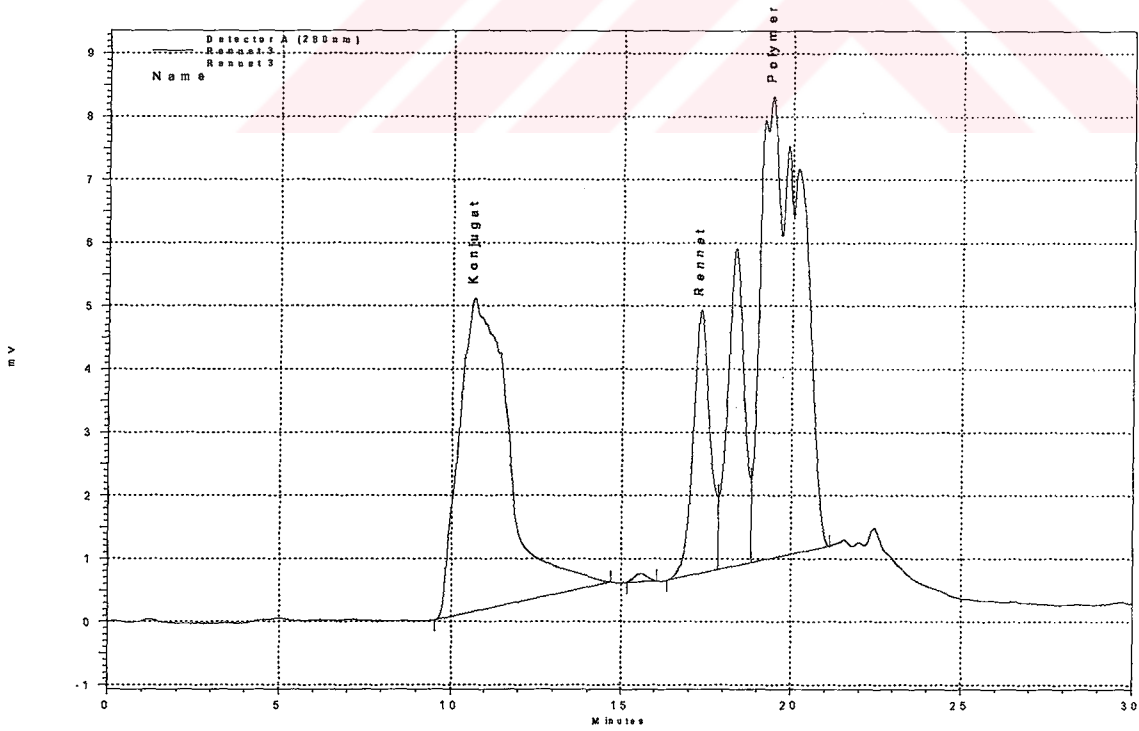
### **3.4.3.7 Rennet miktarı sabit olan Rennet – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve UV dedektör ile incelenmesi**

Polimer : Rennet oranı 0,5 – 3 – 5 – 10 olan çözeltilerin UV 280nm’de enjeksiyonları yapılarak kromatogramları elde edildi.

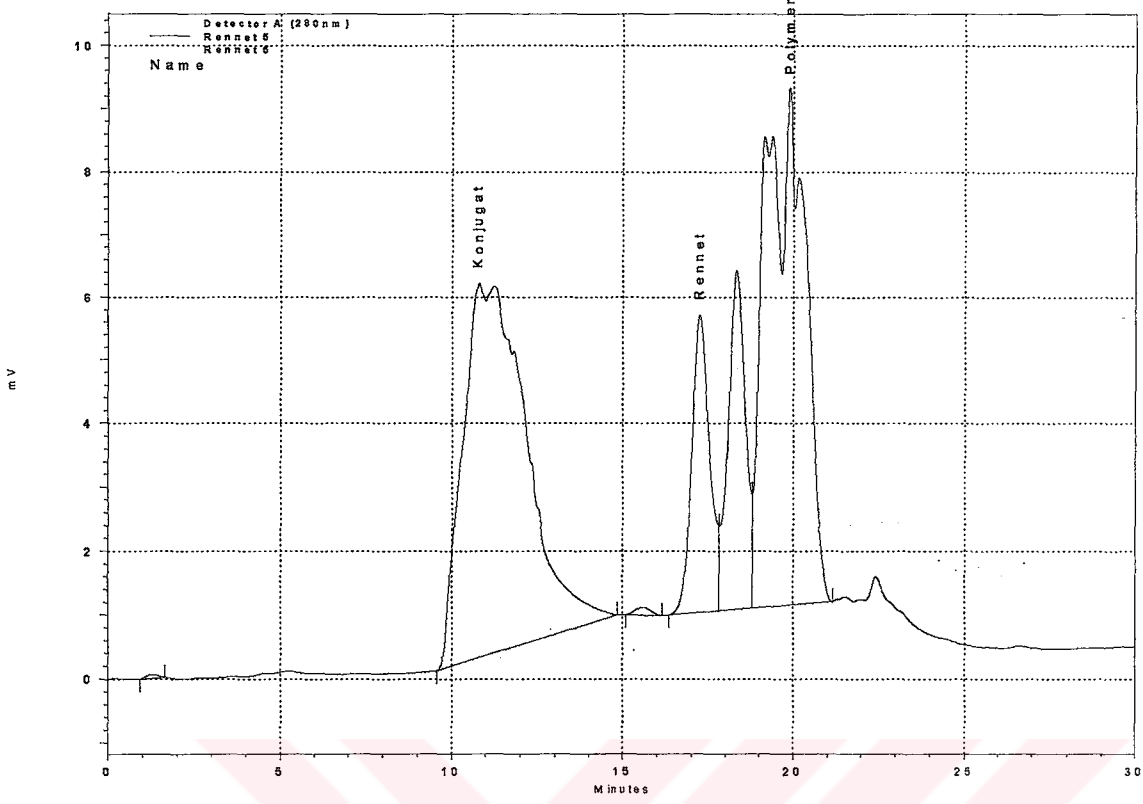




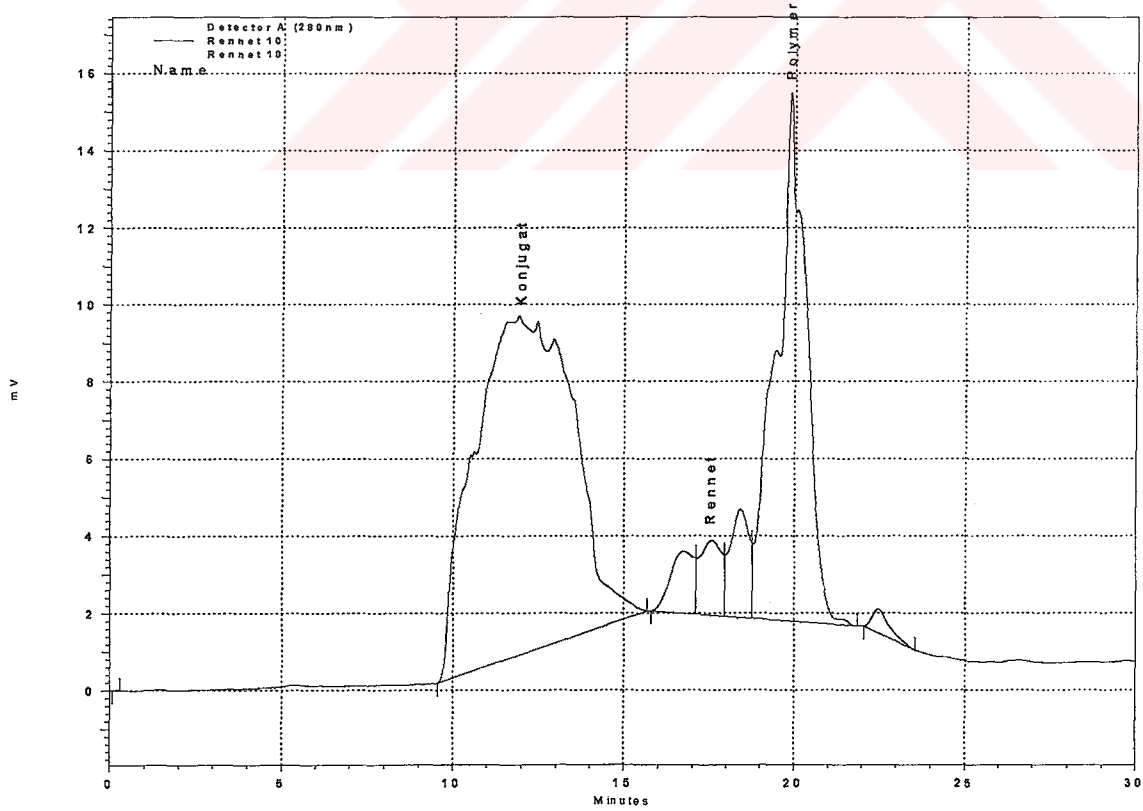
Şekil 3.136 Polimer : Rennet oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.137 Polimer : Rennet oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.138 Polimer : Rennet oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.139 Polimer : Rennet oranı 10 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla UV 280nm'de elde edilen kromatogramı

UV Dedektörle 280nm'de farklı oranlardaki Rennet – Polimer çözeltilerinin enjeksiyonları sonucu elde edilen değerler Çizelge 3.29 Çizelge 3.30 ve Çizelge 3.31'de verilmiştir.

