

168448

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SELÜLAZ-DEKSTRAN KONJUGATLARININ  
İNCELENMESİ

Kimyager Lütü KARAGÖZ

F.B.E. Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında  
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Huriye KUZU (YTÜ)

Doc. Dr. Zuhal Turgut

Prof. Dr. Huriye Kuzu

İSTANBUL, 2005

Yar. Doç. Dr. Zeynep Akdeste

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ .....	iv
KISALTIMA LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Kromatografi .....	2
2.1.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi .....	2
2.1.2 Moleküler Eleme Kromatografisi (SEC, Size Exclusion Chromatography).....	4
2.2 Elektroforez .....	5
2.2.1 Denatüre Edici Koşullar Altında Elektroforez (SDS-PAGE) .....	7
2.3 Selülaz .....	7
2.4 Dekstran.....	11
2.5 Enzimle kimyasal modifikasyonu .....	12
3. MATERYALLER .....	13
3.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler .....	13
3.2 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri.....	14
3.3 Kullanılan Viscotek Marka GPC sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	14
3.4 Kullanılan UV-Vis spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri ....	15
3.5 Kullanılan Protein Ayrıştırma Cihazının Teçhizat ve Çalışma Parametreleri.....	16
3.6 Kullanılan Kimyasallar.....	16
4. DENEYESEL ÇALIŞMA .....	18
4.1 Dekstran Sülfatın Aldehid Türevinin Eldesi .....	18
4.2 Aldehid Miktar Tayini.....	18
4.3 Dekstran - BSA Konjugatlarının Elde Edilmesi.....	22
4.4 Selülazın İzoelektrik Noktasının Tayini .....	23
4.5 Enzim (Selülaz) Aktivitesi Tayini .....	23
4.6 Saflaştırma İşlemleri.....	29
4.7 Selülazın SDS-PAGE Elektroforezi.....	30
4.8 Enzim – Polimer konjugatlarının oluşturulması.....	32

4.9	Enzim-polimer fiziksel karışımının oluşturulması .....	33
4.10	Enzim-polimer konjugatlarının aktivite tayini .....	33
5.	SONUÇLAR.....	35
KAYNAKLAR.....		68
ÖZGEÇMİŞ.....		71



## SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	gram
L	litre
ml	mililitre
μ	mikro
μl	mikrolitre
M	Molar
nm	nanometre



## KISALTIMA LİSTESİ.

NaCl	Sodyum klorür
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat
BSA	Bovin serum albumin
K-Na tartarat	Potasyum-Sodyum Tartarat
CMC	Karboksimetilselüloz
DNS	Dinitrosalisilik asid
D	Dekstarn
SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Kalay (II) klorür dihidrat
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Amonyum sülfat
NaOH	Sodyum hidroksid
NaIO <sub>4</sub>	Sodyum periyodat
KBr	Potasyum Bromür
NaBH <sub>4</sub>	Sodyum borhidrür
TEMED	Tetrametil-etilendiamin
SDS	Sodyum dodesil sülfat



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil. 2.1. Bir HPLC sistemi şeması. ....	3
Şekil. 2.2. Maddelerin alıkonma zamanına göre kolondan çıkışları. ....	4
Şekil. 2.3. Moleküler eleme kromatografisi ile kolonda maddelerin molekül boytuna göre ayrılması. ....	5
Şekil 2.1. (A) Selülozun düz poli -1,4-β- glukoz zinciri, (B) Düz selüloz zincirleri arasında yer alan hidrojen bağları. ....	8
Şekil 2.2. Aspergillus niger ailesinin 3 β-glukosidaz reaksiyonları. (Kalın çizgiler hidroliz reaksiyonlarını, ince çizgiler substratın alıcı olduğu reaksiyonları göstermektedir. • kompleks yapıyı, - kovalent bağı belirtmektedir. K <sub>s</sub> substrat dissosiasyon sabiti, K <sub>i</sub> substratın alıcı yerinden dissosiasyon sabiti, k <sub>2</sub> glikolitik yarımlama aşaması hız sabiti, k <sub>3</sub> hidroliz aşaması hız sabiti, k <sub>4</sub> trans glukozidik aşaması hız sabiti.).....	9
Şekil 2.3. Dekstranın açık formülü.....	11
Şekil 4.1. Dekstran'ın aldehidlenme reaksiyonu.....	18
Şekil 4.2. Dekstran için aldehid miktar tayini kalibrasyon eğrisi .....	21
Şekil 5.1. Dekstran ve aldehid türevinin FTIR spektrumu.....	35
Şekil 5.2 Sentezlenen D-CHO türevinin aldehit tayini medodu ile alınan UV (400nm) spektrumu. ....	36
Şekil 5.3. Selülaz enziminin pI değeri grafiği. ....	37
Şekil 5.4. Selülaz enziminin protein saflaştırma cihazından geçerek fraksiyonlara ayrılması sırasında UV dedektör ile okunan kromatogram.....	38
Şekil 5.5. Saflaştırılmış enzimin protein saflaştırma cihazından geçerek fraksiyonlara ayrılması sırasında UV dedektör ile okunan kromatogram .....	38
Şekil 5.6. Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2'nin GPC sistemi Viscotek marka cihaz ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogramları.....	39
Şekil 5.7. Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2'nin GPC sistemi Viscotek marka cihazın kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogramları. ....	40
Şekil 5.8. Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2'nin GPC sistemi Viscotek marka cihazın UV dedektör ile alınan kromatogramları.....	41
Şekil 5.9. Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2'nin GPC sistemi Viscotek marka cihazın viskozite dedektörü ile alınan kromatogramları.....	42
Şekil 5.10. İşlem görmemiş enzim, havuz 1 ve havuz 2'nin HPLC cihazı ile alınan kromatogramları .....	43
Şekil 5.11. Saflaştırma işlemine tabi tutulan selülaz enziminin SDS jel elektroforezi. ....	44
Şekil 5. 12. İşlem görmemiş enzim ile saflaştırılmış enzimin 50 °C'ta değişik pH değerlerinde ölçümü ile elde edilen aktivite grafiği. ....	45
Şekil 5.13. Saflaştırılmış enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 değerlerinde 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C'de ölçülen aktivitelerinin grafiği. ....	46
Şekil 5.14. D-CHO türevinin FTIR spektrumu. ....	47
Şekil 5.15. D-CHO :BSA konjugatının NaBH <sub>4</sub> ile doyurulmadan önceki FTIR spektrumu. ..	48
Şekil 5.16. D-CHO: BSA konjugatının NaBH <sub>4</sub> ile doyurulduktan sonraki FTIR spektrumu. .	49
Şekil 5.17. D-CHO: BSA konjugatının GPC Viscotek marka cihazı ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogram. ....	50
Şekil 5.18. D-CHO: BSA konjugatının GPC Viscotek marka cihaz UV dedektör ile alınan kromatogram.....	51
Şekil 5.19. D-CHO: BSA konjugatının GPC Viscotek marka cihaz ile alınan kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogram.....	52
Şekil 5.20. D-CHO: BSA konjugatının GPC Viscotek marka cihazın viskozite dedektörü ile alınan kromatogram. ....	53

Şekil 5.21. D-CHO:Selülaz kovalent konjugatının 40°C’de, pH 7,2’de 8 saat karıştırma ile sentezlenen konjugatın UV spektrumu. ....	54
Şekil 5.22. D-CHO:Selülaz kovalent konjugatının 25°C’de, pH 7,2’de 42 saat karıştırma ile sentezlenen konjugatın UV spektrumu. ....	54
Şekil 5.23. D-CHO selülaz 1/5 Konjugat 40 °C’de, pH 7,2, 8 saat karıştırma ile elde edilen konjugatın FTIR spektrumu.....	55
Şekil 5.24. D-CHO selülaz 1/5 Konjugat 42 saat,pH 7,2, oda sıcaklığında karıştırma ile sentezlenen konjugatın FTIR spektrumu. ....	56
Şekil 5.25. Sentezlenen konjugatların Viscotek marka GPC cihazı kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogramı. ....	57
Şekil 5.26. Sentezlenen konjugatların Viscotek marka GPC cihazı UV dedektörü ile alınan kromatogram.....	58
Şekil 5.27. Sentezlenen konjugatların Viscotek marka GPC cihazı ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogram .....	59
Şekil 5.28. Sentezlenen konjugatların Viscotek marka GPC cihazı kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogram .....	60
Şekil 5.29. Sentezlenen konjugatların Viscotek marka GPC cihazı UV dedektörü ile alınan kromatogram.....	61
Şekil 5.30. Sentezlenen konjugatların Viscotek marka GPC cihazı ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogram .....	62
Şekil 5.31. Sentezlenen konjugatların HPLC cihazı ile alınan kromatogramları.....	63
Şekil 5.32. Sentezlenen konjugatların HPLC cihazı ile alınan kromatogramı .....	64
Şekil 5.33. D-CHO:Selülaz konjugatlarının ve fiziksel karışımının değişik pH değerlerindeki aktivite grafikleri. ....	65
Şekil 5.34. D-CHO:Selülaz konjugatları ve fiziksel karışımının optimum pH değerlerinde değişik sıcaklıklardaki aktivite grafikleri. ....	66

## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 4.1. D aldehid türevinin içerdiği aldehid miktarı ve $A_{400}$ nm'deki absorbans değerleri.	20
Çizelge 4.2. Glukoz standartlarının hazırlanması. ....	24
Çizelge 4.3. Glukoz standartları. ....	26
Çizelge 4.4. Değişik pH'larda işlem görmemiş ve saflaştırılmış enzimin aktivite değerleri... 28	28
Çizelge 4.5. Saflaştırılmış enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda aktivitesi. ....	28
Çizelge 4.6. Fraksiyonların aktivite ölçüm değerleri. ....	29
Çizelge 4.7. İşlem görmemiş ve saflaştırılmış enzimin, konjugatlar ve fiziksel karışımın aktivite değerleri. ....	34
Çizelge 4.8. Kovalent konjugatların ve fiziksel karışımın optimum pH'da sıcaklığa göre aktivite değerleri. ....	34





## ÖNSÖZ

Tez çalışmamın yanında Y.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya A.B.D. yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren her türlü yardımı sağlayan ve önerileriyle bana yol gösteren tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Huriye KUZU'ya ;

Derin bilgi birikimi ve yenilikçi fikirleri ile bana yol gösteren, Biyomühendislik laboratuvarlarında her türlü imkanı bize sunarak bu tezin ortaya çıkmasında büyük katkıları olan Biyomühendislik A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Mustafa AKDESTE'ye;

Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı Nanoteknoloji ve Biyosensörler laboratuvarı çalışanlarından, gercesini gündüzüne katarak deneylerin başlangıcından tezi teslim edinceye kadar beni yalnız bırakmayan ve bitirmemde büyük katkıları olan değerli arkadaşım YILDIZ ÖZTÜRK başta olmak üzere yardımlarını esirgemeyen Murat TOPUZOGULLARI'na, Namık AKKILIÇ'a, Eray DALGAKIRAN'a, Yasemin BATTAL'a, Özlem ÖZTOLON'a, Aslı ARSLAN'a, Y.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarından Melda ALTIKATOĞLU'na;

Lisans öğrenimim sırasında bana biyokimyayı sevdiren Barbaros NALBANTOĞLU ve İrfan KÜFREVIÖĞLU başta olmak üzere bu aşamaya gelmemde emeği geçen tüm hocalarıma;

Üniversite sınavına girmemde ve bugünlere kadar gelmemde benden maddi ve manevi desteklerini esigemeyen İsmail KARAÇELİK ve V.Hüsnü ÇELEBİÖĞLU başta olmak üzere, bütün dostlarıma;

Sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Kimyager

Lütfi KARAGÖZ

17 Haziran 2005

## ÖZET

Selüloz bitkilerde bulunan başlıca polisakkariddir ve yeryüzünde en çok bulunan biyolojik materyaldir. Ayrıca atıklarda önemli oranda selüloz bulunması, selülozu parçalayan enzimleri önemli kılmaktadır. Selülozu parçalayan enzimler selülazlar olarak isimlendirilmektedir ki bu enzimler üç tür aktivite göstermektedir; (1) endonükleaz (1,4-β-D-4-glukanohidrolaz, E.C. 3.2.1.4) selüloz molekülünün iç kısmında yer alan bağları hidrolizler, (2) sellobiyohidrolaz (1,4-β-D-4-glukan sellobiyohidrolaz, E.C. 3.2.1.91) selüloz zincirinde uçlarda yer alan bağları kırar ve (3) β-glukosidaz (β-D- glukosid glukohidrolaz, E.C. 3.2.1.21) sellobiyoz ve diğer ufak oligosakkaridleri D-glukoza hidrolizler.

Bu çalışmada, ticari önemi olan selülaz türlerinden *Aspergillus niger*'den elde edilen selülaz kullanıldı. Satın alınan enzim Sephadex G-50 kolonundan geçirilerek saflaştırıldı. Farklı pH ve sıcaklık değerlerinde aktivite tayini yapılarak optimum pH ve sıcaklık değeri belirlendi.

Dekstran'a enzimi kovalent olarak bağlamak için sodyum periyodat ile yükseltgeyerek aldehid türevi elde edildi. Dekstran aldehid türevinin oluştuğu FTIR spektroskopisi ile kontrol edildi. Dekstranda oluşan aldehid grubu sayısını tayin için spektrofotometrik yöntem geliştirildi. Polimerin proteine bağlanması BSA ile ön çalışma yapılarak kontrol edildi. Oluşan konjugat FTIR ve GPC cihazında incelendi. Bunu takiben selülazın polimer ile bağlanma reaksiyonu gerçekleştirildi. Oluşan konjugat FTIR, GPC, HPLC cihazlarında incelendikten sonra farklı pH ve sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapıldı, ve alınan sonuçlar saf enzim ile elde edilenler ile kıyaslandı. Aynı yöntemler kullanılarak, polimer ile enzimin fiziksel karışımı da incelendi.

Sonuç olarak, enzim-dekstran fiziksel karışımı ve enzim-dekstran kovalent konjugatları enzime kıyasla pH 3-7 aralığında daha yüksek aktivite gösterdi. Fiziksel karışım ve kovalent konjugatlar optimum pH 3'te bütün sıcaklıklarda saf enzime göre daha yüksek aktivite verdi.

**Anahtar kelimeler:** *Aspergillus niger* selülaz, selülaz-dekstran konjugatları, aktivite, GPC, FTIR, HPLC.

## ABSTRACT

Cellulose is the major polysaccharide in plants and is most abundant biological material on earth. In addition to this great amounts of wastes include cellulose, because of this reason cellulose-degrading enzymes become very important. Cellulose-degrading enzymes, which exhibit three types of activities are called as cellulases. (1) Endonuclease (1,4- $\beta$ -D-4-glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.4) hydrolyse internal bonds in cellulose molecule. (2) Cellobiohydrolase (1,4- $\beta$ -D-4-glucan cellobiohydrolase, E.C. 3.2.1.91) hydrolyse terminal bonds and (3)  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) cellobiose and little oligosaccharides to D-glucose.

In this study, cellulase from *Aspergillus niger* was examined. In this study dextran is oxidated to its aldehyde derivative by using  $\text{NaIO}_4$ . The amount of aldehyde groups at dextran molecule was determined. Dextran aldehyde derivative was bonded to BSA first. The obtained conjugate was examined using FTIR and GPC techniques. The purchased cellulase was purified by using size exclusion column chromatography with Sephadex G-50, and PBS buffer, pH 7.2. Dextran-cellulase covalent conjugates were synthesized and the covalent bonding was confirmed using the techniques mentioned above. The activities of the purified enzyme, dextran enzyme mixtures and dextran-enzyme covalent conjugates were determined at different pH and temperatures.

It was observed that, dextran-enzyme mixtures and covalent conjugates showed higher activities than pure enzyme between pH 3-7. Dextran-enzyme mixtures and especially covalent conjugates showed higher activity between 25 °C and 80 °C at pH 3.

**Key words:** *Aspergillus niger* cellulase, cellulase-dextran conjugates, activity, GPC, HPLC, FTIR.

## 1. GİRİŞ

Doğada en fazla bulunan polimer olan selüloz, düz poli -1,4- $\beta$ - glukoz zincirlerinden oluşmaktadır. Selüloz en fazla bitkilerin hücre duvarlarında yapıyı oluşturan başlıca bileşen olarak bulunmaktadır. Bitki hücre duvarlarının oldukça kompleks yapısı, selüloz ile birlikte ksiloglukanlar, hemiselüloz, pektin ve proteinleri de içermektedir.

Selülozu parçalayan enzimler selülazlar olarak isimlendirilmektedir ki bu enzimler üç tür aktivite göstermektedir; (1) endonükleaz (1,4- $\beta$ -D-4-glukanohidrolaz, E.C. 3.2.1.4) selüloz molekülünün iç kısmında yer alan bağları hidrolizler, (2) sellobiyohidrolaz (1,4- $\beta$ -D-4-glukan sellobiyohidrolaz, E.C. 3.2.1.91) selüloz zincirinde uçlarda yer alan bağları kırar ve (3)  $\beta$ -glukosidaz ( $\beta$ -D- glukosid glukohidrolaz, E.C. 3.2.1.21) sellobiyoz ve diğer ufak oligosakkaridleri D-glukoza hidrolizler.

*Aspergillus* türlerinin  $\beta$ -glukosidazlar için iyi bir kaynak olduğu ve *Aspergillus niger*'in mikroorganizmalar içinde bugüne kadar bilinen en etkili  $\beta$ -glukosidaz üreticisi olduğu bilinmektedir. Shoseyov ve çalışma arkadaşlarının *A. niger*'den tanımladıkları  $\beta$ -glukosidaz B1 (CMI CC324626) düşük pH'da ve yüksek konsantrasyonda alkol içeren ortamda çalışmaktadır. *A. niger*'den molekül tartısı (116-137 kDa), izoelektrik noktası (pI 3.8-4) ve optimum pH aralığı (3.4-4.5) farklı bir diğer  $\beta$ -glukosidaz da saflaştırılmıştır. pH aktivite profilinin kesin pH optimumları enzim kaynağına göre değişmektedir. Glukosidazlar için, amino asid dizilimlerdeki benzerlikler dikkate alınarak 2000'in üzerinde farklı enzim içeren 77 farklı enzim ailesi (grup) belirlenmiştir.

Daha kararlı enzim elde etmek üzere, *Aspergillus niger* selülazın yükseltgenmiş haldeki dekstran ile konjugasyonu sağlandı. Elde edilen konjugatın saf enzime oranla daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Konjugatların GPC kromatogramlarında değişme meydana geldiği gözlemlendi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kromatografi

Kromatografi, bir karışımın bileşenlerinin gaz veya sıvı bir hareketli faz ile sabit faz üzerinde hareket ettirilmesi sırasında bu bileşenlerin farklı hızlarda göç etmeleri sonucu meydana gelen ayırma işlemidir.

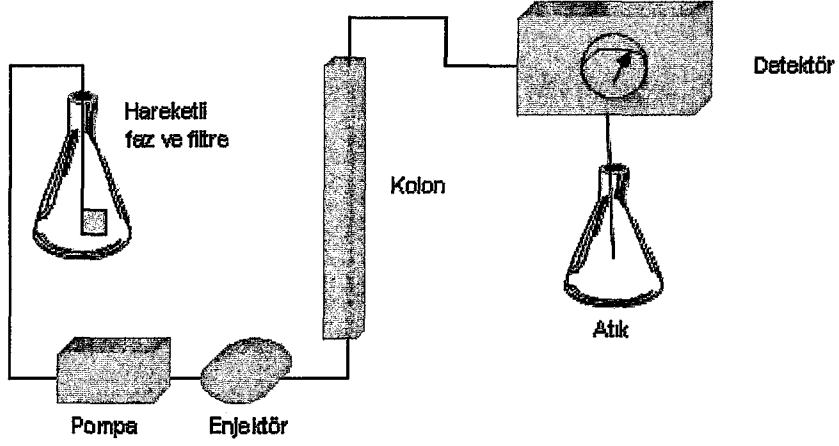
Bütün kromatografik ayırmalar, maddelerin mobil faz ve sabit faz arasındaki dağılıma oranına bağlıdır. İki faz arasındaki dağılım; dağılım katsayısıyla tanımlanmaktadır. Bir maddenin, sabit bir sıcaklıkta, farklı iki çözücü arasındaki dağılım katsayısı sabittir

$$K_d = \frac{\text{Maddenin A fazı içindeki konsantrasyonu}}{\text{Maddenin B fazı içindeki konsantrasyonu}} \quad (2.1)$$

Kromatografide sabit faz genelde bir kolon içinde bulunmaktadır ve mobil faz bu dolgulu kolonun içinden akmaktadır. Kromatografide daima iki faz arasında bir dağılım söz konusudur. Bu fazlardan biri sabitken diğeri bu fazın üzerinden akıp giden hareketli fazdır. Sabit faz katı, sıvı veya sıvıyla kaplanmış bir katı olabilir. Mobil fazın akışkan olması gerektiğinden, sıvı veya gaz halinde olabilir. Dağılım her zaman aynı mekanizmayla olmak zorunda değildir. Örnek olarak adsorpsiyon, iyon değiştirme, afinite vb. etkileşimler verilebilir.

#### 2.1.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Çok ufak tanecikli sabit fazın üzerinden yüksek basınçta hareketli fazın yürütülmesi ile gerçekleştirilen bir kromatografi türüdür.



Şekil. 2.1. Bir HPLC sistemi şeması.

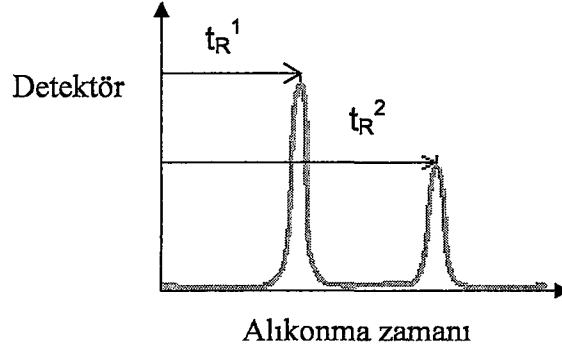
Pompa hareketli fazın istenen basınç ve akış hızında kromatografi sistemine verilmesini sağlamaktadır. Kullanılan kolonların dayanabildikleri maksimum basınç değerleri bulunmaktadır ve bu basınç değeri aşırsa kolon bozulmaktadır. Akış hızını ayarlama sebebi ise karışım bileşenlerinin uygun şekilde ayrılmalarını olanak sağlamaktadır. Akış hızı düşük olduğunda karışım kromatografi sisteminde daha uzun süre tutulacak ve daha iyi bir ayırma sağlanacaktır, ancak bu durumda da çalışma süresini uzatacaktır. Bu nedenle optimum akış hızı ile çalışmak gereklidir. Karışım hareketli faza enjektör ile verilmektedir.

Karışımı çözmekte kullanılan çözücü hareketli faz ile uyumlu olmalıdır. Polarlıkları yakın olmalı, çökme, bulanıklık meydana gelmemelidir. Kolonlar kromatografik ayırmanın gerçekleştiği HPLC parçasıdır.

Kolondan çıkan ayrılmış maddeler detektöre girerler. Burada miktarlarına ve belli çeşitli özelliklerine göre cihaz tarafından saptanırlar. Bir HPLC sisteminde kullanılabilen detektörleri seçici ve seçici olmayan detektörler olarak ikiye ayırabiliriz. Seçici detektörler sadece belli maddelere cevap verirler. Örneğin floresans detektörü sadece floresans özelliği olan maddeleri saptarlar. Seçici olmayan detektörler ise genel uygulamalı detektörlerdir ve çok sayıda maddeyi saptayabilirler.

HPLC’de detektörden geçen herbir madde kromatogramda bir pik olarak gözlenecektir.  $t_R^1$  ve  $t_R^2$  değerleri herbir maddenin alıkonma zamanını göstermektedir. Alıkonma zamanı bir maddenin kolon içinde ne kadar süreyle kaldığını gösteren bir değerdir. Kromatogramdaki pikler dışında kalan kısımlar hareketli fazı göstermektedir ve “baseline” adını almaktadır. Alıkonma zamanı dakika olarak verilmektedir. Bazı hallerde alıkonma zamanı yerine alıkonma hacmi de kullanılmaktadır. Bu durumda okuduğumuz değer maddenin, hareketli

fazın kaçınıcı mililitresinde kolondan çıktığını göstermektedir. Piklerin kapladıkları alanlar maddelerin miktarları ile orantılıdır.



