

**EKMEK MAYASI (*Saccharomyces cerevisiae*) FABRİKASI
ARTIĞI ELEKÜSTÜ MAYADAN
İNVERTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ**

Neşe ÖZDİNÇ

Yüksek Lisans Tezi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. H. Murat VELİOĞLU

2019

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

EKMEK MAYASI (*Saccharomyces cerevisiae*) FABRİKASI ARTIĞI ELEKÜSTÜ
MAYADAN İNVERTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

Neşe ÖZDİNÇ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU

TEKİRDAĞ-2019

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU danışmanlığında, Neşe ÖZDİNÇ tarafından hazırlanan “Ekmek Mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) Fabrikası Artığı Eleküstü Mayadan İnvvertaz Enzimi Üretimi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU (Danışman)

İmza:

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ufuk BAĞCI

İmza:

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Serap DURAKLI VELİOĞLU

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans

EKMEK MAYASI (*Saccharomyces cerevisiae*) FABRİKASI ARTIĞI ELEKÜSTÜ MAYADAN İNVERTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

Neşe ÖZDİNÇ

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU

Bu çalışmada endüstriyel ekmek mayası üretiminde artık olarak açığa çıkan eleküstü mayadan invertaz enzimi üretilmesi amaçlanmıştır. Eleküstü mayadan ekstrakte edilen ve ham enzim olarak tanımlanabilecek, yüksek invertaz aktivitesine sahip ürün (i) püskürtülerek kurutulmuş, (ii) liyofilize ve (iii) sıvı ekstraktı halinde aktivite ölçümüne tabi tutularak (iv) ticari muadili ile karşılaştırılmıştır. Her örnek öncelikle sabit sıcaklık (40°C) ve 4-7 arası değişen pH değerlerinde enzim aktivitesi yönünden incelenmiştir. Bu analizler sonucunda belirlenen optimum pH değeri sabit tutularak bu kez 30-70°C aralığında optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi denemeleri yürütülmüştür. Yapılan çalışmalara göre sıcaklığın sabit tutulduğu pH denemelerinde, tüm ürünlerde optimum pH 4,5 olarak tespit edilmiştir. Ticari invertaz enziminde 3,30 u/ml, püskürtmeli kurutucudan elde edilen üründe 2,90 u/ml, liyofilize üründe 2,91 u/ml ve son olarak sıvı ekstraktta 1,73 u/ml invertaz aktivite değerleri bulunmuştur. Optimum pH 4,5’de ve 30-70°C sıcaklık denemeleri yapılan ürünlerde de optimum sıcaklık 40°C dir. Bu aşamada 60 ve 65°C sıcaklıkların enzimleri etkilediği gözlenmiştir. Buna göre 60 ve 65°C’deki düşük aktivite değerleri sırasıyla 0,43 u/ml, 0,50 u/ml, 0,25 u/ml ve 0,25 u/ml olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda endüstride artık olarak değerlendirilen ve genelde hayvan yemi olarak oldukça ucuz fiyata satışı yapılan bir maddenin invertaz kaynağı olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu anlaşılmıştır. Tez çalışması sonucunda, daha ileri saflaştırma basamakları içeren enzim çalışmalarının yapılabilmesi için önemli veriler elde edildiği sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlar, ileri çalışmalara ışık tutabilecek niteliktedir.

Anahtar kelimeler: Eleküstü maya, invertaz, aktivite

2019, 61 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

THE PRODUCTION OF INVERTASE FROM THE BY-PRODUCT OF BAKER'S YEAST (*Saccharomyces cerevisiae*) FACTORY

Neşe ÖZDİNÇ

Tekirdağ Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU

In the present study, the production possibility of invertase enzyme from sieve residue yeast, by-product of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) factory, was investigated. Crude enzyme extracts obtained from sieve residue yeast (i) spray dried, (ii) lyophilized and (iii) collected in aqueous form were compared with (iv) industrial invertase enzyme sample in terms of enzymatic activity. Every sample was analyzed for enzymatic activity at constant temperature (40°C) and at different pH values between 4 and 7 in order to find out the optimum pH value for highest enzymatic activity. Then, the pH value was kept constant at optimum value and the enzymatic activity was determined at different temperature levels between 30-70°C. Optimum pH value was determined as 4,5 for all samples and the enzymatic activity was found as 3,30, 2,90, 2,91 and 1,73 u/ml for industrial invertase enzyme, spray dried, lyophilized and aqueous extract, respectively. The analysis at optimum pH of 4,5 and at different temperatures showed that the highest enzymatic activity was screened at 40°C for all samples. Additionally, there was a significant loss of enzymatic activity at 60-65°C for all samples. Finally, the study showed that sieve residue yeast has a usage potential in invertase production. While this by-product is sold at low price for animal feeding purposes, advanced purification techniques can be used to create added value in this sector.

Keywords: Sieve residue yeast, invertase, activity.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÇİZELGE DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ÖNSÖZ	xi
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Enzimlerin Tarihsel Gelişimi.....	3
2.2. Enzimlerin Yapısı.....	4
2.2.1. Enzimlerin Katalitik Yapısı.....	6
2.3. Enzimlerin Sistematığı.....	6
2.3.1. Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması.....	6
2.4. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler.....	8
2.4.1. Substrat Konsantrasyonu.....	8
2.4.2. Enzim Konsantrasyonu.....	9
2.4.3. Ortam pH'sı.....	10
2.4.4. Ortam Sıcaklığı.....	11
2.4.5. Su Aktivitesi (a_w).....	12
2.4.6. Enzim İnhibitörleri.....	12
2.4.7. Aktivitörler.....	13
2.4.8. Basınç.....	13
2.5. İnvvertaz Enzimi.....	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	15
3.1. Materyal.....	15
3.2.Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	15
3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	16
3.4. Yöntem.....	16
3.4.1. Eleküstü Mayanın Hidroliz İşlemi.....	16
3.4.2. Püskürterek Kurutma.....	18
3.4.3 Dondurarak Kurutma.....	18

3.4.4. Eleküstü Mayanın Ekstraksiyonu.....	19
3.4.5. İvertaz Aktivite Tayini.....	19
3.4.5.1. Titrasyon Metodu ile Enzim Aktivite Tayini.....	19
3.4.5.2. Spektrofotometrik Metod ile Enzim Aktivite Metodu.....	22
4.BULGULAR.....	23
4.1. Ham Enzim Eldesi.....	23
4.1.1. Ham Enzim Verimi.....	23
4.2. İvertaz Aktivite Tayini.....	24
4.2.1. Titrasyon Metodu ile Enzim Aktivite Tayini.....	24
4.2.1.1. Sabit Sıcaklık Değişen pH Değerlerinde Enzim Aktivite Tayini.....	24
4.2.1.2. Optimum pH Değişen Sıcaklık Değerlerinde Enzim Aktivite Tayini.....	27
4.2.2. Spektrofotometrik Metod ile Enzim Aktivite Tayini.....	30
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	38
5.1. Tartışma.....	38
5.2. Sonuç.....	41
6. KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	47

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Enzim Sınıflandırılması ve Örnekleri.....	8
Çizelge 2.2. Farklı Enzimlerin Ortam pH'ları.....	11
Çizelge 4.1. Absorbans Değerleri ve Kalibrasyon Grafiği.....	31
Çizelge 5.1. Literatür Araştırmaları.....	40

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Mide Pepsin Enzimi.....	3
Şekil 2. 2. Fisher Anahtar-Kilit İlişkisi.....	4
Şekil 2.3. Kofaktör, Koenzim, Apoenzim, Haloenzim Yapıları.....	5
Şekil 2.4. Fisher Anahtar-Kilit Mekanizması.....	5
Şekil 2.5. Inducked Fit Mekanizması.....	6
Şekil 2.6. Substrat Konstrasyonunun Enzim Hızına Etkisi.....	9
Şekil 2.7. Enzim Konstrasyonunun Enzim Hızına Etkisi.....	9
Şekil 2.8. Ortam pH'sının Enzim Hızına Etkisi.....	10
Şekil 2.9. Farklı Enzimlerin Ortam pH'ları.....	10
Şekil 2.10. Ortam Sıcaklığının Enzim Hızına Etkisi.....	11
Şekil 2.11. Sakkarozun Hidroliz Tepkimesi.....	13
Şekil 2.12. İnvvertazın Genel Tepkimesi.....	14
Şekil 3.1. Elek Üstü Mayanın Hidroliz Aşaması.....	17
Şekil 3.2. Püskürterek Kurutma Aşamaları.....	18
Şekil 4.1.Sabit Sıcaklık Değişen pH Değerleri Ticari İnvvertaz Aktivite Sonuçları.....	25
Şekil 4.2. Sabit Sıcaklık Değişen pH Değerleri Püskürterek Kurutulmuş Aktivite Sonuçları.....	25
Şekil 4.3. Sabit Sıcaklık Değişen pH Değerleri Liyofilize Aktivite Sonuçları.....	26
Şekil 4.4. Sabit Sıcaklık Değişen pH Değerleri Eleküstü Maya Ekstraktı Aktivite Sonuçları.....	26
Şekil 4.5. Optimum pH'da, Değişen Sıcaklık Değerleri Ticari İnvvertaz Aktivite Sonuçları.....	28
Şekil 4.6. Optimum pH'da, Değişen Sıcaklık Değerleri Püskürterek Kurutulmuş Aktivite Sonuçları.....	28
Şekil 4.7. Optimum pH'da, Değişen Sıcaklık Değerleri Liyofilize Aktivite Sonuçları.....	29
Şekil 4.8. Optimum pH'da, Değişen Sıcaklık Değerleri Eleküstü Maya Ekstraktı Aktivite Sonuçları.....	29

Şekil 4.9. Sabit Sıcaklık Değişen pH Değerleri Ticari İvertaz Glukoz Sonuçları.....	32
Şekil 4.10. Sabit Sıcaklık Değişen pH Değerleri Püskürterek Kurutulmuş Glukoz Sonuçları.....	32
Şekil 4.11. Sabit Sıcaklık Değişen pH Değerleri Liyofilize Glukoz Sonuçları.....	33
Şekil 4.12. Sabit Sıcaklık Değişen pH Değerleri Eleküstü Maya Ekstraktı Glukoz Sonuçları.....	33
Şekil 4.13. Optimum pH'da, Değişen Sıcaklık Değerleri Ticari İvertaz Glukoz Sonuçları.....	34
Şekil 4.14. Optimum pH'da, Değişen Sıcaklık Değerleri Püskürterek Kurutulmuş Glukoz Sonuçları.....	35
Şekil 4.15. Optimum pH'da, Değişen Sıcaklık Değerleri Liyofilize Glukoz Sonuçları.....	35
Şekil 4.16. Optimum pH'da, Değişen Sıcaklık Değerleri Eleküstü Maya Ekstraktı Glukoz Sonuçları.....	36

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

a_w	: Su Aktivitesi
CH_3COOH	: Asetik Asit
$C_2H_3NO_2$: Sodyum Asetat
$C_6H_{12}O_6$: Nişasta
C_7H_8	: Toluene
$C_7H_4N_2O_7$: 3,5 -dinitrosalicylic acid (DNS)
CO_2	: Karbondioksit
$CuSO_4$: Bakır II Sülfat
Df	: Seyreltme Faktörü
d	: Dakika
F	: Konsantrasyon Faktörü
G	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
H_2SO_4	: Sülfirik Asit
$KNaC_4H_4O_6$: Potasyum Sodyum Tartarat (Rochelle Tuzu)
KI	: Potasyum İyodür
KHz	: Kilohertz
Km	: Michaelis-Menten Sabiti
Kg	: Kilogram
L	: Litre
mg	: Milligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
μmol	: Mikromol

Mol/ml	: Mol/mililitre
NaOH	: Sodyum Hidroksit
Na ₂ S ₂ O ₃	: Sodyum Thiosülfat
Na ₂ SO ₄	: Sodyum Sülfat
N	: Normalite
Nm	: Nanometre
Q ₁₀	: Sıcaklık Katsayısı
pH	: pH metre
Rpm	: Dakikada Devir Sayısı
S	: Saniye
u/ml	: Volume Aktivite
u/gr	: Bir Gram Enzimin Toplam Hacme Oranı
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
V _s	: Örnek hacmi
V _{max}	: Maximum Hız

Kısaltmalar

- DNS : 3,5-dinitrosalisilik asit
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
E.U : Enzim Birimi
E.C : Enzim Komisyonu
ETS : Elektron Taşıma Sistemi

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında ve tez çalışmam boyunca, büyük katkısını gördüğüm desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez çalışmamın ön hazırlık süreci Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği bölümünde gerçekleşmiş olup, çalışmalarım boyunca değerli görüşlerinden yararlandığım ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya ve Banu SEZER'e minnetlerimi sunarım.

Araştırmalarım sırasında bilgilerini ve deneyimlerini benden esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Serap DURAKLI VELİOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarımın yanı sıra ön hazırlık süreci boyunca yanımda olan ve laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen, çalışma arkadaşlarım Süleyman BAYTUR, Armin BJELAK, Çişil Cebeci, Sabriye Bükre ORAL, Gamze YILMAZ, Buse Nur URAL, Canısı SAĞLAM teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyip her koşulda yanımda olan değerli aileme ve emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2019

Neşe ÖZDİNÇ
Ziraat Mühendisi

1. GİRİŞ

Kimyasal tepkimelerin hızını arttıran biyomoleküllere enzim adı verilmektedir. Genel olarak tüm enzimler protein yapısındadır (Garret ve ark. 1999). Enzimler, kendileri değişikliğe uğramadan, hücre içinde oluşan binlerce tepkimenin hızını ve spesifikliğini düzenleyen biyolojik katalizörlerdir. Metabolik tepkimelerin her birini enzimler kontrol eder, tepkimelerin hızlandırılmasında görev alır. Tepkimenin başlangıcında enzimlerin etki ettiği madde substrat, tepkime sonucu olarak artan ve açığa çıkan madde de ürün olarak adlandırılır. Genel olarak enzimler, substratın en dış yüzeyinden etki göstermeye başlayarak şeklinde değişiklikler oluşturur ve ürün ortaya çıkarırlar. Son aşama olarak ürün oluşumundan sonra, enzimler başka bir substrat için hazırlanır (Bhatt 2000).

Kühne 1878 yılında enzim terimini ilk defa ortaya atmıştır. Enzim terimi Latincedeki “En” ve “Zyme” kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşturulmuştur. Türkçe karşılığı En ve Zyme kelimelerinin “içinde” ve ”maya” olup, asıl olarak “mayanın içerisinde” (Enzym=In yeast) anlamına gelmektedir.

Enzimler mikroorganizma, bitki ve hayvanların canlı hücreleri tarafından sentezlenir. Yaşamın devamı için enzimler elzem (gerekli) olan moleküllerdir. Hücre içinde bulunan her enzim aktivite göstermektedir. *In vivo* koşullarda olabileceği gibi *in vitro* (hücre dışında) koşullarda da aktivite gösterirler. Enzimler düşük aktivasyon enerjisi, düşük işletme sıcaklığı ve basıncında yüksek aktivite gösterirler.

Enzimler, endüstride kullanılan kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında kullanımı oldukça yaygın yardımcı ajanlardır. Yüksek katalitik etkinlikleri ve sahip oldukları spesifik özellikleri öne çıkan önemli avantajlarıdır. Enzimler substrat özgüllüğüne sahip olmasından dolayı, tek bir son ürün oluşumunu sağlamakta ve gereksiz yan ürünün oluşmasını da engellemektedir. Bu durumda, yüksek tepkime verimi sağlamasından dolayı maliyeti düşürmektedir. Çevre boyutuna bakılırsa, enzimlerin protein yapıya sahip olmaları biyolojik olarak bozunabilmelerine imkân tanır, böylelikle atık yönetimini kolaylaştırır (Krajewska 2003, Aehle 2004, Kasavi 2006, Özçömlekçi 2006).

İnvertaz (-fruktofuranozidaz, E.C 3.2.1.26) enzimi, sakkarozun fruktoz ve glukoza çevrilmesinde kullanılan biyolojik katalizördür. İnvertaz enzimi genellikle mayalardan elde edilmektedir. Endüstri alanında ise tatlandırıcı ve kristallenmeyen fruktozun eldesinde kullanılan enzimdir (Başçı 1985, Akpınar 2004). İnvertaz enzimi kimliği belirlenen proteinler

arasında en önemli enzimlerden birisidir. Enzim kinetiğinin prensiplerinin çıkartılmasında kullanılmıştır (Michaelis ve Menten, 1913).

Sanayi ve genellikle gıda endüstrisinde invertaz enzimi kullanımı yaygındır, bunlara örnek olarak; şekerleme sanayiinde uygulamalar, kamış melasının etanole fermantasyonu, invert şeker şuruplarının hazırlanması verilebilir.