Çizelge 3.29 UV 280nm'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Rennet'e ait sonuçları

Polimer - Rennet oranı ( $n_{DSA}/n_R$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	17,306	146194	4284
3	100	17,312	140906	4173
5	100	17,229	171521	4675
10	100	17,562	88519	1944

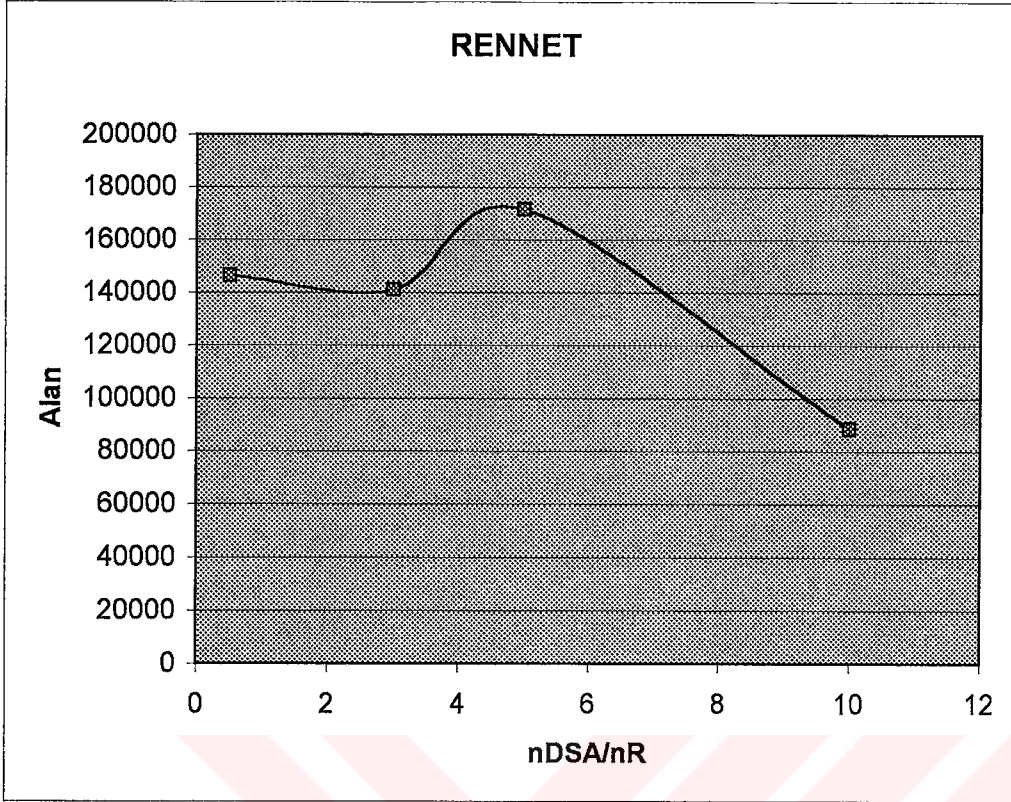
Çizelge 3.30 UV 280nm'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Polimer'e ait sonuçları

Polimer - Rennet oranı ( $n_{DSA}/n_R$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	19,158	463631	7608
3	100	19,408	611882	7289
5	100	19,908	665467	8083
10	100	19,883	840154	13490

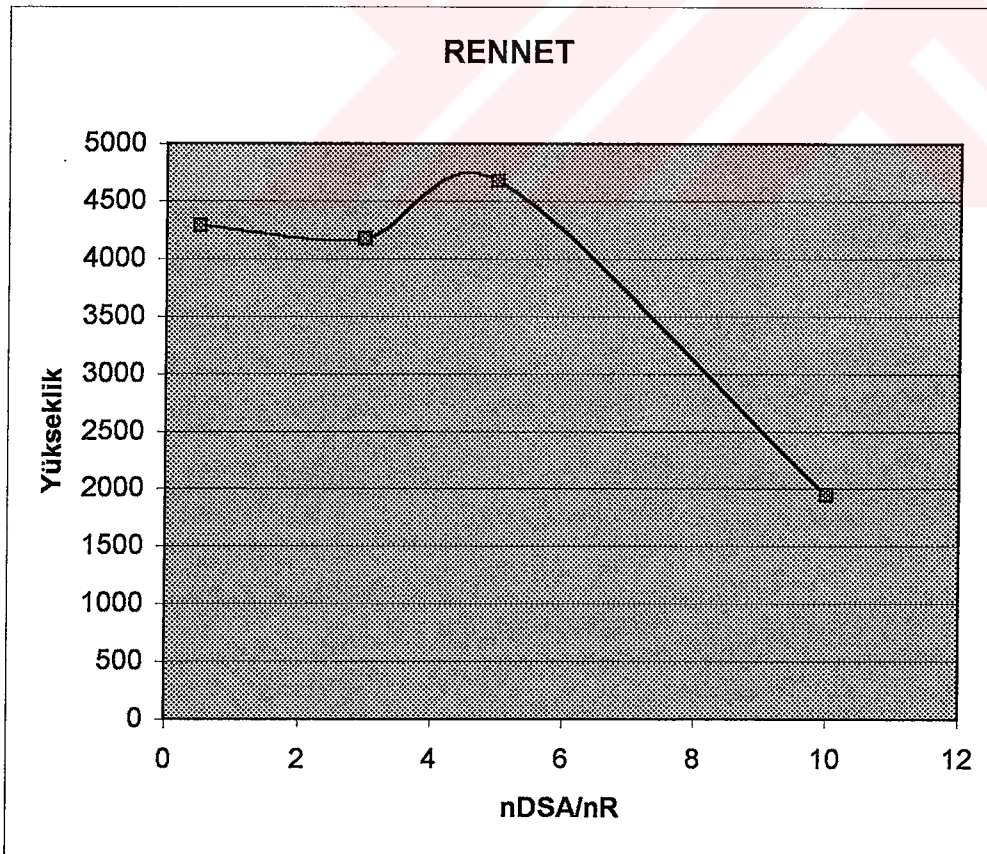
Çizelge 3.31 UV 280nm'de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Konjugat'a ait sonuçları

Polimer - Rennet oranı ( $n_{DSA}/n_R$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	10,459	81682	1454
3	100	10,656	511755	4960
5	100	10,817	755616	5873
10	100	11,992	176884	8631

Elde edilen sonuçlardan faydalanarak Polimer-Rennet oranına karşı Rennet alanı grafiği (Şekil 3.140), Polimer-Rennet oranına karşı Rennet yüksekliği grafiği (Şekil 3.141), Polimer-Rennet oranına karşı Polimer alanı grafiği (Şekil 3.142), Polimer-Rennet oranına karşı Polimer yüksekliği grafiği (Şekil 3.143), Polimer-Rennet oranına karşı Konjugat alanı grafiği (Şekil 3.144), Polimer-Rennet oranına karşı Konjugat yüksekliği grafiği (Şekil 3.145) elde edildi.

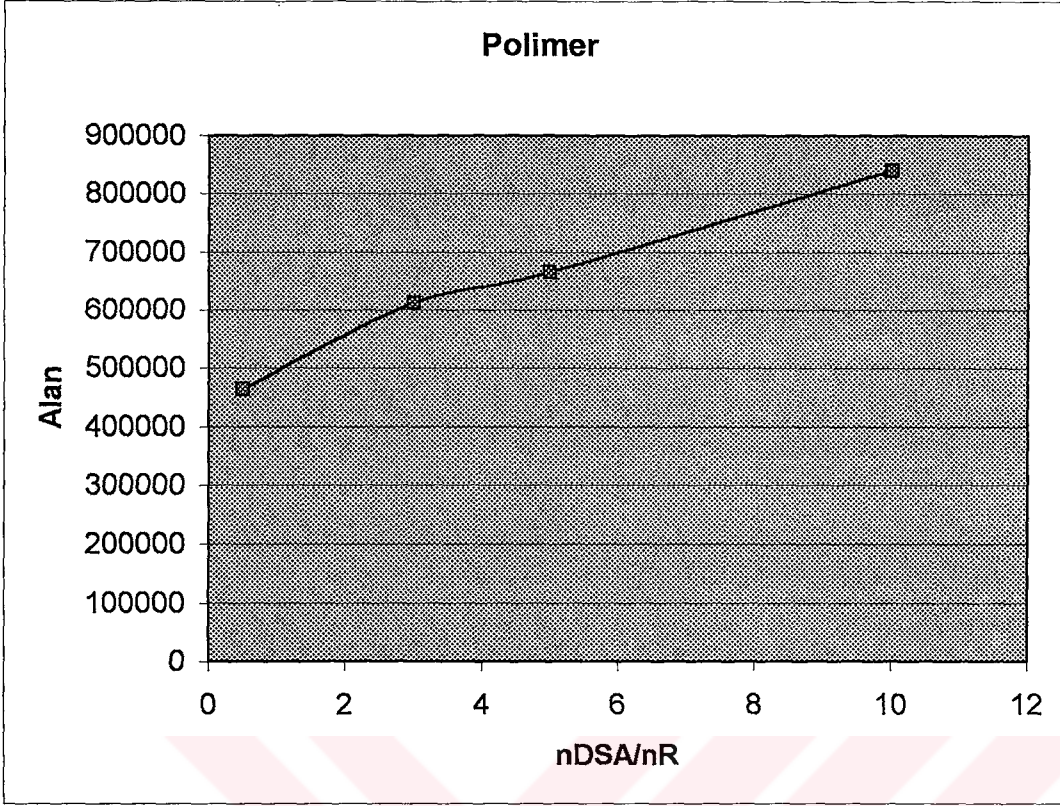


Şekil 3.140 Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Rennet alanı grafiği