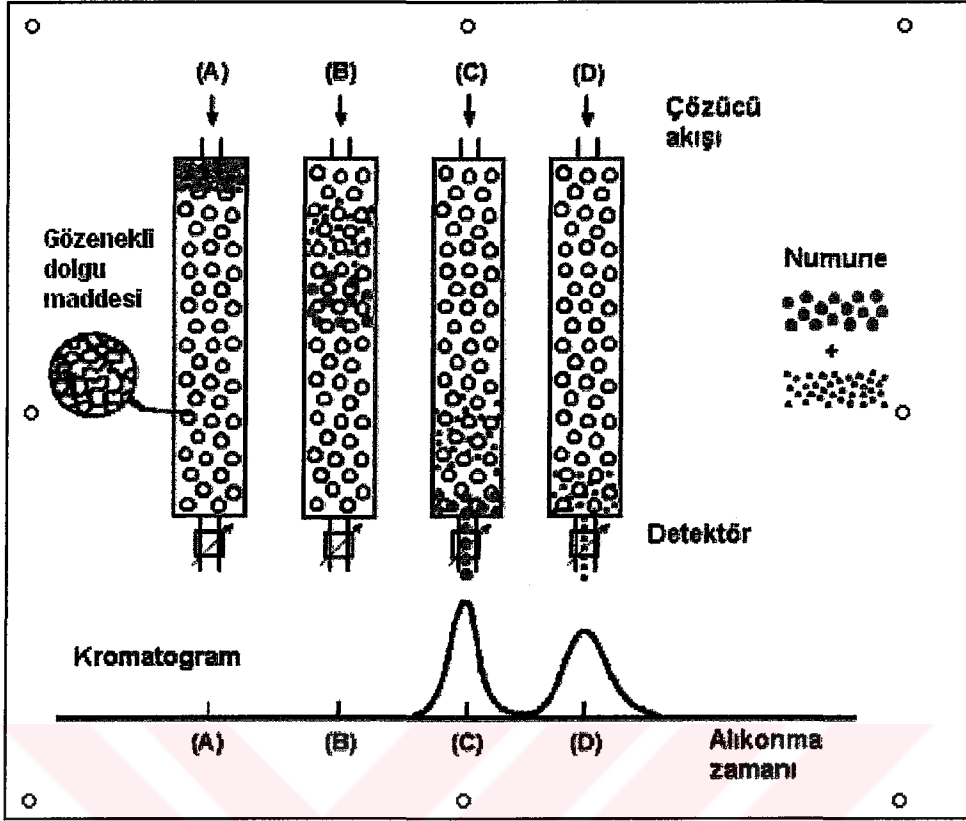
Şekil. 2.2. Maddelerin alıkonma zamanına göre kolondan çıkışları.

HPLC'yi kolon içinde gerçekleşen ayırma mekanizmalarına göre aşağıda verildiği gibi sınıflandırılabilir.

- a) Normal faz kromatografisi:
- b) Ters faz kromatografisi
- c) İyon değiştirme
- d) İyon çifti kromatografisi
- e) Moleküler eleme kromatografisi
- f) Afinite kromatografi

### 2.1.2 Moleküler Eleme Kromatografisi (SEC, Size Exclusion Chromatography)

Polimerlerin HPLC'de ayrılmasında bu kromatografi türü kullanılmaktadır. Bu kromatografi türünde sabit faz olarak belirli büyüklükte gözenekleri olan çapraz bağlı polimerler kullanılmaktadır. Polimerler farklı boyutlarda molekülleri içermektedir. Polimer çözeltisinde, herbir polimer molekülü boyutuna bağlı olarak farklı hidrodinamik çapa sahip olacaktır. Bu polimer molekülleri boyut esasına göre birbirinden moleküler eleme kromatografisi ile ayrılabilir (Skoog, D., A., 1992, Vijayalakshmi, M., 2002, Pasch, H.,1999, Gündüz, T.,1993).



Şekil. 2.3. Moleküler eleme kromatografisi ile kolonda maddelerin molekül boytuna göre ayrılması.

## 2.2 Elektroforez

Elektroforez, elektrik yüklü partiküllerin elektrik alanında zıt yüklü elektroda göç etmesini esas almaktadır. Pozitif yük taşıyan tanecikler katoda (negatif elektrod), negatif yük taşıyan tanecikler anoda (pozitif elektrod) doğru göç eder. Biyolojik moleküllerin ayrılmasında geniş ölçüde kullanılan bir yöntemdir. Bu göç etme bazı faktörlerden etkilenir;

- Yükün büyüklüğü: Net yük arttıkça moleküller daha hızlı hareket eder.
- Molekülün büyüklüğü: Büyük moleküller daha yavaş hareket etmeye eğilimlidirler.
- Destek ortamının özellikleri: Küçük gözenekli destek ortamları moleküler elek gibi davranmaktadır. Destek ortamının viskozitesindeki artma, akışkanlığı ve bunun yanında adsorbsiyonu yavaşlatır.
- Elektrik alanın büyüklüğü: Voltajın artması göç hızını artırır.



- Endosmoz: Destek ortamına özgü olarak, ayrılan moleküllerin akışına ters yönde çözünen ve çözücü moleküllerinin hareketi ile sonuçlanır.
- Tamponun iyonik gücü: Tamponun iyonik gücü düşük olduğunda göç daha hızlı gerçekleşir.
- Sıcaklık: Sıcaklığın yükselmesi, göç hızını arttırmaktadır.

E elektrik alan şiddetinde, q yükünü taşıyan partiküle, F elektriksel kuvveti uygulanır.

$$F = q.E \quad (2.2)$$

Hareket sırasında bu partikül,

$$F_{\text{sürtünme}} = V.f \quad (2.3)$$

Olan sürtünme kuvvetinin de etkisindedir.

$$V = \text{hız}$$

$$F = \text{sürtünme katsayısı}$$

Bu iki kuvvet birbirine zıt yöndedir. Sabit elektrik alanda bu iki kuvvet birbirini dengelediğinde ( $F_{\text{elekt.}} = F_{\text{sürt.}}$ ) partikül sabit hızla hareket eder.

$$q.E = V.f \quad (2.4)$$

$$V / E = \mu = q / f \quad (2.5)$$

Yüklü partiküllerin birbirinden ayrılması akışkanlıklarına bağlıdır. Yüklü moleküllerin elektrik alanda hareketi molekülün yük / kütle değeri ile ilgilidir.

İzoelektrik noktalarında (pI) protein moleküllerinin + ve - yükleri eşit olduğundan, bu moleküller belirtilen koşulda elektrik alanda hareketsiz kalırlar. İzoelektrik noktanın dışındaki pH'larda protein molekülleri + veya - elektrikle yüklenirler ve yüklerinin yoğunluğuna bağlı olarak göç ederler. Genelde örnekler, bir destek maddesi üzerinde göç ederler. Bu matris kağıt, selülez asetat, nişasta jeli, agaroz veya poliakrilamid jel olabilir. Proteinlerin ayrılması amacıyla bir çok elektroforez tekniği bulunmaktadır. Bunlar boyut, net yük ve hidrofobiklik gibi üç ana özelliğin birinin ya da üçünün kombinasyonunu esas almaktadır. Doğal koşullarda (native) elektroforez çözünen proteinlerin biyolojik özelliklerinin kaybolmadan anizlenmesinde kullanılır. Aktivitelerini koruyarak anizimlerin analizi doğal elektroforez ile yapılabilmektedir. Buna karşın daha sert ve denatüre edici koşullar daha az çözünür

proteinlerin analizinde kullanılır. Önemli bir uygulama olan, SDS varlığında gerçekleştirilen poliakrilamid jel elektroforezinde proteinler moleküler büyüklüğe göre ayrılır karakterize edilirler. Protein saflaştırmada diğer önemli yöntem ise izoelektrik noktalara göre ayırım yapan izoelektrik fokuslamadır.

Protein saflaştırmada poliakrilamid jel elektroforezi; protein saflığının kontrolü, fraksiyonlama, saf proteinin alt birim yapısının incelenmesi, molekül kütlesi tayini, izoelektrik nokta tayini, izoenzimlerin belirlenmesi gibi kullanım alanlarına sahiptir. Elektroforetik metodların dikkate değer dezavantajı ise, diğer saflaştırma yöntemlerine göre daha zaman alıcı olmasıdır. Ancak son yıllarda son derece popüler olan minyatür elektroforez sistemleri nin kullanımı ile bu probleme çözüm getirilmiştir.

### 2.2.1 Denatüre Edici Koşullar Altında Elektroforez (SDS-PAGE)

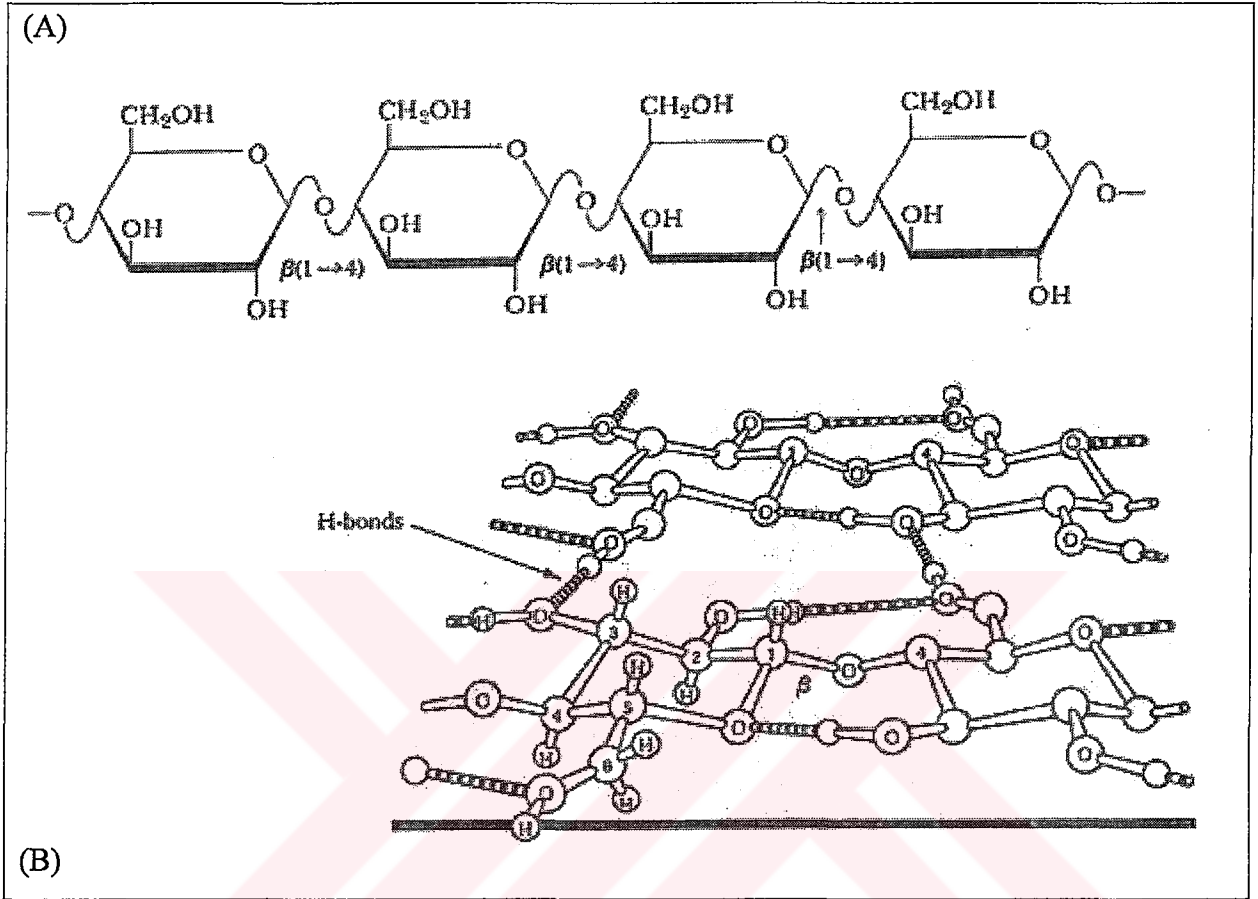
SDS anyonik bir deterjandır. Proteinin net yükünü maskeler ve negatif yüklü SDS molekülleri protein molekülünü kaplar. Protein negatif yükü kaplanmış olur. Elektroforetik ayırma artık yüke göre değil sadece etkin moleküler kütleyle bağlıdır. SDS-PAGE uygulanacak örnekler merkaptotanol, SDS-bromfenol blue ve sükröz veya gliserol içeren tamponla muamele edilir. Merkaptotanol; proteinin tersiyer yapısını bir arada tutan disülfid bağlarını indirger, SDS ise proteini denatüre ederek proteinin doğal yapısını bozar ve molekülü eksi yüklü bir kılıfla kaplar. Saf bir protein SDS jel elektroforezinde tek bant verir. Proteinin alt birimlerinin farklı kütlede olması durumunda birden fazla bant görmek mümkündür. Molekül kütlesi birbirine yakın olan proteinler bu yöntemle ayrılamazlar.

Bu yöntemin dezavantajı, elektroforezden sonra proteinlerin enzimatik yada biyolojik aktivitelerini yitirmeleridir. Avantajı ise proteinlerin molekül kütlelerinin tayinine olanak sağlamasıdır ( Voet, D., 1990, Haris, E., L., V., 1989).

### 2.3 Selülaz

Doğada en fazla bulunan polimer olan selüloz, düz poli -1,4-β- glukoz zincirlerinden oluşmaktadır. Selüloz en fazla bitkilerin hücre duvarlarında yapıyı oluşturan başlıca bileşen olarak bulunmaktadır. Bitki hücre duvarlarının oldukça kompleks yapısı, selüloz ile birlikte ksiloglukanlar, hemiselüloz, pektin ve proteinleri de içermektedir (Campbell, M., K.,2005,

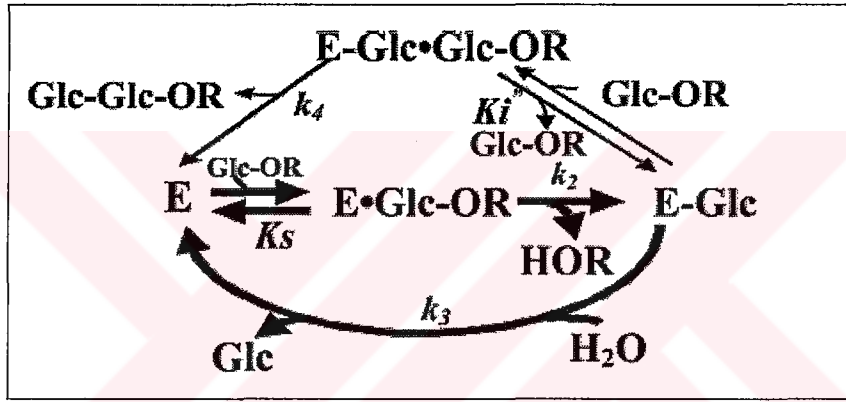
Seidle H., F., 1995).



Şekil 2.1. (A) Selülozun düz poli -1,4- $\beta$ - glukoz zinciri, (B) Düz selüloz zincirleri arasında yer alan hidrojen bağları.

Selüloz bitkilerde bulunan başlıca polisakariddir ve yeryüzünde en çok bulunan biyolojik materyaldir. Ayrıca atıklarda önemli oranda selüloz bulunması, selülozu parçalayan enzimleri önemli kılmaktadır. Glukozun D-glukoza enzimatik hidrolizi kompleks bir olaydır. Hem amorf, hem de kristal bölgeler bulunduran selüloz suda çözünmez. Düz polimer zincirleri arasında yer alan hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri bir ağ yapısı oluşturmakta, 60-70 glukoz içeren lifler meydana gelmekte ve bu liflerin bir araya yığılması ile düzenli kristaller ortaya çıkmaktadır. Lifler hemiselüloz ve lignin matriksin içine gömülmekte ve böylece oluşan karmaşık yapı enzimlerin selülozu glukozu hidrolizini zorlaştırmaktadır. Selülozu parçalayan enzimler selülazlar olarak isimlendirilmektedir ki bu enzimler üç tür aktivite göstermektedir; (1) endonükleaz (1,4- $\beta$ -D-4-glukanohidrolaz, E.C. 3.2.1.4) selüloz molekülünün iç kısmında yer alan bağları hidrolizler, (2) sellobiyohidrolaz (1,4- $\beta$ -D-4-glukan sellobiyohidrolaz, E.C. 3.2.1.91) selüloz zincirinde uçlarda yer alan bağları kırar ve (3)  $\beta$ -

glukosidaz ( $\beta$ -D- glukosid glukohidrolaz, E.C. 3.2.1.21) sellobiyoz ve diğer ufak oligosakkaridleri D-glukoza hidrolizler. Selülozun bozunmasında, son aşamada glukoz oluşumunda  $\beta$ -glukosidaz önemli role sahiptir.  $\beta$ -glukosidaz sellobiyozu hidrolizlediği için, sellobiyozun diğer selülaz bileşenleri (komponentleri) üzerindeki inhibisyon etkisini de yok etmiş olur. *Trichoderma reesei*'den üretilen ve en çok popüler olan selülaz, sellobiaz yönünden fakir olduğundan, selülozun glukoz dönüşmesini kısıtlı olarak gerçekleştirebilir. Sellobiozun birikmesi selülaz reaksiyonlarında "feedback inhibition" a sebep olur. Bu yüzden selülaz sisteminde sellobiaz varlığı aktiviteyi arttırmakta ve şekere dönüştürme işleminde anahtar rol üstlenmektedir (Seidle H., F., 2005, Shen, X., 2004).



Şekil 2.2. *Aspergillus niger* ailesinin 3  $\beta$ -glukosidaz reaksiyonları. (Kalın çizgiler hidroliz reaksiyonlarını, ince çizgiler substratın alıcı olduğu reaksiyonları göstermektedir. • kompleks yapıyı, - kovalent bağı belirtmektedir.  $K_s$  substrat dissosiasyon sabiti,  $K_i$  substratın alıcı yerinden dissosiasyon sabiti,  $k_2$  glikolitik yarımlama aşaması hız sabiti,  $k_3$  hidroliz aşaması hız sabiti,  $k_4$  trans glukozidik aşaması hız sabiti.)

Transglukosidik reaksiyonlar memeli, bitki, mantar(fungus) ve bakteri  $\beta$ -glukosidazlarının ortak özelliğidir. Transglukolizasyon reaksiyonu, son aşamada (Şekil 2.2.), bir alıcının (acceptor: bir alkol veya şeker) su ile yer değiştirmesi sonucu meydana gelir. Substratın bizzat alıcı (acceptor) olduğu mekanizma şekil 2.2.'de verilmektedir. Substratın zincir sonunda yer alan glukozu ile indirgen olmayan glukozu (non-reducing sugar) arasındaki glikosidik bağ kırılır ve zincirin ucundaki glukoz ile enzimin oluşturduğu kompleksten bu glukoz serbest bırakılır. Enzim bileşeni (komponenti) tarafından işgal edilmiş olan ve daha sonra serbest bırakılan yer, alıcı (acceptor) yeri olur. Alıcı (acceptor; şekil 2.2.'de ikinci substrat molekülü), alıcı (acceptor) yerine bağlanır, alıcı (acceptor) ile glukoz arasında kovalent bağ oluşur ve glukoz enzime kovalent olarak bağlanması gerektiğini hatırlar (bağlanır). Alıcı (acceptor) su

molekölü ile yarışır, ve transglukosidik reaksiyon alıcının (acceptor) reaksiyonu verme eğilimi kadar affinitesine ve konsantrasyonuna da bağlıdır. Ticari anlamda glukosidleri üretmede transglukosidik reaksiyonlar çok önemlidir. Başlıca 3  $\beta$ -glukosidaz ailesi, *Aspergillus niger*  $\beta$ -glukosidaz endüstriyel anlamda değerlendirilmektedir (Seidle H.F., 2005, Okada, G., 1988).

Günümüzde selülazların ve hemiselülazların en önemli uygulama alanı kağıt endüstrisidir, ki bu uygulamalar kağıt hamurunun beyazlatılması (biobleaching), çözünmüş halde kağıt hamuru eldesi, atık kağıtların geridönüşümünde mürekkebin giderilmesi şeklinde sıralanabilir.

Yenilenebilir biyokütleden etanol üretimi de, alternatif enerji kaynağı olması yönünden dikkat çekicidir. Lignoselülozik (lignocellulosic) biyokütleden etanol üretim prosesinde başlıca problem hidrolizde görülmektedir. Lignoselülozik biyokütlenin hidrolizi sonucu başlıca glukoz ve ksiloz oluşmaktadır. Ve ekonomik bir proseste bu her iki şekerin etanole dönüşmesi gereklidir. Bu nedenle, lignoselülozik biyokütlenin yakıtla dönüştürülmesi işleminde, selülazlar ile hidroliz, hemiselülazlar da birlikte kullanılarak yapılmaktadır. Selülaz ve hemiselülazların hidroliziyle elde edilen ürün polifenol, organik asitler gibi kimyasallar ve aseton, butanol gibi solventlerin üretilmesinde de kullanılmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda bu enzimlerin üretim maliyeti ve üretimde düşük verim başlıca problemlerdir.

*Aspergillus niger* KK2'den elde edilen selülazların ve hemiselülazların yüksek aktiviteye sahip olması şekerle dönüştürme işlemi (saccharification) yönünden önemlidir. *A. niger* KK2'den elde edilen selülazlar ve hemiselülazlar kağıt endüstrisinde, gıda endüstrisinde ve kimya endüstrisinde kullanılabilir (Kang, S.W., 2004).

$\beta$ -glukosidazlar (EC 3.2.1.21;  $\beta$ -D-glukosid glukohidrolaz) biyolojide birçok farklı görev yapmaktadır. Bunlar mantarlar (fungi) ve bakteriler tarafından selülozik biyokütlenin parçalanması (degradation), memelilerde lizozomda glikolipidlerin parçalanması (degradation) ve bitkilerde glukoz bağlı (glucosylated) flavonoidlerin parçalanması (cleavage) şeklinde sıralanabilir. Görüldüğü gibi bu enzimler endüstri uygulamaları ile ilgilidirler. Bu enzimler yalnızca selülozu bozunduran enzim sisemlerinin bileşeni (komponenti) değildirler, aynı zamanda gıda endüstrisinde de uygulama alanı bulmaktadırlar.

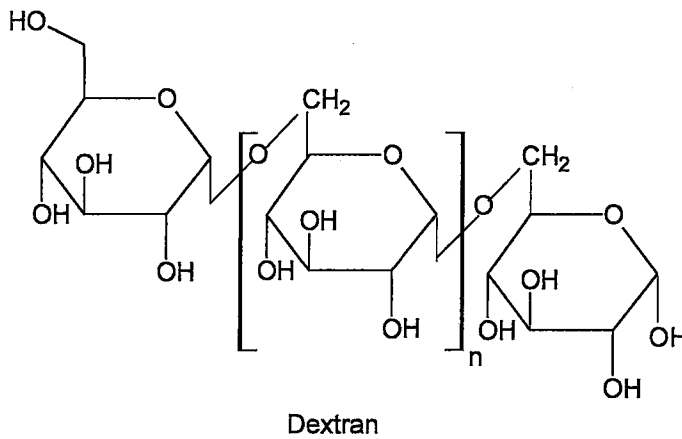
*Aspergillus* türlerinin  $\beta$ -glukosidazlar için iyi bir kaynak olduğu ve *Aspergillus niger*'in mikroorganizmalar içinde bugüne kadar bilinen en etkili  $\beta$ -glukosidaz üreticisi olduğu belirtilmektedir. Shoseyov ve çalışma arkadaşlarının *A. niger*'den tanımladıkları  $\beta$ -glukosidaz B1 (CMI CC324626) düşük pH'da ve yüksek konsantrasyonda alkol içeren ortamda

çalışmaktadır. Bu enzim şarap, meyva suyu gibi düşük pH değerine sahip gıdalarda lezzet ve koku veren glukosidleri etkili şekilde hidrolizlemekte ve böylece lezzette artma sağlamaktadır. *A.niger*'in toksik olmadığı kabul edildiği için bu enzim gıda endüstrisi için özellikle çekicidir. *A.niger*'den molekül tartısı (116-137 kDa), izoelektrik noktası (pI 3.8-4) ve optimum pH aralığı (3.4-4.5) farklı bir diğer  $\beta$ -glukosidaz da saflaştırılmıştır. Gerçekte ticari *A.niger*'den substrat spesifikliğı farklı en az iki  $\beta$ -glukosidaz saflaştırılmıştır. Glukosidazlar için, amino asid dizilimlerindeki benzerlikler dikkate alınarak 2000'in üzerinde farklı enzim içeren 77 farklı enzim ailesi (grup) belirlenmiştir (Dan, S., 2000).

Ekonomik anlamda fungal selüloz üretimi yönünden *Trikoderma* türleri, *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium* gibi birçok mikroorganizma incelenmiştir (Lockington, R., A., 2002). Deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanılan bir selüloz enzimi türü, alkali endo  $-1,4-$  $\beta$ -glukonazın alkalifilik *Bacillus* spp.'den üretimi de ayrıntılı olarak araştırılmıştır (Hakamada, Y., 2001, Ito, S., 1998, Ito, S., 1997).