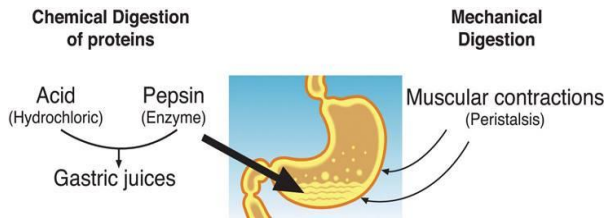
Literatür incelendiğinde proteinler ve enzimlerin saflaştırılması, farklı enzimlerin aktivitelerinin hesaplanması, enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması konusunda oldukça fazla çalışma olduğu görülmektedir. İvertaz enzimi de bu çalışmalar kapsamında, üretim, modelleme, optimizasyon gibi alt başlıklarda incelenmiş bir enzim olmakla beraber artık bir madde olan eleküstü mayadan invertaz eldesi konusu ülkemizin enzim ithalatının azaltılmasına, ucuz ve yerli kaynaklar kullanılarak fayda sağlayacak bir çalışma olarak görülmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Enzimlerin Tarihsel Gelişimi

İnsanlar geçmişten günümüze kadar enzimlerden farklı yollarla yararlanmışlardır. Antik çağlarda insanların, peynir, mayalı ekmek, bira, şarap, sirke vb. gıdaların üretiminin yanında deri, keten ve çivit işlemede de enzimleri kullandığı bilinmektedir (Kirk 2002). Örneğin, amilaz enzimi kaynağı olan malt biracılıkta, rennet enzimi içeren mide mukozası peynir yapımında, papain enzimi içeren “papaya bitki özü” etlerin yumuşatılmasında kullanılmıştır.

Enzimler konusunda ilk çalışmalar sindirim ve fermentasyon konusunda başlamıştır. Spallanzani (1729-1799) 17. yüzyılda sindirim konusunda ilk çalışmaları yapan ve mide pepsininin varlığını kanıtlayan ilk araştırmacıdır (Şekil 2.1). Yapılan çalışmada, kafes içinde yer alan şahinlere et parçaları yedirmiş, ardından şahinleri kusturarak mide sıvısının eti yumuşattığını gözlemlemiştir. Böylelikle mide sıvısının eti yumuşatmadaki önemi kanıtlanmıştır (Buxbaum 2007).



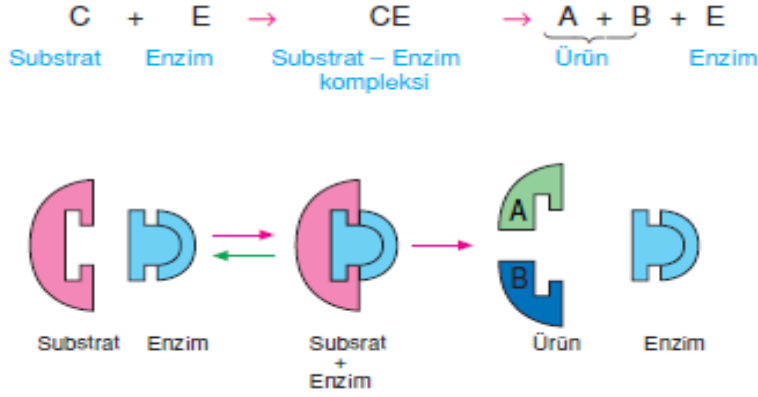
Şekil 2.1. Mide pepsini enzimi

Kirchoff 18. yüzyılda buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekere dönüştüğünü göstermiştir (Telefoncu 1986).

Payen ve Persoz Fransız kimyagerler 1833 yılında, filizlenmiş arpadan nişasta hidrolizinden daha çok etkili olan maddeyi elde ederek daha sonraki çalışmalarda diyastaz olarak adlandırmışlardır.

Pasteur enzim biliminin ortaya çıkmasında önemli katkılarıyla şeker ve maya varlığında alkol fermentasyonunun gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Buna karşılık Liebig, fermentasyon için canlı hücreye gereksinim olmadığını savunmuştur. 2 görüş arasındaki farklılık 1870-1890 yılları arasında devam etmiştir. Tartışmalar sonucunda 1897 yılında Büchner maya hücrelerinden izolasyon yaparak, enzimlerin canlı maya hücreleri dışında da aynı fonksiyonlarını yerine getirdiğini kanıtlayarak, tartışmaya son vermiştir.

Fischer 1894 yılında, enzimlerin substratlarına özgü olan spesifikliklerini ortaya koyarak, anahtar-kilit modelini tanımlayarak, bazı kavramların enzimoloji alanına girmesini sağlamıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Fischer'in Anahtar-kilit modeli (Zbynek Prokop ve ark. 2012)

Fischer'in 1894 yılında enzimlerin spesifikliğini anlatan "anahtar-kilit" (lock-and-key) modeline karşılık, 1959 yılında Koshland enzim spesifikliği konusunda "uyum meydana getirme" (induce-fit) modelini öne sürmüştür. Bu modellerin ışığında günümüzde hala geçerliliğini koruyan adımlar atılmıştır.

James B. Sumner 1926 yılında, Cornell Üniversitesinde ilk kez üreaz enzimini fasulyeden izole etmiştir (Lehninger ve ark. 2004). Üreaz kristallerinin tamamen proteinden oluştuğunu ortaya çıkartan Sumner, enzimlerin preotein yapılı olduklarını ileri sürmüştür ve bu teziyle 1947' de Nobel ödülünü kazanmıştır. Devamında 1930 yılında Northrop, pepsin enzimini saf halde elde ederek Nobel ödülüne layık bulunmuştur (Gözükara 1989).

Enzimler geçmişten günümüze farklı çalışmalarla incelenmiştir. Her geçen gün enzimlerin farklı alanlarda kullanımı da yaygınlaşmaktadır.

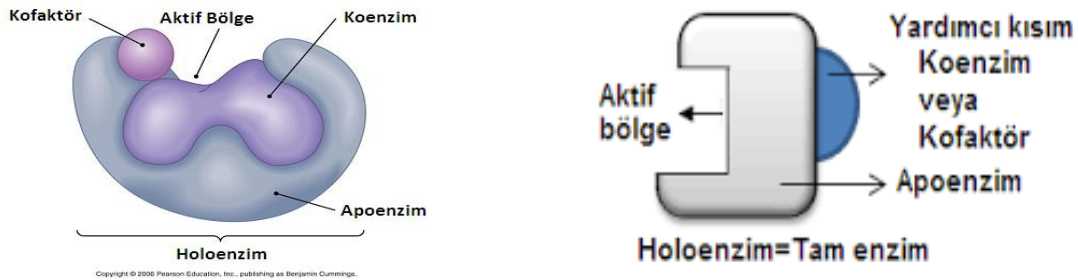
2.2 Enzimlerin Yapısı

Enzimler, biyolojik reaksiyonları katalizleyen protein yapılı moleküllerdir. Her bir enzimin proteini oluşturan amino grup asitlerin sayısı, dizilişi ve moleküllerin konformasyonu belli bir dizayn içerisindedir.

Protein yapısında olmayan, metal iyonlarından oluşan yan gruplara kofaktör denir. Koenzim ise, enzimlerin aktivite yapısında olmasını sağlayan karmaşık organik moleküllerdir. Kofaktörler yüksek sıcaklıklara dayanıklı yapılardır. Kofaktör ve koenzimler enzimlere sıkı ya da gevşek bağlanabilirler.

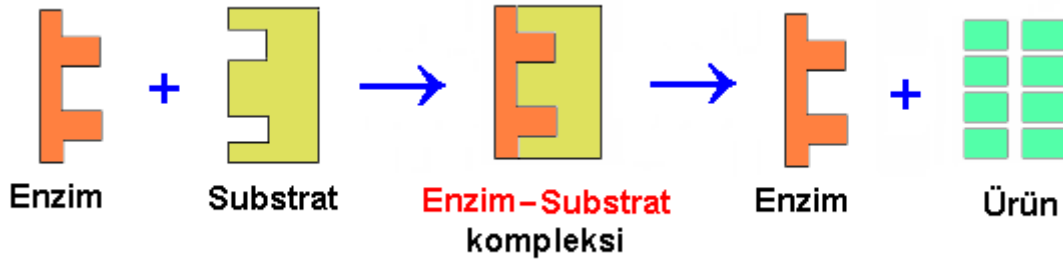
Enzimlerin dış yüzeyine bağlanan ve protein yapısında olmayan gruplar da vardır, bunlara prostetik grup adı verilir. Şekil 2.3’de gösterildiği gibi bir enzim koenzimi ya da kofaktörü ile bağlysa ve aktif durumdaysa holoenzim adını alır. Bunun tam aksine bir enzim koenzimi ve kofaktörü ile enzimden ayrılır ve inaktif durumda olursa apoenzim adını alır (Gözükara 1997). Enzim aktivitesi koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda optimum sonuç elde edilir (Bailey ve ark. 1977).

Kofaktör kendi içinde 3 gruba ayrılır; koenzimler, prostetik grup ve inorganik iyonlardır.

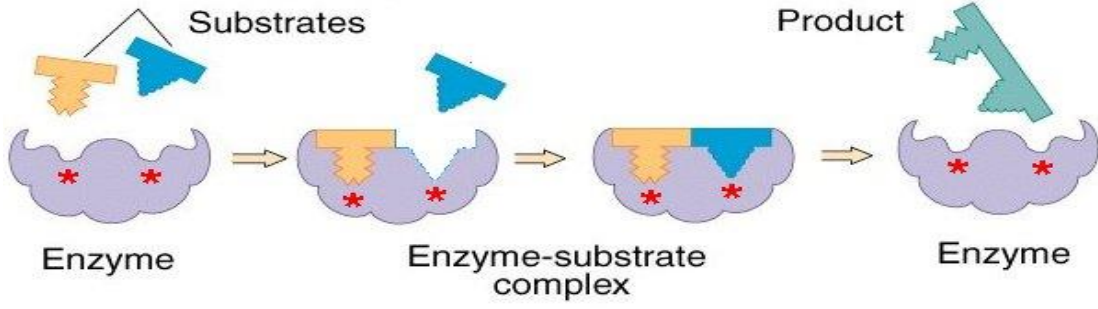


Şekil 2.3. Kofaktör, koenzim, apoenzim ve holoenzim yapısı (Day P.R. 1996)

Enzimlerin aktif bölgesine bağlanan ve enzimler üzerinde aktivite gösteren moleküle substrat denir. Substratın bağlandığı ve enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği bu bölge aktif merkez adını alır. Aynı zamanda “katalitik merkez” ya da “substrat merkezi” gibi farklı şekillerde adlandırılır. Her bir enzimin kendine özgü bir substratı bulunur. Enzim-substrat ilişkisi anahtar- kilit ilişkisine benzetilir. Substrat anahtar, enzim de kilide benzetilerek aralarında geometrik olarak uyumlu kompleks yapı oluşur (Şekil 2.4). Buna karşılık 1958 yılında Koshland’ın uyum modeline göre ise; enzimler esnek (induced fit) yapılı olup, aktif bölgeleri substrat ile birleşince sürekli şekil değiştirmektedir, sabit bir aktif bölgeye bağlanmaz (Şekil 2.5).



Şekil 2.4. Fischer’in anahtar-kilit modeli



Şekil 2.5 Induced fit modeli

2.2.1 Enzimlerin Katalitik Yapısı

Enzimler tepkimelerin hızını arttıran, tepkime sonucunda kendileri değişikliğe uğramadan ve harcanmadan çıkan moleküllerdir. Enzimler tepkimelerin kinetik özelliğini etkilemektedir. Enzimlerin aktiviteleri, katalizledikleri reaksiyonun hızına göre belirlenir. Enzim aktivitesi “turnover sayısı” ya da “enzim birimi” olarak ifade edilir. Enzim birimi normal koşullarda dakikada 1 mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substrat miktarı olarak ifade edilir. Başka bir tanıma göre, bir enzim birimi (1 E.U) dakikada 1 μ mol substrat katalizleyen enzimin mg olarak miktarıdır. Optimum pH ve sıcaklıkta enzim birimi en ideal değeri verir.

Enzim seçiciliği, enzimleri diğer kimyasal katalizörlerden ayıran en önemli özelliktir. Enzimler her tepkimeyi katalizlemezler. Bu duruma “enzim seçiciliği” denir. Enzimler, reaksiyon seçiciliği yönünden dört gruba ayrılırlar (Pekin 1979).

Mutlak seçicilik: Enzim tek bir tepkimeyi katalizler, tek substrata seçicidir.

Grup seçicilik: Enzim, yapısında belli bir grup substrat ile ilgili tepkimeleri katalizler.

Tepkime ya da bağ seçicilik: Enzimler, belli bir tepkime ürününü katalizler. Substrat yapısında bulunan belli bir bağa seçicidir.

Sterokimyasal seçicilik: Enzim burada substratın sterokimyasal şekliyle etkileniyorsa seçicidir.

2.3 Enzimlerin Sistematiği

2.3.1 Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması

Enzimlerin sayısı 1950’lerin sonuna kadar hızlı bir şekilde artış göstermiştir. Araştırmacıların aynı enzime farklı isimler vermelerinden dolayı isimlendirmede karışıklıklar meydana gelmiştir. Karışıklıkların düzenlenmesi amacıyla 1956 yılında Uluslararası Enzim Komisyonu (International Commission on Enzyme) kurulmuştur.

Enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması için üç genel prensip kabul edilmiştir. Birincisi; -az eki ile biten enzim isimleri, tek enzimler için kullanılmalıdır. İkincisi; katalizledikleri tepkimelere göre enzimler adlandırılmalıdır. Üçüncüsü; katalizlenen tepkime tipine göre enzimler adlandırılmalıdır. Bu üç prensip enzim komisyonu (E.C.) tarafınca belirlenen kod numaraları kullanılarak enzimlerin adlandırılmasını sağlar. Enzimler, genellikle iki isme sahiptir. Biri sistematik biri de yaygın kullanılan isimlerindedir. Enzimler, sistematik ismi ve E.C. kodu ile tanımlandıktan sonra, verilen isimle karışıklık olmadan kullanılabilir (Aehle 2004).

Enzim komisyonuna göre enzimler katalizledikleri tepkimeye göre altı ana gruba ayrılır ve her biri farklı bir kod numaraları ile tanımlanır. "E.C." ön ekiyle başlayan kodlar noktalarla birbirinden ayrılmış dört farklı görevi ifade eder.

- i) ilk rakam, enzimin hangi alt sınıftan hangisine ait olduğunu gösterir.
- ii) ikinci rakam, enzimin alt sınıfını tanımlar.
- iii) üçüncü rakam, ikinci alt grubu temsil eder.
- iv) dördüncü rakam, enzimin alt-alt sınıfının seri numarasını tanımlar.

Bu tanımlamaya göre enzimlerin sınıflandırılması aşağıdaki gibidir:

Enzim Sınıfı 1: Oksidoredüktazlar, oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon (indirgenme) tepkimelerini katalizleyen enzim sınıfıdır. Yükseltgenme tepkimeleri; bir moleküle oksijen eklemek ya da hidrojen ayırmak, indirgenme tepkimeleri; bir molekülden oksijen ayırmak ya da hidrojen eklemek anlamına gelmektedir.

Enzim Sınıfı 2: Transferazlar, bir molekülden H⁺ dışında, carbon, azot ve fosfor taşıyan grupları diğer moleküle taşınmasını katalizleyen enzim grubudur.

Enzim Sınıfı 3: Hidrolazlar, tepkimelere su katılması şartıyla bağların parçalanmasını katalizleyen enzim grubudur. Diastaz, maltaz, invertaz, amilaz, pepsin ve tripsin örnek verilebilir.

Enzim Sınıfı 4: Liyazlar, hidroliz ve oksidasyon tepkimeleri haricinde farklı kimyasal bağları kırabilen enzim grubudur. C-C, C-O, C-N gibi bağların eliminasyonu ile katalizlenir.

Enzim Sınıfı 5: İzomerazlar, geometrik ve optik izomerlerin rasemizasyonunu katalize eden enzim grubudur. Yaptıkları izomerasyonlara göre; rasemazlar, epimerazlar, cis-trans, izomerazlar, mutazlar ve sikloizomerazlar olarak bilinmektedirler.

Enzim Sınıfı 6: Ligazlar, fosfat bağlarının yüksek enerjilerini kırarak carbon ile carbon, azot, kükürt ve oksijen bağlanmasını katalize eden enzim grubudur (Keha ve Küfrevioğlu 2010).

Aşağıdaki çizelge 2.1.'de enzim sınıflarına ait bazı örnekler verilmiştir.