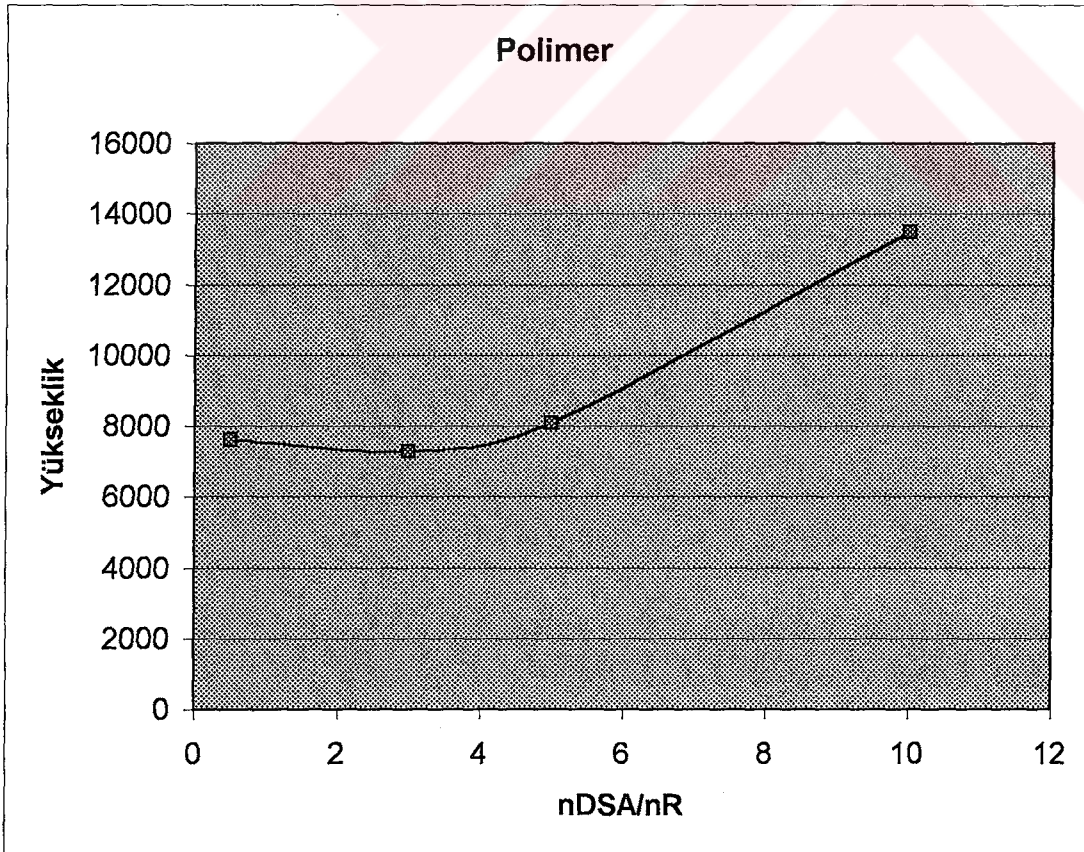


Şekil 3.141 Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Rennet yüksekliği grafiği

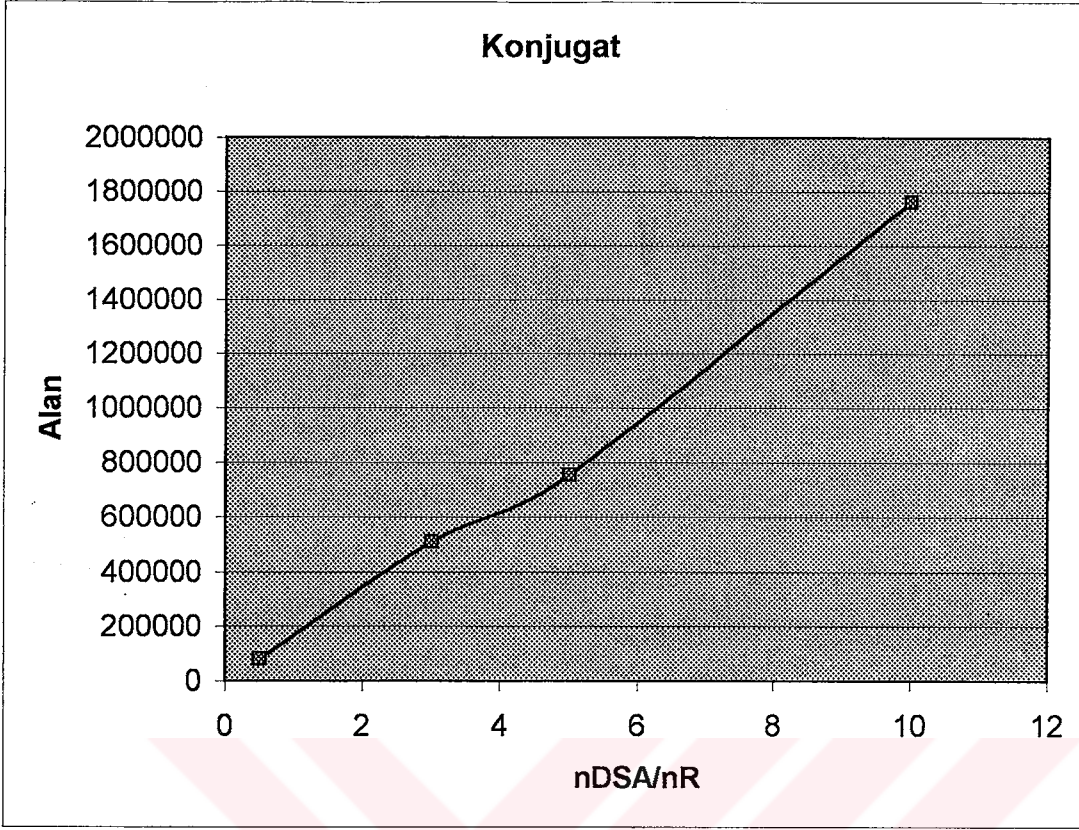




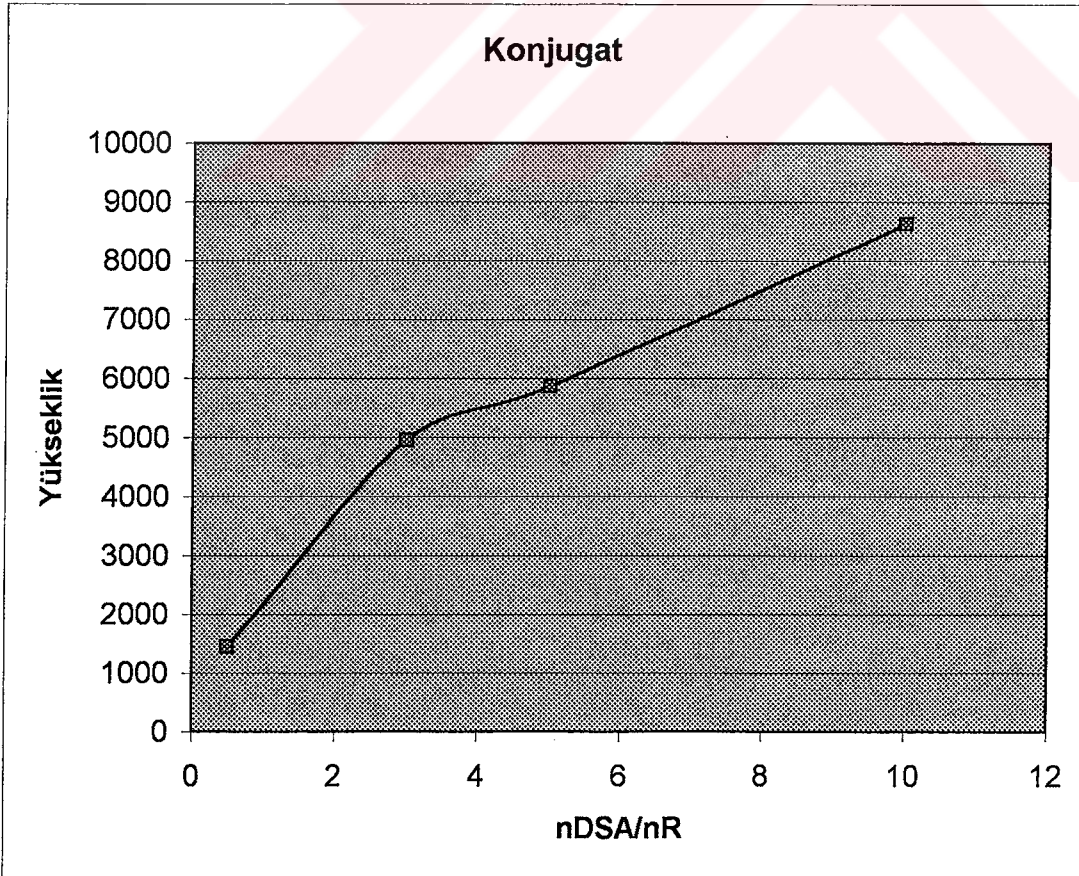
Şekil 3.142 Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer alanı grafiği