## 2.4 Dekstran

Dekstran mikrobiyal sentez ile elde edilen polisakkaridlerin genel adıdır. Dekstran molekülü anhidro  $-D-$  glukopiranoz birimlerinin başlıca  $\alpha-1,6$ -glikosid bağı ile bağlanması sonucu meydana gelmiştir. Dekstran yıllardır tıbbi uygulamalarda yer almaktadır (Gladysheva, I., P,2001, Collen, A., 2001).



Şekil 2.3. Dekstranın açık formülü.

## 2.5 Enzimlerin kimyasal modifikasyonu

Yüksek basınç altında, yüksek veya düşük sıcaklıkta fizyolojik pH dışında pH değerine sahip ortamlarda, yüksek tuz konsantrasyonunda sonuç olarak normal dışı koşullarda yaşayan organizmalar ve bulundukları proteinlerin bu koşullarda stabil olması insanların dikkatini çekmiştir. Özellikle termofilik proteinler, bu proteinlerde katlanma ve buna dayalı fizikokimyasal özellikler, stabilite ve yüksek sıcaklıkta çalışan enzimleri dizayn etmede önemli olmuştur. Yüksek sıcaklıkta çalışan enzimler deterjan, gıda v.b., endüstrinin çeşitli alanlarında çok yararlı olmaktadır. Termofilik enzimlerin mezofilik homologlarına göre proteolize daha dayanıklı olduğu da belirlenmiştir (Kamalakkannan, S., 2004, Roy, J., J., 2005, Balabuchevich, N., G., 2004).

Suda çözünen globular proteinler sıkıca paketlenmiş gibi bir yapı göstermektedirler ve bunların iç kısmı çoğunlukla katıya benzer bir hal almıştır. Proteinlerde sıkıştırılmış gibi bir yapı bulunması stabilite açısından önemlidir. Bu nedenle, doğal olarak amino asit dizilimi ile protein üç boyutlu yapısı arasındaki bağlantı önem taşımaktadır. Genetik mühendisliği tekniklerinden faydalanarak amino asit dizili değiştirilmiş, dolayısıyla fizikokimyasal özellikleri farklı modifiye enzimler elde edilmektedir (Kamalakkannan S., 2004, Roy, J., J., 2005, Balabuchevich, N., G., 2004, Collen, A., 2001, Hakamada, Y., 2001, Vogt, G., 1997)

Ufak moleküllü kimyasal maddeler veya suda çözünen polimerler kullanılarak yapılan kimyasal modifikasyon işlemleri ile özellikleri değiştirilmiş enzimler elde edilebilmektedir (Fuentes, M., 2004, Abian, O., 2002) Bu şekilde üretilen optimum sıcaklığı ve pH aralığı farklı, ortamda bulunan kimyasal maddelere dirençli enzimler çeşitli uygulamalar için yararlı olmaktadır. Enzimlerin immobilizasyonu da genel olarak stabilitelerinde artma sağlamaktadır. Doğal ve sentetik makromoleküllerin antijenler, antikolar, ilaç aktif maddeleri ve enzimler ile oluşturduğu konjugatlar tıpta ve biyoteknolojinin çeşitli dallarında kapsamlı uygulama alanları bulmaktadır (Mustafaev, M., 1996, Mustafaev, M.I.,1998, Mustafaev, M., 1996, Salman Dilgimen, 2001, Karşıluyan, H., 1997).

### 3. MATERYALLER

#### 3.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Kaba terazi	: Precise BJ 6100D
Hassas terazi	: Precise XB 220A
Manyetik karıştırıcı	: Heidolph MR 3001
Vorteks	: Heidolph Type REAX top
Su bantosu	: GFL 1086
Soğutmalı santrifüj	: ThermoIEC (Micromax RF) Model 230
Liyofilizatör	: Telstar Cryodos
Dikey elektroforez	: Güç kaynağı Apelex PS 503 : Numune tankı: TermoEC 120 Mini Vertical Gel System
Saf su cihazı	: Millipore F4SN77678
pH metre cihazı	: Inolab
HPLC sistemi	: Shimadzu Program Class VP.
GPC sistemi	: Viscotek 4 detektörlü SEC-HPLC-GPC
Protein ayrıştırma cihazı	: Model 2110 fraction collector
U.V. Visible Spektrofotometre	: Model V-530 JASCO Program
Kullanılan malzemeler	:
• Otomatik pipet	: Finnpiptette 0-50 µl, 100-1000 µl
• Beher	: 50ml, 100 ml, 500 ml, 1 L



- Penisilin şişeleri
- Ependorf tüpleri

### 3.2 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Kolon	: Silika jel kolon ( LC column Shim Pack Diol-300)
Boyut	: 7,9mm x 50cm
Akış hızı	: 1 ml/dak
Dedektör	: UV-VIS detektör (SPD-10AV)
Mobil faz	: PBS; pH= 7,0; %0,05 NaN <sub>3</sub>
Akış hızı	: 1ml / dakika
Kolon sıcaklığı	: 25 °C
Dalga boyu	: 280 nm

### 3.3 Kullanılan Viscotek Marka GPC sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Viscotek cihazı dolgulu kolon kullanan bir kolon sıvı kromatografisidir. Viscotek cihazında sıvı hareketli faz yüksek basınçta ufak tanecikli hareketli faz üzerinde hareket ettirilmektedir. Bu tekniğe yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilmektedir.

Viscotek cihazı üç bölümden oluşur:

1. Numune hazırlama ve pompa bölümü

Viscotek GPCmax VE2001 GPC SOLVENT / SAMPLE MODULE

2. Kolon ve dedektör kısmı

Viscotek TDA 302 Triple Detector Array

3. Bilgisayar kısmı

Yazılım adı: Omnisecc 3.1 programı.

Viscotek cihazında poröz tipli kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Poröz kolonlar içindeki dolgu maddesinin taneciklerinin çapı 3-10 µm arasında değişmektedir.

Kolon 1 : TOSOH G 5000 PWXL

Polimer dolgulu kolon

Akış hızı : 0,8ml/dak

Boyut : 7,8mm x 30 cm

Kolon 2 : Shim-Pack Diol 300

Silika dolgulu kolon

Akış hızı : 1ml/dak

Boyut : 7,9mm x 50 cm

Kolon 3 : TOSOH G 3000 SWXL

Silikon dolgulu kolon

Akış hızı : 0,8ml/dak

Boyut : 7,8 mm x 30cm

Mobil faz : PBS; pH= 7,0; %0,05 NaN<sub>3</sub>

Kolon sıcaklığı : 25 °C

Dalga boyu : 280 nm

### 3.4 Kullanılan UV-Vis spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Optical System : Single monochromator

Detektör : Silikon fotodiod (S1337)

Işık kaynağı : Deuterium lamp : 190 to 350 nm

Halogen lamp : 390 to 1100 nm

### 3.5 Kullanılan Protein Ayırıştırma Cihazının Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

U.V. monitör	: Biorad Econo (model EM-1)
Fraksiyon toplayıcı	: Biorad model 2110 fraction collector
Kayıt edici	: Biorad chart recorder model 1327
Pompa	: Biorad Econo pump (model EP-1)

### 3.6 Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Maddeler	Üretici Firma	Lot No.
Cellulase from Aspergillus niger	Fluka	22178
CMC	Fluka	21902
DNS	Fluka	42260
BSA	Sigma	117H1346
K-Na Tartarat	Fluka	60413
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haen	04269
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fluka	71647
NaCl	Riedel-de Haen	13423
Citric acid monohydrate	Riedel-deHaen	22102
Dextran $M_w=188.000$	Sigma	D-4876
Sephadex G50	Fluka	84946
Acetic acid solution	Fluka	45754

Phenol	Merck	822296
Sodium metabisulfite	Fluka	71928
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fluka	96528
Tris	AppliChem	A2264,0500
Glycin	AppliChem	A1007,0500
D-(+)-Glukoz	Sigma	G7528-250G
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Fluka	09979
NaOH	Riedel-de Haen	06203
Hydrazine dihydrochloride	Fluka	53840
$\text{NaIO}_4$	Fluka	71862
KBr	Fluka	60089
$\text{NaBH}_4$	Merck	S3912873 403
Dialysis Tubing Cellulose Membrane	Sigma	D9777-BULK
N.N'-Methylene-bis- Acrylamide	Sigma	M 7256
SDS	Fluka	71725
Bromophenol blue	Sigma	B 8026
Gliserol	Fluka	49781
B-Mercaptoethanol	Fluka	63689
TEMED	Sigma	T 9281
Ammonium persulfate	Fluka	09913

## 4. DENEYESEL ÇALIŞMA

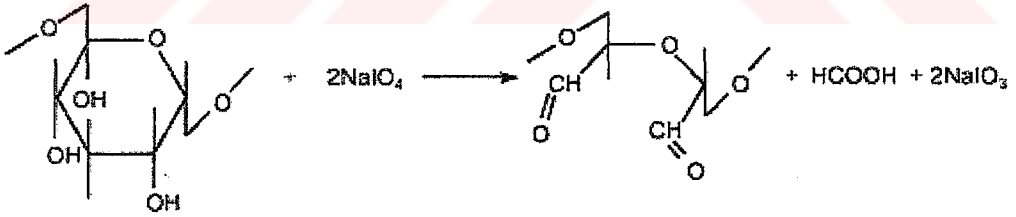
### 4.1 Dekstranın Aldehid Türevi Eldesi

#### Kullanılan Çözeltiler

- 1) 3,33 g Dekstran 30ml destile suda çözüldü.
- 2) 8 g  $\text{NaIO}_4$  120ml destile suda çözüldü.

#### Deneyin Yapılışı

- 1) Dekstran çözeltisinin üzerine  $\text{NaIO}_4$  yavaş yavaş karıştırılarak eklendi.
- 2) Bu çözelti karanlıkta, oda sıcaklığında 24 saat süreyle karıştırıldı.
- 3) Elde edilen yükseltgenmiş dekstran ile birlikte ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için ürün 24 saat karanlık ortamda, oda sıcaklığında destile suya karşı diyalize bırakıldı.
- 4) Soğutarak kurutma ile (liyofilizatörde) aldehid grupları bulunduran dekstran elde edildi (Sacco, D., 1988, Betancor, L., 2004, Dobrenchenko, S., 1993).



Şekil 4.1. Dekstran'ın aldehidlenme reaksiyonu.

### 4.2 Aldehid Miktar Tayini

#### Kullanılan Çözeltiler

- 1) 0,01M  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,22563g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /100ml Destile su)
- 2) 1M Hidrazin Klorür ( $\text{H}_2\text{N-NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$ ) (10,603g/100ml destile su)

3) Dekstranın aldehit türevi içeren örnek tartılıp suda çözüldü.

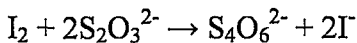
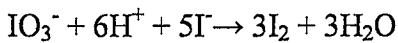
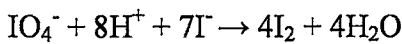
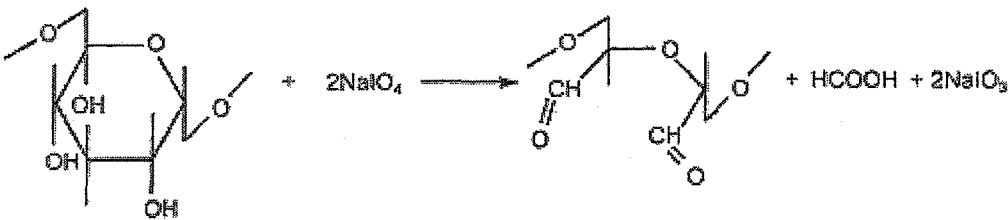
## Deneyin Yapılışı

### I

- 1) Hidrazin klorür çözeltisinden 0,5ml bir erlene alındı.
- 2) Kalay klorür çözeltisinden 0,5ml alınıp hidrazin klorür çözeltisi üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- 3) Bu çözelti üzerine dekstranın aldehid türevi çözeltisinden değişik miktarlarda eklendi ve destile su ilavesi ile hacim 5 ml'ye tamamlandı.
- 4) Elde edilen çözelti 50 °C'de 10 dakika bekletildi ve bu süre sonunda çözeltinin sarı renkli olduğu görüldü.
- 5) 60 dakika tamamlandığında reaksiyonu durdurmak için bu çözeltiyi içeren erlen hızla buzlu su bulunduran kaba alındı ve 5 dakika bekletildi.
- 6) Oluşan sarı renkli çözeltinin absorpsiyon spektrumu (350-500nm arasında) alındı (Nieves, M.,L., 1992, Uchiyama, S., 2003, Afkhami, A., 2004)

### II

Dekstranın aldehid türevi sentezi yapılırken reaksiyonun başında ve 24 saat sonunda ortamdaki  $\text{IO}_4^-$  azalmasını ölçmek için  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  ile titrasyon yapıldı.  $\text{IO}_4^-$  miktarındaki azalma reaksiyona giren  $\text{IO}_4^-$  miktarını göstermekte.



0,5 g KI tartılıp 25 ml destile suda çözüldü. Ortamı asidlendirmek amacı ile 1 ml derişik HCl eklendi. Dekstranın aldehid türevi sentezindeki reaksiyon ortamından alındı (3,33g D/150 ml) 0,5 ml (0,0111g D) ve bu çözeltiliye eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. 10 dakika sonunda çözeltili karanlık ortamdan alındı zerine 1-2 damla nişasta indikatörü eklendi ve  $S_2O_3^{2-}$  (0,1N, Faktörü 1,126) ile titre edildi. Bu işlem aldehid türevi sentezi reaksiyonunun başında ve sonunda tekrarlandı.

Reaksiyonun başlangıcında yapılan titrasyonda 10,2 ml  $S_2O_3^{2-}$  harcandı.

Reaksiyonun sonunda yapılan titrasyonda 7 ml  $S_2O_3^{2-}$  harcandı.

Fark 3,2 ml reaksiyona giren  $IO_4^-$  miktarını göstermekte.

0,0563 mmol  $S_2O_3^{2-}$  / 0,5 ml

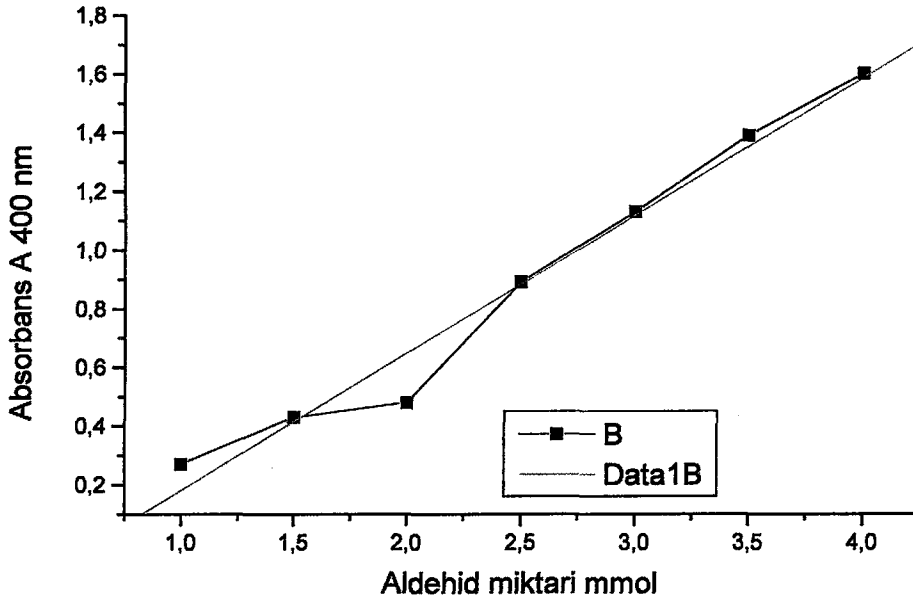
Tesir değeriği =1

0,0563 mmol / 22,2 mg D

0,0025 mmol -CHO / 1 mg D

Çizelge 4.1. D aldehid türevinin içerdığı aldehid miktarı ve  $A_{400}$  nm'deki absorbans değeri.

		A 400 nm
1 mg D-CHO	0,0025 mmol -CHO	0,27144
1,5 mg D-CHO	0,0038mmol -CHO	00,42689
2 mg D-CHO	0,0050mmol -CHO	0,47751
2,5 mg D-CHO	0,00625 mmol -CHO	0,86523
3 mg D-CHO	0,0075 mmol -CHO	1,13308
3,5 mg D-CHO	0,00875 mmol -CHO	1,38898
4 mg D-CHO	0,01 mmol -CHO	1,59729



Şekil 4.2. Dekstran için aldehid miktar tayini kalibrasyon eğrisi

$$R^2 = 0,98735, \quad SD = 0,08901, \quad N = 7, \quad P < 0,0001$$

$$Y = 187,98X + 0,29564$$

Sentezlenen konjugatlarda mmol aldehid / mg dekstran (aldehid türevi) değerleri hesaplandı.

40 °C'de 8 saat karıştırma ile sentezlenen konjugatın aldehid miktar tayini

$$0,00219 \text{ mmol/-CHO}$$

42 saat karıştırma ile sentezlenen konjugatın aldehit tayini 0,00169mmol /-CHO

### Örneklerin FTIR Spektrumlarının Alınması

Örneklerin her biri için madde miktarı %1 olacak şekilde saf KBr ile karıştırılıp preste 10 ton basınç altında tablet haline getirilir. Aletin havaya karşı baseline'ı alındı. Daha sonra hazırlanan tablet alete yerleştirilerek örneğin spektrumu alındı.



### 4.3 Dekstran - BSA Konjugatlarının Elde Edilmesi

Gerekli miktar dekstran aldehid türevi bulunduran çözeltiliye yeterli miktar BSA çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 8 saat süreyle karıştırıldı. Bu süre sonunda oluşan Schiff bazı  $\text{NaBH}_4$  eklenerek (0,034g  $\text{NaBH}_4$  / 1g polimer) indirgendi. Bu işlemler için gerekli BSA miktarı aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$\frac{n_{\text{protein}}}{n_{\text{polimer}}} = \frac{C_{\text{prot}} \cdot M_{A \text{ pol}}}{C_{\text{pol}} \cdot M_{A \text{ prot}}}$$

$$n_{\text{polimer}} = C_{\text{pol}} \cdot M_{A \text{ prot}}$$

$$C_{\text{pol}} = 0,1\text{g}/100\text{ml} = 1\text{mg/ml}$$

$$M_{A \text{ pol}} = 188.000$$

$$M_{A \text{ prot}} = 66.000$$

$$\frac{n_{\text{protein}}}{n_{\text{polimer}}} = \frac{C_{\text{prot}} \cdot 188.000}{1 \cdot 66.000} = 1$$

$$n_{\text{polimer}} = 1 \cdot 66.000$$

$$C_{\text{prot}} = 0.351\text{mg/ml}$$

BSA örneğinin protein içeriği % 48 olduğu için;

$$C_{\text{prot}} = 0,351 \cdot 100/48 = 0,731\text{mg/ml}$$

Seyrelme oranundan dolayı;  $C_{\text{prot}} = 0,734\text{mg/ml} \cdot 2 = 1.46\text{mg/ml}$  BSA

Bu konsantrasyonda hazırlanan BSA çözeltisinden 1ml alındı ve aldehid grupları bulunduran dekstran çözeltisinden de 1ml (2mg/ml) eklendi. Tepkime içeriği sürekli karıştırma ile oda sıcaklığında 8 saat bekletildi. Aldehidin karbonil grubu ile proteinin amin grubu arasında kondenzasyon tepkimesi sonucunda bir schiff bazı olan dekstran-BSA konjugatı elde edildi.

#### 4.4 Selülazın İzoelektrik Noktasının Tayini

Satın alınan selülaz enziminden 20mg tartıldı ve 2ml PBS tamponunda çözüldü. Bu enzim çözeltisinden 200µl alınıp PBS tamponu ile 2ml'ye tamamlandı. HCl ilave ederek pH 2'ye ayarlandı. 0,1N NaOH çözeltisinden 10'ar µl eklenerek titre edildi. Her NaOH çözeltisi ilavesinden sonra çözeltinin pH değeri okundu. Okunan pH ile NaOH sarfiyatı arasında çizilen grafikten selülazın izoelektrik noktası hesaplandı.

#### 4.5 Enzim (Selülaz) Aktivitesi Tayini

##### Kullanılan Çözeltiler

A) Sitrat tamponu 0,05M, pH 4,8

B) Enzim çözeltisi: sitrat tamponunda (pH 4,8 ), 1ml'de 1mg protein ( $A_{280}/1,34$ ) olacak şekilde hazırlandı.

C) Sitrat tamponunda (pH 4,8), %2'lik CMC (carboxymethyle cellulose) olacak şekilde hazırlandı.

D) DNS renk reaktifi çözeltisi:

10,6g 3,5-Dinitrosalisilik asid ile 19,8g NaOH 1416ml destile suda karıştırılarak çözüldü ve üzerine 306g Na-K tartarat, 50°C de eritilen 7,6ml Fenol, 8,3g Na metabisülfid eklendi.

E) Konsantrasyonu 2mg/ml olan glukoz standart çözeltisi hazırlandı.

##### Deneyin Yapılışı

I. Deney 50ml'lik erlenlerde yapıldı.

**TEST**

**KÖR**

1. Sitrat tamponu (50°C'deki su banyosunda beklemekte olan)

9ml

9ml

2. CMC çözeltisi eklendi.

0,5ml

0,5ml

3. Selülaz enzimi çözeltisi eklendi ve karıştırılarak

0,5ml

----

50°C su banyosunda 30 dakika bekletildi.

4. 30 dakika süre sonunda selülaz enzim çözeltisinden

köre de eklendi ----- 0,5ml

5. 50 ml'lik şilifli kapaklı erlenlere bu çözeltilerden

2ml alınıp üzerine DNS çözeltisi eklendi. Her iki erlen kapakları 3ml 3ml

Kapatılmış halde 100<sup>0</sup>C'da kaynamakta olan su banyosunda 15 dakika bekletildi.

Bu süre sonunda her iki erlen buzlu su bulunduran ortama alınarak hızla soğutuldu.

6. UV-Vis spektrofotometrede test çözeltisinin 540nm'deki absorbansı köre karşı okundu.

II. Aktivite tayini için glukoz çözeltisi ile standart eğrinin hazırlanması.

1. 50 ml'lik şilifli kapaklı erlenlere aşağıdaki tabloda verilen glukoz çözeltileri ve kör alındı.

Çizelge 4.2. Glukoz standartlarının hazırlanması.

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4
Glukoz çözeltisi	0,05 ml	0,06 ml	0,07 ml	0,08 ml
Destile su	1,95 ml	1,94 ml	1,93 ml	1,92 ml
DNS	3ml	3ml	3ml	3ml

	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8
Glukoz çözeltisi	0,09 ml	0,1 ml	0,11 ml	0,12 ml
Destile su	1,91 ml	1,90 ml	1,89 ml	1,88 ml
DNS	3ml	3ml	3ml	3ml

	Std 9	Std 10	Std 11	Blank
Glukoz çözeltisi	0,13 ml	0,14 ml	0,15 ml	----
Destile su	1,87 ml	1,86 ml	1,85 ml	2ml
DNS	3ml	3ml	3ml	3ml

2. Kapakları kapatılmış halde, erlenler 100<sup>0</sup>C'de kaynamakta olan su banyosunda 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda erlenler buzlu su bulunduran ortama alınarak hızla soğutuldu.

3. UV-Vis spektrofotometrede standart çözeltilerinin 540nm'deki absorbansı köre karşı okundu.

**Hesaplamalar**

Glukoz çözeltisi:

20 mg	10 ml
X	1 ml

---

X= C=2 mg/ml glukoz; Stok çözelti derişimi

Std 1.