Çizelge 2.1. Enzim Sınıflandırılması ve Örnekleri

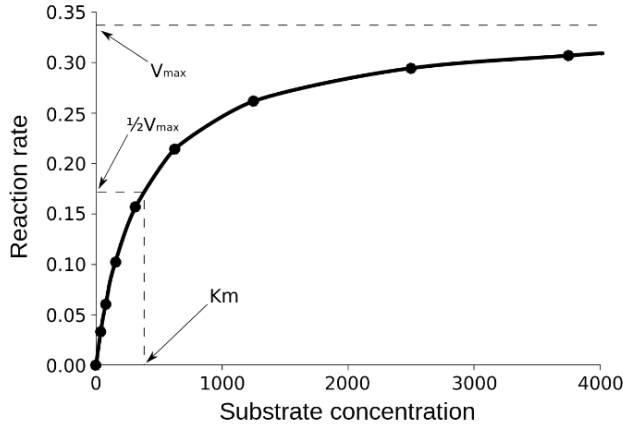
Ana Gruplar	Enzim	Kod
Oksidoredüktazlar	Laktat dehidrogenaz	1.1.1.27
Transferazlar	Alanin transminaz	2.6.1.2
Hidrolaz	İnvertaz	3.2.1.26
Liyaz	Piruvat dekarboksilaz	4.1.1.1
İzomeraz	Alanin rasemaz	5.1.1.1
Ligaz	Glutamin sentetaz	6.3.1.2

2.4 Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Tüm kataliz sistemlerinde olduğu gibi, enzimin yakın çevre koşulları çok önemlidir. Ana tepkiyen, tepkimeyi inhibe eden ve tepkimeyi aktivite eden maddelerin derişimleri enzim sistemlerinde önemli bir yere sahiptir. Buna bağlı olarak enzimin iyonlaşma derecesini değiştiren veya yapısının bozulmasına sebep olan etkiler enzim aktivitesini değiştirirler. Enzim aktivitesine etki eden faktörlerin tepkime üzerine olan etkilerini belirlemek için farklı koşullar altında enzim tepkimesi belirlenir. Enzim aktivitesini hesaplamak için kullanılan substrat miktarı ya da oluşan ürün miktarı ölçülür. Böylelikle enzim aktivitesi hız olarak tanımlanır (Gözükara, 1989). Enzimatik tepkimelerin aktivitesini etkileyen faktörler aşağıda verilmiştir:

2.4.1 Substrat Konsantrasyonu

Enzim hızına etki eden tüm faktörler ve enzim konsantrasyonu sabit tutulduğunda, enzim hızı artan substrat miktarına göre belli bir noktaya kadar artış gösterir ve maksimum noktaya ulaşınca sabit kalarak devam etmektedir (Nalbantoğlu 2013) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Substrat konsantrasyonunun enzim hızına etkisi

Enzim konsantrasyonunun (ve diğer bütün koşulların) sabit tutulduğu koşullarda, substrat konsantrasyonu arttırıldıkça reaksiyon hızı hiperbolik bir eğri gösterecek şekilde artmaktadır. Bu ilişki Şekil 2.6 da görülmektedir. K_m değeri Michaelis-Menten sabitidir ve maksimum enzim hızının yarısı olan $V_{max}/2$ değerine erişilmesini sağlayan substrat konsantrasyonudur.

Enzimlerin çoğunlukla K_m değeri 10^{-2} ve 10^{-5} mol/l aralığında değiştiği bilinmektedir. K_m değeri ne kadar çok düşük olursa, enzimin substrata olan ilgisi de o kadar büyük olur.

2.4.2 Enzim Konsantrasyonu

Enzim aktivitesini etkileyen tüm koşullar sabit tutulduğunda, doğrusal bir grafik oluşmaktadır. Enzim konsantrasyonu artıkça enzim hızı da ona bağlı olarak doğru orantılı şekilde artmaya devam eder (Gözükara 1997) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Enzim konsantrasyonunun enzim hızına etkisi

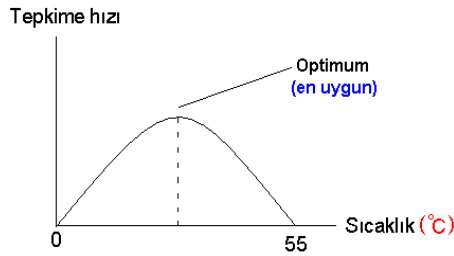
Enzim konsantrasyonu ile enzim hızı bazı durumlarda sapmalar oluşturabilir. Bunlar:

1. Oksijen gibi sınırlı çözünen substratların varlığıyla
2. Substratın karakteristik özellikte olmamasıyla
3. Tepkime zincirlerinin birbirine bağlı olmamasıyla

4. Farklı substrat, tampon madde veya inhibitör varlığıyla

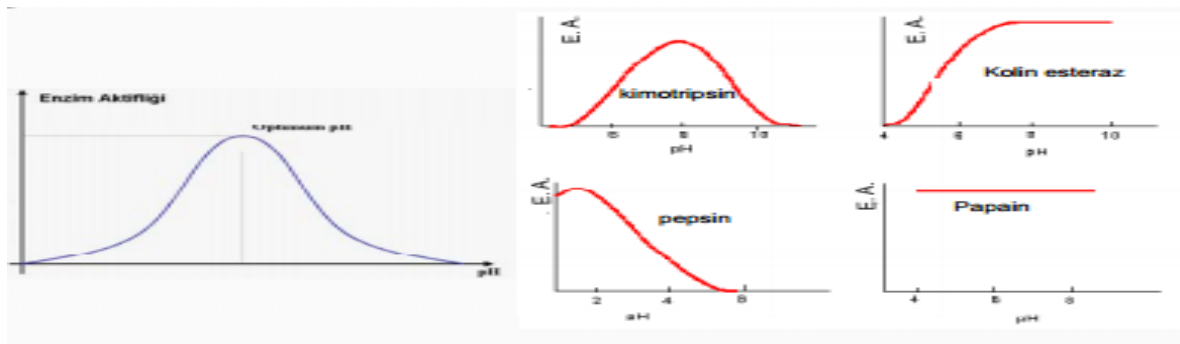
2.4.3 Ortam pH'sı

Enzimlerin bulunduğu ortam pH değerini etkilemektedir. Enzimlerin aktivitesi ortamda yer alan hidrojen iyonlarının derişimlerine göre farklılık göstermektedir. Enzimatik tepkimelerin ortamında bulunan asitlik-bazlık derecesini ifade eden H^+ yapısı bozulur. pH değişimi, enzimlerin aktif merkezindeki iyonizasyonu bozarak, substrat molekülünün çözünürlüğünü değiştirir. Enzimlerin aminoasit zincirindeki iyonik yapılar denatüre olduğu için katalitik aktivitelerini kaybederler. Her bir enzimin aktivitesinin optimum olduğu pH değeri vardır, buna "optimum pH" denir (Şekil 2.8). Bu pH değerinin üzerinde ya da altında aktivite düşer (Sümengen 2011, Bhat 2000).



Şekil 2.8. Ortam pH'ının enzim hızına etkisi

Aktif merkezin iyonik özelliği değiştiği için enzim-substrat ilişkisinde değişmektedir. Bu sebepten dolayı enzim ile çalışılan çalışmalarda ortam pH değeri mümkün olduğunca optimum halde tutulmalıdır. Bunun için tampon çözeltiler kullanılır ve optimum pH enzimin kaynağına göre değişebilir. Her enzim için optimum pH farklıdır. Optimum pH aralığı 2-10 arasında değişmektedir (Şekil 2.9)



Şekil 2.9. Farklı enzimlerin optimum pH'ları

Çeşitli koşullarda enzimlerin optimum pH'ı değişmektedir. Bu değişikliklere sebep olan faktörler arasında; enzimlerin elde edildiği kaynak, kullanılan substrat tipi,

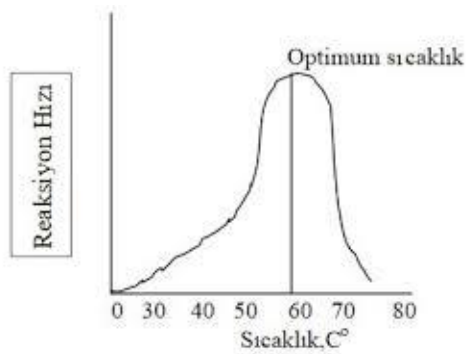
konsantrasyonu, sıcaklık ve tepkime süresi sayılabilir. Farklı enzimlerin optimum PH aralıkları aşağıdaki çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Farklı enzimlerin ortam pH’ları

Enzimler	Optimum pH
Alkalin fosfataz (süt)	10.00
Beta-amilaz (patates)	5.00
Katalaz (sığır akciğeri)	3.10
Katepsinler (karaciğer)	3.50-5.00
Fisin (incir)	6.50
Glukoz oksidaz	5.60
Lipaz	7.00
Lipoksidaz	7.00-9.00
Polifenol okidaz	6.00
Tripsin	8.00

2.4.4 Ortam Sıcaklığı

Enzimlerin hızını ve stabilitesini etkileyen faktörlerden biridir. Diğer tüm koşullar sabit tutulduğunda, sıcaklık arttıkça reaksiyonun hızı da belli bir noktaya kadar artmaya devam eder. Bu noktadan sonra sıcaklık artışları devam ederse enzim hızı çok ani düşüşler gerçekleşir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri dönüş noktasına “optimum sıcaklık” adı verilmektedir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10.Ortam sıcaklığının enzim hızına etkisi

Enzimin hızı, düşük sıcaklıklardan başlayarak her 10°C de bir yaklaşık iki katına çıkmaktadır. Enzimatik olmayan reaksiyonlar içinde geçerli olan bu durum $Q_{10} = 2$ şeklinde ifade edilmekte olup “ sıcaklık katsayısı” adını almaktadır.

Enzimatik tepkimelerin bir çoğu için sıcaklık ortalaması 30-50°C arasında optimum olarak verilir. Hayvansal kaynaklı enzimlerin optimum sıcaklığı bitkisel kaynaklı enzimlere göre daha düşüktür. Enzimler mikroorganizmalardan elde ediliyorsa da farklılık gösterebilir. Bazı termofilik mikroorganizmaların optimum sıcaklığı 70-72°C gibi yüksek sıcaklıklara sahiptirler. Örneğin sıcak sulara yaşayan *Thermus aquaticus*'un DNA polimeraz enziminin optimum sıcaklığı 72°C dir.

Optimum sıcaklık koşulu aynı zamanda pH ve reaksiyon süresini de etkileyen önemli bir faktördür. Sıcaklık eğer 60°C'nin üzerine çıkarsa enzimler genellikle denatüre olmakta, hızını kaybederek etkisiz hale gelmektedirler. Bu sebepten dolayı gıda üretiminde istenmeyen enzim faaliyetlerinin önlenmesi ve gıda malzemelerinin özellikle konserve haline getirilmesinde önem taşımaktadır. Gıdaların enzimatik yapısının bozulmaları sıcaklık kontrolü kapsamında; dondurma, haşlama, pastörizasyon, sterilizasyon, fosfolipaz aktivitesi, bulanık meyve suyu vs yapımında önem taşımaktadır.

2.4.5 Su Aktivitesi (a_w)

Enzim aktivitesi genellikle sulu sistemler içinde gerçekleştirilir. *In vitro* koşullarda enzimatik reaksiyonlar sulu çözelti olan hücre sitoplomasında gerçekleşmektedir. Diğer yandan hücre membranlarında lipid depolarında, ETS (elektron transport sistemi) ile gerçekleşen de bulunmaktadır.

Su aktivitesinin enzim hızını belirlemede 3 temel yöntemden yararlanılmaktadır. Bu 3 yöntemin ortak prensibi, sabit koşullarda artan su aktivitesine bağlı olarak, karşı gelen enzim hızlarının belirlenmesi ve bu değerlerin grafiğe geçirilmesini kapsamaktadır. Yöntemin tek farkı, birinci yöntemde sulu çözelti ile çalışılırken, diğer iki yöntemde su yerine organik çözücüye yer verilmesidir.

2.4.6 Enzim İnhibitörleri

Reaksiyon ortamında bulduklarında, enzimatik reaksiyon hızını azaltan maddelere "inhibitör" adı verilmektedir. Doğal ve yapay olan bu maddeler enzim hızının önlenmesi ve kontrol altında tutulmasında vasita olarak kullanılır. İnhibitörler hem etki mekanizmalarının hem de metabolik yolların bilinmesinde biyokimyacılar açısından oldukça önem taşımaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2010). İnhibitörler, tersinir ve tersinmez olarak ikiye ayrılır. Tersinmez inhibitörler, ya aktif merkeze bağlanır, ya da enzim molekülünün konformasyonunu değiştirerek, aktif merkez yapısını tamamen bozarlar. Bu maddeler enzim aktivitesini tamamen yok ettiklerinden önem taşımazlar. Tersinir inhibitörler ise enzimlerle arabileşik oluştururlar.

Michaelis-Menten sabiti veya maksimum tepkime hızının değerlerini azaltıcı yönde etki ederler.

Tersinir-tersinmez inhibitörler arasındaki en önemli fark; tersinir inhibitörlerin enzimle kısa sürede kovalent bağ olmayan yapı oluşturmaları ve oluşan bağların diyaliz ya da jel filtrasyonunla ayrılmasıdır.

2.4.7 Aktivörler

Enzim reaksiyonlarını pozitif yönde etkileyen bileşiklere “aktivör” adı verilmektedir. 2 grupta toplanabilir; ilk grup sadece substratla birleşerek aktivör rolü oynar, ikinci grup ise serbest enzimle birleşerek aktivör rolü oynar (Gözükara 1989).

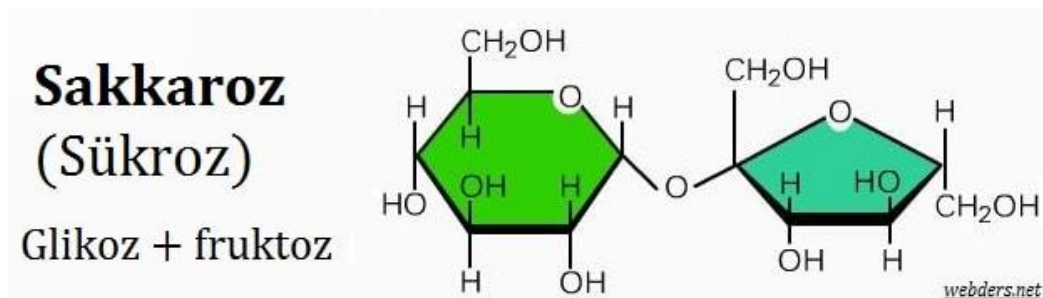
2.4.8 Basınç

Gıda üretim proseslerinde enzimleri tek basınçla inaktive ederek basınç yaratılmaktadır. Fakat yüksek sıcaklıklar kayma kuvvetiyle birlikte uygulanarak, basın. Enzimin inaktivitesine sebep olmaktadır. Yüksek basınç; pektinesteraz, lipaz, polifenol oksidaz, lipoksigenaz, peroksidaz, fosfataz, katalaz gibi bazı enzimlerin üzerine uygulanmış olup, inaktive ettiği ortaya çıkarılmıştır.

Enzim hızına etki eden bu faktörlerin yanısıra; tepkime süresi, tepkime ürünleri, ışık, hormonlar ve radyasyon sayılabilir.

2.5 İvertaz Enzimi

İvertazlar (β -fruktofuranozidaz) enzim kodu E.C 3.2.1.26 olarak bilinen (Sükraz), β -D- fruktofuranozidlerin indirgen olmayan β -fruktofuranozidaz artıklarının hidrolizini katalize eden hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Çok sayıda α 1- β 2- glikoidik bağın hidrolizini katalize ederler (Guimarães, 2007; Warchol, 2002; Janer, 2004; Nakamura, 1988; Álvaro-Benito, 2007). Sakkarozun hidrolizlenmesi sonucunda glikoz ve fruktoz meydana gelir. Oluşan kimyasal şekil 2.11. de Haworth formülü ile gösterilmiştir.

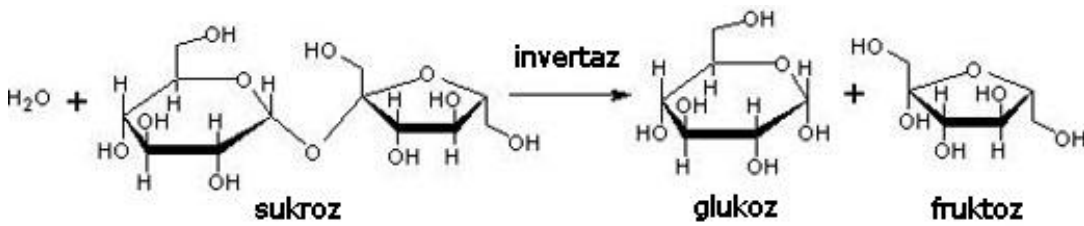


Şekil 2.11. Sakkarozun hidroliz tepkimesi (Haworth Formülü)

İnvertaz enzimi genellikle ekmek mayası ve bira mayasından elde edilir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces carbergensis* mikroorganizmaları invertaz açısından endüstriyel öneme sahip mikroorganizmalardır. Maya invertazının optimum pH aralığı 4.0-5.5 arasındadır. Bu pH aralığı invertazın en kararlı olduğu aralıktır.