Şekil 3.143 Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği



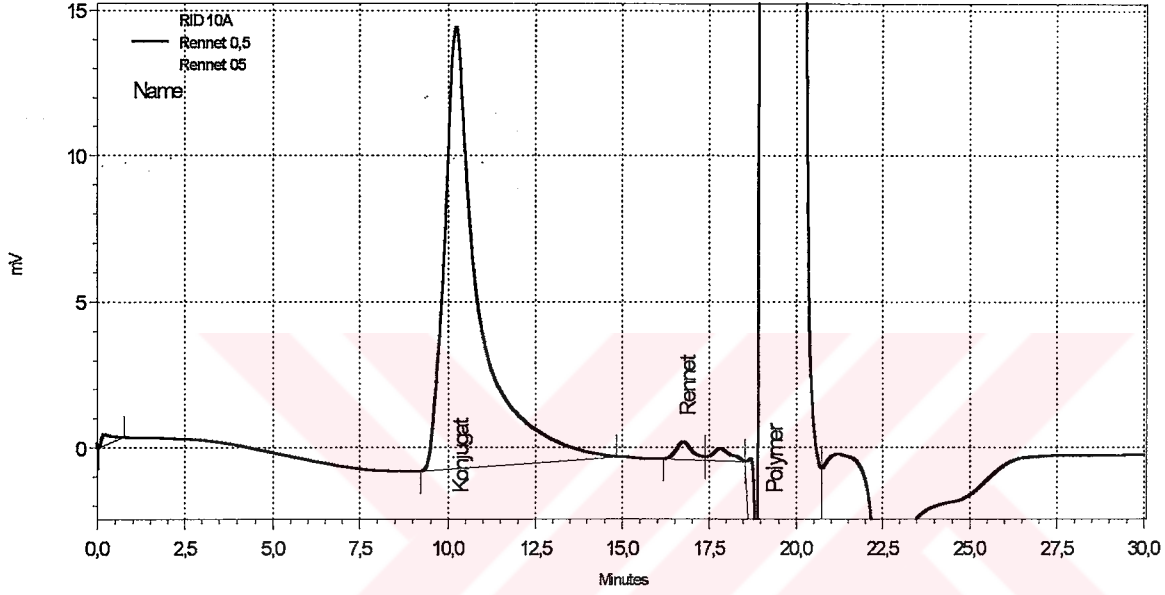
Şekil 3.144 Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Konjugat alanı grafiği



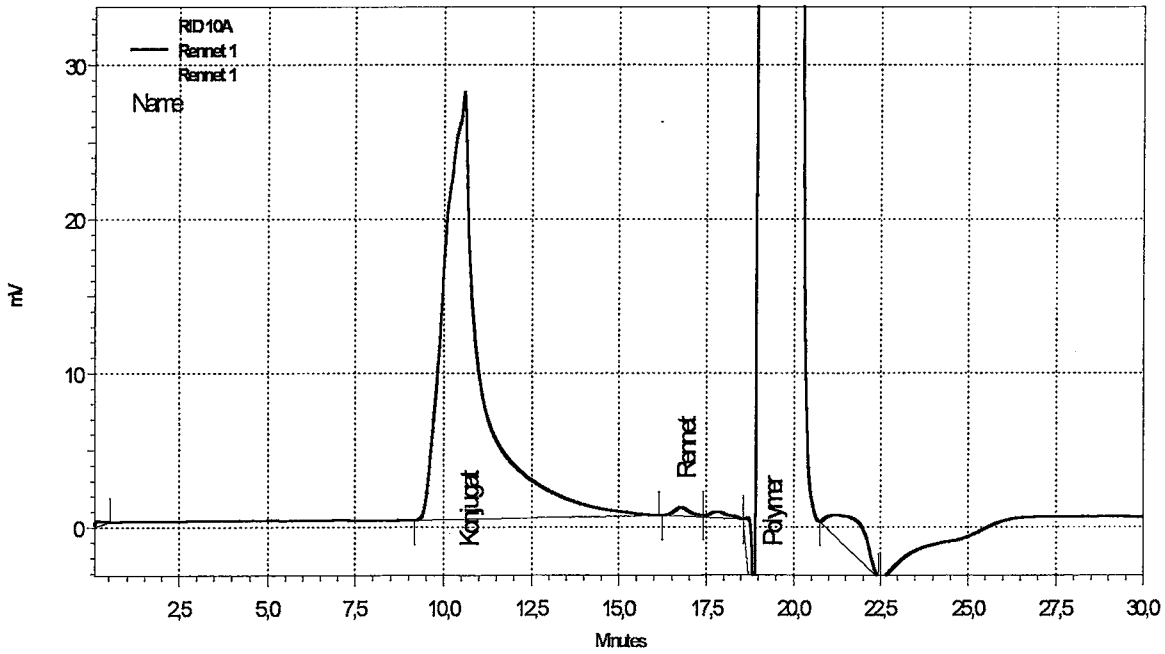
Şekil 145 Polimer : Rennet oranı'na karşı UV 280nm'de elde edilen Konjugat yüksekliği grafiği

### 3.4.3.8 Rennet miktarı sabit olan Rennet – Polimer konjugat çözeltisinin enjeksiyonu ve RI dedektör ile incelenmesi

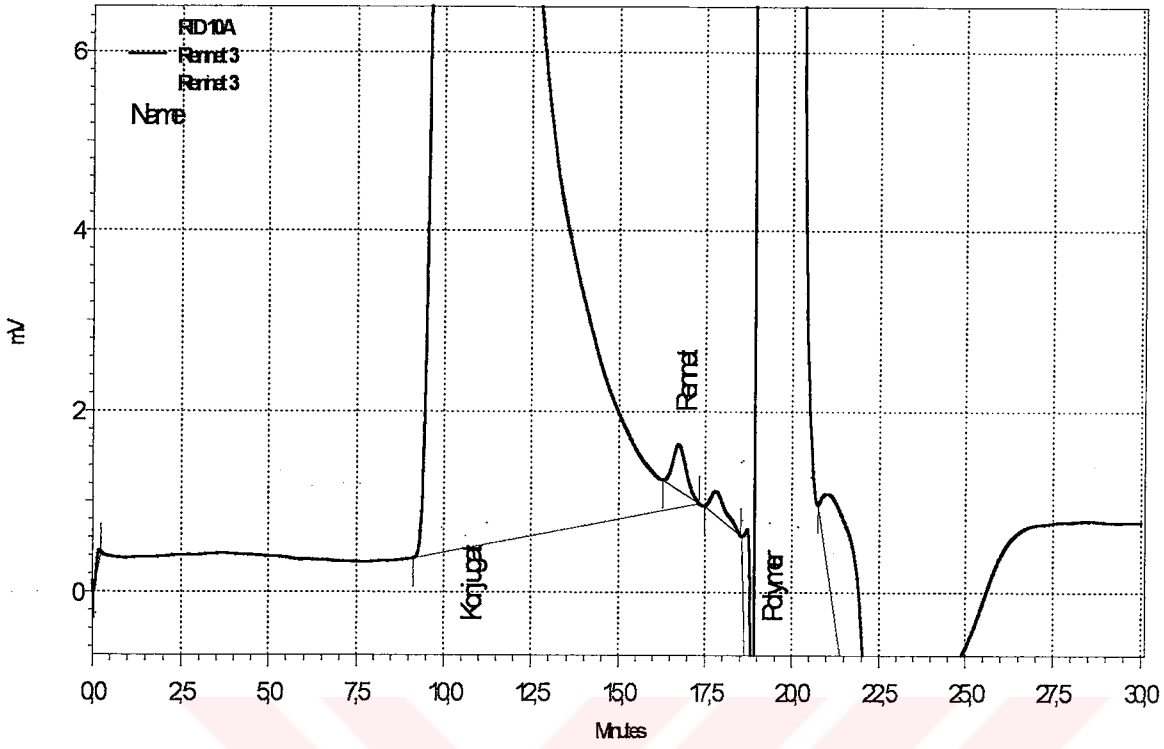
Polimer : Rennet oranı 0,5 – 1 – 3 – 5 olan çözeltilerin RI dedektör’de enjeksiyonları yapılarak kromatogramları elde edildi. Konjugat ve enzim piklerinin iyi görünebilmesi için kromatogramın skalası konjugat pikine göre ayarlandı.