1ml'de	2 mg glukoz
0,05 ml'de	y

---

y=0,1 mg glukoz

Std 2. y=0,12 mg glukoz

Std 3. y=0,14 mg glukoz

Std 4. y=0,16 mg glukoz

Std 5. y=0,18 mg glukoz

Std 6. y=0,2 mg glukoz

Std 7. y=0,22 mg glukoz

Std 8. y=0,24 mg glukoz

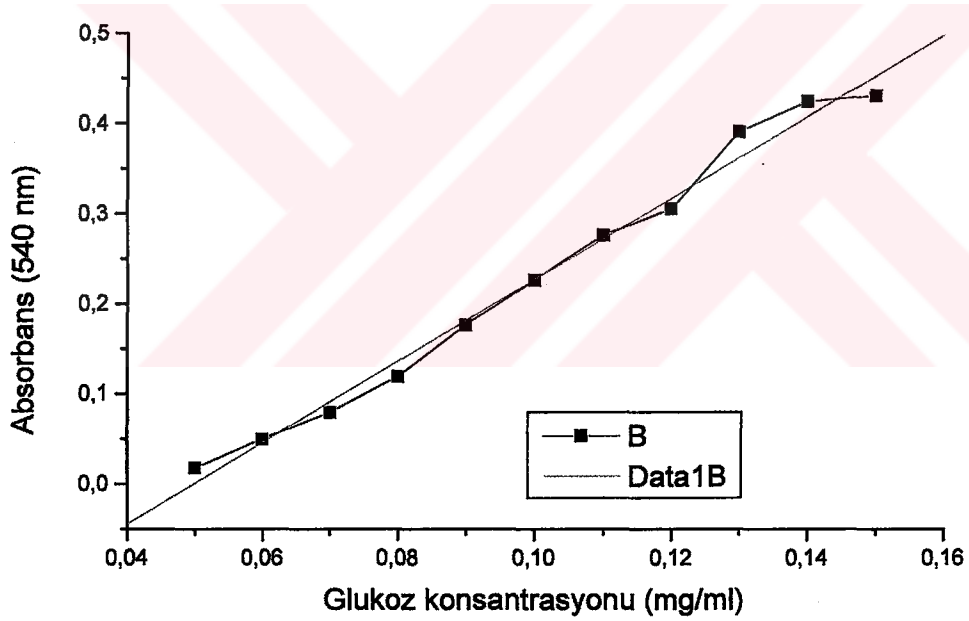
Std 9. y=0,26 mg glukoz

Std10. y=0,28 mg glukoz

Std11. y=0,30 mg glukoz

Çizelge 4.3. Glukoz standartları.

STANDARTLAR (glukoz)	ABSORBANS (540 nm)
Std 1. (0,05 mg/ml)	0,01760
Std 2. (0,06 mg/ml)	0,04981
Std 3. (0,07 mg/ml)	0,07902
Std 4. (0,08 mg/ml)	0,11922
Std 5. (0,09 mg/ml)	0,17644
Std 6. (0,10 mg/ml)	0,22635
Std 7. (0,11mg/ml)	0,27575
Std 8. (0,12 mg/ml)	0,30533
Std 9. (0,13 mg/ml)	0,39069
Std10.(0,14 mg/ml)	0,42421
Std11.(0,15 mg/ml)	0,43082



Şekil.3.2. DNS metodu ile glukoz derişimine göre elde edilen kalibrasyon eğrisi.

$$Y = 4,5184 X - 0,225$$

$$SD = 0,0166 ; R = 0,99452 ; P = < 0,0001 ; n = 11$$

Selülaz enziminin katalizi ile CMC'den glukoz oluşmasını sağlayan reaksiyon 50°C'da, 10 ml sitrat tamponu (pH 4,8) çözeltisinde gerçekleştirildi. Bu 10 ml çözeltiden alınan 2 ml örnek üzerine 3 ml DNS çözeltisi eklendi ve böylece renk reaksiyonu 5 ml hacimde

gerçekleştirilmiş oldu. Bu işlemten sonra, satın alınan (herhangi saflaştırma işlemi görmemiş) enzim kullanılarak yapılan denemede 540 nm'de absorban değeri 0,2619 olarak okundu.

DNS renk reaktifi ile glukozun reaksiyonundan sonra 540 nm'de okunan absorban değeri ile glukoz konsantrasyonu (mg/ml) arasında çizilen kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$Y = 4,5184 X - 0,225$$

$m_{\text{glukoz (mg)}} = (A_{540} + 0,225) / 4,5184 \times 10/2 \times 5/2$  formülünden 10 ml hacimdeki reaksiyon

çözeltisinde oluşan glukoz miktarı hesaplandı

10/2 : enzim-CMC reaksiyon çözeltisi için seyrelme oranı

5/2: DNS çözeltisinde seyrelme oranı

1 U, 1 daikada CMC'den 1  $\mu\text{mol}$  glukoz açığa çıkaran enzim miktarı. (U/mg enzim)

$$1U = \frac{(A_{540} + 0,225) / 4,5184 \times 10/2 \times 5/2}{180,2 \times 30} \times 1000 / \text{mg protein}$$

Glukoz  $M_w = 180,2$  Da

1000 : mmol'ü  $\mu\text{mol}$ 'e çevirmek için kullanılan değer

30 : Reaksiyon süresi (30 dak).

İşlem görmemiş enzimin ve saflaştırılmış enzimin aktivitesi pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 değerlerinde 50°C'de tayin edildi. Daha sonra saflaştırılmış enzimin aktivitesi de bu pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda tayin edildi.

Çizelge 4.4. Değişik pH'larda işlem görmemiş ve saflaştırılmış enzimin aktivite değerleri.

pH	İşlem görmemiş enzim aktivitesi (U/mg protein)	Saflaştırılmış enzim aktivitesi (U/mg protein)
2	0,5516	0,8872
3	0,618	1,019
4	0,574	0,87
5	0,4575	0,655
6	0,3838	0,53
7	0,3838	0,489
8	0,2589	0
9	0,2518	
10	0,2425	

Aktivite grafiği Şekil 5.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Saflaştırılmış enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda aktivitesi.

Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 4,8	pH 6	pH 7	pH 8
25	0,62 (U/mg)	0,63 (U/mg)	0,5 (U/mg)	0,3 (U/mg)	0,32 (U/mg)	0,29 (U/mg)	0
30	0,49 (U/mg)	0,59 (U/mg)	0,5 (U/mg)	0,27 (U/mg)	0,3 (U/mg)	0,3 (U/mg)	0
40	0,78 (U/mg)	0,77 (U/mg)	0,55 (U/mg)	0,296 (U/mg)	0,37 (U/mg)	0,35(U/mg)	0
50	0,89 (U/mg)	0,75 (U/mg)	0,52 (U/mg)	0,36 (U/mg)	0,37 (U/mg)	0,32 (U/mg)	0
60	0,76 (U/mg)	0,76 (U/mg)	0,63 (U/mg)	0,368 (U/mg)	0,36 (U/mg)	0,3 (U/mg)	0
70	0,69 (U/mg)	0,71 (U/mg)	0,71 (U/mg)	0,362 (U/mg)	0,3 (U/mg)	0,29 (U/mg)	0
80	0,55 (U/mg)	0,64 (U/mg)	0,48 (U/mg)	0,27 (U/mg)	0	0	0

Aktivite grafikleri Şekil 5.13'de gösterilmiştir

#### 4.6 Saflaştırma İşlemleri

Satın alınan selülaz enziminin (Fluka 22178) %28 protein içerdiği belirlendi ( $A_{280}/1,34$ ). Bu enzim örneğinin Viscotek cihazında alınan kromatogramları da değerlendirilerek, dekstran - selülaz konjugatlarını elde etmek için yapılacak çalışmada kullanılmak üzere, daha saf enzim örneği kullanmanın yararlı olacağına karar verildi. Jel filtrasyon işlemleri uygulandı.

##### Jel Filtrasyon ile (Sephadex G-50) Saflaştırma

20 mg/2ml (PBS pH 7,3) enzim ( $A_{280}/1,34$  ile hesaplanan) örneği kolona verildi. PBS tamponu kullanılarak her bir tüpte 30 damla olacak şekilde fraksiyonlar toplandı.

Bu maksatla Bio -Rad marka protein saflaştırma sistemi, 1,6cm x 40cm kolon ile kullanılarak jel filtrasyon işlemi uygulandı. Akma hızı 0,35 ml/dakika olacak şekilde ayarlandı. Kolon dolgu maddesi olarak sephadex G-50 kullanıldı. Eluasyon işlemi UV monitör vasıtasıyla izlendi. Alınan fraksiyonların 280 nm'de okunan absorbans değerlerinden yararlanarak protein konsantrasyonları ( $A_{280}/1,34$ ) ve aktiviteleri tayin edildi.

PBS ile alınan fraksiyonlardan havuzlar oluşturup aktivitekeri hesaplandı.

Çizelge 4.6. Fraksiyonların aktivite ölçüm değerleri.

	Aktivite (U/mg protein)
Havuz 1.1	0,63
Havuz 1.2	0,68
Havuz 1.3	1,08
Havuz 2	aktivite yok
İşlem görmemiş enzim	0,23

Havuz 1.1, 1.2, 1.3'ün aynı yerde toplanmasına karar verildi (havuz 1). Toplanan bu enzim de saflık kontrolü amacı ile jel filtrasyon işlemine tabi tutuldu (Şekil 5.5.)



#### 4.7 Selülazın SDS-PAGE Elektroforezi

##### Kullanılan Çözeltiler

A) %30Akrilamid/Bisakrilamid karışımı:

29 g akrilamid ve 1 g N,N'-Metil-bis Akrilamid karıştırıldı, 100 ml destile suda çözüldü. Bu renkli çözelti renkli şişede 4<sup>0</sup>C'de 30 gün saklanabilir.

B) 1,5 M Tris-HCl çözeltisi (pH: 8,8):

18,1 g Tris 100ml destile suda çözüldü. HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlandı. 4<sup>0</sup>C'de saklanabilir.

C) 1 M Tris-HCl Çözeltisi (pH: 6,8).

12,1 g Tris 100 ml destile suda çözülerek pH'sı HCl ile 6,8 'e ayarlandı. Bu çözelti 4<sup>0</sup>C'de saklanabilir.

D) %10 SDS (w/v):

Sürekli karıştırılarak 10g SDS 60 ml suda çözüldü ve destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

E) %10 Amonyum Persülfat (w/v):

0,1 g Amonyum Persülfat 1 ml destile suda çözüldü.

F) Yükleme Tamponu (Sample Buffer):

1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 ml
Gliserol	1,6 ml
%10 SDS	1,6 ml
%0,5 (w/v) bromfenol blue	0,4 ml
β-merkaptoetanol	0,4 ml
Destile su	8 ml

G) Yürütme Tamponu (Runningf Buffer):

45 g Tris-base, 15 g SDS ve 216 g glisin karıştırılıp, 3 litre destile suda çözüldü. Bu çözeltiden 600 ml alınıp 3 litreye tamamlandı.

F) Selülaz enzim çözeltisi:

100 mg enzim 5 ml destile suda çözülerek uygulanacak olan örnek çözelti hazırlandı.

### Deneyin Yapılışı

A) % 10'luk 10 ml alt jelin hazırlanması:

% 30 Akrilamid karışımı	3,3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
% 10 Amonyum Persülfat	0,1 ml
% 10 SDS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml
Destile su	4,0 ml

(TEMED en son konulur)

B) % 5'lik üst jelin hazırlanması:

% 30 Akrilamid karışımı	0,83 ml
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,63 ml
% 10 SDS	0,05 ml
% 10 Amonyum Persülfat	0,05 ml
Destile su	3,4 ml
TEMED	0,005 ml

(TEMED en son konulur)

Alt jel ve üst jel disk içine dökülerek kuyucuk tarağı yerleştirilir ve jelin polimerleşmesi için yaklaşık 30 dakika beklenir ve sonra tarak çıkarılır. ve disk elektroforeze yerleştirilir, üzerine hazırlanan yürütme tamponu konulur. 15 µl yükleme tamponu ile 15 µl enzim örneği karıştırılıp S-S bağlarını kırmak için birkaç dakika 95<sup>0</sup>C'deki su banyosunda tutulur ve kuyucuklara verilir. Bir kuyuya test olarak aynı şekilde hazırlanan BSA çözeltisi konulur. Sonra akım uygulanarak yaklaşık 1 saat beklenir. Bu sürenin sonunda disk elektroforezden çıkarılarak jel yıkanır ve boya çözeltisine konulur. 50-60<sup>0</sup>C'de 30 dakika beklendikten sonra

destraing buffer'da gözlenir. Alınan enzim örneklerinin SDS page elektroforezleri Şekil 5.11'de gösterilmiştir.

#### 4.8 Enzim – Polimer konjugatlarının oluşturulması

Aldehid grupları bulunduran dekstran ile konjugat oluşturmak üzere enzim/polimer mol oranı 5 olarak alındı. Bu işlem için gerekli enzim miktarı aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$\frac{n_{protein}}{n_{polimer}} = \frac{C_{prot} \cdot M_{A pol}}{C_{pol} \cdot M_{A prot}}$$

$$n_{polimer} = \frac{C_{pol} \cdot M_{A prot}}{C_{prot} \cdot M_{A pol}}$$

$$C_{pol} = 0,1 \text{ g/100ml} = 1 \text{ mg/ml}$$

$$M_{A pol} = 188.000$$

$$M_{A prot} = 31.000$$

$$\frac{n_{protein}}{n_{polimer}} = \frac{0,5 \text{ mg/ml} \cdot 188.000}{C_{pol} \cdot 31.000} = 5$$

$$n_{polimer} = \frac{C_{pol} \cdot 31.000}{0,5 \text{ mg/ml} \cdot 188.000} \cdot 5$$

$$C_{pol} = 0.606 \text{ mg/ml}$$

Bu hazırlanan polimer çözeltisinden 1 ml ve aldehid grupları bulunduran polimer çözeltisinden 1 ml eklendi. Değişik koşullarda iki konjugat oluşturuldu. Reaksiyon içeriği sürekli karıştırma ile oda sıcaklığında pH 7,2'de 42 saat boyunca karıştırıldı. Diğer konjugat ise 40 °C'de pH 7,2'de 8 saat boyunca karıştırıldı. Aldehidin karbonil grubu ile proteinin amin grubu arasında kondensasyon reaksiyonu gerçekleşmesi sonucu, bir schiff bazı olan enzim-polimer konjugatı elde edildi.

#### 4.9 Enzim-polimer fiziksel karışımının oluşturulması

Aldehid grupları bulundurmeyen dekstran ile konjugat oluşturmak üzere enzim/polimer mol oranı 5 olarak alındı. Bu işlem için gerekli enzim miktar aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$\frac{n_{\text{protein}}}{n_{\text{polimer}}} = \frac{C_{\text{prot}} \cdot M_{A \text{ pol}}}{C_{\text{pol}} \cdot M_{A \text{ prot}}}$$

$$n_{\text{polimer}} = \frac{C_{\text{pol}} \cdot M_{A \text{ prot}}}{C_{\text{prot}} \cdot M_{A \text{ pol}}}$$

$$C_{\text{pol}} = 0,1 \text{ g}/100 \text{ ml} = 1 \text{ mg}/\text{ml}$$

$$M_{A \text{ pol}} = 188.000$$

$$M_{A \text{ prot}} = 31.000$$

$$\frac{n_{\text{protein}}}{n_{\text{polimer}}} = \frac{0,5 \text{ mg}/\text{ml} \cdot 188.000}{C_{\text{pol}} \cdot 31.000} = 5$$

$$n_{\text{polimer}} = \frac{C_{\text{pol}} \cdot 31.000}{0,5 \text{ mg}/\text{ml} \cdot 188.000} = 0,606 \text{ mg}/\text{ml}$$

$$C_{\text{pol}} = 0,606 \text{ mg}/\text{ml}$$

Bu derişimlerde hazırlanan polimer çözeltisinden 1 ml ve polimer çözeltisinden 1 ml eklendi.

#### 4.10 Enzim-polimer konjugatlarının aktivite tayini

Enzim-polimer konjugatlarının ve fiziksel karışımın, daha önce satın alınan enzim için uygulanan yöntemde olduğu gibi farklı pH'lardaki aktivitesi ve optimum pH'da sıcaklığa göre aktivitesi tayin edildi. Ortamın pH değerine bağlı olarak aktiviteleri aşağıdaki tabloda

verildiği gibi elde edildi.

Çizelge 4.7. İşlem görmemiş ve saflaştırılmış enzim, konjugatlar ve fiziksel karışımın aktivite değerleri.

pH	İşlem görmemiş enzim (U/mg)	Saflaştırılmış enzim(U/mg)	D:Sel 1/5 Fiziksel karışım(U/mg)	D:Sel 1/5 Konj. 40 C 8 s(U/mg)	D:Sel 1/5 Konj. 48 s oda sıc.(U/mg)
2	0,5516	0,8872	1,09	1,2	1,206
3	0,618	1,019	1,12	1,51	1,253
4	0,574	0,87	0,87	1,16	0,833
5	0,4575	0,655	0,5449	0,73	0,7199
6	0,3838	0,53	0,6338	0,66	0,54
7	0,3838	0,489	0,4946	0,52	0
8	0,2589	0	0	0,47	
9	0,2518			0	
10	0,2425				

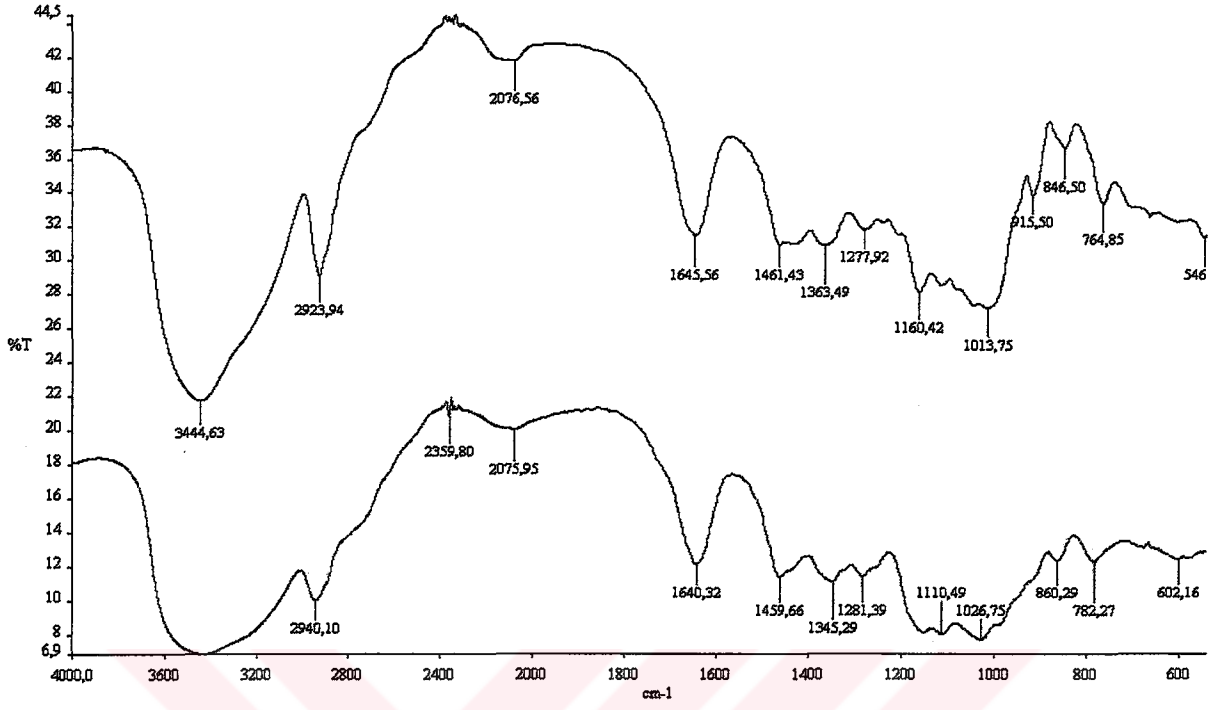
Aktivite grafikleri Şekil 5.33'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Kovalent konjugatların ve fiziksel karışımın optimum pH'da sıcaklığa göre aktivite değerleri.

Sıcaklık	D:Sel 1/5 Konj. 40 C 8s (U/mg)	D:Sel 1/5 Konj. 48 s oda sıc.(U/mg)	D:Sel 1/5 Fiziksel karışım(U/mg)	Enzim (havuz1)(U/mg)
25	0,996	0,97	1,04	0,63
30	1,023	1,043	1,019	0,59
40	1,16	1,025	1,068	0,77
50	1,51	1,253	1,12	0,75
60	1,36	1,398	1,175	0,76
70	1,13	1,08	1,168	0,71
80	1,09	1,02	1,07	0,64

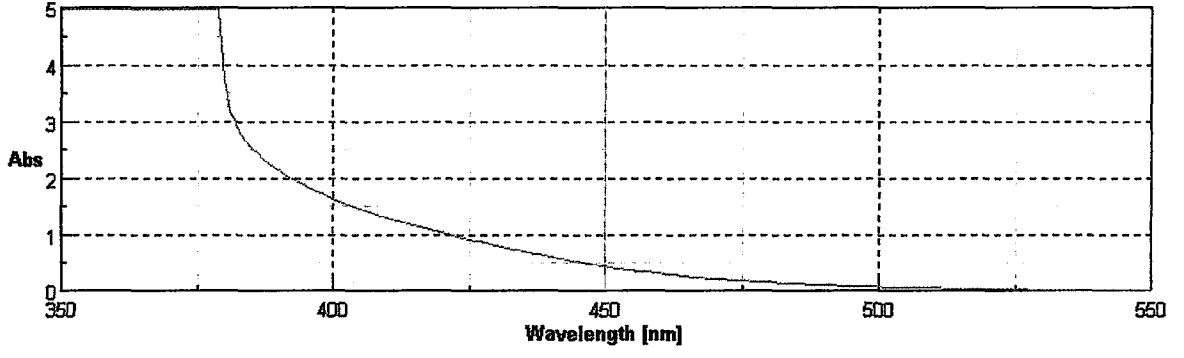
Aktivite grafikleri Şekil 5.34'de gösterilmiştir.

## 5. SONUÇLAR

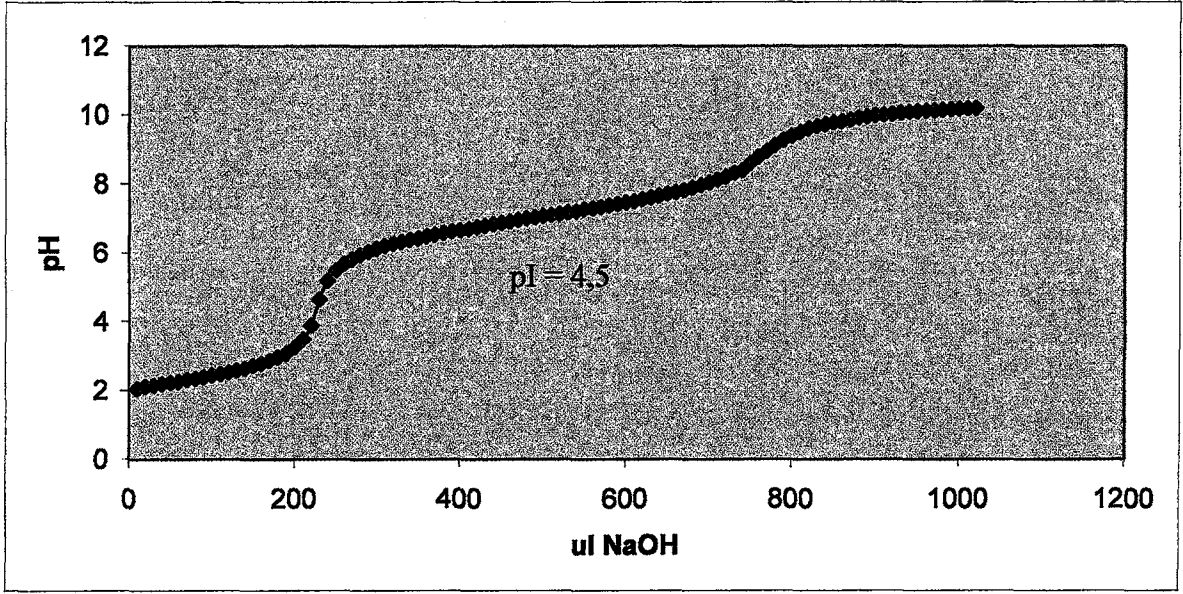


Şekil 5.1. Dekstran ve aldehid türevinin FTIR spektrumu.

(----- D-CHO, ----- D)

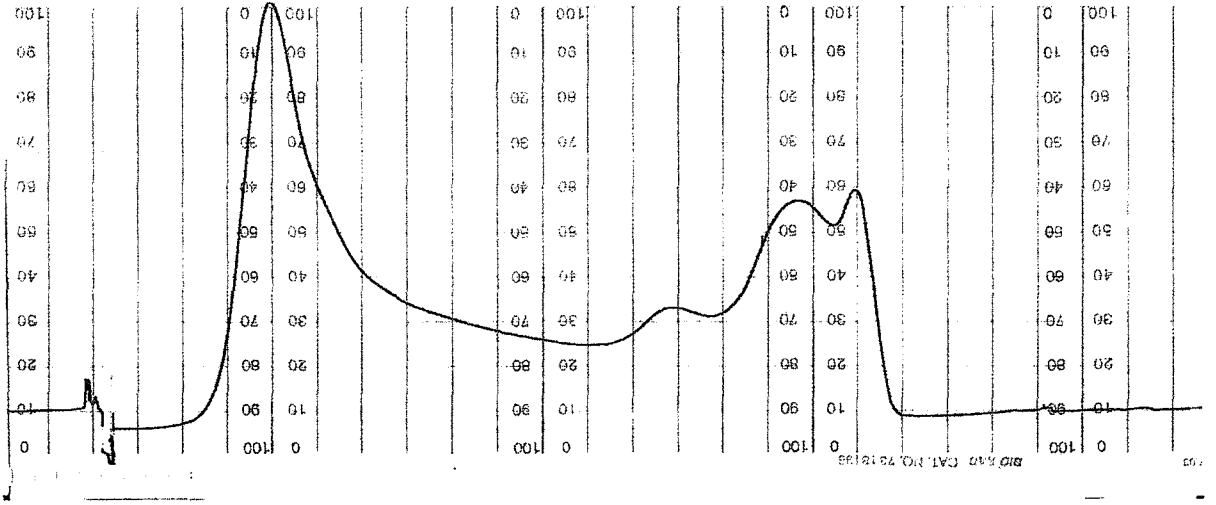


Şekil 5.2 Sentezlenen D-CHO türevinin aldehit tayini medodu ile alınan UV (400nm) spektrumu.