İnvertaz enziminin kimliği ilk belirlenen proteinler arasında yer almaktadır. İvertazlar, krem renkli, suda çözünebilir, karboksilik grupça zengin olan bir enzimdir. Katı yapılu invertazlar ısıya karşı dayanıklıdır.

İnvertazlar bitkisel; üzüm, patates, bambu, tütün, ananas, havuç, mango, pirinç, arpa, yulaf, elma, portakal, şeftali, domates, kavun ve nohut vs. mikrobiyal kaynaklardan; (*Sacromises cerevisia*, *Aspergillus niger*) elde edilebilmektedir (Hepokur 2007, Kat 2013). Mikrobiyal kaynaklı invertaz enzimleriyle yapılan çalışmalar daha çok endüstri alanında (Tomotani ve ark 2006, Bayramoğlu ve ark 2003, Sanjay ve ark 2006).



Şekil 2.12. İvertaz enziminin genel tepkime mekanizması (Reddy and Maley, 1990)

İnvertaz enzimi, endüstriyel alanda ve özellikle gıda sanayinde oldukça uygulama alanı bulunmaktadır. Örneğin; şekerleme sanayindeki uygulamalar, kamış melasının etanole dönüştürülmesi fermentasyonu, sığır yemlerinin hazırlanması, çikolata üretimi, invert şeker şuruplarının hazırlanması sayılabilir. Endüstride invert şeker şuruplarının yapılmasında asit hidrolizi veya enzimatik hidroliz kullanılmaktadır. Asit hidrolizi kullanımında yüksek oranda renkli ürünler, kül ve istenmeyen yan ürünlerin oluşmasından dolayı enzimatik hidroliz kullanımı yönünde bir değişim söz konusudur (Telefoncu 1986).

Biyoteknolojik çalışmalarda farklı enzimlerin kullanımı da oldukça yaygındır. Enzimlerin farklı metodlarla izolasyonu, saflaştırılması yapıldığı gibi enzim aktivite ölçümü de dikkat çeken bir konudur. İvertaz eldesi ve aktivite tespit çalışmaları literatürde oldukça yaygın olmasına karşın artık olarak değerlendirilen bir üründen enzimin elde edilebilme potansiyelini ortaya koymak amacıyla yürütülen bu tez çalışmasında, farklı pH ve sıcaklık

değerlerinde enzim aktivitesi tayini ve bu değerlerin ticari muadil enzim ile karşılaştırılmasına çalışılmıştır.

Tez kapsamında invertaz enziminin elde edileceği hammadde olarak kullanılan eleküstü maya üniversitemiz yakınında yer alan ve ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisia*) üretimi gerçekleştiren Lesaffre Turquie A.Ş fabrikasından temin edilmiştir. Aynı artık madde kullanılarak gerçekleştirilen “eleküstü mayanın maya ekstraktı üretiminde kullanımı” konulu ve TÜBİTAK 2241/A Sanayi Odaklı Lisans Bitirme Tezi Destekleme Programı tarafından desteklenen proje bu tez çalışması için temel oluşturmuştur. Proje sonucunda olumlu sonuçlar elde edilince bir sonraki aşama olan elek üstü mayadan tez çalışması olarak invertaz enzimi aktivite varlığının araştırılmasına karar verilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışması kapsamında hammadde olarak kullanılan eleküstü maya, Lesaffre Turquie A.Ş fabrikasından yaklaşık 3 kilogram kadar, şeffaf poşetle paketlenmiş, ışığa maruz bırakılmayacak şekilde alınarak, en kısa zamanda laboratuvar koşullarına getirilmiştir. Analizler gerçekleştirilinceye kadar ışık almayacak şekilde yaklaşık +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3. 2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler; sodyum fosfat tamponu, asetat tamponu, NaOH, CuSO₄, KI, H₂SO₄, Na₂S₂O₃, toluen, KNaC₄H₄O₆ Merck firmasından (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya), nişasta, ticari invertaz enzimi, DNS, %10’luk sodyum sülfid ve glukoz standardı yerel üretici ve tedarikçilerden temin edilmiştir.

3. 3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Tezde kullanılan cihaz ve ekipmanlar şunlardır: pH metre (Mettler Toledo, Columbus, ABD), ultrasonikatör (Q Sonica LLC, NY, ABD), santrifüj (Sigma 3-18K, Almanya), püskürtmeli kurutucu (Buchi, B-290, İsviçre), hassas terazi (Ohaus, PA-224-A, İsviçre), manyetik karıştırıcı (Stuart, CB162, İngiltere), el tipi pH metre (Milwaukee, 02-19, ABD), su banyosu (JK-WBN-150A, Çin), vorteks (Hinotek, QL-866, Çin), spektrofotometre (Mecasys Optizen POP, UV-Vis, Kore) ve liyofilizatör (Christ, Alpha 2-4 LD Plus, Almanya).

3.4. Yöntem

3.4.1. Eleküstü Mayanın Hidroliz İşlemi

Temin edilen eleküstü maya topaklanmış halde olduğundan havanda toz hale getirilmiştir. Toz haldeki eleküstü maya sonraki işlemlerin yapılacağı Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Laboratuvarı'na uygun koşullarda götürülmüştür.

Ultrasonikasyon öncesi örneğin çözündürülmesinde kullanılacak pH 7,6'lık 50 mM sodyum fosfat tamponu, 8,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1000 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmış ve pH değeri 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanılarak sabitlemiştir.

Şekil 3.1'de gösterilen işlem basamakları takip edilerek; 10 g örnek üzerine 500 ml saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda 15 d boyunca tam bir çözünme sağlanacak şekilde karıştırılmıştır. Homojen hale gelen sıvı karışımdan 250 ml alınarak ayrı bir kaptaki 250 ml tampon çözelti ile karıştırılmıştır. Ultrasonikatör ile 20 KHz frekansta 10 s süreli 8 tekrarda parçalanan hücre yapısından salınan proteince yoğun sıvı kısmın ortamdaki toplanması için santrifüj aşamasına geçilmiştir. Karışımdan 50 ml'lik falkon tüplerine aktarılan örnekler 10000 rpm'de 10 d boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Protein ve dolayısıyla enzim açısından zengin süpernatant falkon tüplerinden ağzı kapalı cam kaplara aktarılarak ileri analizler yapılmaya dek buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Elek üstü mayanın hidroliz aşamaları

3.4.2 Püskürterek Kurutma

Püskürterek kurutma, sıvı örneklerin sıcak hava ortamına püskürtülmesiyle örneğin içindeki suyun evaporasyonu sonucunda toz halde elde edilmesine dayanan işlemdir. Püskürtülen örnek emülsiyon, süspansiyon ve solüsyon halinde olabilir. Ve elde edilen ürün de granül yapılı ya da partikül halinde olabilir. Sonuç olarak elde edilen ürünün formu, verilen solüsyonun özelliklerine göre ve kurutucunun dizaynına göre değişmektedir.

Ultrasonikasyon ve santrifügasyon sonrası elde edilen süpernatant püskürtmeli kurutucu kullanılarak toz hale getirilmiştir. Bu aşamada cihaz 60 ve 90 °C arasında değişen sıcaklıklarda çalıştırılmıştır. Cihazın uzun süre kullanılmaması sebebiyle süpernatant sıvının toz hale gelmesi 1 gün boyunca sürmüştür. Sıvı halde verilen örnek sistemden örnek toplama alanında toz halde elde edilmiştir. Enzim aktivitesi çalışmalarında kullanılmaya yetecek bir miktar toplanana dek tekrar edilen kurutma işlemi neticesinde yaklaşık 10 g toz örnek ağız kapalı saklama kaplarında buzdolabı koşullarında ileriki analizlere kadar muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Püskürtmeli kurutucu

3.4.3 Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon)

Dondurarak kurutma (liyoofilizasyon) süspansiyon halde veya çözelti halinde bulunan ürünlerin dondurulması ve sonrasında süblimasyon yoluyla gaz fazının uzaklaştırılması yöntemine dayalı bir işlemdir. Bu aşamada ürünler katı halden sıvı faza geçmeden düşük basınca maruz kalarak kurutulmaktadır.

Ultrasonikasyon ve santrifügasyon sonrası elde edilen süpernatant liyoofilizatör kullanılarak toz hale getirilmiştir. Örnekte su miktarının yüksek olması ve cihaz kapasitesinin düşük olması dolayısıyla yaklaşık 4 gün süren liyoofilizasyon işlemi neticesinde yarı yapışkan

katı ürün elde edilmiştir. Elde edilen ürün buzdolabı koşullarında ileriki analizler için muhafaza edilmiştir.

3.4.4 Eleküstü Maya Ekstraktı

Çalışmada karşılaştırma yapma olanağı sağlamak ve kurutma işlemlerinin oluşturabileceği olumsuz etkileri gözlemlemek amacıyla santrifügasyon sonrası toplanan süpernatanttan hiçbir işlem yapılmadan muhafaza edilen kısım yine buzdolabı koşullarında ileriki analizlere kadar muhafaza edilmiştir.

3.4.5 İnvvertaz Aktivite Tayini

Tez kapsamında invvertaz enzim aktivitesi belirlemek ve elde edilen ham enzimin ticari muadili ile karşılaştırmasını yapmak amacıyla iki farklı yöntem kullanılmıştır. Titrasyon ve spektrofotometre temelli bu iki yöntemden elde edilen sonuçlar eleküstü mayada invvertaz varlığını ortaya koymak amacıyla kullanılmıştır. Püskürterek kurutulmuş, liyofilize edilmiş, sıvı ekstraktı halde elde edilmiş ve ticari olarak temin edilmiş invvertaz aktivitesine sahip örnek değerlendirilmiştir.

3.4.5.1. Titrasyon metodu ile enzim aktivite tayini

Prosedüre göre, 4 farklı örnek öncelikle invvertaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı olan 40 °C’de pH aralıkları 4-7 arasında değişiklikler yapılarak aktivite ölçümüne alınmıştır. Ardından, ilk aşamada belirlenen optimum pH’da sıcaklık 30-70 arasında değiştirilerek aktivite ölçülmüştür.

Prosedürde 8 farklı kimyasal madde kullanımı mevcuttur. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması aşağıdaki gibidir:

% 5’lik sakkaroz solüsyonu: İlk olarak 80 mM asetat tamponu hazırlanmıştır. Bunun için 6,56 g CH₃COONa ile 4,8 ml asetik asit behere konular, toplamda hacmi 1000 ml’ye tamamlanır, manyetik karıştırıcı da balık yardımıyla karıştırılır. pH denemeleri için yapılan çalışmalarda sodyum asetat tamponu pH 4-7 arasında 1N HCl ve 1N NaOH İle ayarlanır. Bu işlemden sonra 5 g sakkaroz tartılır, 100 ml 50 mM’lık asetat tamponundan konularak, çözeltinin korunması için birkaç damla tolüen eklenerek, homojen hale gelene kadar manyetik karıştırıcıda balık yardımı ile karıştırılır.

Alkali Çözeltisi: 103 g NaOH ve 86,50 g Rochelle tuzu 250 ml’lik erlene konularak saf suyla tamamlanır, manyetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar çözdürülür.

CuSO₄ Çözeltisi: % 6,93'lük CuSO₄ çözeltisi için 63,9 g CuSO₄ 1000 ml'ye saf su ile tamamlanır. Magnetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar çözdürülür.

Potasyum İyodür (KI) Çözeltisi: % 30'luk potasyum iyodür çözeltisi için, 300 g KI 1000 ml saf suyla tamamlanır. Homojen hale gelene kadar magnetik karıştırıcıda çözdürülür.

Sülfirik Asit (H₂SO₄) Çözeltisi: % 25'lik sülfirik asit çözeltisi için, 25 ml sülfirik asit 100 ml saf su ile tamamlanır. Magnetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar karıştırılır.

Sodyum Tiyosülfat (Na₂S₂O₃) Çözeltisi: 50 mM olacak şekilde, 4000 ml için 49,638 gr Na₂S₂O₃ ve 4 g Na₂CO₃ saf su ile magnetik karıştırıcıda tamamen homojen hale gelene kadar çözdürülür. Bu çözelti kullanmadan 3-4 gün önce hazırlanmalıdır. Tez çalışmasında bu çözelti ilk olarak 250 ml olarak hazırlanmıştır.

Çözünen Nişasta Çözeltisi: Yapılacak her analiz için nişasta çözeltisi taze olarak hazırlanmalıdır. Bunun için %2'lik nişasta çözeltisi için 2 g nişasta 100 ml saf su ile magnetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar çözdürülür ve kaynatılır.

Enzim Solüsyonu (Seyreltici): 50 mM asetat tamponu hazırlanır. Bunun için 4,1 g sodyum asetat (CH₃COONa) ile 3 ml asetik asit behere konulur, toplamda hacmi 1000 ml'ye tamamlanır, magnetik karıştırıcı balık yardımıyla karıştırılır. pH denemeleri için yapılan çalışmalarda sodyum asetat tamponu pH 4-7 arasında 1N HCl ve 1N NaOH ile ayarlanır.

İlk aşama olarak, hazırlanan 50 mM ve 80 mM asetat tamponlarından sakkaroz solüsyonu ve enzim solüsyonu hazırlanır. Sakkaroz solüsyonu için 80 mM asetat tamponundan 100 ml alınır, içerisine 5 g sakkaroz tartılarak magnetik karıştırıcıda çözdürülür. Çözünen solüsyona birkaç damla tolüene eklenir ve kullanıma hazır hale gelmiştir.

Bu işlem çalışılacak 4-7 pH aralığı için her zaman yeniden hazırlanır. Çünkü hazırlanan 50 mM ve 80 mM asetat tamponlarının pH'ları 4-7 arasında hazır halde cam şişelerde saklanmıştır.

Enzim solüsyonu için 50 mM asetat tamponundan, toplam hacmi 250 ml olacak şekilde elimizde bulunan 4 farklı invertaz enzimi aktivitesi ölçülecek ürünlere göre farklı oranlarda hazırlanır.

Ticari invertaz enziminden 0,5 ml alınıp, üzerine 249,5 ml 50 mM asetat tamponu eklenir.

Püskürtülerek kurutulmuş örnekten 1:50 oranında seyrelterek bir karışım oluşturulmuştur. 0,25 g ürün 12,5 ml saf su ile homojen hale gelene kadar çözdürülmüştür. Ardından bu karışımdan 0,5 ml alınıp, üzerine 249,5 ml 50 mM asetat tamponu eklenmiştir.

Liyofilize edilmiş örnek aslında tamamen toz halde olması beklenirken yapışkanimsi ve suda çözünmeye meyilli bir yapıda olduğundan kurutulmuş örnek hazırlanmasındakine benzer şekilde, 8,04 g liyofilize edilmiş örnekten 1:50 oranında sulandırma işlemi yapılarak kullanılmıştır. 0,25 g liyofilize örnek 12,5 ml saf su ile tamamen çözdürülmüştür. Ardından bu karışımdan 0,5 ml alınıp, üzerine 249,5 ml 50 mM asetat tamponu eklenmiştir.

Ekstrakt örneği santifüj sonrasında toplanan süpernatant kısımdır. Toplanan süpernatant yeterince sulu bir karışım olduğundan enzim solüsyonu hazırlanırken, 1 ml örnek alınıp üzerine 249 ml 50 mM asetat tamponu eklenmiştir.

İkinci aşama; sıcaklık sabit tutulup 4-7 pH aralıkları denenerak farklı pH'larda invertaz aktivite değişimlerine bakılmıştır. Sıcaklık su banyosunda 40°C'ye sabitlenip pH 4.00'dan başlanarak Ph 7.00 ye kadar bu aşamada aynı işlemler yapılmıştır. Çalışmalarda örnek ve blank olmak üzere iki farklı şekilde yapılmıştır. 1 ml sakkaroz (substrat) çözeltisi test tüpü içine pipetlenmiştir. Test tüpü 40°C'ye ısınmış su banyosunda 5 d boyunca bekletilmiştir. 40°C'de dengelenen test tüpüne 1 ml daha önceden hazırlanmış enzim çözeltisi eklenmiştir. Ardından test tüpü içindeki tepkimeyi durdurmak için 2 ml alkali çözeltisi eklenmiş ve 40°C'de su banyosunda 3 d bekletilmiştir. Bu aşamada blank ölçerken, enzim çözeltisi yerine 2 ml alkali çözeltisi eklenmiş ve 40°C'de 3 d bekletildikten sonra 1 ml enzim çözeltisi konulmuştur. Buradaki amaç enzimle substratın bağlanmasını engellemektir. Tepkimesi durdurulan test tüpündeki sıvı örnek 100 ml'lik erlene aktarılmıştır. Test tüpü 3 ml saf su yardımı ile 3 kez çalkalanmış ve durulanmıştır. Erlendeki sıvı örnek içine 2 ml CuSO₄ eklenmiş, magnetik karıştırıcıda ısıtıcı kısmı açık olacak şekilde kaynar hale gelene kadar beklenmiştir. Erlendeki örnek kaynamaya başlayınca 2 d beklenmiştir. Kaynayan ve süresi dolan erlen akan çeşme suyu altında oda sıcaklığına gelene kadar soğutulmuştur. Soğuk olan örneğe sırasıyla KI ve H₂SO₄ çözeltilerinden 2 ml eklenmiş ve erlen çalkalanmıştır. Tamamen karışan erlen içine taze hazırlanmış ve kaynar halde olan nişasta çözeltisinden birkaç damla damlatılmış ve titrasyon değeri okunmuştur. Titrasyon değeri ölçümünde cam büret sodyum thiosülfat çözeltisi ile doldurulmuş ve renk değişimleri gözlemlenene kadar kontrollü şekilde titrasyon yapılmıştır. İlk aşamada nişasta çözeltisi eklenince sıvının rengi bakır renklidir. Titrasyon yapıldıkça bakır renginden yeşile doğru geçiş olmaktadır, yeşile döndüğü andaki büret üzerindeki değer not

edilmiştir. Titrasyon işlemi devam ettikçe yeşil olan renk açık pembe rengine doğru gitmektedir.