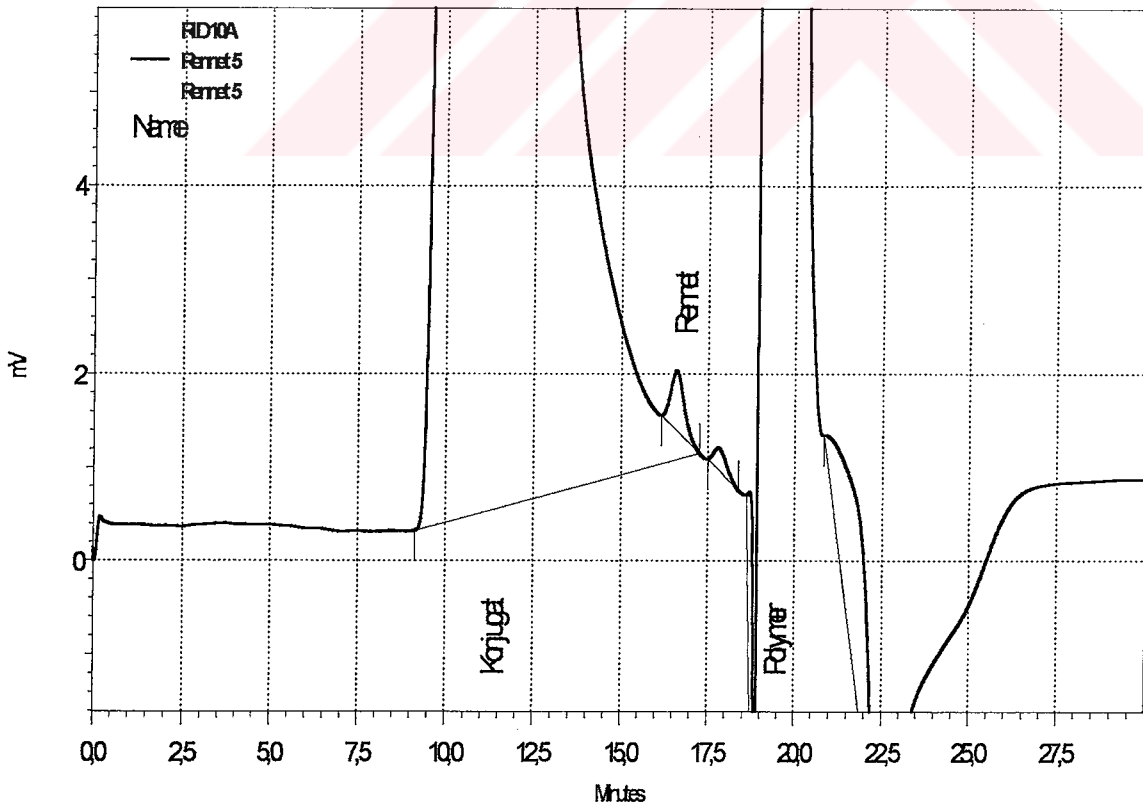
Şekil 3.146 Polimer : Rennet oranı 0,5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektör’de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.147 Polimer : Rennet oranı 1 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektör’de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.148 Polimer : Rennet oranı 3 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektör'de elde edilen kromatogramı



Şekil 3.149 Polimer : Rennet oranı 5 olan çözeltinin 100µl enjeksiyonuyla RI dedektör'de elde edilen kromatogramı

RI Dedektörle farklı oranlardaki Rennet – Polimer çözeltilerinin enjeksiyonları sonucu elde edilen değerler Çizelge 3.32, Çizelge 33 ve Çizelge 3.34’de verilmiştir.

Çizelge 3.32 RI dedektör’de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Rennet’e ait sonuçları

Polimer - Rennet oranı ( $n_{DSA}/n_R$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	16,730	19803	601
1	100	16,763	18504	568
3	100	16,746	13228	501
5	100	16,606	17130	638

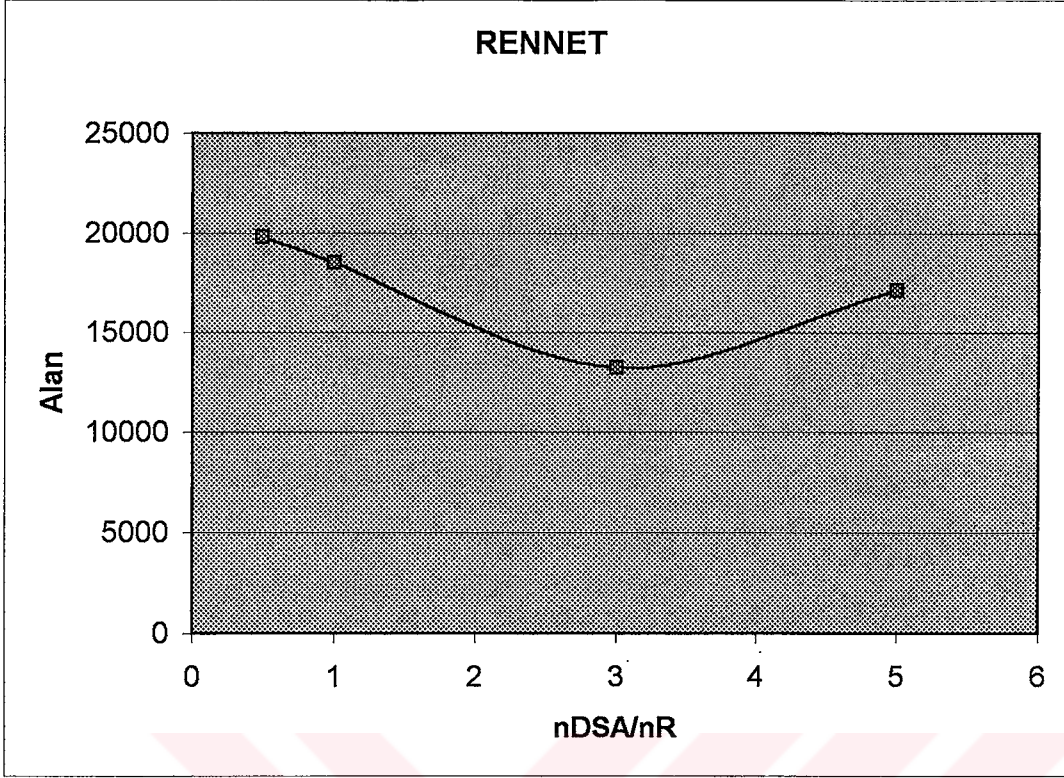
Çizelge 3.33 RI dedektör’de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Polimer’e ait sonuçları

Polimer - Rennet oranı ( $n_{DSA}/n_R$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	19,258	27149107	638375
1	100	19,261	27801965	643097
3	100	19,236	28193139	638260
5	100	19,225	27853518	633116

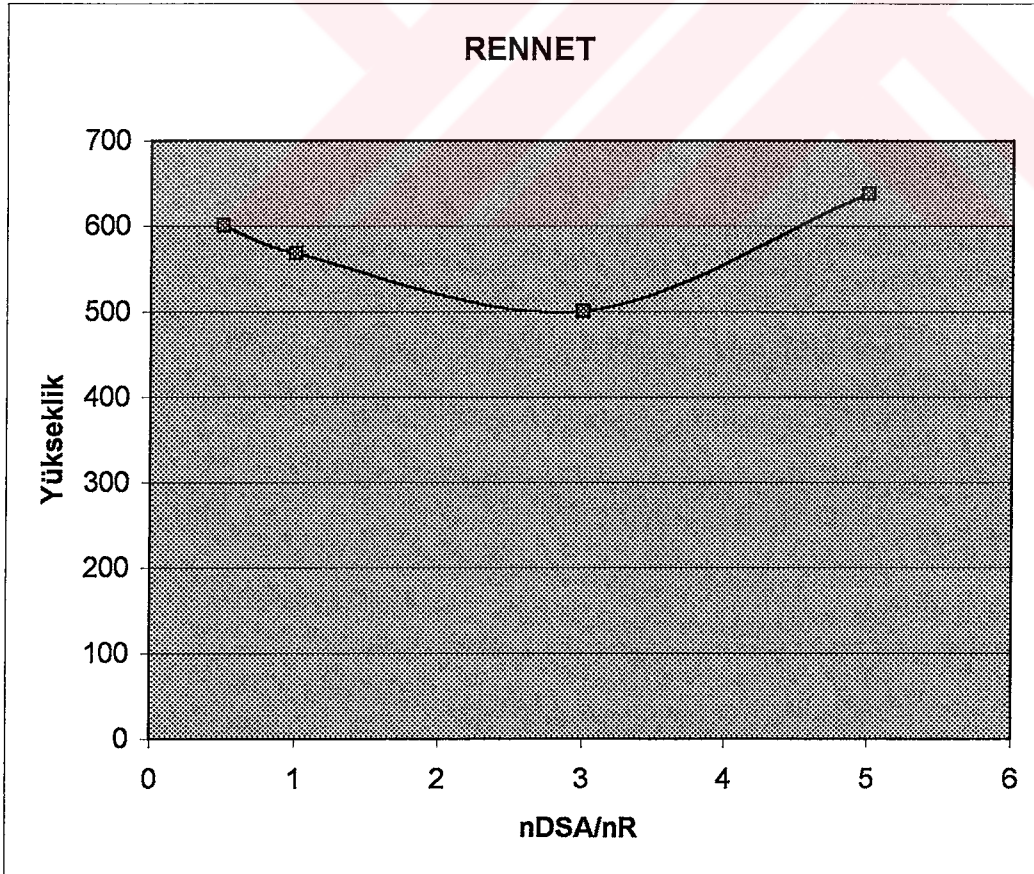
Çizelge 3.34 RI dedektör’de elde edilen Rennet - Polimer kromatogramlarının Konjugat’a ait sonuçları