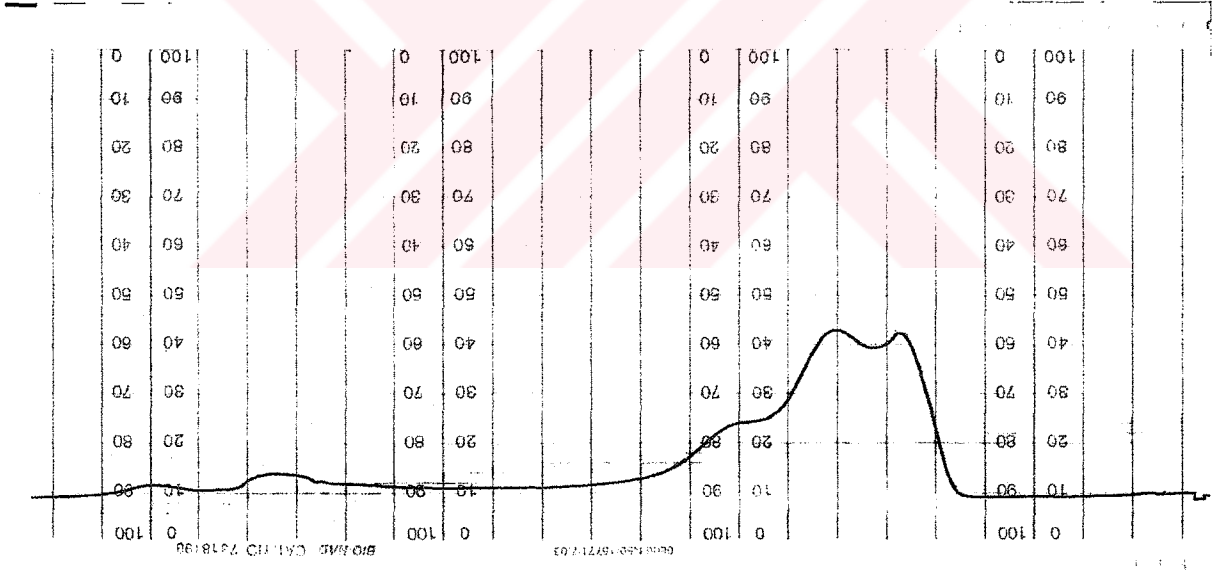


Şekil 5.3. Seltülaz enziminin pI değeri grafiği.

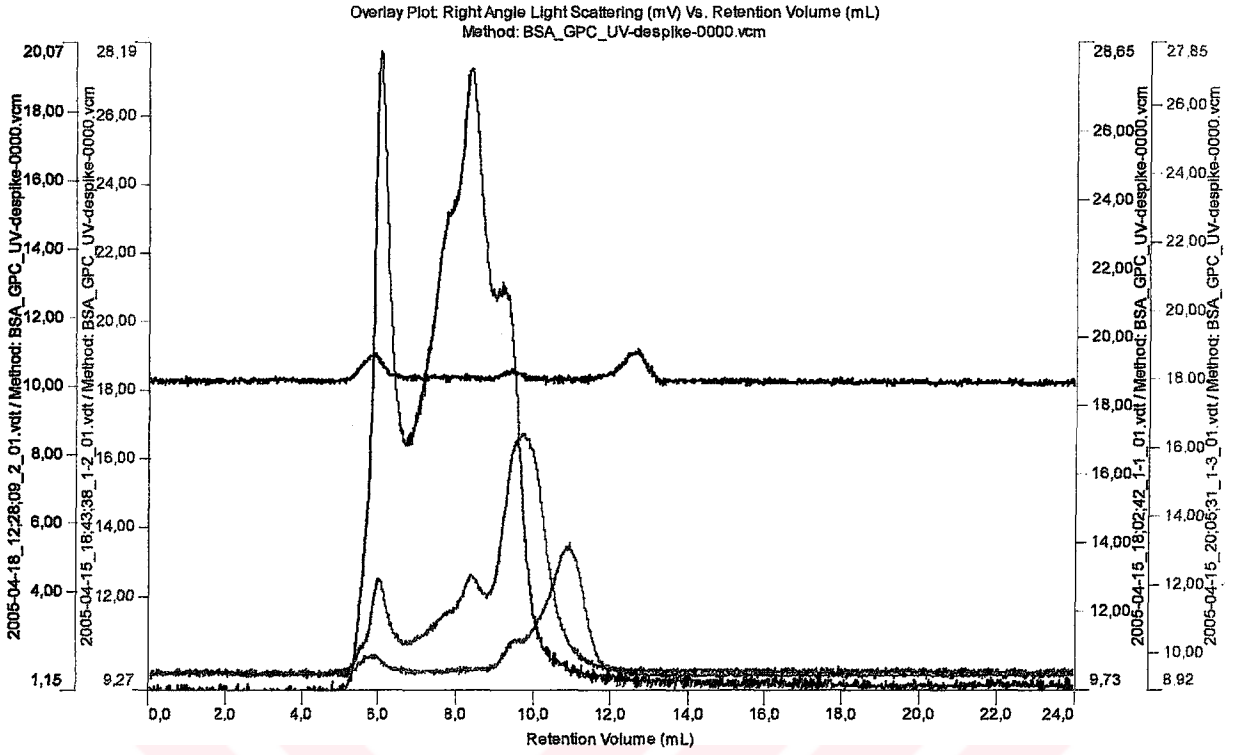




Şekil 5.4. Seliülaz enziminin protein saflaştırma cihazından geçerek fraksiyonlara ayrılması sırasında UV dedektör ile okunan kromatogram.



Şekil 5.5. Saflaştırılmış enzimin protein saflaştırma cihazından geçerek fraksiyonlara ayrılması sırasında UV dedektör ile okunan kromatogram



Şekil 5.6. Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2'nin GPC sistemi Viscotek marka cıkaz ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogramları

( ----1.1, - - - - - 1.2, - - - - - 1.3, - - - - - 2)

Kolon : Tosoh G 3000 SWXL

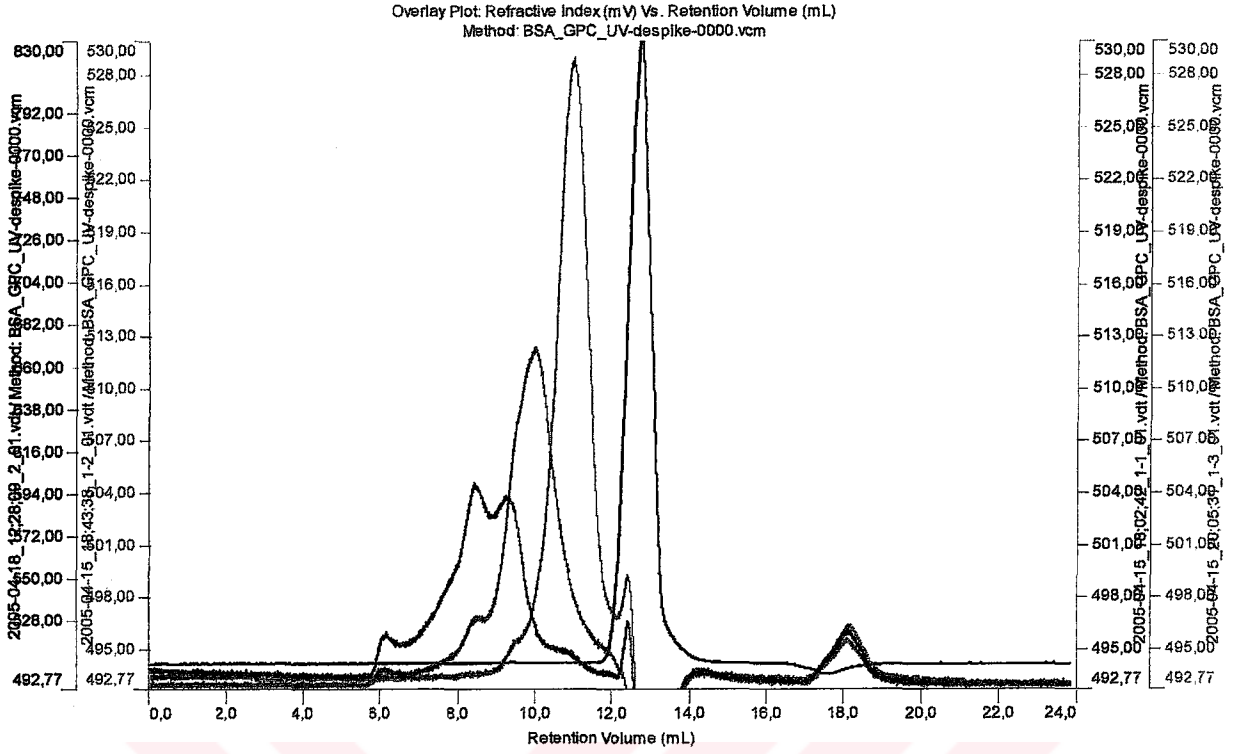
Numuneler : Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2

Akış hızı : 0,8 ml/dak

Mobil faz : PBS

Dedektör adı : Işık saçılması

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.7. Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2'nin GPC sistemi Viscotek marka cihazın kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogramları.

( ----1.1, ..... 1.2, -.-.-.-1.3, -----2)

Kolon : Tosoh G 3000 SWXL

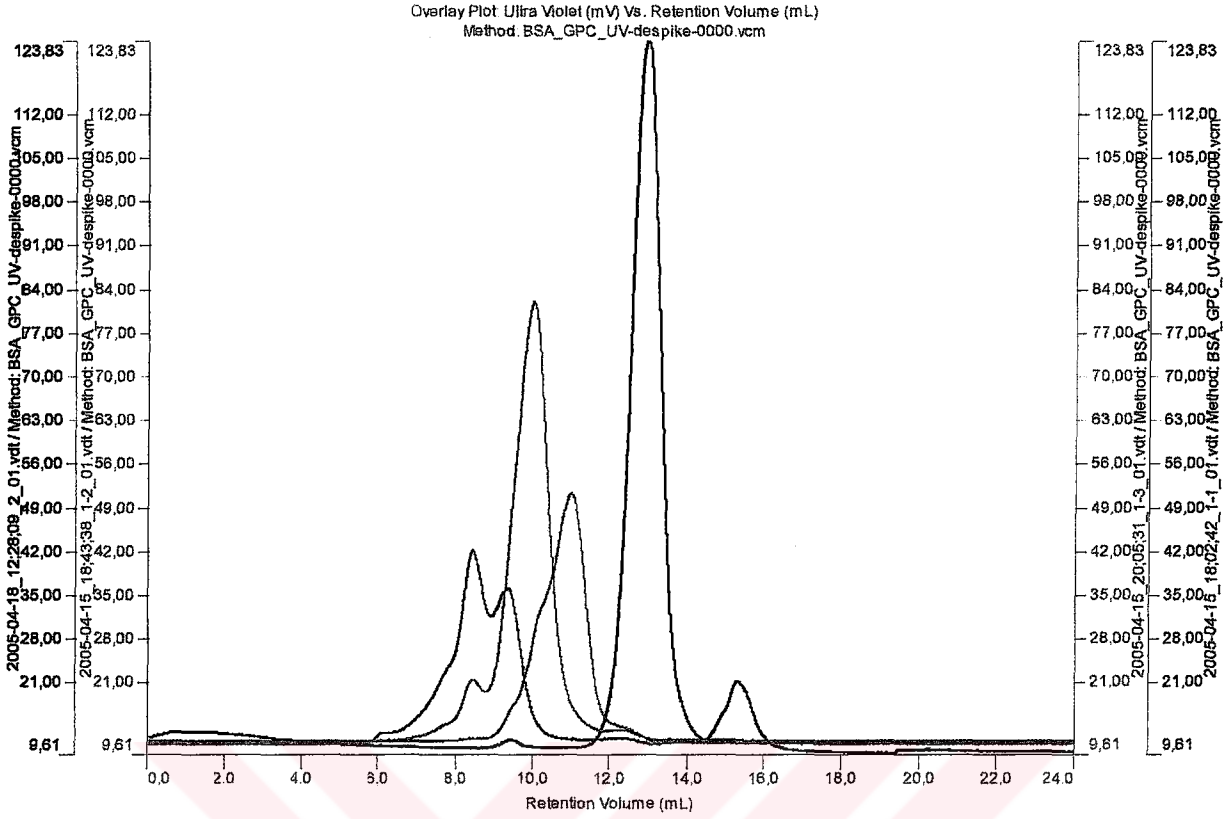
Numuneler : Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2

Akış hızı : 0,8 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : Kırılma indisi

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.8. Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2'nin GPC sistemi Viscotek marka cihazın UV dedektör ile alınan kromatogramları

( ----1.1, ..... 1.2, -.-.-.-1.3, - - - - - 2)

Kolon : Tosoh G 3000 SWXL

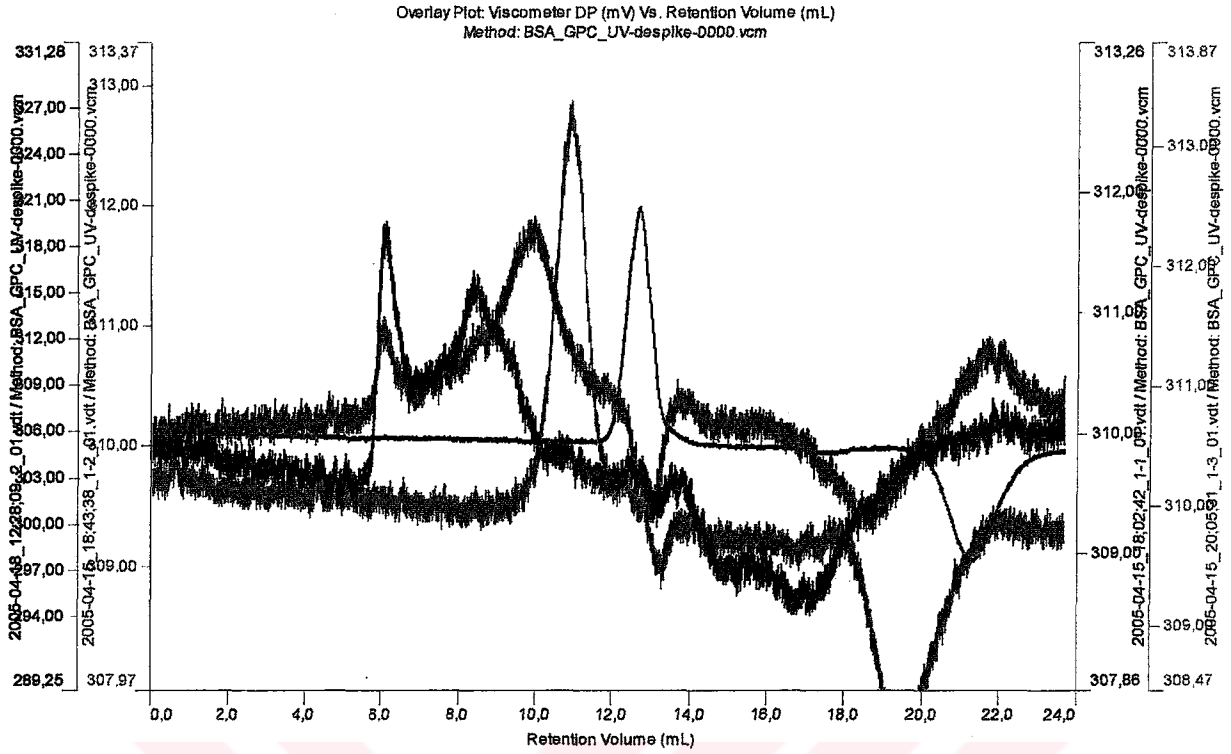
Numuneler : Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2

Akış hızı : 0,8 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : UV

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.9. Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2'nin GPC sistemi Viscotek marka cihazın viskozite dedektörü ile alınan kromatogramları

( ----1.1, ..... 1.2, -.-.-.-1.3, - - - - - 2)

Kolon : Tosoh G 3000 SWXL

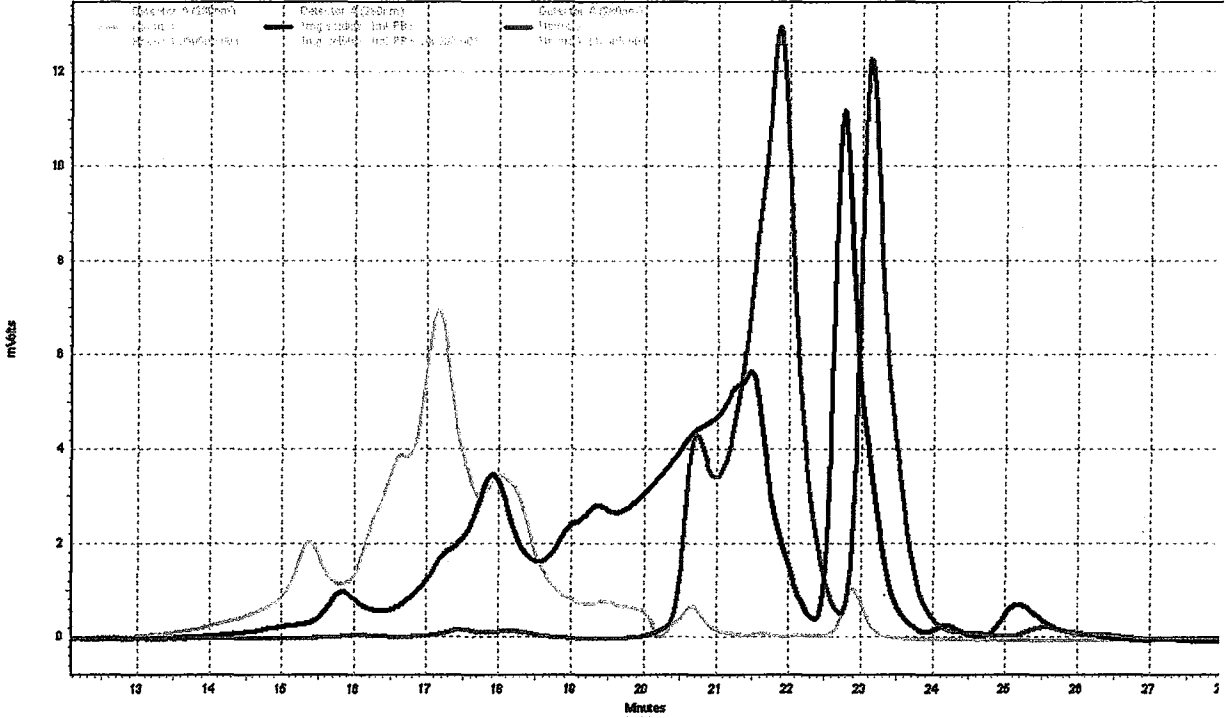
Numuneler : Havuz 1.1, 1.2, 1.3 ve havuz 2

Akış hızı : 0,8 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : Viskozite

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.10. İşlem görmemiş enzim, havuz 1 ve havuz 2'nin HPLC cihazı ile alınan kromatogramları

(.....havuz 1, — işlem görmemiş enzim, ----- havuz 2)

Kolon : Shim-Pack Diol 300

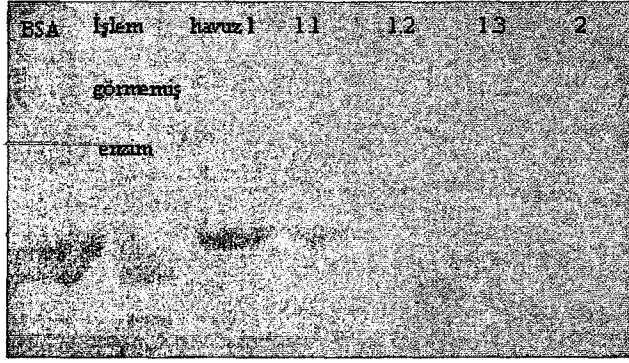
Numuneler : İşlem görmemiş enzim, havuz 1 ve havuz 2

Akış hızı : 1 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : UV

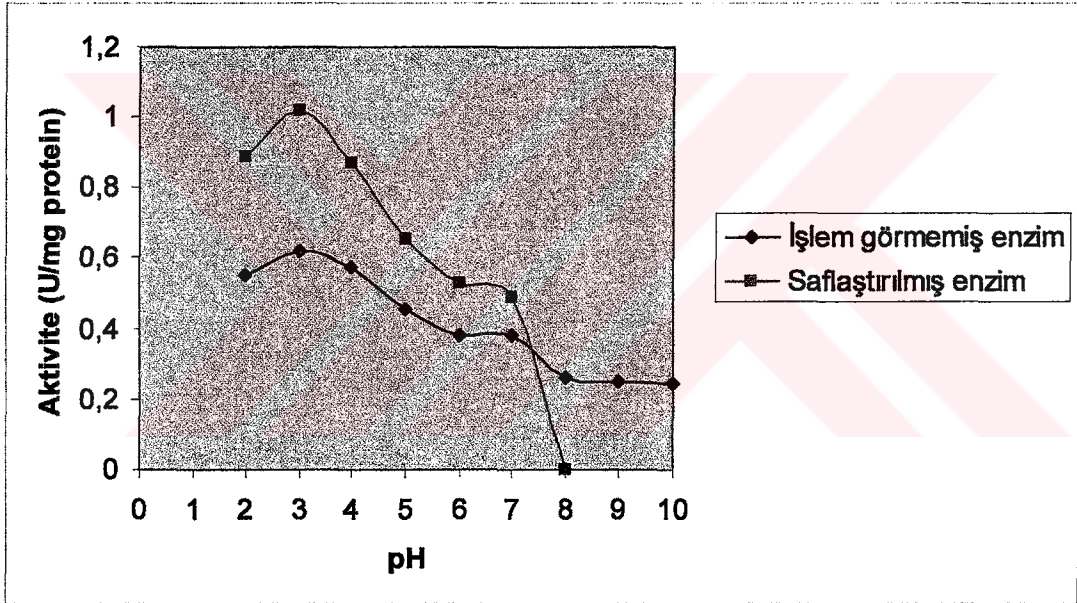
Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.11. Saflaştırma işlemine tabi tutulan selüloz enziminin SDS jel elektroforezi.