Bu aşamaların sonucunda sıcaklık 40°C’de sabit tutulup pH aralıkları denenerek 4 farklı örneğin invertaz aktivite değerleri ölçülmüştür. Bunun sonucunda optimum pH aralığı bulunarak, diğer işlem de optimum pH sabit tutularak, 30-70°C arasında su banyosu sıcaklığı değiştirilerek invertaz aktivite tayini yukarıda anlatılan tüm aşamaların aynısı yapılarak ölçülmüştür.

Yapılan invertaz aktivitesi hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$volume\ activity\ (U/ml) = \frac{\Delta titer\ (b - t) * F * df}{0,600 * V_s} = \Delta titer * F * 1,66 * df$$

U: Unit

ml : Mililitre

$\Delta titer$: Titrasyon Farkı

b: Blank

t: Test

F: Konstrasyon Faktörü

df: Dilüsyon farkı

0,600: 50 mM Na titrasyon farkı

1,66: Sabit

Vs: Örnek Hacmi

3.4.5.2. Spektrofotometrik metod ile enzim aktivite tayini

DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) (Miller G.L, 1959) çözeltisi, 10 g NaOH, 10 g DNS saf su ile çözündürülüp, hacmi 1000 ml’ye tamamlanmıştır. Oluşan bu karışımdan 100 ml alınarak içerisine 1 ml %10’luk sodyum sülfid ilavesi yapılmıştır.

Rochelle tuzu için, 400 g sodyum fosfat tartarot tartılarak, hacmi 1000 ml saf su ile magnetik karıştırıcıda çözündürülmüştür.

DNS analizi için; 0-0,5 g/L konsantrasyonlarda glukoz solüsyonları hazırlanır. Test tüpü içinde yer alan, invertaz aktivitesi ölçülen 4 farklı örnekler ve blanklar buzdolabından çıkartılır. Test tüpü içine homojen yapıda olan her bir örnekten 1 ml örnek eklenir, üzerine 2 ml DNS ilave edilip 90°C'ye ayarlı su banyosuna 15 d boyunca inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda her bir test tüpüne 1 ml Rochelle tuzu eklenir ve vortekslenir. Test tüpleri ardından boş bir kaptaki bulunan 20 °C'lik su banyosunda oda sıcaklığına kadar kontrollü şekilde soğutulur. Soğuyan örnekler 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunur.

4.BULGULAR

4.1. Ham enzim eldesi

4.1.1. Ham enzim verimi

Ön hazırlık aşamaları dikkate alındığında, ultrasonikasyon sonrası santrifüje alınan 1000 ml çözelti içerisinde 10 g elektüstü maya bulunmaktadır. Püskürtmeli kurutucuya beslenen 1000 ml süpernatanttan 2 g toz halde ham enzim elde edilmiş olup verim %20 olarak hesaplanmıştır.

İkinci yöntem olan liyofilizasyonda ise cihaza konan 1000 ml süpernatanttan yaklaşık 6 g yarı yapışkan halde ham enzim elde edilmiştir. Kuru madde analizi de yapılan bu üründe verimin prosesin tamamı için %18 olduğu görülmüştür. Sıvı ekstrakt olarak kullanılan süpernatant için ise herhangi bir verim hesabı yapılmamıştır.

Her ne kadar ileri saflaştırma basamakları ile bu verimin bir miktar daha düşeceği kabul edilse de proses edilen her 100 g elektüstü mayadan yaklaşık 20 g ham enzim elde edilebileceği anlaşılmaktadır.

Enzim üretimi, izolasyon, saflaştırma ve karakterizasyon gibi kapsamlı basamaklar içeren, en önemli maliyet kalemi olarak enzimin üreticisi olan canlıyı (bitki, hayvan, mikroorganizma) geliştirmek veya tedarik etmek olan zahmetli ve maliyetli bir prosestir. Son yıllarda hayvansal kaynaklı enzimler bazı etik kaygılar sebebiyle, bitkisel kaynaklı enzimler ise üretim maliyetleri sebebiyle daha az üretilir hale gelmiştir. Bunların yerini mikrobiyal kaynaklı enzimler almaktadır. Mikroorganizmalar kullanılarak enzim üretiminde izolasyon ve saflaştırma gibi işlemlerin yapılması belirli bir maliyet getirirse dahi en önemli maliyet kalemi mikroorganizmanın geliştirilmesi sırasında kullanılan besin ortamı ve gelişme şartlarının sağlanması için yapılacak harcamalardır. Bu sebeple halihazırda hücre içerisinde enzim üretmiş olan ancak çeşitli sebeplerle artık olarak değerlendirildiğinden ekonomiye kazandırılmayan "bulk" halindeki mikroorganizmalardan enzim geri kazanımını konu alan bu tez çalışmasının

daha ileri saflaştırma aşamalarının deneneceği araştırmalara temel oluşturacağı dūřünlmektedir.

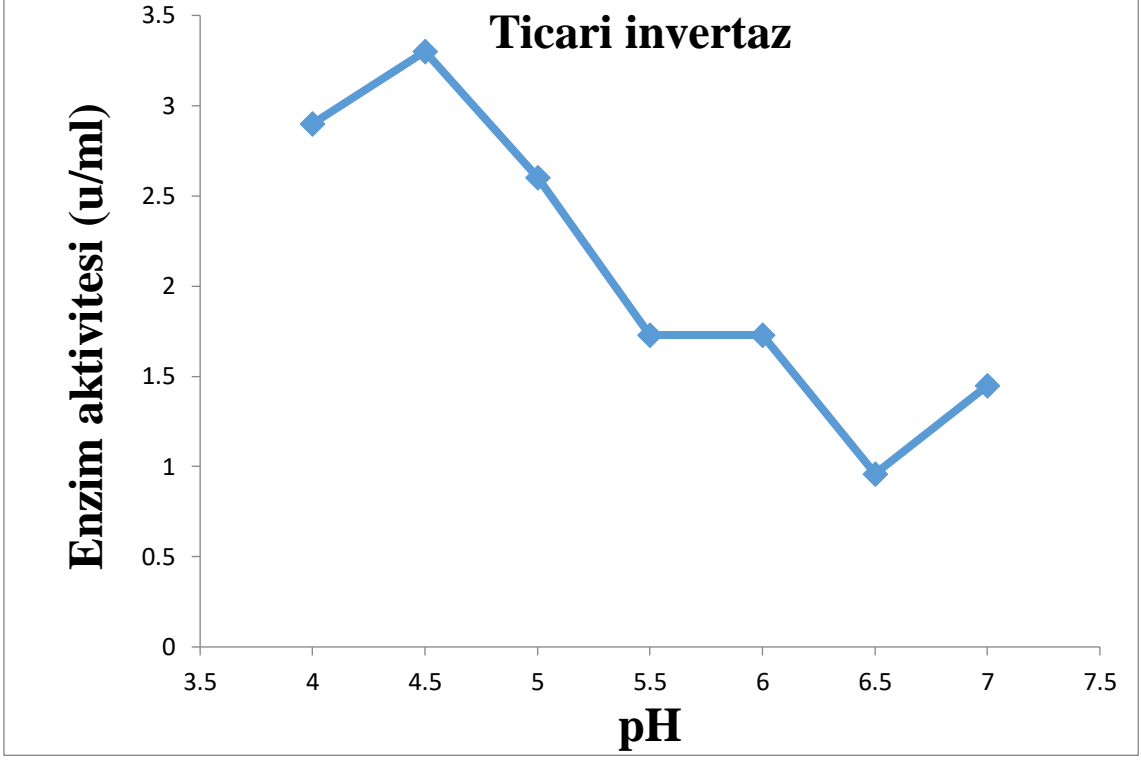
4.2.İnvertaz Aktivite Tayini

4.2.1. Titrasyon metodu ile enzim aktivite tayini

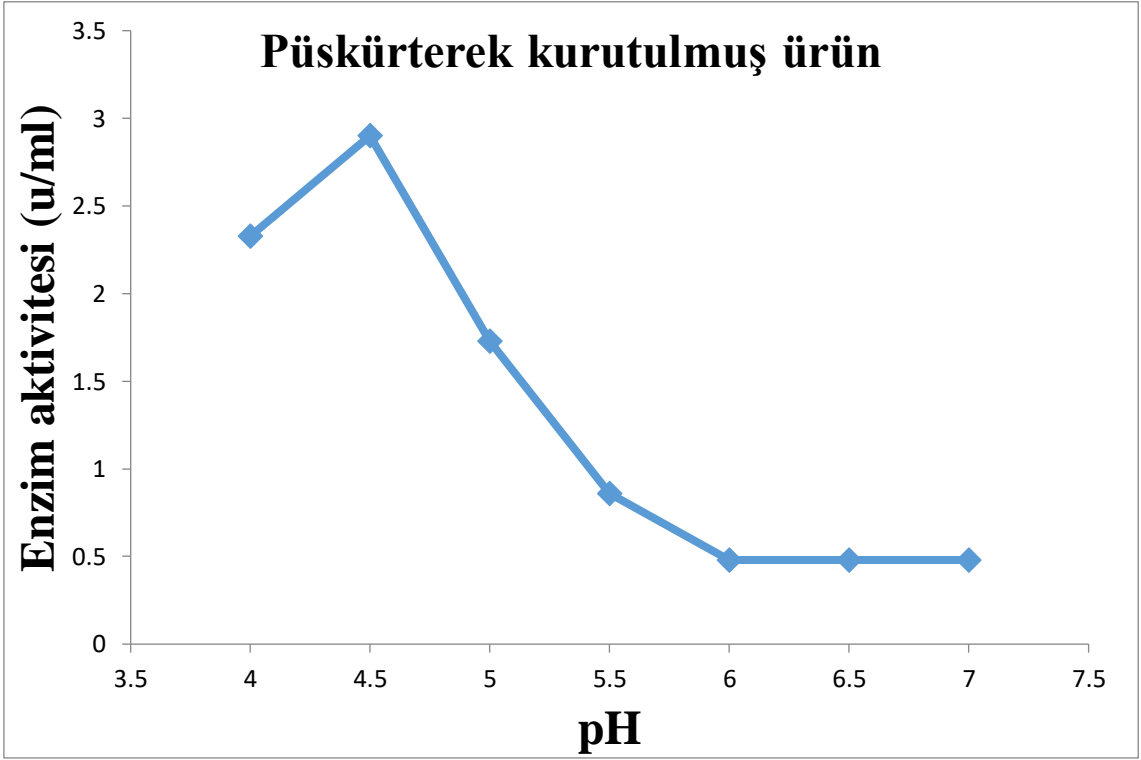
Titrasyon metodu kullanılarak; sıcaklık 40°C’de sabit tutulup 4-7 arasında değiştirilen pH değerleri ve optimum pH kullanılarak 30-70°C’de denemeler yapılmıştır.

4.2.1.1. Sabit sıcaklık değişen pH değerlerinde enzim aktivite tayini

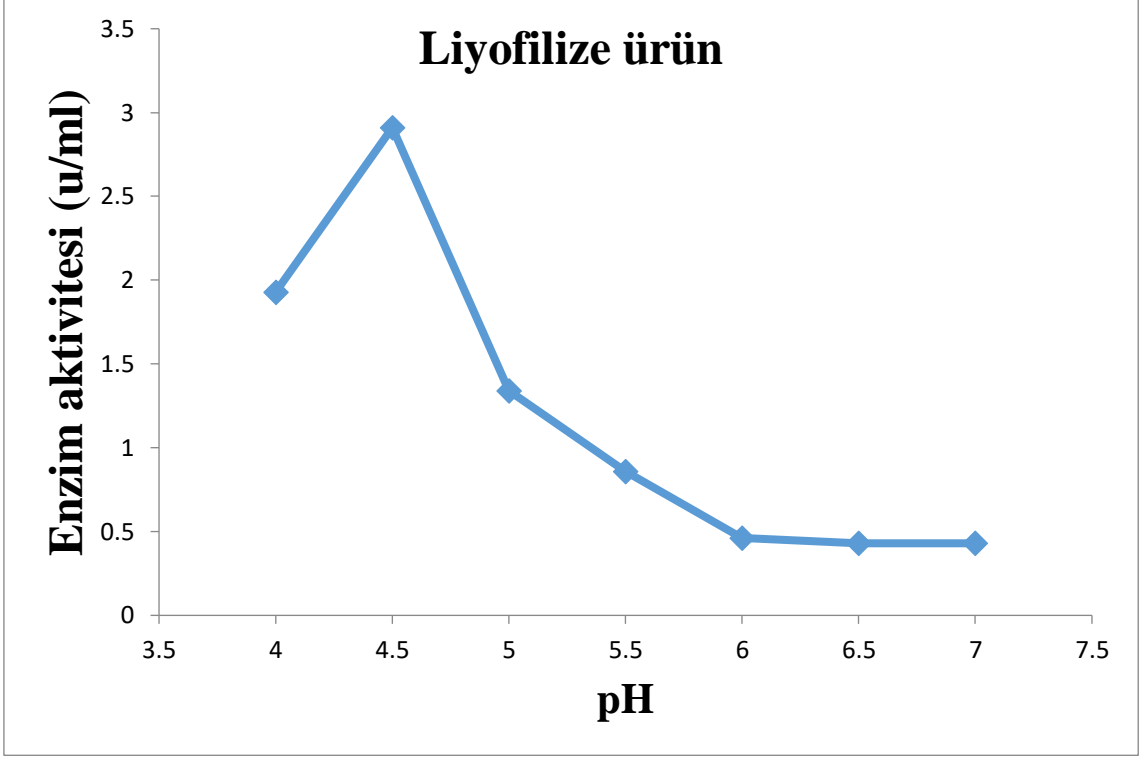
Enzimler, protein yapısında bulduklarından yüksek sıcaklık enzimlerin yapısına ve aktivitesinin hesaplanmasına olumsuz sonuē göstermektedir. Bu sebepten yapılan literatür araştırmalarında invertazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 40-45°C olarak verilmiştir (Jones ve ark. 1970, Mendonides ve ark. 2014). Çalışmamızda sıcaklık sabit tutulup, pH denemeleri için yapılan analizde sıcaklık 40°C olarak seēilmiřtir.