Polimer - Rennet oranı ( $n_{DSA}/n_R$ )	Enjeksiyon hacmi ( $\mu\text{L}$ )	Alıkonma Zamanı (dak.)	Alan	Yükseklik
0,5	100	10,231	1034890	15148
1	100	10,586	2056678	27681
3	100	10,575	5956682	50507
5	100	11,108	9373191	65037

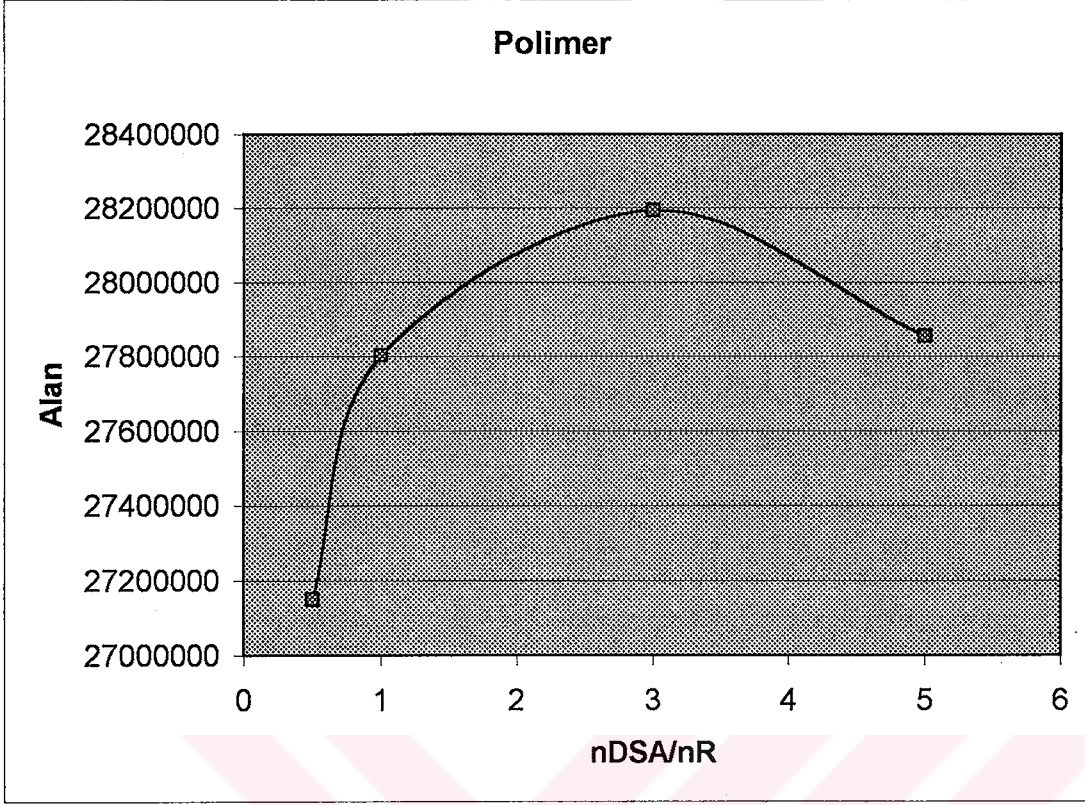
Elde edilen sonuçlardan faydalanarak Polimer-Rennet oranına karşı Rennet alanı grafiği (Şekil 3.150), Polimer-Rennet oranına karşı Rennet yüksekliği grafiği (Şekil 3.151), Polimer-Rennet oranına karşı Polimer alanı grafiği (Şekil 3.152), Polimer-Rennet oranına karşı Polimer yüksekliği grafiği (Şekil 3.153), Polimer-Rennet oranına karşı Konjugat alanı grafiği (Şekil 3.154), Polimer-Rennet oranına karşı Konjugat yüksekliği grafiği (Şekil 3.155) elde edildi.



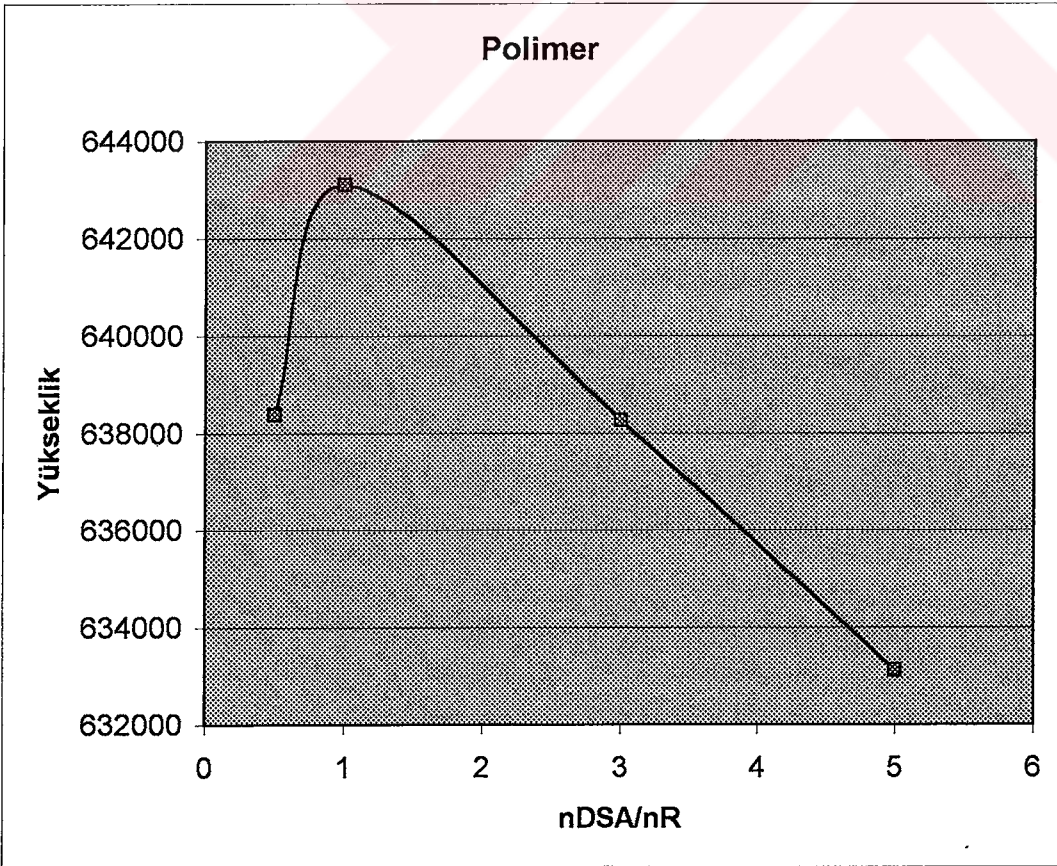
Şekil 3.150 Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Rennet alanı grafiği



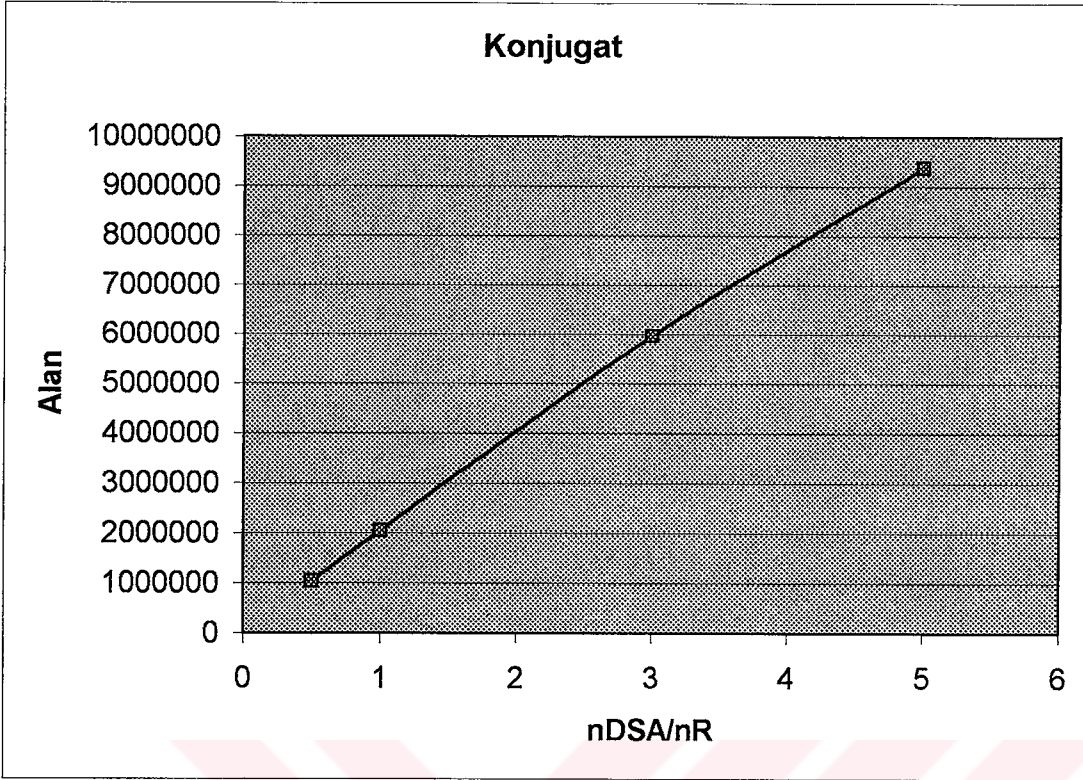
Şekil 3.151 Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Rennet yüksekliği grafiği