(1 BSA, 2 işlem görmemiş enzim, 3 havuz 1, 4 havuz 1.1, 5 havuz 1.2, 6 havuz 1.3, 7 havuz 2)

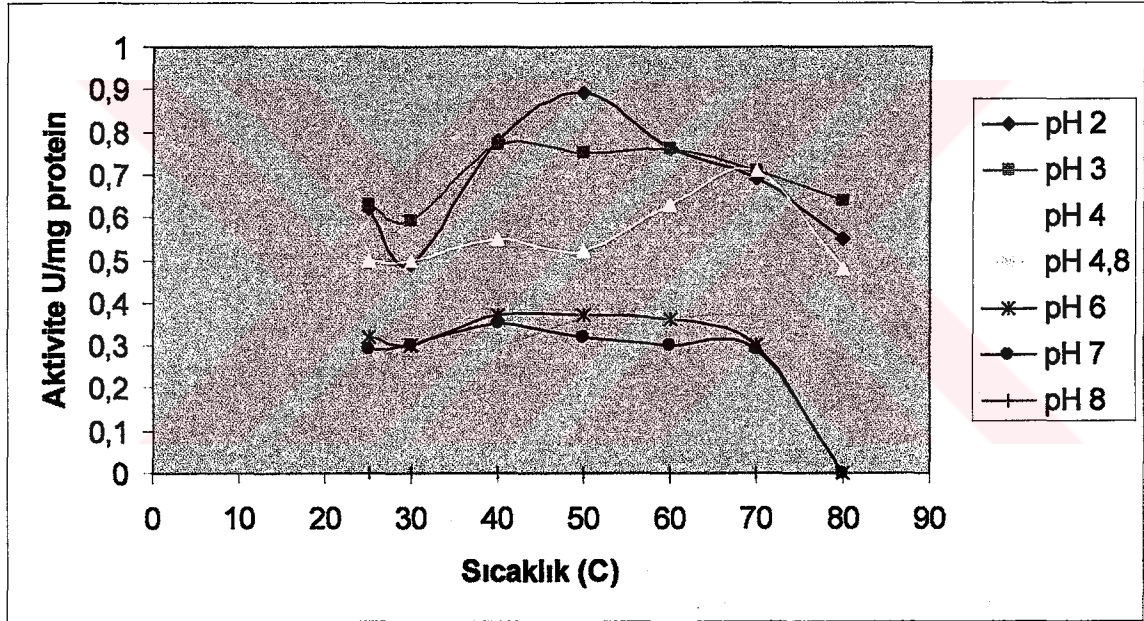
pH	İşlem görmemiş enzim aktivitesi(U/mg protein)	Saflaştırılmış enzim aktivitesi (U/mg protein)
2	0,5516	0,8872
3	0,618	1,019
4	0,574	0,87
5	0,4575	0,655
6	0,3838	0,53
7	0,3838	0,489
8	0,2589	0
9	0,2518	
10	0,2425	



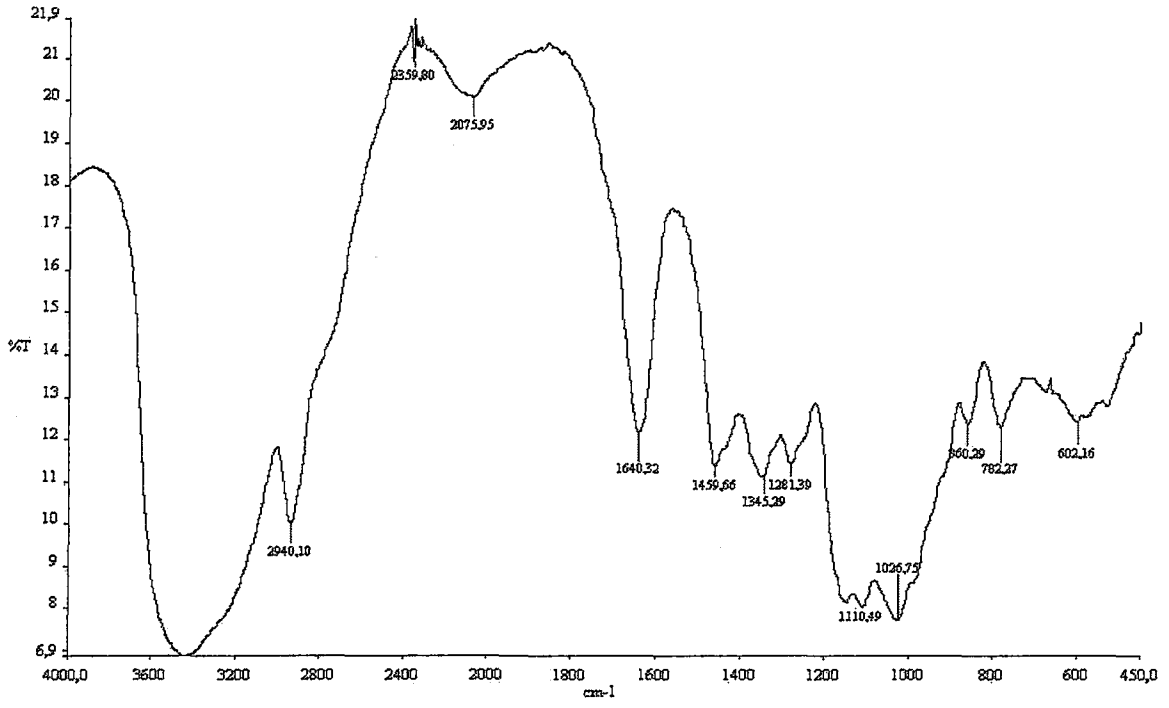
Şekil 5. 12. İşlem görmemiş enzim ile saflaştırılmış enzimin 50 °C'ta değişik pH değerlerinde ölçümü ile elde edilen aktivite grafiği.



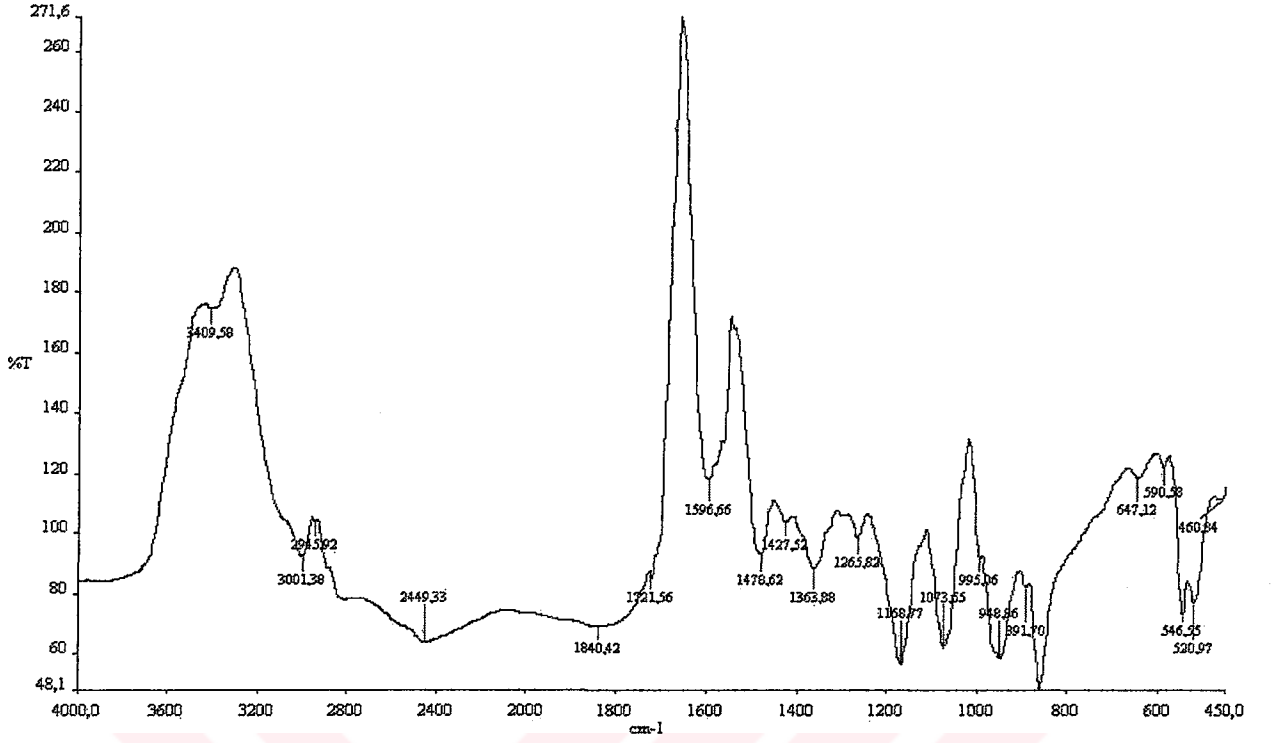
Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 4,8	pH 6	pH 7	pH 8
25	0,62 (U/mg)	0,63 (U/mg)	0,5 (U/mg)	0,3 (U/mg)	0,32 (U/mg)	0,29 (U/mg)	0
30	0,49 (U/mg)	0,59 (U/mg)	0,5 (U/mg)	0,27 (U/mg)	0,3 (U/mg)	0,3 (U/mg)	0
40	0,78 (U/mg)	0,77 (U/mg)	0,55 (U/mg)	0,296 (U/mg)	0,37 (U/mg)	0,35(U/mg)	0
50	0,89 (U/mg)	0,75 (U/mg)	0,52 (U/mg)	0,36 (U/mg)	0,37 (U/mg)	0,32 (U/mg)	0
60	0,76 (U/mg)	0,76 (U/mg)	0,63 (U/mg)	0,368 (U/mg)	0,36 (U/mg)	0,3 (U/mg)	0
70	0,69 (U/mg)	0,71 (U/mg)	0,71 (U/mg)	0,362 (U/mg)	0,3 (U/mg)	0,29 (U/mg)	0
80	0,55 (U/mg)	0,64 (U/mg)	0,48 (U/mg)	0,27 (U/mg)	0	0	0



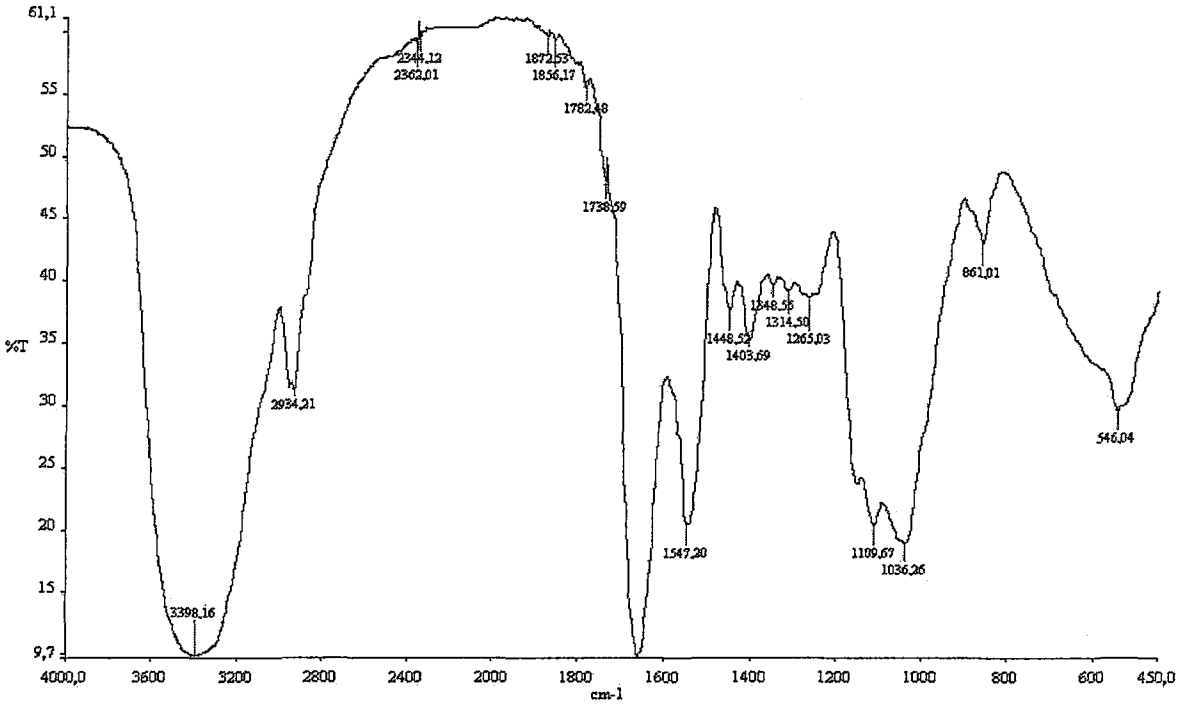
Şekil 5.13. Saflaştırılmış enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 değerlerinde 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C'de ölçülen aktivitelerinin grafiği.



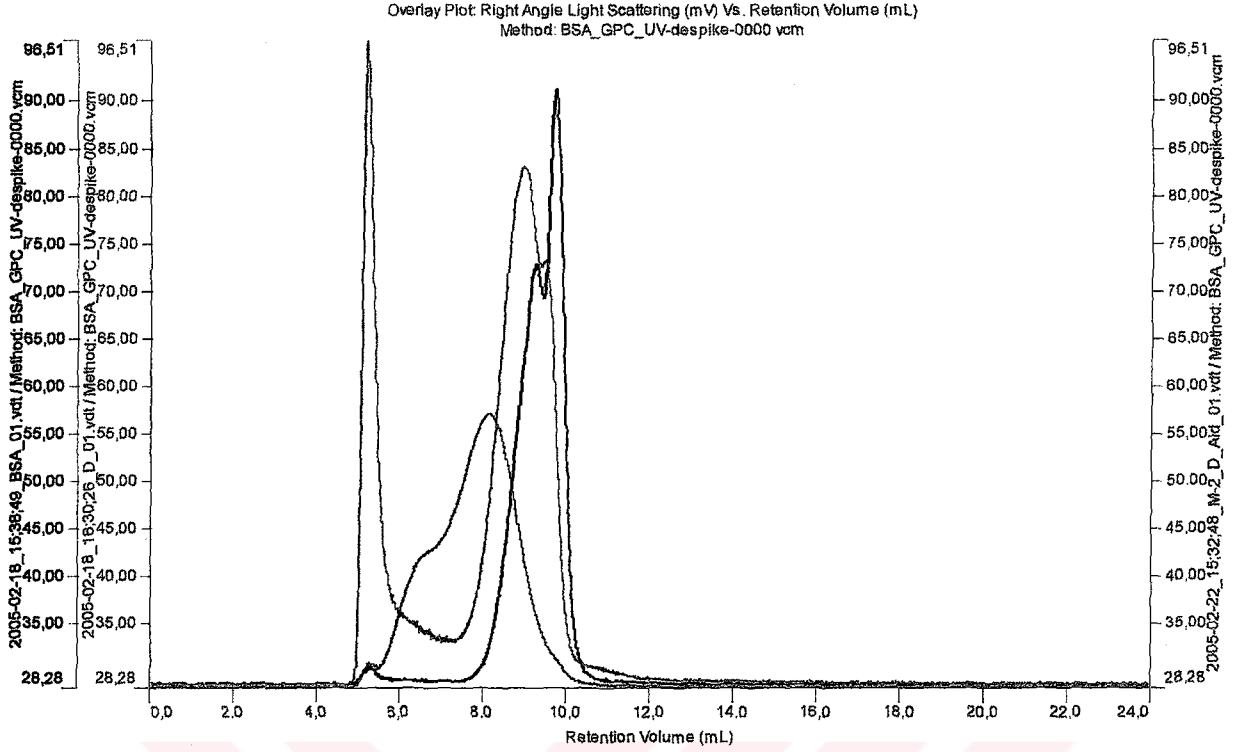
Şekil 5.14. D-CHO türevinin FTIR spektrumu.



Şekil 5.15. D-CHO :BSA konjugatının NaBH<sub>4</sub> ile doyurulmadan önceki FTIR spektrumu.



Şekil 5.16. D-CHO: BSA konjugatının NaBH<sub>4</sub> ile doyorulduktan sonraki FTIR spektrumu.



Şekil 5.17. D-CHO: BSA konjugatının GPC Viscotek marka cihazı ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogram.

(-----BSA, -----D, ----- BSA:D-CHO konjugat)

Kolon : Tosoh G 5000 PWXL

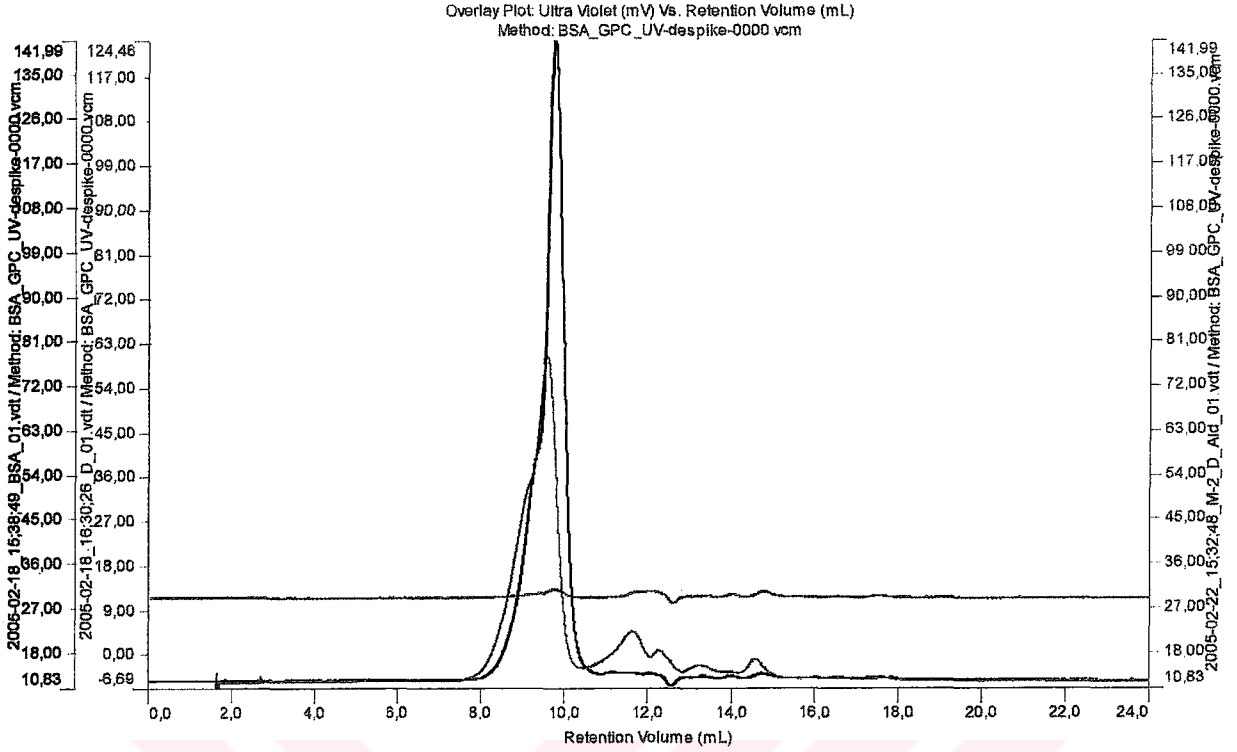
Numuneler : BSA, D, BSA: D-CHO konjugat

Akış hızı : 0,8 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : Işık saçılması

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.18. D-CHO: BSA konjugatının GPC Viscotek marka cihaz UV dedektör ile alınan kromatogram.

(-----BSA, -----D, ----- BSA:D-CHO konjugat)

Kolon : Tosoh G 5000 PWXL

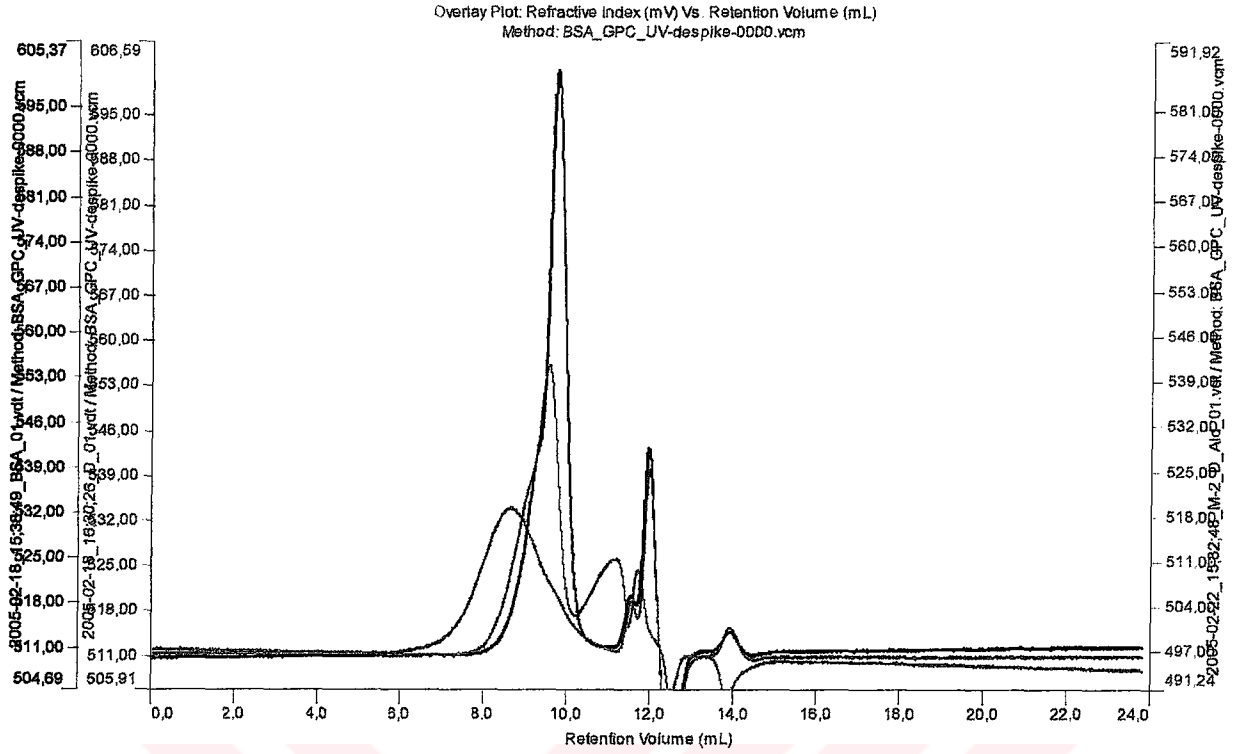
Numuneler : BSA, D, BSA:D-CHO konjugat

Akış hızı : 0,8 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : UV

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.19. D-CHO: BSA konjugatının GPC Viscotek marka cihaz ile alınan kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogram.

(-----BSA, -----D, ----- BSA:D-CHO konjugat)

Kolon : Tosoh G 5000 PWXL

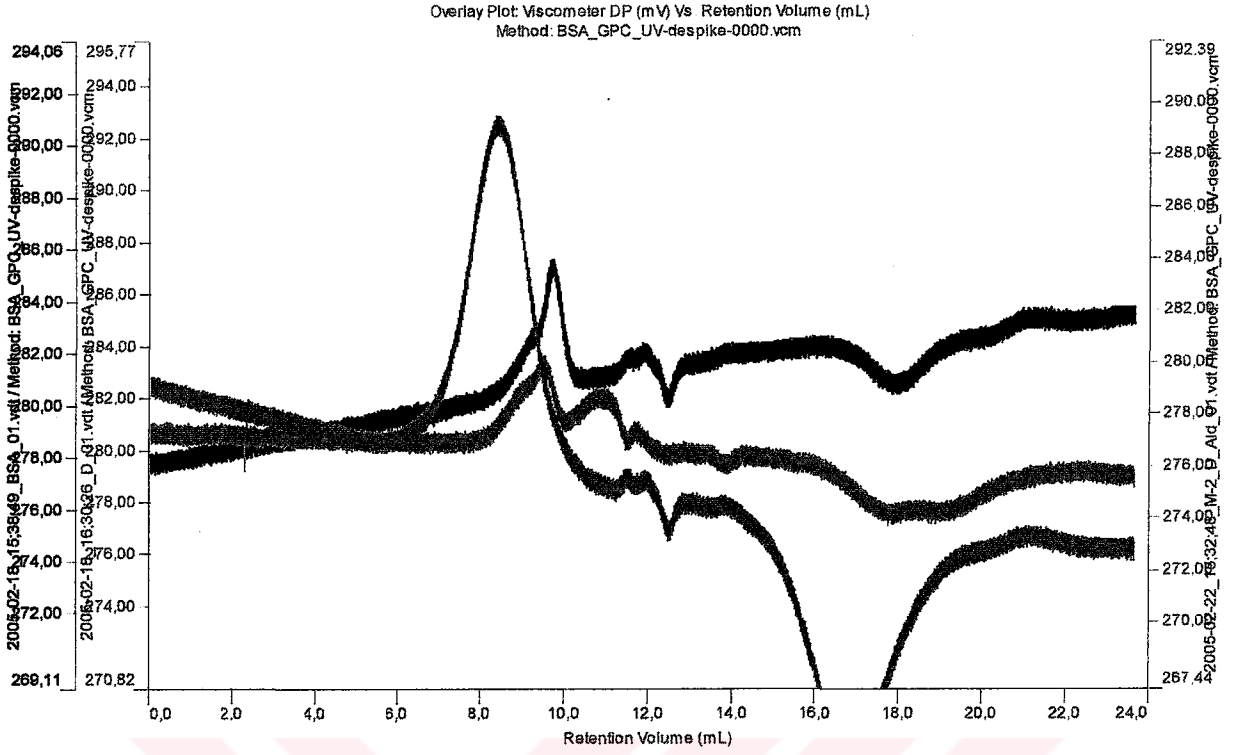
Numuneler : BSA, D, BSA:D-CHO konjugat

Akış hızı : 0,8 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : Kırılma indisi

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.20. D-CHO: BSA konjugatının GPC Viscotek marka cihazın viskozite dedektörü ile alınan kromatogram.