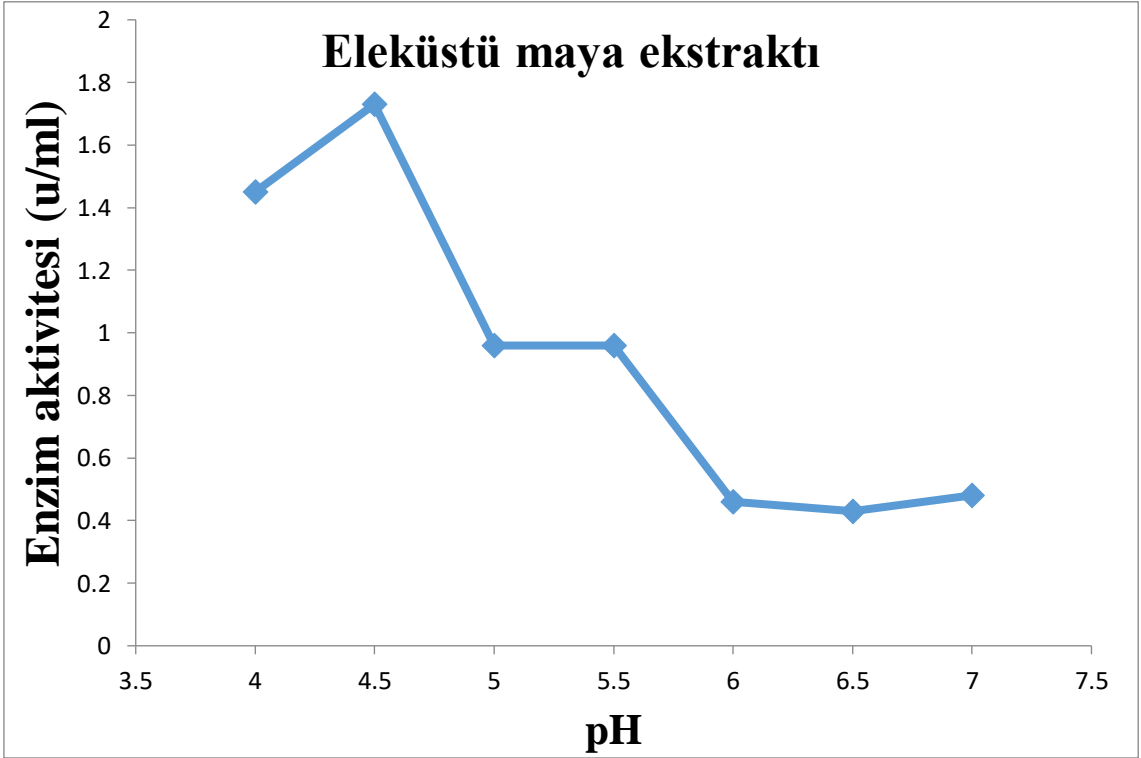
Şekil 4.1. Sıcaklık 40°C, 4-7 pH denemesi ticari invertaz sonuçları



Şekil 4.2. Sıcaklık 40°C, 4-7 pH denemesi püskürterek kurutulmuş örnek sonuçları



Şekil 4. 3. Sıcaklık 40°C, 4-7 pH denemesi liyofilize örnek sonuçları



Şekil 4.4. Sıcaklık 40°C, 4-7 pH denemesi eleküstü maya ekstraktı sonuçları

Yukarıda verilen şekillerde, sıcaklığın 40°C’de sabit tutulan ve pH aralıkları 4-7 arasında değiştirilen ürünlerin invertaz aktivite değerleri verilmiştir.

İlk olarak şekil 4.1 de ticari invertaz enziminin sonuçlarına bakıldığında, piyasadan satın alınan Tito marka ticari invertaz enzimin prosedüre göre invertaz aktivite değerleri verilmiştir. 40°C’de optimum pH 4,5’te 3,30 u/ml olarak bulunmuştur. Yani pH 4,5’te ticari invertaz enzimin aktivitesi 3,30 u/ml olarak bulunmuştur. pH 6,5’e baktığımızda ise en düşük aktivite değeri 0,96 u/ml olarak bulunmuştur.

Şekil 4.2 de verilen püskürterek kurutulmuş örnekten elde edilen sonuçlara bakıldığında, sıcaklık yeniden 40°C’de sabit tutulup optimum aktivitenin bulunduğu pH değeri 4,5 olarak bulunmuştur. pH 4,5’te invertaz aktivite değeri 2,90 u/ml bulunurken, en düşük aktivitenin hesaplandığı pH değerleri 6/6,5 ve 7 olarak görülmektedir.

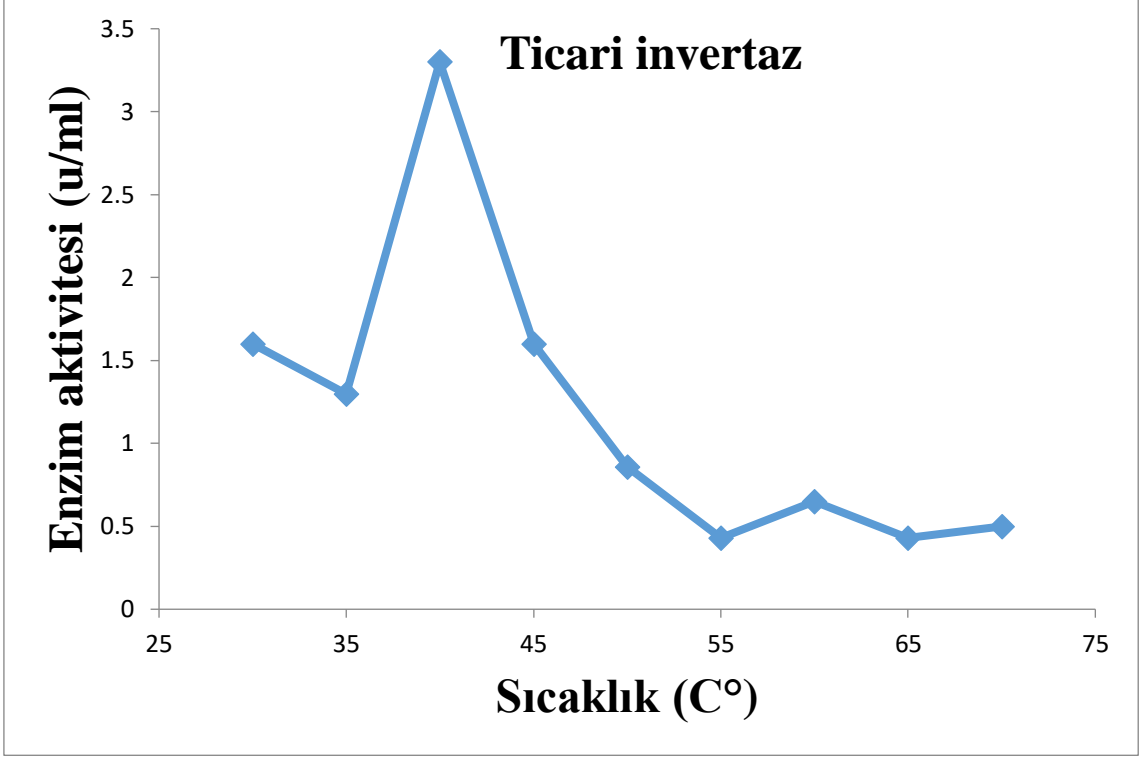
Liyofilize üründen yapılan şekil 4.3 te verilen invertaz aktivite değerine göre optimum pH yeniden 4,5 olarak tespit edilirken, bulunan değer ise 2,91 u/ml olarak görülmektedir. Buna karşılık en düşük aktivitenin görüldüğü pH değeri 7 iken, burdaki aktivite değeri 0,43 u/ml olarak görülmektedir.

Son olarak şekil 4.4 te eleküstü mayanın ekstrakt invertaz aktivitesine bakıldığında optimum pH 4,5 ve değeri 1,73 iken, en düşük aktivite pH 6,5’te 0,43 u/ml olarak hesaplanmıştır.

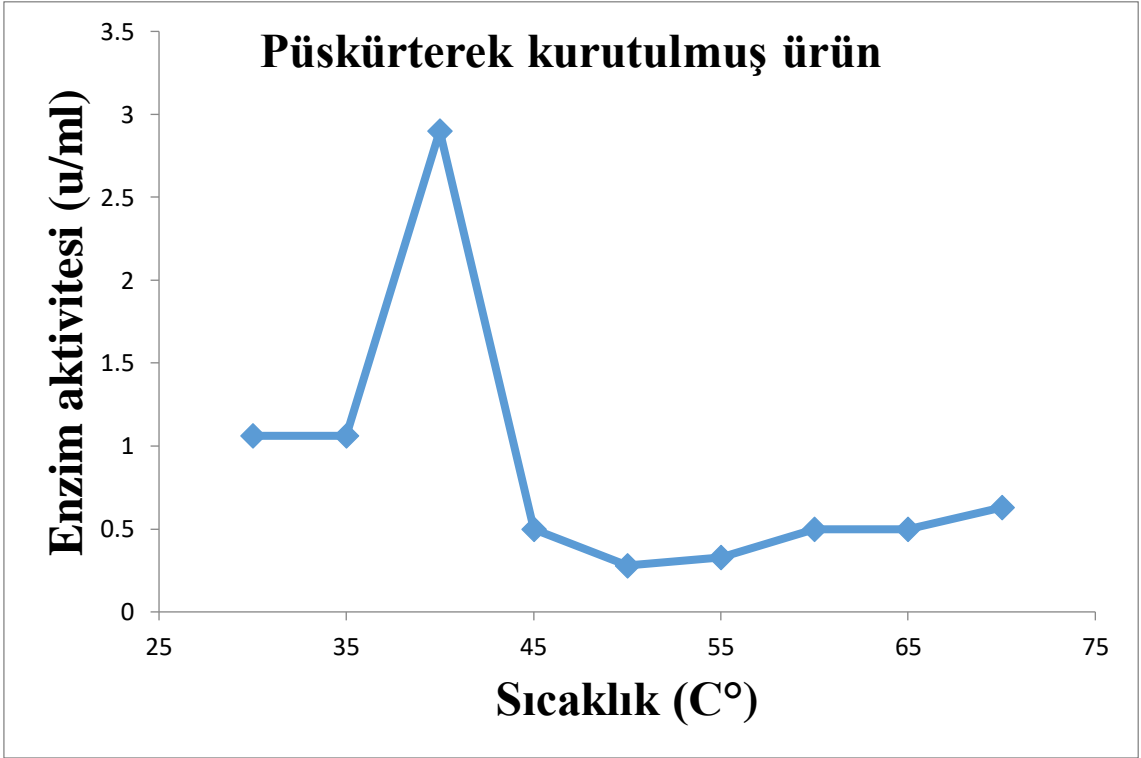
İnvertaz aktivitesi hesaplanan tüm örneklerle bakıldığında, tüm örneklerin ölçümünde bulunan optimum pH değeri 4,5 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla bir sonraki deneme olan optimum pH değeri 4,5 kullanılarak, 30-70°C arası sıcaklıkların denemesi yapılmıştır.

4.2.1.2. Optimum pH değişen sıcaklık değerlerinde enzim aktivite tayini

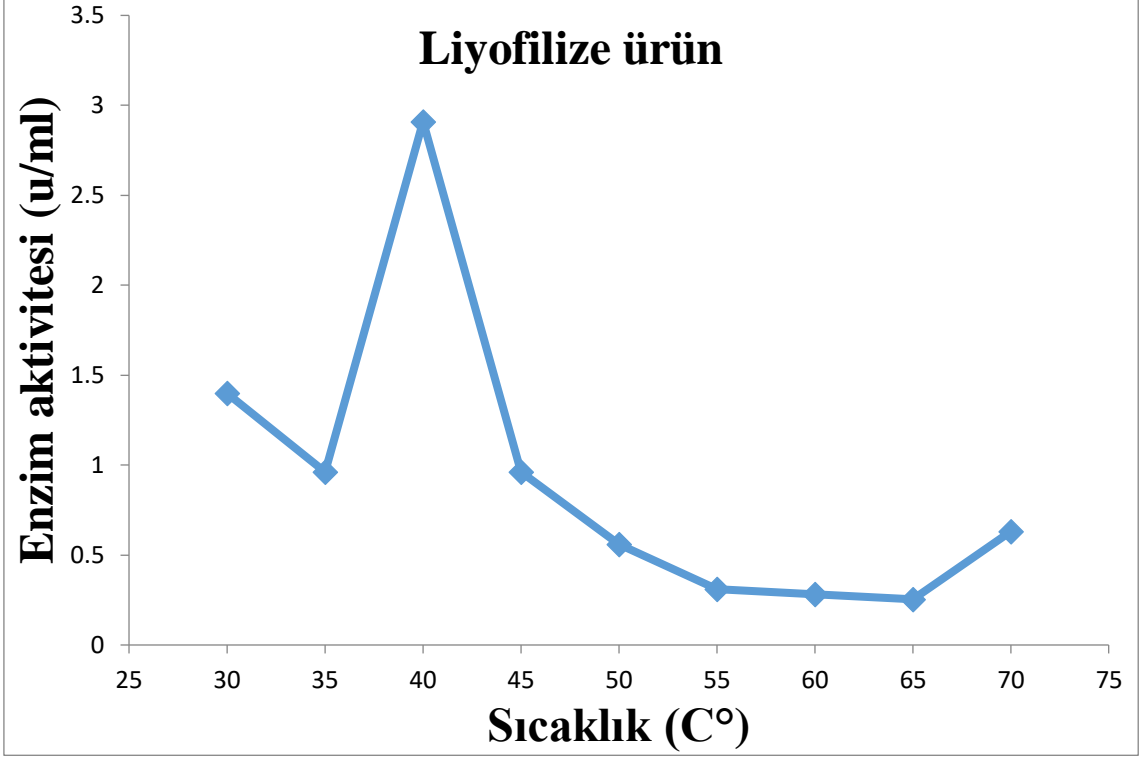
Sıcaklığın sabit tutulduğu, optimum pH aralığında en iyi aktivite sonucunu veren pH ilk aktivite ölçümünde hesaplanmıştır. Optimum pH kullanılarak sıcaklık denemeleri yapılmıştır. Sıcaklıklar 30 ile 70°C arası değişen su banyosu ayarlanarak invertaz aktivite tayini hesaplanmıştır.



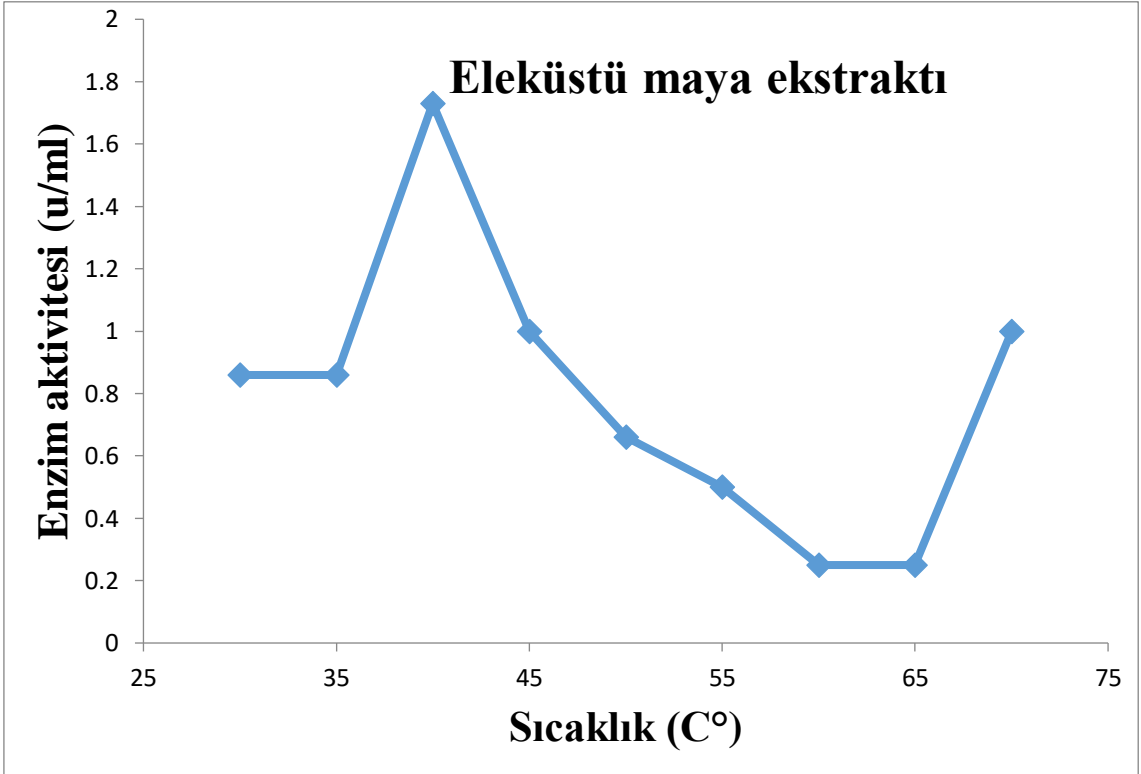
Şekil 4.5. Optimum pH'da 30-70°C arası sıcaklık denemesi ticari invertaz sonuçları



Şekil 4.6. Optimum pH'da 30-70°C arası sıcaklık denemesi püskürterek kurutulmuş örnek sonuçları



Şekil 4.7. Optimum pH'da 30-70°C arası sıcaklık denemesi eleküstü maya ekstraktı sonuçları



Şekil 4.8. Optimum pH'da 30-70°C arası sıcaklık denemesi liyofilize örnek sonuçları

Yukarı verilen çizelgelerde, optimum pH 4,5 kullanılarak sıcaklığın 30-70°C arası denenmiş invertaz aktivite sonuçları verilmiştir.

Sıcaklıklar tek tek incelendiğinde, en yüksek invertaz aktivitesinin optimum olduğu sıcaklık 40°C olduğu görülmektedir. Bu sıcaklığı takiben 30 ve 45 °C sıcaklıklarında da optimuma yakın değerler elde edilmiştir. En düşük invertaz aktivitesinin görüldüğü sıcaklık değeri 65°C olduğu söylenebilir.

Elde edilen 4 farklı ürünün, invertaz aktivite değerine bakıldığında; şekil 4.5 te ticari invertaz da optimum pH'da ve sıcaklık denemesinde optimum sıcaklık 40°C olup aktivite değeri 3,30 u/ml dir. En düşük aktivitenin görüldüğü sıcaklık 55 ve 65 °C olup, aktivite değerleri 0,43 u/ml dir.