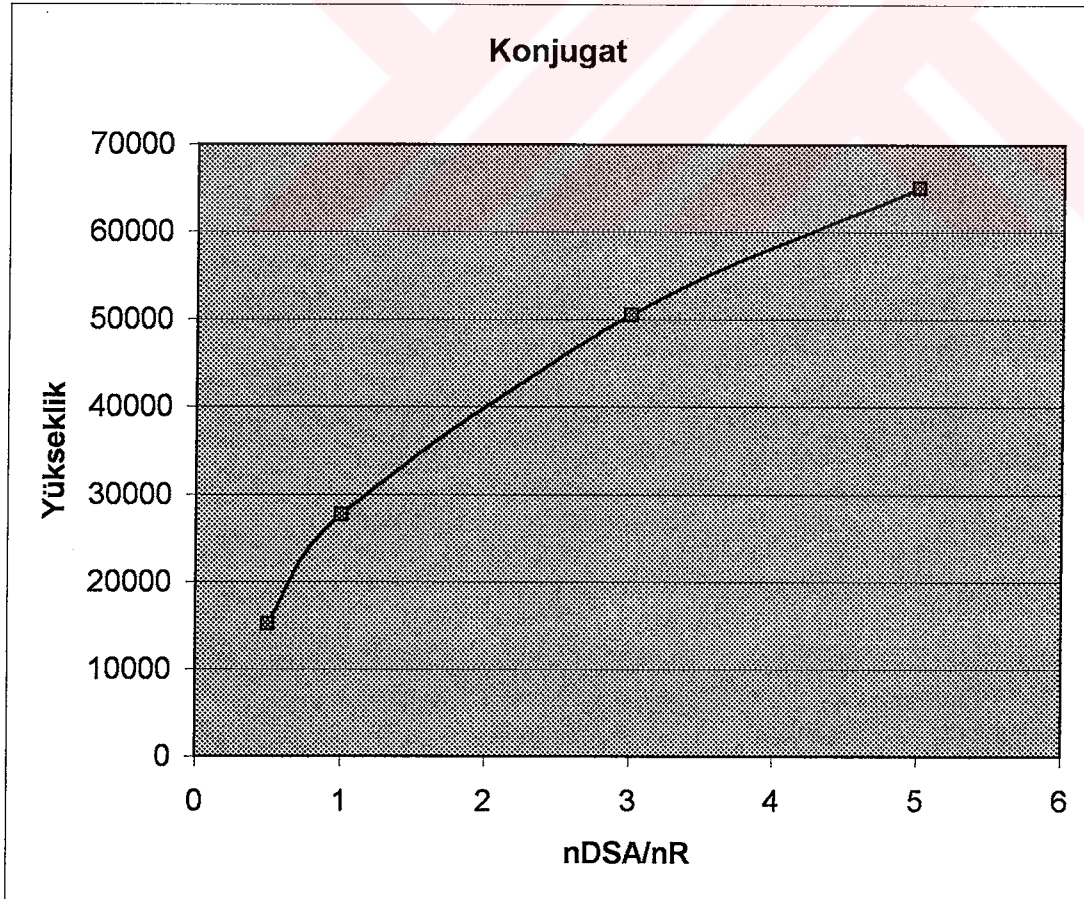
Şekil 3.152 Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Polimer alanı grafiği



Şekil 3.153 Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Polimer yüksekliği grafiği



Şekil 3.154 Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Konjugat alanı grafiği



Şekil 3.155 Polimer : Rennet oranı'na karşı RI dedektör'de elde edilen Konjugat yüksekliği grafiği



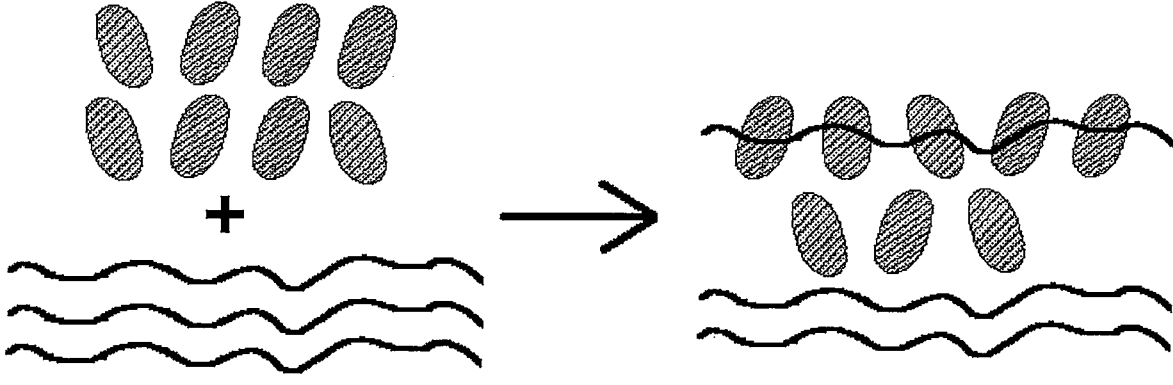
#### 4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Grafiklerde görüldüğü gibi UV dedektör ile ulaşılan sonuçlar RI dedektörden alınan sonuçlardan farklıdır. Polimer pikinden önce alınan pikin hem alanı hem de yüksekliği UV dedektör ile ölçüldüğünde enzimin karışımdaki miktarı arttıkça artış göstermektedir. Fakat bu artış RI dedektör ile yapılan çalışmalarda tespit edilmemektedir. Bu iki sonuç polimerin enzimle bağlandığının bir kanıtıdır. Enzim miktarı arttırıldığında UV dedektörde hem enzime ait pikin hem de polimere ait pikin artış gösterdiği görülmüştür. RI dedektöründe ise alınan sonuçlar molekül sayısı ile bağlantılı olduğundan enzim artış gösterirken polimer sabit kalmaktadır. Bu durum polimer'in protein ile bağlanma mekanizmasında bir polisakkarid molekülüne ardarda birkaç proteinin bağlandığını gösterir.

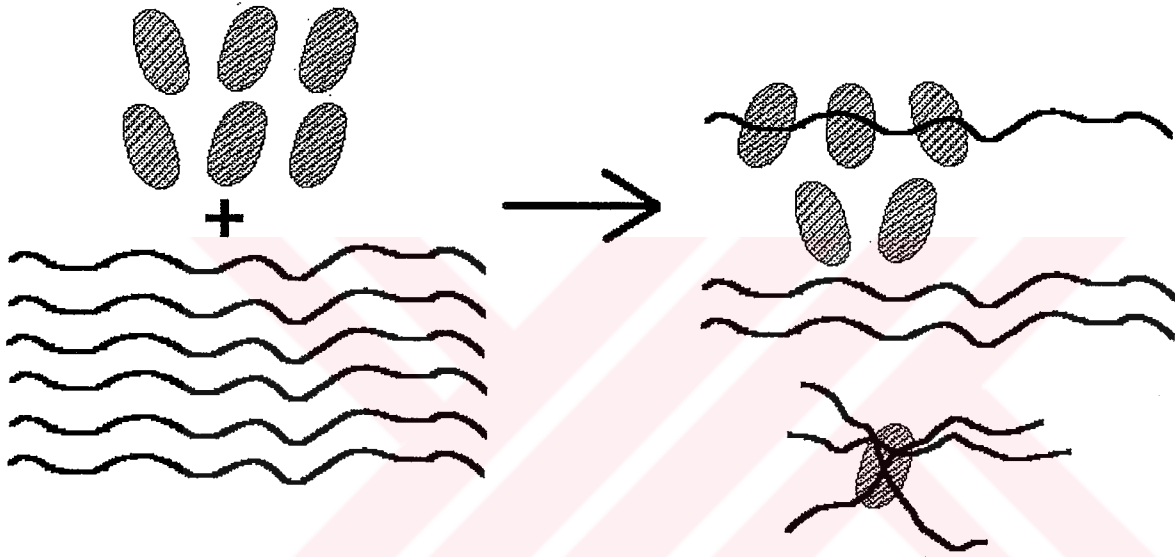
Ayrıca sistemde kovalent konjugasyon oluşması hakkında, enzimin saf halde verildiğinde ve polimerle karışık halde verildiğinde aynı yerde çıkan piklerden elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak grafikler hazırlanmışlardır. Bu grafiklerde görüldüğü gibi enzim gerçekten de polimerle bağlanmıştır. Ancak UV'den alınan sonuçlarda yaklaşık %50'si bağlanıyorsa, RI dedektörden alınan sonuçlardan yaklaşık tüm protein moleküllerinin reaksiyona girdiğini görülmektedir. Bu sonuçların değerlendirilmesi için ek deneylere ihtiyaç olmasına rağmen bir farklarının iki farklı deteksiyon yönteminden kaynaklandığını söyleyebilirim.