(-----BSA, .....D, -.-.-.- BSA:D-CHO konjugat)

Kolon : Tosoh G 5000 PWXL

Numuneler : BSA, D, BSA:D-CHO konjugat

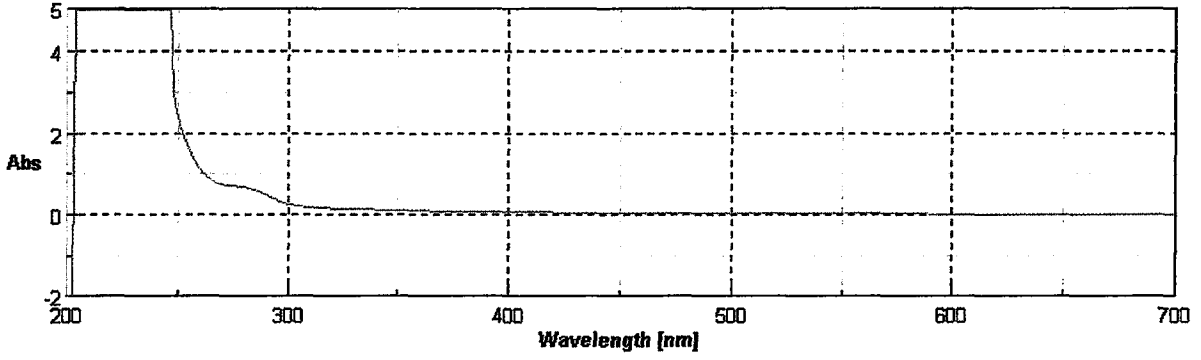
Akış hızı : 0,8 ml/dak

Haraketli faz : PBS

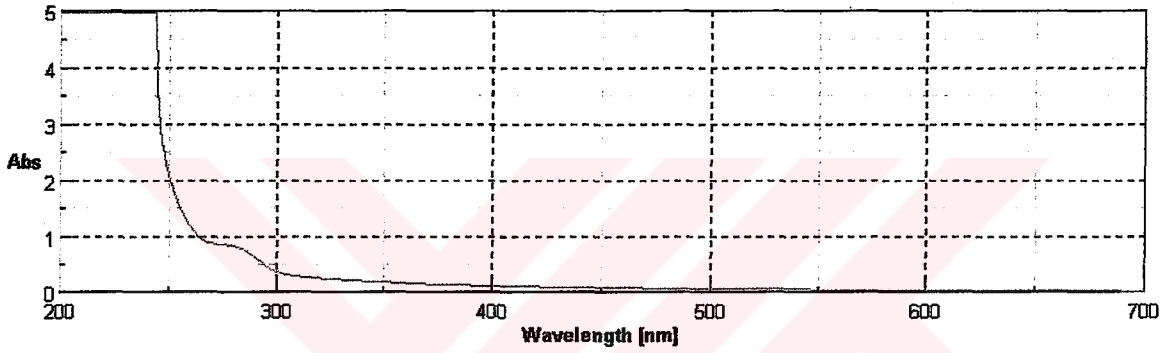
Dedektör adı : Viskozite

Sıcaklık : 25 °C

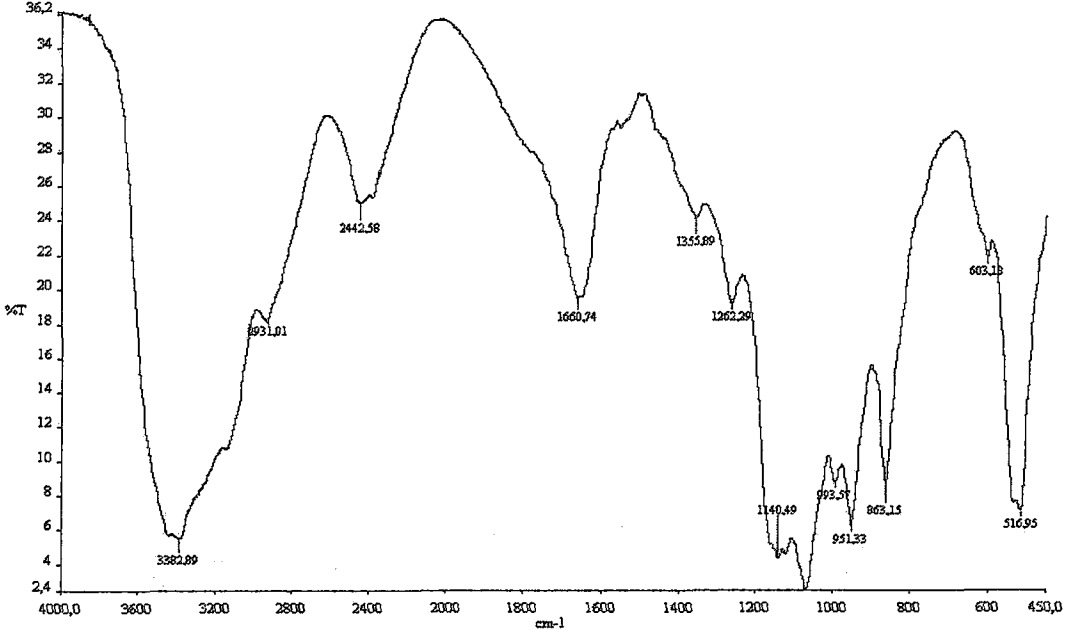




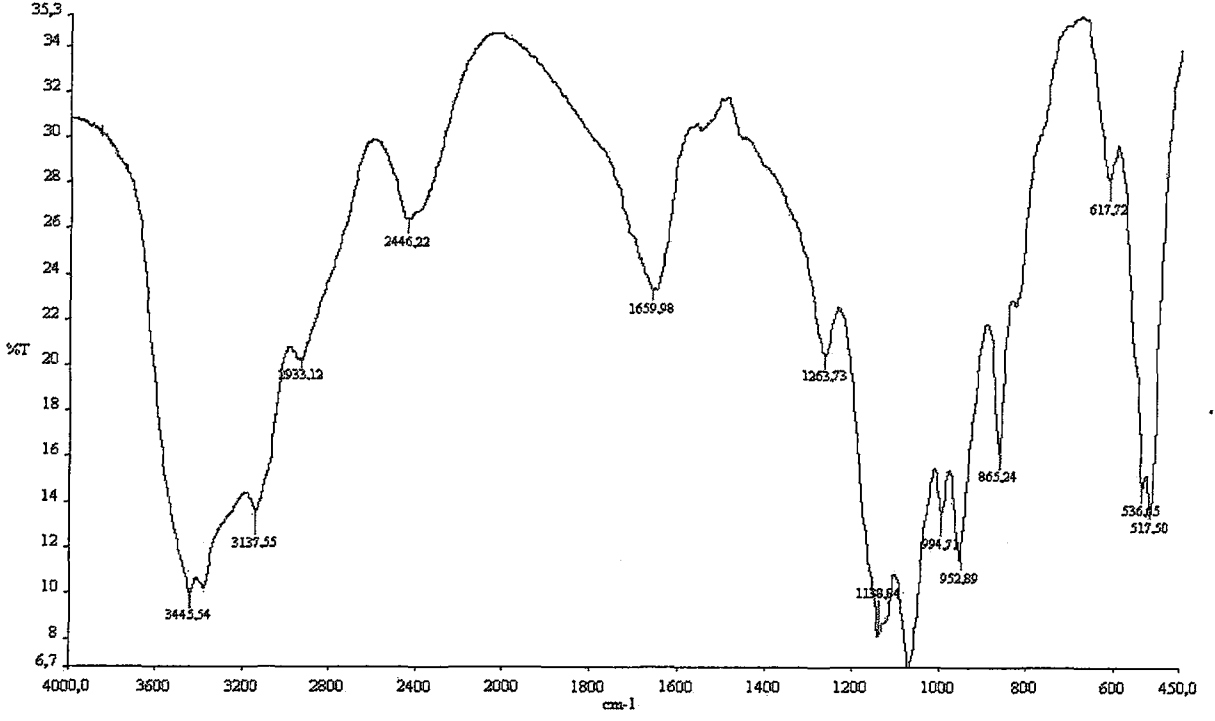
Şekil 5.21. D-CHO:Selülaz kovalent konjugatının 40°C'de, pH 7,2'de 8 saat karıştırma ile sentezlenen konjugatın UV spektrumu.



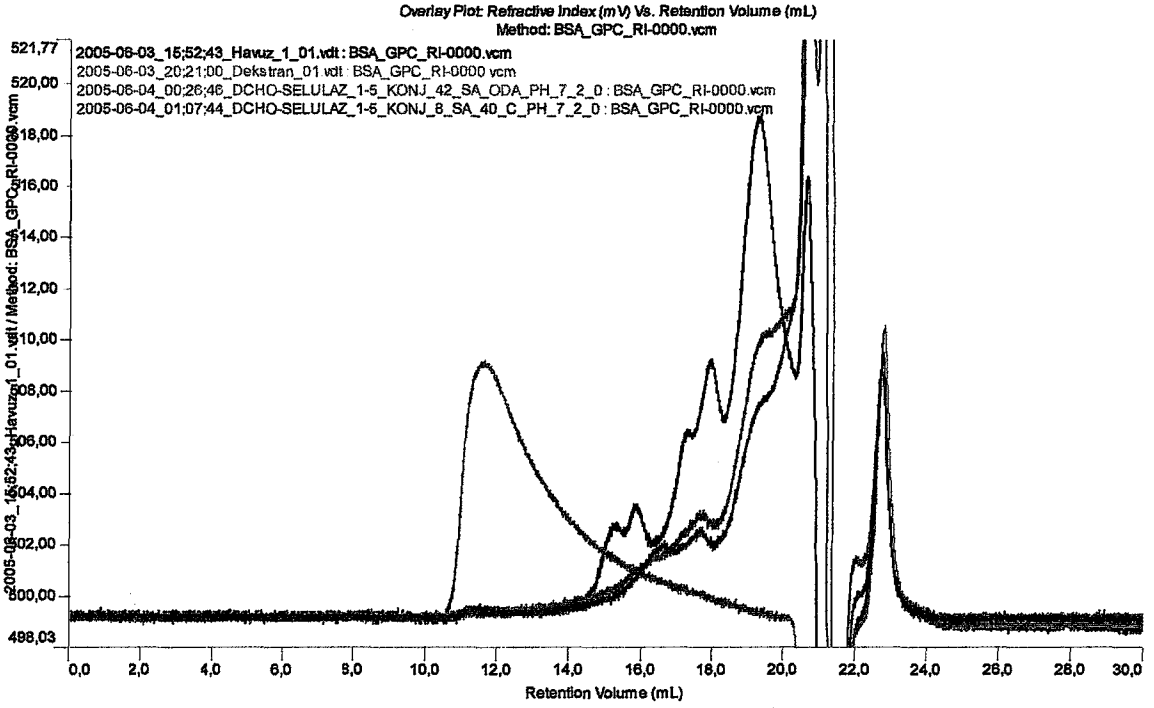
Şekil 5.22. D-CHO:Selülaz kovalent konjugatının 25°C'de, pH 7,2'de 42 saat karıştırma ile sentezlenen konjugatın UV spektrumu.



Şekil 5.23. D-CHO selülaz 1/5 Konjugat 40 °C'de, pH 7,2, 8 saat karıştırma ile elde edilen konjugatın FTIR spektrumu.



Şekil 5.24. D-CHO selülaz 1/5 Konjugatt 42 saat, pH 7,2, oda sıcaklığında karıştırma ile sentezlenen konjugatın FTIR spektrumu.



Şekil 5.25. Sentezlenen konjugatların Viscotek marka GPC cihazı kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogramı.

(-----D, ----saflaştırılmış selülaz, -----D-CHO:Selülaz 1/5 40°C'ta 8 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat, -----D-CHO:Selülaz oda sıcaklığında 42 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat)

Kolon : Shim-Pack Diol-300

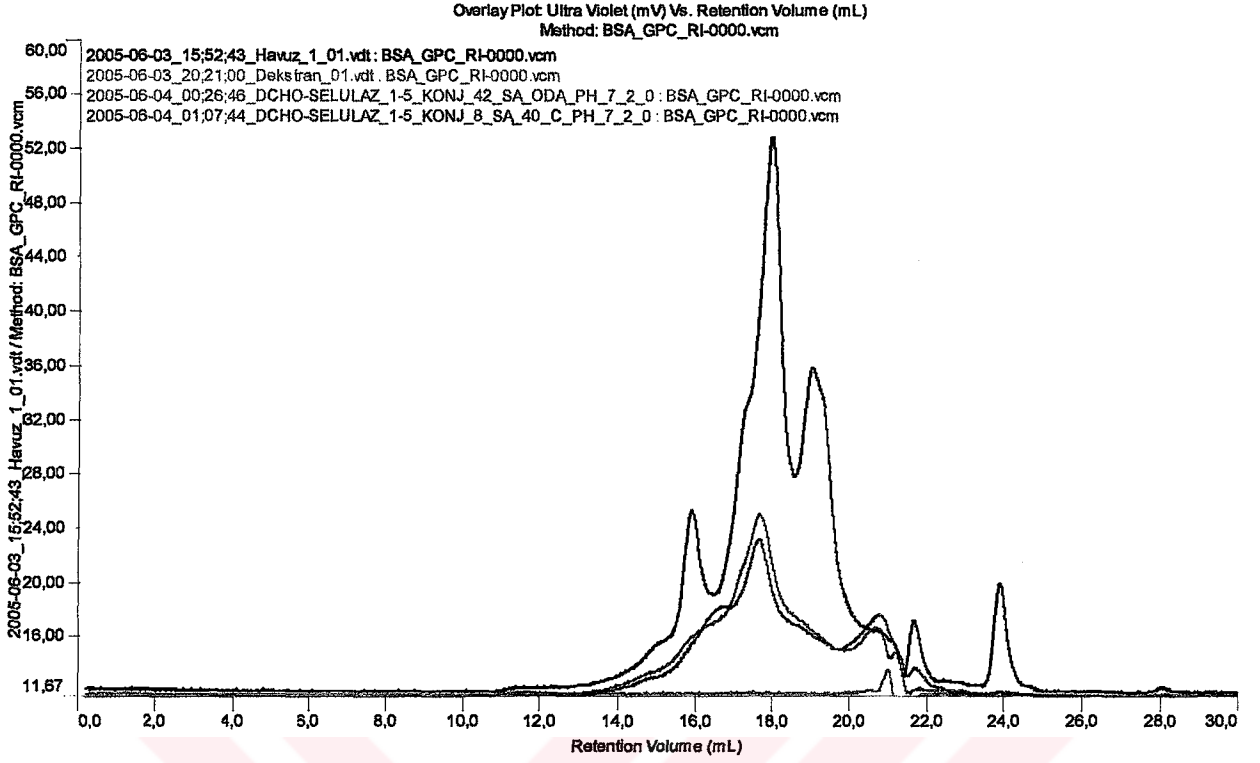
Numuneler : D, saflaştırılmış selülaz, D-CHO:Selülaz 1/5 40°C'ta 8 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat, D-CHO:Selülaz oda sıcaklığında 42 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat .

Akış hızı : 1 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : Kırılma indisi

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.26. Sentezlenen konjugatların Viscotek marka GPC cihazı UV dedektörü ile alınan kromatogram

(-----D, -----saflaştırılmış selülaz, -----D-CHO:Selülaz 1/5 40 °C'ta 8 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat, -----D-CHO:Selülaz oda sıcaklığında 42 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat )

Kolon : Shim-Pack Diol-300

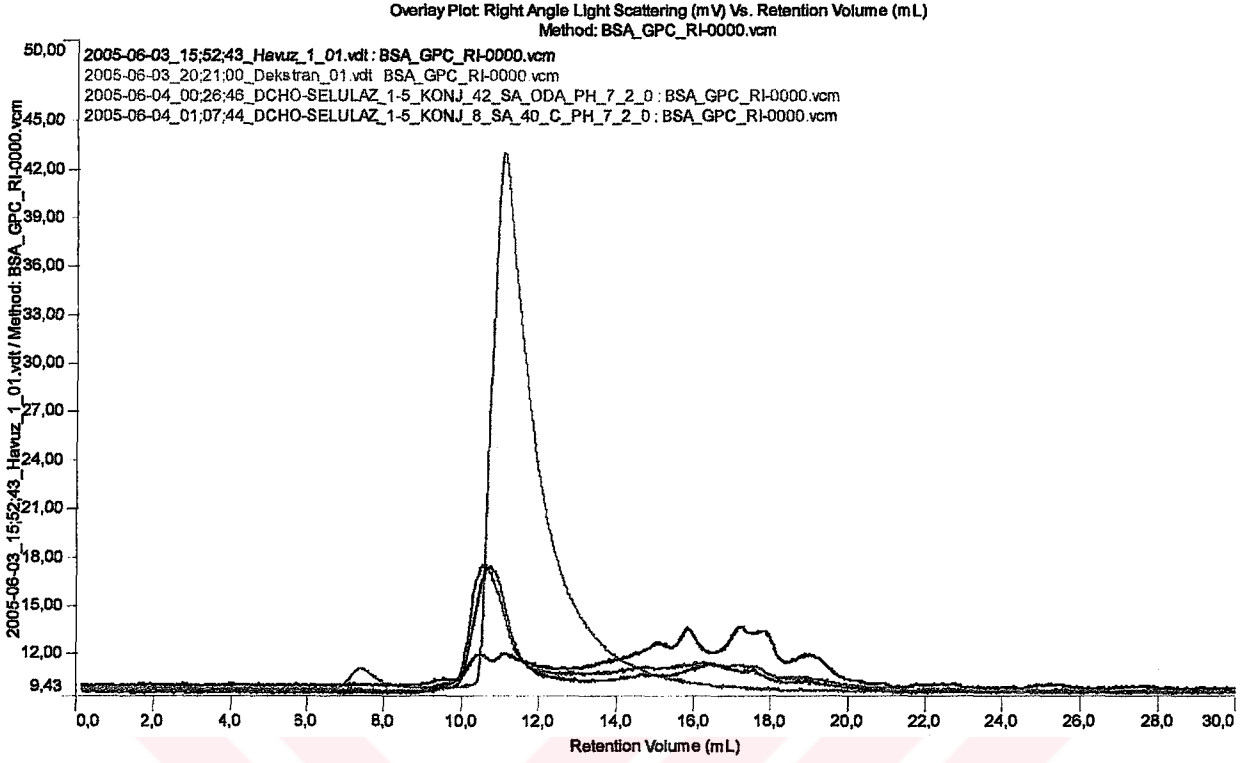
Numuneler : D, saflaştırılmış selülaz, D-CHO:Selülaz 1/5 40°C'ta 8 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat, D-CHO:Selülaz oda sıcaklığında 42 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat .

Akış hızı : 1 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : UV

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.27. Sentezlenen konjugatların Viscotek marka GPC cihazı ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogram

(-----D, ----saflaştırılmış selülaz, -----D-CHO:Selülaz 1/5 40 °C'ta 8 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat, -----D-CHO:Selülaz oda sıcaklığında 42 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat )

Kolon : Shim-Pack Diol-300

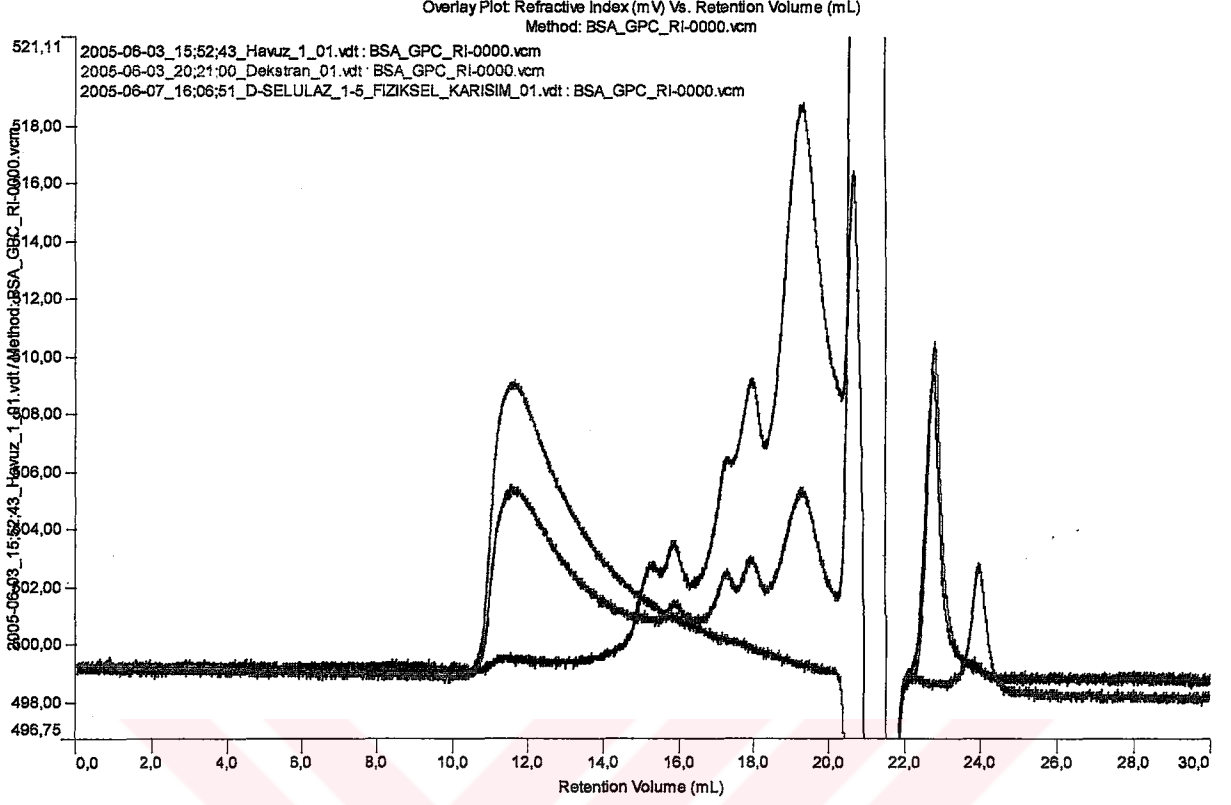
Numuneler : D, saflaştırılmış selülaz, D-CHO:Selülaz 1/5 40 °C'ta 8 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat, D-CHO:Selülaz oda sıcaklığında 42 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat .

Akış hızı : 1 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : Işık saçılması

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.28. Selülaz-dekstran fiziksel karışımının Viscotek marka GPC cihazı kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogram

(-----D, -----saflaştırılmış selülaz, -----D-Selülaz 1/5 fiziksel karışım)

Kolon : Shim-Pack Diol-300

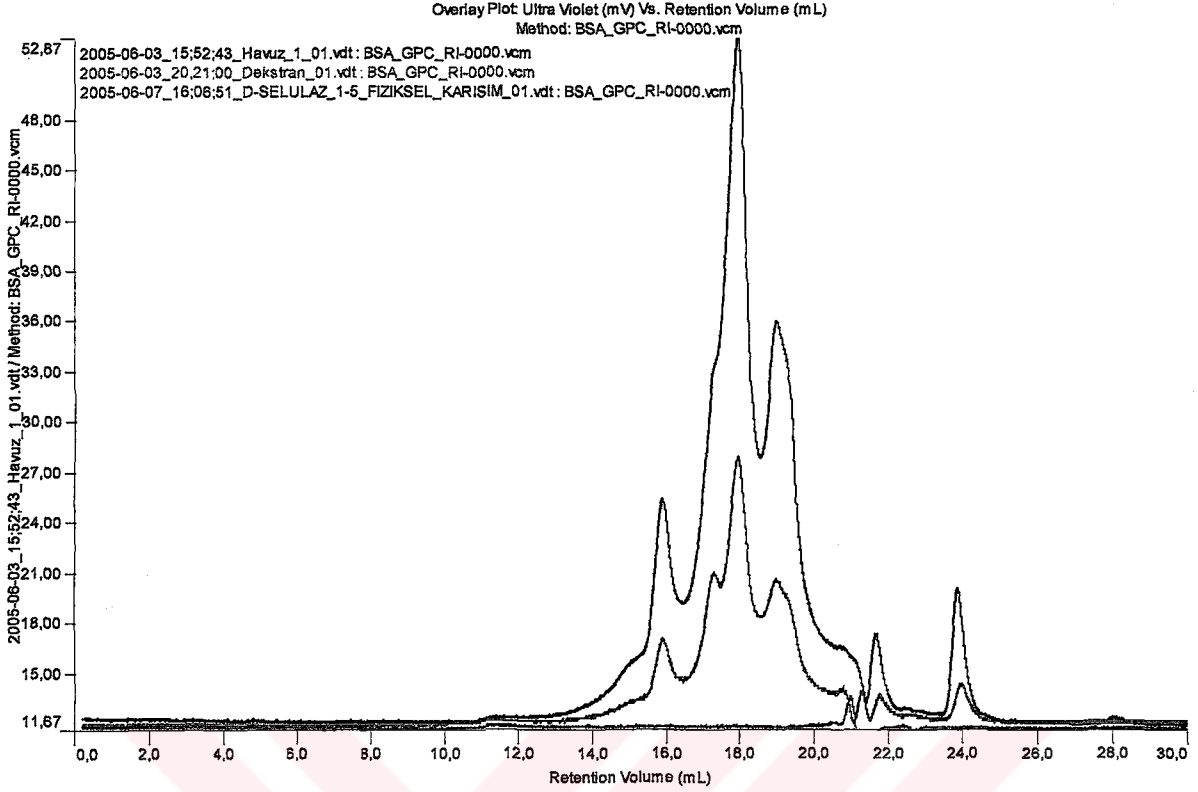
Numuneler : D, saflaştırılmış selülaz, D-Selülaz 1/5 fiziksel karışım

Akış hızı : 1 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : Kırılma indisi

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.29. Selülaz-dekstran fiziksel karışımının Viscotek marka GPC cihazı UV dedektörü ile alınan kromatogram

(-----D, -----saflastirilmis selulaz, -----D-Selulaz 1/5 fiziksel karisim)

Kolon : Shim-Pack Diol-300

Numuneler : D, saflastirilmis selulaz, D-Selulaz 1/5 fiziksel karisim

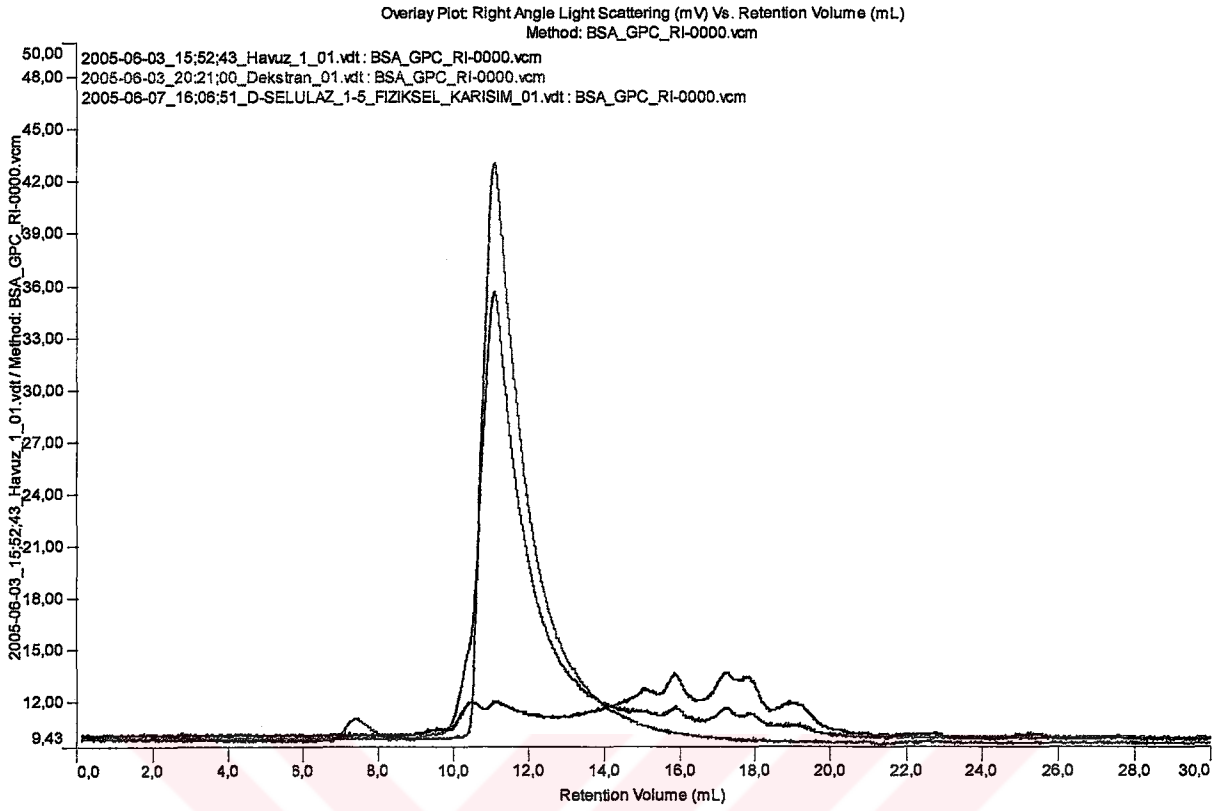
Akış hızı : 1 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : UV

Sıcaklık : 25 °C





Şekil 5.30. Selülaz-dekstran fiziksel karışımının Viscotek marka GPC cihazı ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogram

(-----D, -----saflaştırılmış selülaz, -----D-Selülaz 1/5 fiziksel karışım)

Kolon : Shim-Pack Diol-300

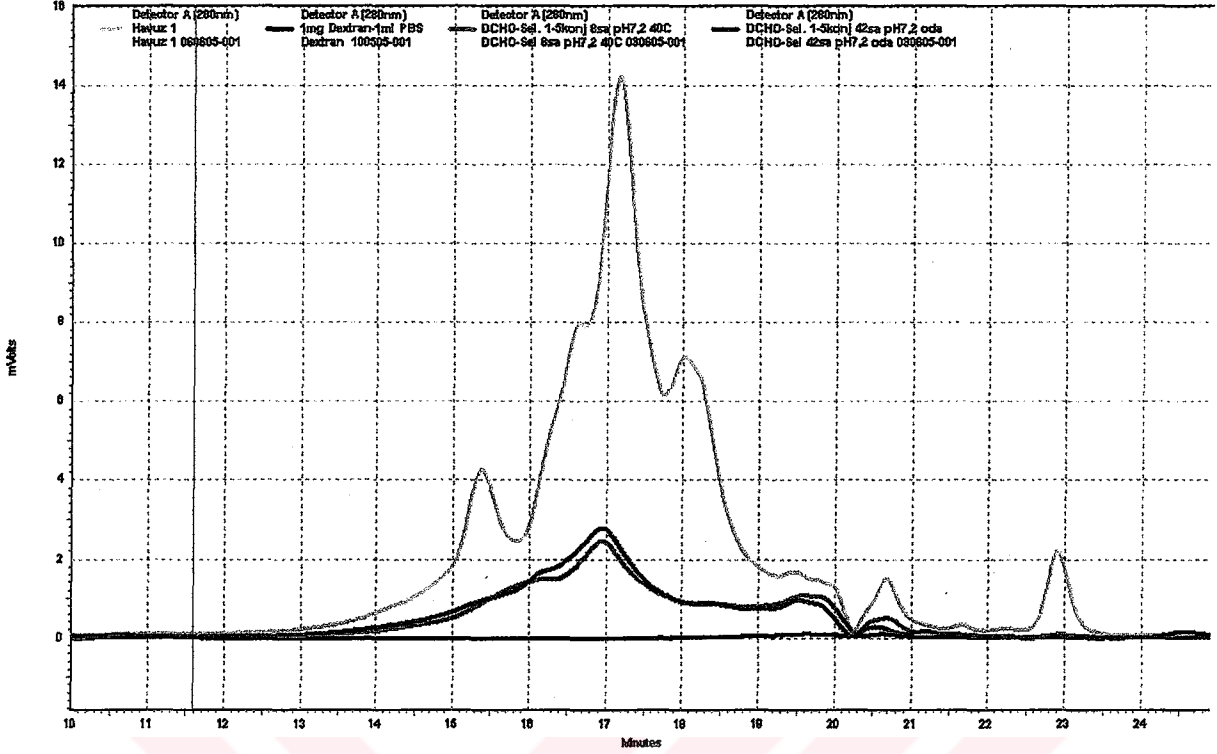
Numuneler : D, saflaştırılmış selülaz, D-Selülaz 1/5 fiziksel karışım

Akış hızı : 1 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : Işık saçılması

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.31. Sentezlenen konjugatların HPLC cihazı ile alınan kromatogramları

(----D, — saflaştırılmış selülaz, .....D-CHO:Selülaz 1/5 40°C'ta 8 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat, -.-.-D-CHO:Selülaz oda sıcaklığında 42 saat pH 7,2'de sentezlenen konjugat )

Kolon : Shim-Pack Diol-300

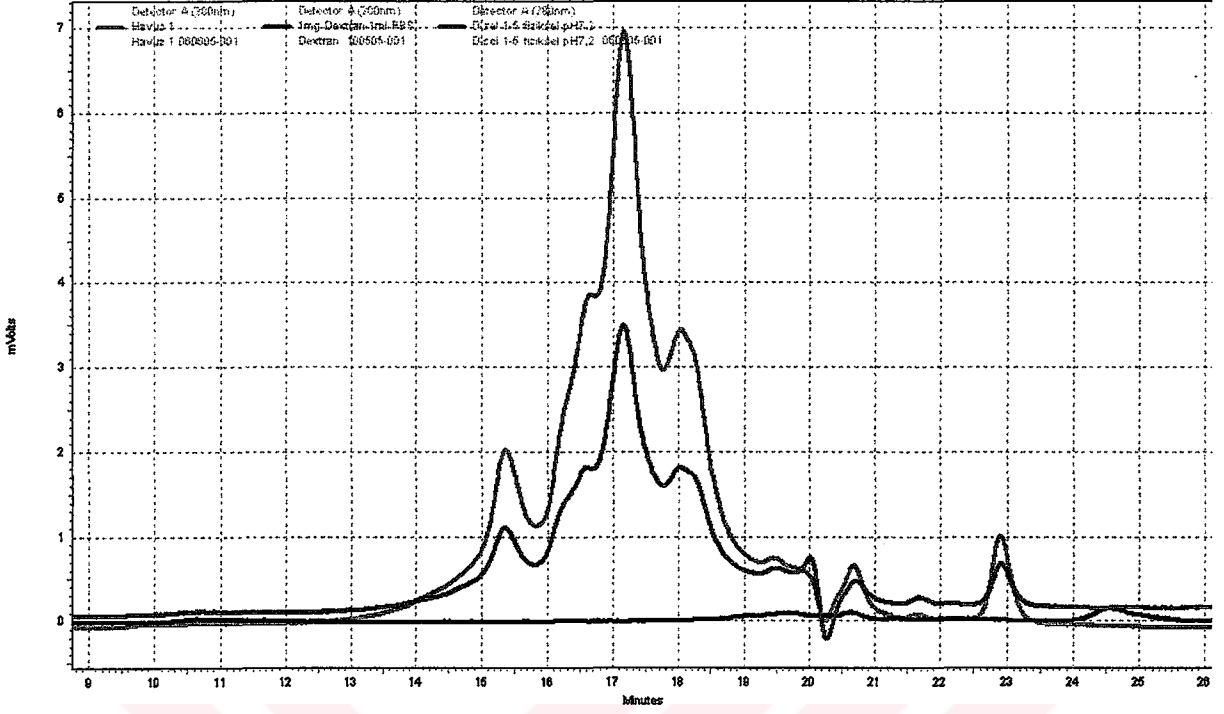
Numuneler : D, saflaştırılmış selülaz, D-CHO:Selülaz 40 °C 8 saat ve D-CHO:Selülaz 42 saat oda sıcaklığında karıştırılmış konjugat

Akış hızı : 1 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : UV

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.32. Selülaz-dekstran fiziksel karışımının HPLC cihazı ile alınan kromatogramı

(-----D, -----saflaştırılmış selülaz, -----D-:Selülaz 1/5 fiziksel karışım)

Kolon : Shim-Pack Diol-300

Numuneler : D, saflaştırılmış selülaz, D-Selülaz 1/5 fiziksel karışım

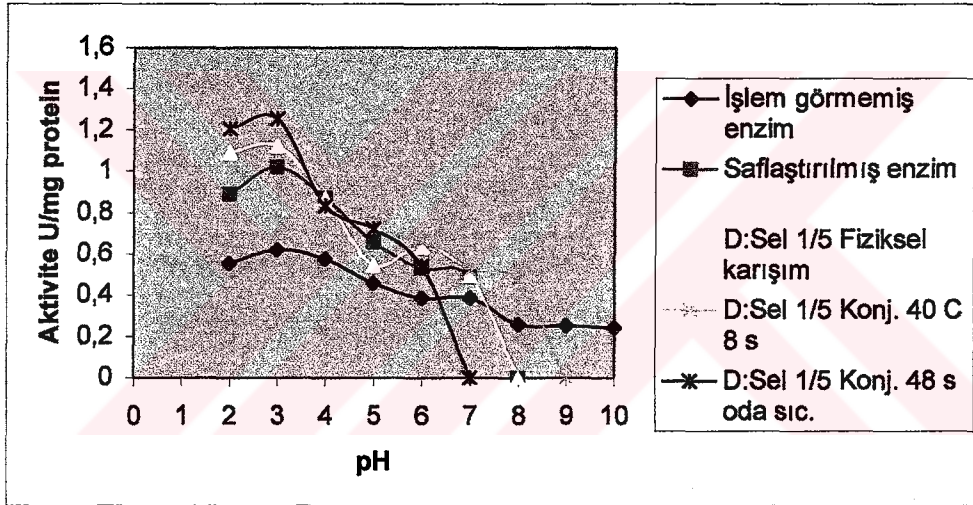
Akış hızı : 1 ml/dak

Haraketli faz : PBS

Dedektör adı : UV

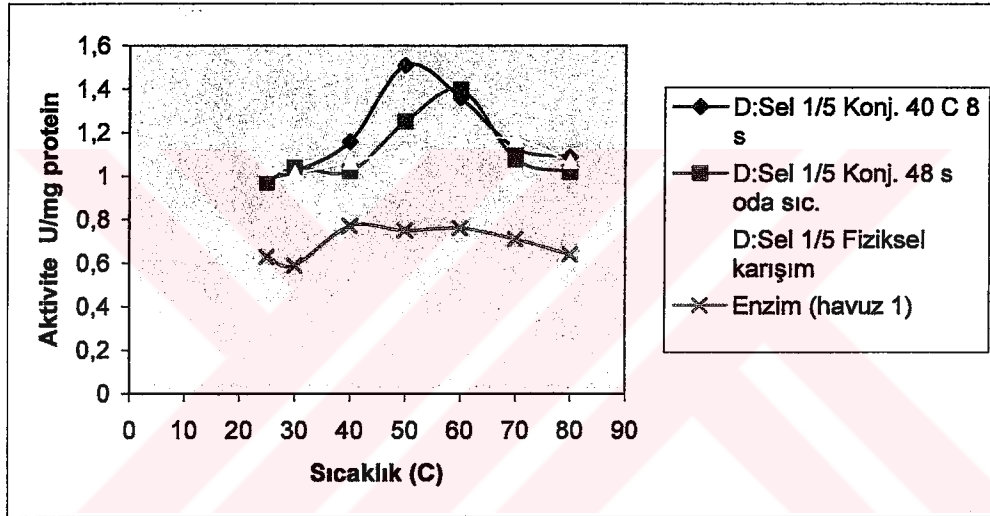
Sıcaklık : 25 °C

pH	İşlem görmemiş enzim (U/mg)	Saflaştırılmış enzim (U/mg)	D:Sel 1/5 Fiziksel karışım (U/mg)	D:Sel 1/5 Konj. 40 C 8s (U/mg)	D:Sel 1/5 Konj. 42 s oda sıc. (U/mg)
2	0,5516	0,8872	1,09	1,2	1,206
3	0,618	1,019	1,12	1,51	1,253
4	0,574	0,87	0,87	1,16	0,833
5	0,4575	0,655	0,5449	0,73	0,7199
6	0,3838	0,53	0,6338	0,66	0,54
7	0,3838	0,489	0,4946	0,52	0
8	0,2589	0	0	0,47	
9	0,2518			0	
10	0,2425				



Şekil 5.33. D-CHO:Selülaz konjugatlarının ve fiziksel karışımının değişik pH değerlerindeki aktivite grafikleri.

Sıcaklık	D:Sel 1/5 Konj. 40 C 8 s (U/mg)	D:Sel 1/5 Konj. 48 s oda sıc. (U/mg)	D:Sel 1/5 Fiziksel karışım (U/mg)	Enzim (havuz1) (U/mg)
25	0,996	0,97	1,04	0,63
30	1,023	1,043	1,019	0,59
40	1,16	1,025	1,068	0,77
50	1,51	1,253	1,12	0,75
60	1,36	1,398	1,175	0,76
70	1,13	1,08	1,168	0,71
80	1,09	1,02	1,07	0,64



Şekil 5.34. D-CHO:Selülaz konjugatları ve fiziksel karışımının optimum pH değerlerinde değişik sıcaklıklardaki aktivite grafikleri.

**Sonuçların değerlendirilmesi;**

- FTIR spektrumunda 1642 nm'de oluşan pik Dekstran'da C=O bağı oluştuğunu, dolayısı ile D-CHO türevinin sentezlendiğini gösterdi.
- Suda çözünen "H<sub>2</sub>N-NH<sub>2</sub>.2 HCl" in katalizör varlığında, 50 °C'ta Dekstran'ın içerdiği aldehid gruplarına bağlanması ile oluşan sarı renkli ürünün 400 nm'de verdiği absorbans değerlerinden yararlanarak, mmol aldehid /mg dekstran tayini gerçekleştirildi.
- 1,6 cm x 40 cm boyutlarındaki kolon dolgu maddesi olarak sefadeks G-50 kullanılarak, UV monitörlü fraksiyon toplayıcısından yararlanarak, jel filtrasyon kromatografisi ile satın alınan enzimden saf enzim elde edildi.
- "D-CHO":BSA ve daha sonra "D-CHO":Selülaz konjugatları sentezlendi. Elde edilen konjugatlar ve selülaz-dekstran fiziksel karışımı FTIR, GPC, HPLC, UV-Vis spektrofotometresi ile karakterize edildi.
- Saf enzimin, Enzim-dekstran kovalent konjugatlarının ve enzim-dekstran fiziksel karışımının aktiviteleri farklı pH ve sıcaklıklarda tayin edildi ve kıyaslandı. Enzime kıyasla enzim-dekstran kovalent konjugatları pH 3-8 aralığında daha yüksek aktivite gösterdi. Fiziksel karışım ve kovalent konjugatlar optimum pH değerinde iken her sıcaklıklarda saf enzime göre daha yüksek aktivite verdi.

## KAYNAKLAR

- Abian, O., Wilson, L., Mateo, C., et al., Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules new enzyme derivatives to be used in any reaction medium, *J. Molecular Catalysis B*, 2002, 19-20, 295-303.
- Afkhami, A., Zarei, A., R., Simultaneous spectrophotometric determination of hydrazine and phenylhydrazine based on their condensation reactions with different aromatic aldehydes in micellar media using H-point standard addition method, *Tlanta*, 2004, 62, 559-565.
- Balabuchevich, N., G., Zimina, E., P., Larionova, N., I., Encapsulation of catalase in polyelectrolyte microspheres composed of melamine formaldehyde, dextran sulfate, and protamine, *Biochemistry*, 2004, 69, 763-769.
- Betancor, L., Gallego, F., L., Hidalgo, A., et al., Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde, *Journal of Biotechnology*, 2004, 110, 201-207.
- Campbell, M., K., *Biochemistry*, second edition, 1995, p. 329-330, Saunders Coll. Publ. , New York.
- Collen, A., Ward, M., Tjerneld, F., et al., Genetically engineered peptide fusion for improved protein partitioning in aqueous two-phase system Effect of fusion localization on endoglucanase I of *Trichoderma reesei*, *J. Chromatography A*, 2001, 910, 275-284.
- Dan, S., Marton, I., Dekel, M., ... Cloning, Expression, Characterization, and Nucleophile Identification of Family 3, *Aspergillus niger*  $\beta$ -Glucosidase, *J. Biol Chem*, 2000, 275(7), 4973-4980.
- Dobrenchenko, S., N., Ivanova, I., L., S., Kleiner, A., R., An investigation of periodate-oxidised dextran, *Carbohydrate Research*, 1993, 241, 189-199.
- Fuentes, M., Segura, L., R., Abian, O., et al., Determination of protein-protein interaction through aldehyde-dextran intermolecular cross-linking, *Proteomics*, 2004, 4, 2602-2607.
- Ghose, T., K., Measurement of cellulase activities, *Pure and Appl. Chem.*, 1987, 59, 257-268.
- Gladysheva, I. P., Moroz, N. A., Papisova, A. I., Larionova, N. I., Soybean Bowman-Birk Inhibitor Conjugates with Clinical Dextran, *Biochemistry (Moscow)*, 2001, 66(4), 384-389.
- Gündüz, T., *Instrumental Analiz*, 3. Baskı, 1993, Ankara.
- Hakamada, Y., Hatada, Y., Ozawa, T., et al., Identification of thermostabilizing residues in a *Bacillus alkaline cellulase* by construction of chimeras from monophilic and thermostable enzymes and site-directed mutagenesis, *FEMS Microbiol. Letters*, 2001, 195, 67-72.
- Haris, E., L., V., Angel, S., *Protein Purification Methods a Particular approach*, Oxford University Press, 1989, New York.
- Hattori, K., Yoshida, T., Nakashima, H., et al., Synthesis of sulfonated amino-polysaccharides having anti-HIV and blood anticoagulant activities, *Carbohydrate Res.*, 1998, 321, 1-8.
- Ito, S., Kobayashi, T., Ozaki, K., A., K., et al., Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures, *Extremophiles*, 1998, 2, 185-190.

- Ito, S., Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: Enzymatic properties, genetics, and application to detergents, *Extramorphiles*, 1997, 1, 61-66.
- Kamalakkannan S., Murugan, V., Jagannadham, M., V., et al., Bacterial lipid modification of proteins for novel protein engineering application, *Prot.Eng.*, 2004, 17, 721-729.
- Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S. et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass, *Biosource Technology*, 2004, 91, 153-156.
- Karşilayan, H., Hemmilä, I., Takalo, H., Toivonen, A., Petterson, K., Lövgren, T., Mukkala, V.-M., Influence of Coupling Method on the Luminescence Properties, Coupling Efficiency, and Binding Affinity of Antibodies Labelled with Europium(III) Chelates, *Bioconjugate Chem.*, 1997, 8(1), 71-75.
- Lockington, R., A., Rodbourn, L., Barnett, S., et al., Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*, *Fungal Genetics and Biology*, 2002, 37, 190-196.
- Mähner, C., Lechner, M.D., Nordmeier, E., Synthesis and characterisation of dextran and pullulan sulphate, *Carbohydr. Res.*, 2001, 331, 203-208.
- Mustafaev, M., Osada, Y., Matsukata, M., Basalp, A., Çirakoğlu, B., Bermek, E., New Amphiphilic Immunogens by Poly(N-Isopropylacrylamide)-Modified Bovine Serum Albumin, *Polymer Gels and Networks.*, 1996, 4, 363-372.
- Mustafaev, M., Yücel, F., Çirakoğlu, B., Bermek, E., Immuno Response to Progesterone Involved in  $\text{Cu}^{2+}$ -Mediated Polyanion-Protein Complex – Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones, *Immunology letters*, 1996, 52, 63-68.
- Mustafaev, M.I., Mustafaeva, Z., Bermek, E., Osada, Y., New Amphiphilic Immunogens by  $\text{Cu}^{2+}$ -Mediated Complexes of Water-Born Poly(N-isopropylacrylamide) and Bovine Serum Albumin, *J. Bioact Compet. Polym.*, 1998, 13, 33-49.
- Nieves, M.,L., Wentzell, P.,D., Crouch S.,R., Continuous flow method for the determination of aromatic aldehydes, *Analytica Chimica Acta*, 1992, 258, 253-258.
- Okada, G., Cellulase of *Aspergillus niger*, *Methods in Enzymology*, 1988, 160, 259-264.
- Pasch, H., Trathnigg, B., HPLC of Polymers, 1999, New York.
- Roy, J.,J., Sumi, S., Sangeetha, K., Abraham, T., E., Chemical modification and immobilization of papain, *J. Chemical Tech. Biotech.*, 2005, 80, 184-188.
- Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E., Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates, *J. Biol. Macromol.*, 1988, 10, 305-310.
- Salman Dilgimen, A., Mustafaeva, Z., Demchenko, M. Kaneko, T., Osada, Y., Mustafaev, M., Water-Soluble Covalent Conjugates of Bovine Serum Albumin with Anionic Poly(N-isopropyl-acrylamide) and Their Immunogenicity, *Biomaterials*, 2001, 22, 2383-2392.
- Seidle H.F., Huber, R.E., Transglucosidic reaction of *Aspergillus niger* Family 3  $\beta$ -glucosidase:..., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005, in pres.
- Shen, X., Xia, L., Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-



07, *Process Biochemistry*, 2004, 39, 1363-1367.

Skoog, D., A., Leary, J., J., *Principles of Instrumental Analysis*, fourth edition, 1992, New York.

Uchiyama, S., Ando, M., Aoyagi, S., Isomerization of aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazones derivatives and validation of high-liquid chromatographic analysis, *J. Chromatography A*, 2003, 996, 95-102.

Vijayalakshmi, M., A., *Biochromatography*, first published, 2002, New York.

Voet, D., Voet, J., G., *Biochemistry*, John Wiley and Sons Inc., 1990, New York.

Vogt, G., Woell, S., Argos, P., Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs, *J. Mol. Biol.*, 1997, 269, 631-643.



**ÖZGEÇMİŞ**

Doğum tarihi	26.02.1977
Doğum yeri	Kırcaali
Lise	1995-1998 Gebze Lisesi
Lisans	1998-2002 Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2002- Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya bölümü Biyokimya ABD