Şekil 4.6 da püskürterek kurutulmuş örneğin optimum pH'da ve optimum sıcaklığın 40°C olarak görüldüğü ve değer 2,90 u/ml olarak bulunduğu görülmektedir. En düşük aktivitenin 50°C'de okunan 0,28 u/ml değeridir.

Liyofilize edilen örneğin şekil 4.7 de verildiği üzere, optimum pH ve optimum sıcaklık değerine bakıldığında aktivite değeri 2,91 u/ml olarak bulunmuştur. En düşük aktiviteye sahip olan sıcaklık değeri 65°C olup, aktivitesi 0,25 u/ ml olarak hesaplanmıştır.

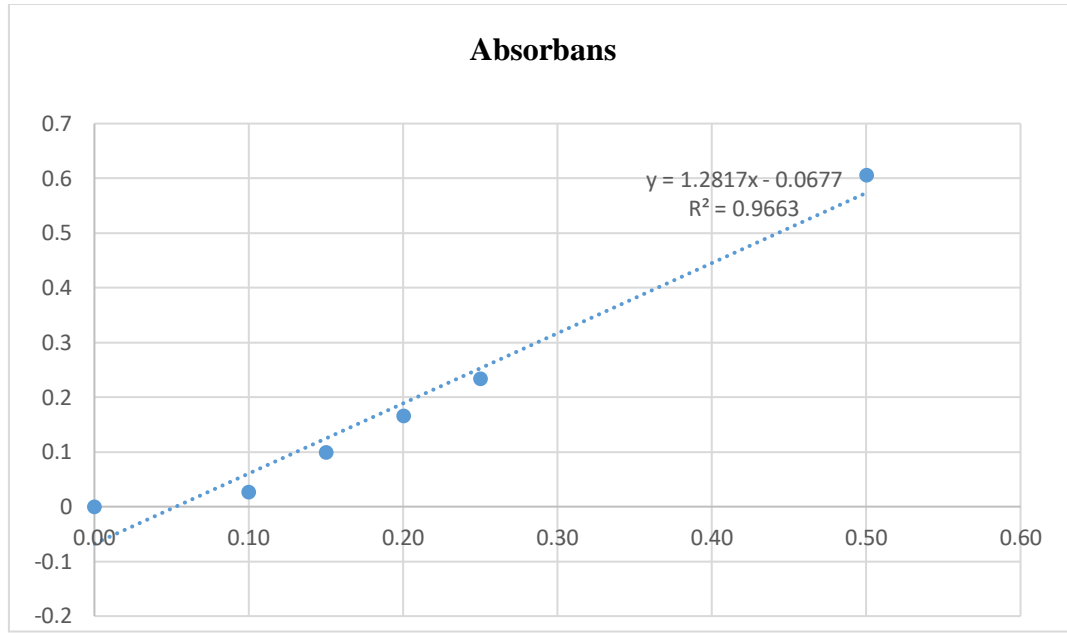
Son ürün olan şekil 4.8 de verilen eleküstü maya ekstraktına bakıldığında optimum pH ve optimum sıcaklık değerinde aktivitenin en yüksek değeri 1,73 u/ml dir. 60-65°C sıcaklarına baktığımızda iki sıcaklık değerinde aktivitenin düşük olduğu değer 0,25 u/ml olarak verilmiştir.

4.2.2. Spektrofotometrik metod ile enzim aktivite tayini

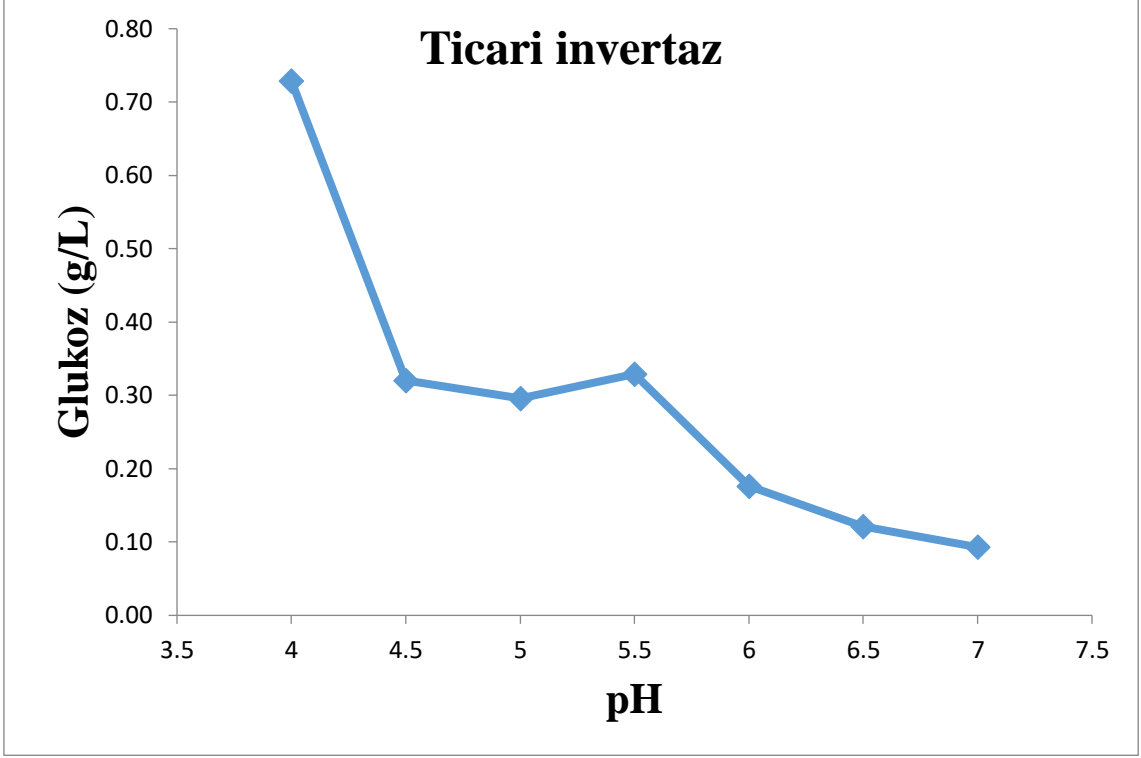
Spektrofotometre metodu kullanılarak; sıcaklık 40°C'de sabit tutulup 4-7 arasında değiştirilen pH değerleri ve optimum pH kullanılarak 30-70°C'de denemeler yapılmıştır. Analiz öncesinde 0 ile 0,5 arasında değişen glukoz standartları hazırlanmıştır. Aşağıdaki çizelge 4.9 de absorban değerleri ve kalibrasyon grafiği verilmiştir.

Çizelge 4.1 Absorbans değerleri ve kalibrasyon grafiği

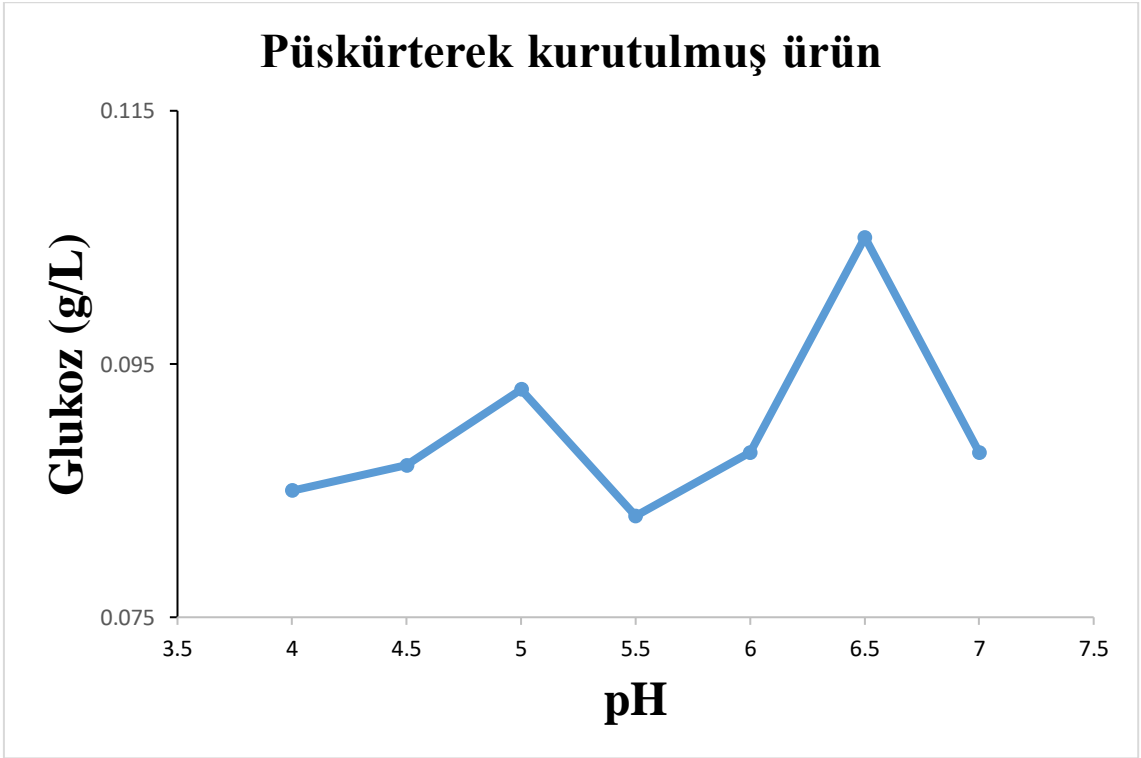
Glukoz (g/L)	Absorbans
0,00	0
0,10	0,027
0,15	0,099
0,20	0,166
0,25	0,234
0,50	0,606



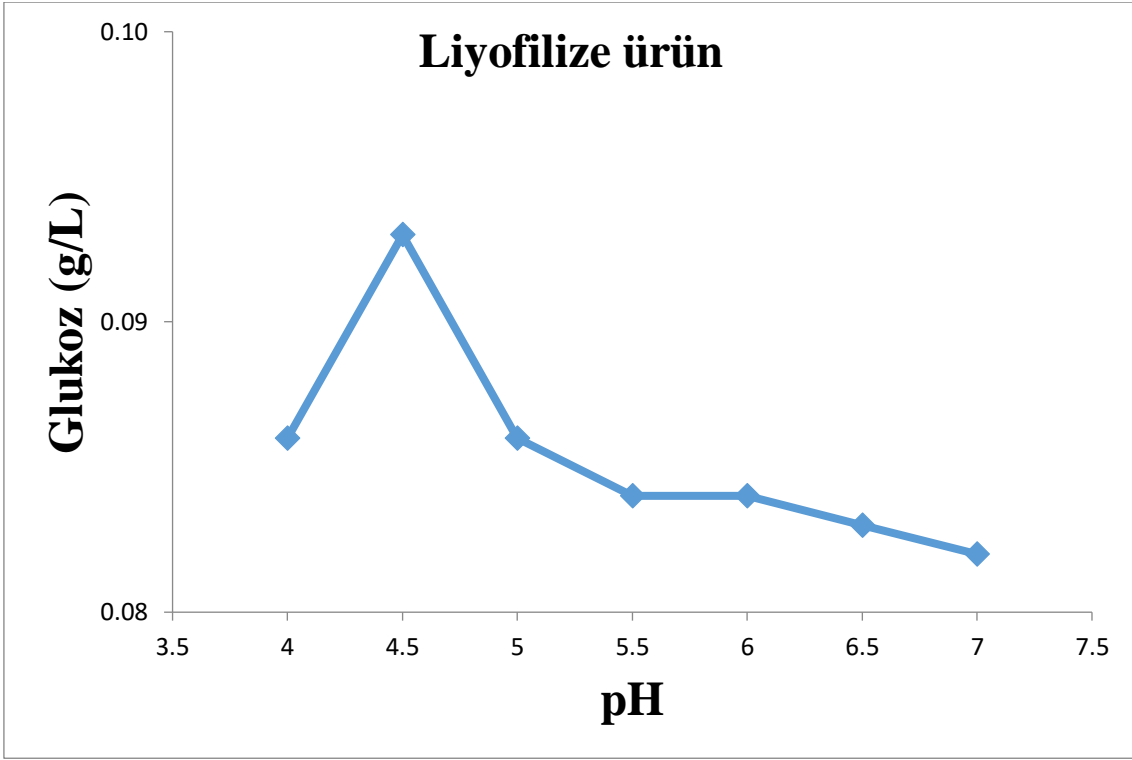
Çizelge 4.1 da verildiği üzere spektrofotometre metodu kullanılarak yapılan glukoz analizi sonucunda, 0 ile 0,5 arasında değişen absorbans değerleri ölçülmüştür. Absorbans değerlerinin yoğunluğu artıkça, ölçülen absorbans sonuçlarında giderek artan veriler elde edilmiştir.



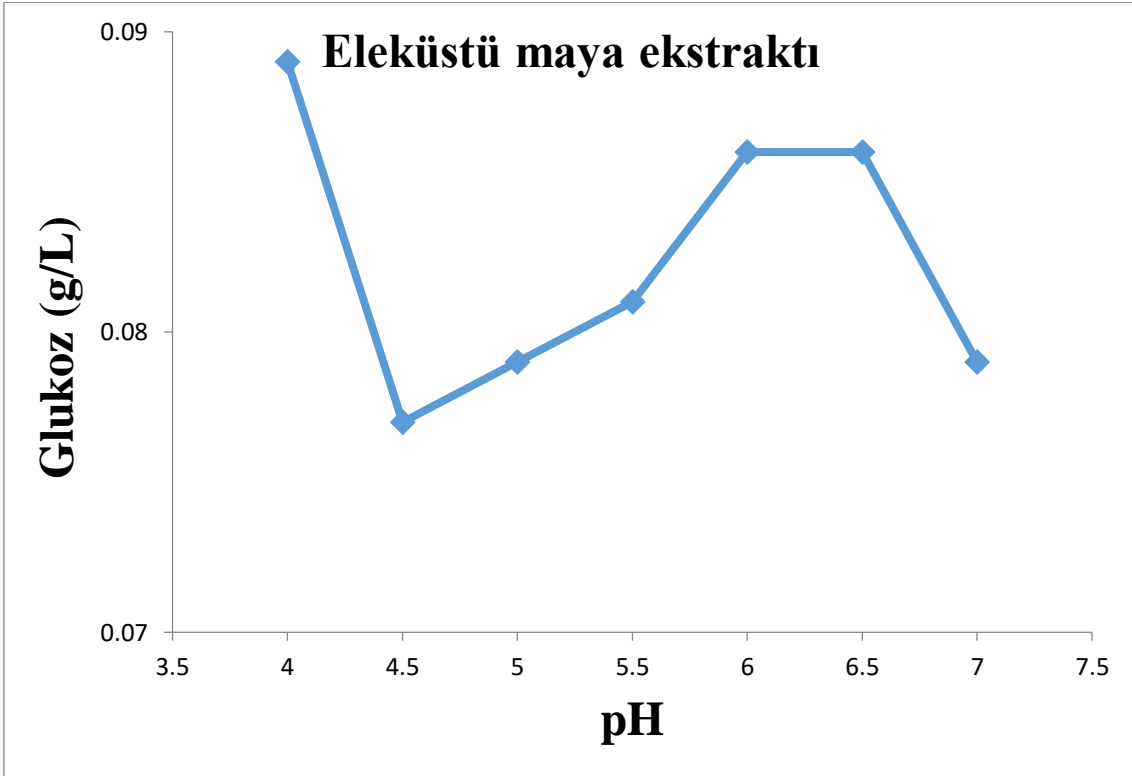
Şekil 4.9. Sabit sıcaklık değişen pH değerlerinde ticari enzim glukoz sonuçları



Şekil 4.10. Sabit sıcaklık değişen pH değerlerinde püskürterek kurutulmuş örneğin glukoz sonuçları



Şekil 4.11. Sabit sıcaklık değişen pH değerlerinde liyofilize edilmiş örneğin glukoz sonuçları



Şekil 4.12. Sabit sıcaklık değişen pH değerlerinde eleküstü maya ekstraktı glukoz sonuçları

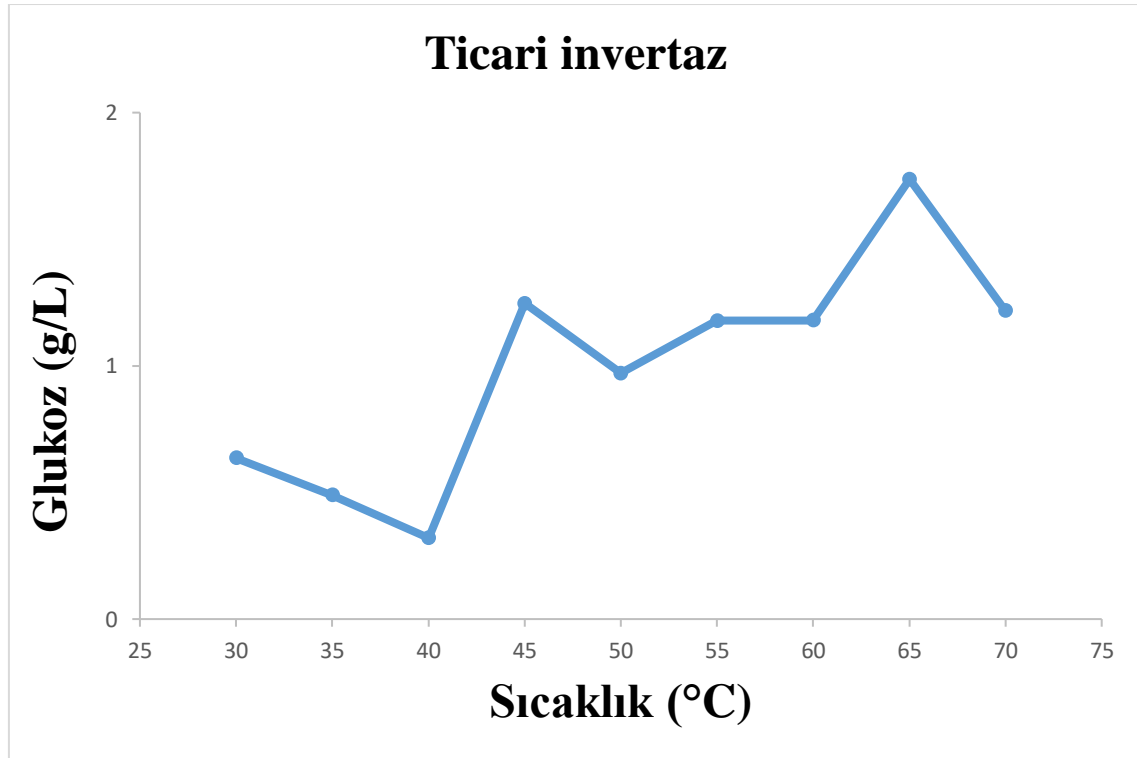
Yukarıda verilen şekillerde, sıcaklığın 40°C’de sabit tutulan ve pH aralıkları 4-7 arasında değiştirilen ürünlerin invertaz aktivite değerleri verilmiştir.