Diğer bir bulgu olarak polimerin sabit enzimin değişken olduğu sistem ile enzimin sabit polimerin değişken olduğu sistem karşılaştırıldığında reaksiyonun gidişinin sistemdeki enzim ve polimer oranına bağlı olduğu söylenebilir. Polimerin sabit enzimin değişken olduğu yani enzimin polimerden fazla olduğu sistemlere ait kromatogramlar incelendiğinde ortamda üç farklı komponentin olduğu açıkça görülmektedir: bağlanmamış enzim, bağlanmamış polimer ve lineer enzim-polimer konjugatı. Buradaki konjugat lineer yapıdaki bir polimer üstüne kovalent olarak bağlanmış birçok enzimden oluşmaktadır. Enzimin sabit polimerin değişken olduğu yani polimerin enzimden fazla olduğu sistemlere ait kromatogramlar incelendiğinde ise ortamda 4 farklı komponentin olduğu görülmektedir: bağlanmamış enzim, bağlanmamış polimer, lineer enzim-polimer konjugatı ve bir enzime birden fazla polimerin bağlandığı ve molekül ağırlığı diğer üç komponente göre çok daha büyük olan enzim-polimer konjugatı.

Elde edilen verilerden yola çıkarak reaksiyonun oluşumu hakkında aşağıdaki modeller geliştirilmiştir:



Şekil 4.1 Enzimin polimerden fazla olduğu sistemde oluşan reaksiyon modeli



Şekil 4.2 Polimerin enzimden --fazla olduğu sistemde oluşan reaksiyon modeli

Bu çalışmayla ilk kez iki farklı deteksiyon yöntemli HPLC analizi uygulanarak aldehit dekstran sülfatın hem  $\alpha$ -amilaz hem de rennet enzimleri ile suda çözünebilen kovalent konjugatlar oluşturduğu kanıtlanmıştır. Reaksiyonun gidişinin componentlerin oranına bağlı olduğu ve konjugat moleküllerinin gerek saf enzim ve gerekse de polisakkarit molekülünü içerdiğini söylemek mümkündür.

**KAYNAKLAR**

Abdel Malak. A.C. (1992), 'calf Chymosin as a Catalyst of Peptide Synthesis', *Biochem.J.*, 288:941-943

Barach J. ,(1985), 'What'S New in Genetic Engineering of Dairy Starter Cultures and Dairy Enzymes' , 39(10):73

Berger,E.G. ,Buddecke E. ,Kamerling, J.P., Kobata A.,Paulson, J.C. ve Veliegenthart J.R.G, (1982) 'Structure, biosynthesis, and functions of glycoprotein glycans' *Experientia*,38:1129

Browv.D.E.,Wynne G.M.,Clarke J.A. ve Yada Y.R. (1990) 'Prufication of Two Fungal Aspartic Proteinsases Using Fast Protein Liquid Chromatography',*Agric.Biol.Chem* ,54(6):1563-1565

Chadborn.N. ,Brynt.J.,O'Shea.P.,(1999) 'Ligand-depent Conformatiaonal of Serum Albumin Revealed by Tryptophan Fluorescence Quenching' *Biophysical Journal*, 76:2198-2207

Dalgleish D.G.,(1982) 'Devolopments in Dairy Chemistry -1' Fox P.F.,EdAppleied Science,New York 157-187

Demchenko A.P. ,(1996) 'Ultraviolet Spectroscopy of Proteins' SpringerVarlag,Heidelberg.

Demirci M.,/1996) 'Her Yönüyle Peynir', Hasan Yayıncılık, İstanbul

Dennis A. Cornelius ve Elkbart,Ind. (1982) 'Procces For Decreasing The Thermal Stability of Microbial Rennet' ,United States Patent No: 4,348,482

Fox P.F ,(1987) 'Cheese Chemistry, Physics and Microbiology' Elsevier Applied Science Publisher , London and New York

Fox P.F ,(1987) 'General and Molecular Aspects of Rennets' Elsevier Applied Science Publisher , London and New York

Harris E.L.V. VE Angal.S. (1989) 'Protein Prufication Methods a Partical Approach,Oxford University Press

Holmes D.G. ve Ernstrom A.C., (1973) 'Distribution of Milk-Clotting Enzymes between Curd and Whey,and their Survival During Cheddar Cheese Making' *J.Dairy Sci.* 56:622(Abstr)

Hysolp D.B., Swanson A.M. ve Lund D.B.,(1979) 'Heat Inactivation of Milk-Clotting Enzymes at Different pH' *Journal of Dairy Science* 62(8):1227-1232

Lagnarge A.Paquet,D.ve Alais C. (1980) 'Comparative Study of two *Mucor miehei* Acid Proteinase Prufication and some Molecular Properties' *İnt.J. Biochem.* ,11:347

Lakowicz J.R. (1986) 'Principles of Fluorescence Spectrscopy Plenum Press' New York

Mustafaev M.L. (1996) 'Biyopolimerler' Marmara Araştırma Merkezi, Gebze

Ottesen M. VE Rickrt W. (1970) ' The Isolations and Partial Characterization of an Acid Protease Produced by *Mucor miehei*' *Compt.Rend. Trav. Lab. Calsberg.*, 37:301

Pszczola E.D. (1989) 'Rennet containing %100 Chymosin Increases Cheese Quality and Yield' *Food Technology*, 84-89

Rickert W.S ve Mc Bride-Waren P.A. (1975) ' Acid Proteases From Species of *mucor* II. Partial Characterization of Acid Protease Produced by Strain of *Mucor miehei* Isolated in Cuba' *Can.J.Biochem.*53:269

Schwimmer S.(1981) ' Source Book of Food Enzymology the Avi Publishing Company Inc. Westport, Connetticult.

Scoot R. (1981) 'Cheesemarking Practice' Vol.2. ,Applied Science Publisher, London

Smith J.L. ve Yada R.Y (1991) 'Charaterization of two Aspartyl Proteinases from a Commercial Fungal (*Mucor miehei* ) Rennet' *Can.Inst.Food Sci.Technol.J.* 24(1/2):48-56

Sternberg M.Z. (1971) 'Crystalline Milk-Clotting Protease from *Mucor miehei* and Some of its Properties' *Journal of Dairy Science* 54(2):159-167

Sven B-J, Palle S., Peter E.,(1986) 'Method for Thermal Destabilization of Microbial Rennet', United States Patent No: 4,591,565

Turhan M., Mutlu M., (1997) 'Kinetics of caseins/chymosin hydrolysis' *Milchwissenschaft*,52(10):559-563

Van Hooydonk A.C.M. ve Walstra P. (1987), 'a Consistent Model for the Clotting of Milk by Rennet; aReply to a Comment' *Neth.Milk. Dairy. J.* ,41:293-295

Voynick I.M. ve Fruton J.S. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,68,257-258

Visser S.,Slanger J ve Van Rooijen (1987)'Peptide Substrate for Chymosin (Rennin)' *Biochem J.*,244:553-558

Yada Y.R ve Nakai S. (1986) 'Use of Principal Component Analysis to Study the Relationship between Physical/Chemical Properties and the Milk-Clotting to Proteolytic Activity Ratio of Some Aspartyl Proteinases' *J.Agric.Food.Chem.* 34:675-679

Yada Y.R ve Nakai S. (1986) ' Secondary Structure of Some Aspartyl Proteinases' *Journal of Food Biochemisrty*, 10:155-183

Yoshitaka K.,Susumu H.,Hauro M.,Shinjiro I. 'Process for Improving the Quality of Microbial Rennet' United States Patent No: 3,950,221

**ÖZ GEÇMİŞ**

Doğum Tarihi 27.09.1976

Doğum Yeri İstanbul

Lise 1991-1994 Maçka Anadolu Teknik Lisesi, İstanbul

Lisans 1994-1998 Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fak.  
Kimya Bölümü, İstanbul

Yüksek Lisans 2000-Devam ediyor Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Ens.  
Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Prog.

**Çalıştığı Kurumlar**

2000-Devam ediyor Tübitak Marmara Araştırma Merkezi  
GBTAE-MegaLab