İlk olarak şekil 4.9 incelendiğinde, en yüksek glukoz değeri pH 4’te 0,729 g/L elde edilirken, en düşük glukoz değeri pH 7’de 0,093 g/L elde edilmiştir.

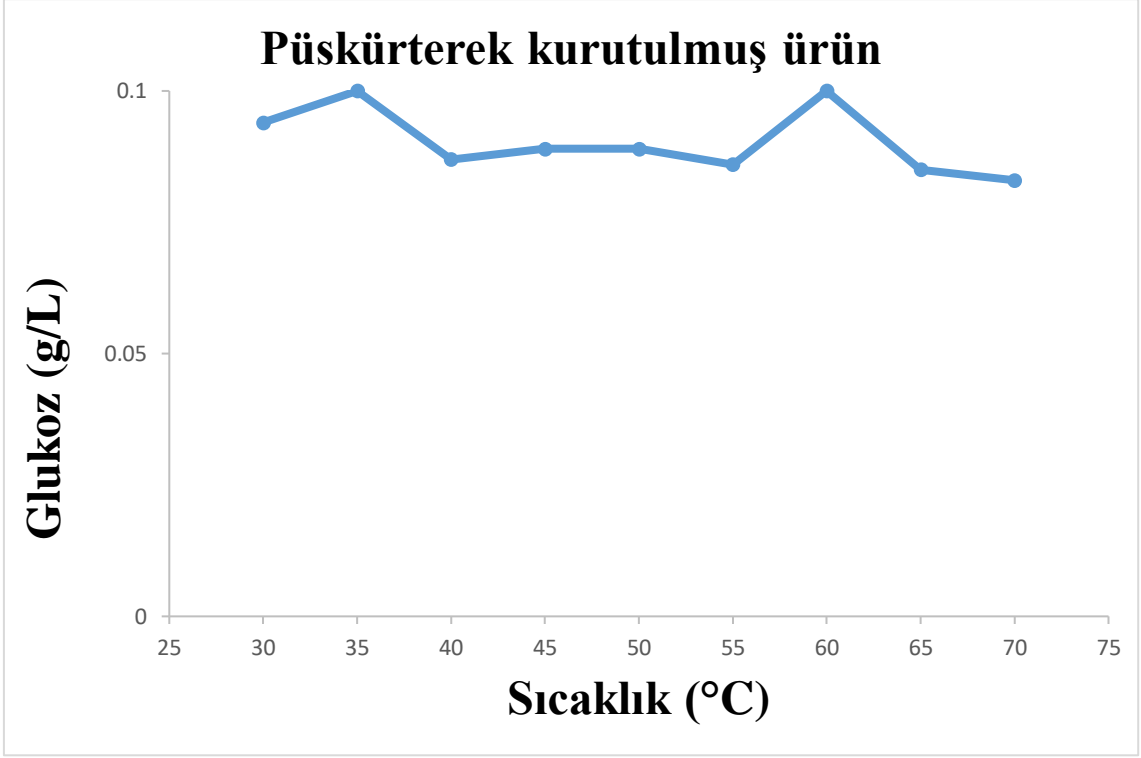
Püskürterek kurutulan örnek sonuçlarının şekil 4.10 de en yüksek glukoz değerinin pH 6,5’te 0,105 g/L olarak okunurken, en düşük glukoz değeri de pH 4’te 0,085 g/L sonucu elde edildiği görülmektedir.

Liyofilize elde edilen örneğin sonuçları şekil 4.11 de incelendiğinde, en yüksek glukoz değerinin pH 4,5’te 0,093 g/L elde edilirken, en düşük glukoz değeri ise pH 7’de 0,082 g/L elde edilmiştir.

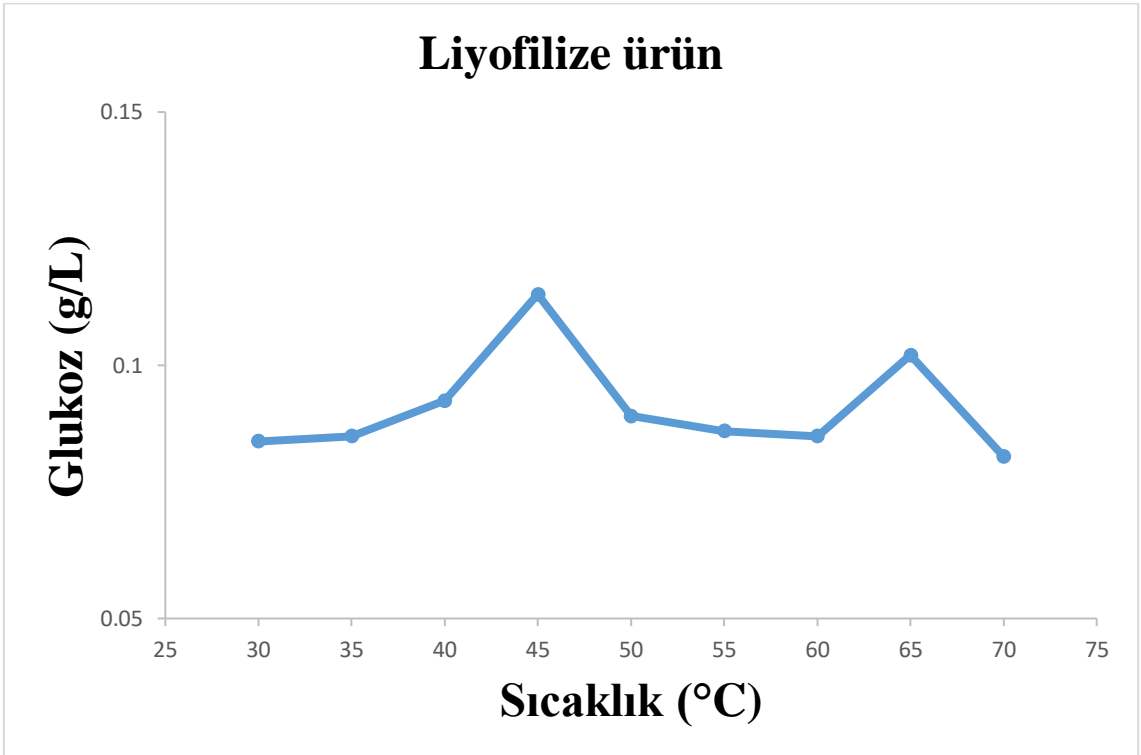
Şekil 4.12 de verilen elektüsti maya ekstraktı glukoz değerlerinden en yüksek pH 4’te 0,089 g/L bulunurken, en düşük glukoz değeri pH 4,5’te 0,077 g/L ölçülmüştür.



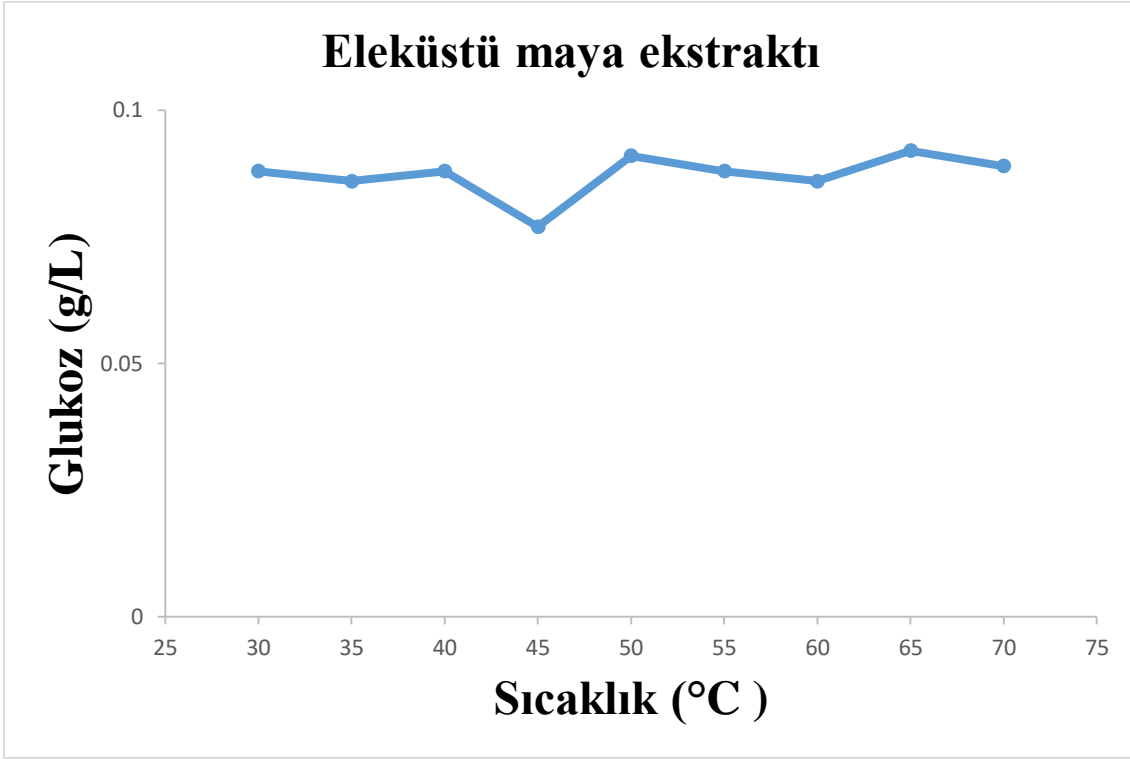
Şekil 4.13. Optimum pH değişen sıcaklık değerlerinde ticari enzim glukoz sonuçları



Şekil 4.14. Optimum pH değışen sıcaklık değeriinde püskürterek kurutulmuş örneğinin **glukoz** sonuçları



Şekil 4.15. Optimum pH değışen sıcaklık değeriinde liyofilize edilmiş örneğinin **glukoz** sonuçları



Şekil 4.16. Optimum pH değışen sıcaklık değerlerinde eleküstü maya ekstraktı aktivite sonuçları

Yukarı verilen şekillerde, optimum pH 4,5 kullanılarak sıcaklığın 30-70°C arası denenmiş invertaz aktivite sonuçları verilmiştir.

Şekil 4.13 te verilen ticari invertaz enziminin glukoz değerleri yer almaktadır. En yüksek glukoz değeri sıcaklık 65 °C olup, 1,737 g/L sonucu tespit edilirken, en düşük glukoz değeri de 40 °C olup 0,320 g/L olarak bulunmuştur.

Püskürterek kurutulmuş örneğın glukoz değerleri şekil 4.14 te verilmiştir. Bu çizelgeye göre en yüksek 35 ve 60 °C olup glukoz değeri 0,100 g/L bulunmuştur.

Şekil 4.15 da verilen liyofilize edilmiş örnekten elde edilen glukoz değerlerine bakılırsa, en yüksek 45 °C de 0,114 g/L olup, en düşük 70 °C de 0,082 g/L sonucu bulunmuştur.

Eleküstü maya ekstraktı glukoz değerleri de şekil 4.16 de verilmiştir. Çizelgede en yüksek 65 °C de 0,092 g/L olup, en düşük 45 °C de 0,077 g/L olarak ölçülmüştür.

Endüstride kullanılan invertaz enziminin yerli kaynaklar kullanılarak düşük maliyetli üretimi ülkemizin dışa bağımlılığını azaltacak potansiyele sahip bir araştırma alanıdır. İvertaz enzimi birçok çalışmada model enzim olarak kullanılmış ve farklı kaynaklardan eldesi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu enzimin karakterizasyonu da literatürde başarılı bir şekilde yapılmış durumdadır. Ancak yapılan çalışmalar incelendiğinde bitkiler ve mikroorganizmaların kaynak olarak kullanıldığı ve dolayısıyla bu canlıların kontrollü şartlarda geliştirilerek enzim üretiminin sağlandığı görülmektedir.

Karkaş (2009) tarafından yapılan çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*'dan ekstrakte edilerek saflaştırılan invertaz enziminin endüstride rahatlıkla kullanılabilir özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Mikrobiyal invertaz üretiminin denendiği ve kaynak mikroorganizma olarak *Aspergillus oryzae*'nin kullanıldığı bir çalışmada aktivite geri kazanımı %50 seviyesinde kalmıştır (Dhananjay ve Mulimani, 2008). Yapılan bir diğer çalışmada ak dut meyvesinden ekstrakte edilen bitkisel kaynaklı invertazın ham hali ile 4,01 U/mg spesifik aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuş olup ileri saflaştırma teknikleri ile bu aktivitenin yaklaşık 5 kat arttığı ifade edilmiştir (Şahin, 2015). Yine bitki kaynaklı invertaz üretimi çalışmasında enzim kaynağı olarak domates kullanılmış olup araştırmacı tarafından bildirilen spesifik aktivite değeri saf enzim için 31 U/mg seviyesindedir (Yücekan, 2008). Patatesten invertaz eldesine yönelik yapılan bir çalışmada ise saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri araştırılmış olup bitkiden enzim geri kazanım oranının oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Duman ve Kaya, 2014).

Ekmek mayası olarak da bilinen ve ülkemizde başarılı bir şekilde ticari üretimi yapılan *S.cerevisiae* iyi bir invertaz üreticisidir. Ancak ekmekçilikte mayanın bu özelliğinden ziyade ortamda amilaz (dışarıdan una eklenen veya doğal olarak bulunan) tarafından oluşturulan basit şekerleri kullanarak CO₂ oluşturma yeteneği dikkate alınmaktadır. *S.cerevisiae* “bulk” halinde üretilmesi sırasında doğal olarak hücre içinde invertaz enzimi üretmektedir. İleri aşamalarda ürünün yaş, kuru veya instant ekmek mayasına dönüştürülmesinde de bu enzim hücre yapısında kalmaktadır. Ancak kuru maya üretiminin bir aşaması olan, sulu ortamdaki ekmek mayasının kurutulması sırasında, kurutucu tamburların eleklerinden geçemeyen veya topaklanan mayalar son ürün aşamasına ulaşmadan sistemden ayrılmakta ve “eleküstü maya” adıyla artık olarak işlem görmektedir. Bu artık üründe “maya aktivitesinin” düşük olduğu, paketlemede soruna yol açtığı ve markete sevk edilemeyeceği kabul edildiğinden bazı durumlarda imha yoluna gidilmekte, bazı durumlarda da çok düşük bir bedelle hayvan yemi

üreticilerine satışı yapılmaktadır. Bu tez çalışmasından elde edilen verilerin literatürde bildirilen invertaz aktivite değerlerinden bazılarına yakın olduğu görülmekle beraber, ileri saflaştırma halinde invertaz üretiminin bu hammaddeden mümkün olabileceği düşünülmektedir.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Tartışma

Bu çalışma maya fabrikası artığı olan eleküstü mayanın, geri kazanımı konusunda yapılan bir çalışma niteliği taşımaktadır. Bu doğrultuda eleküstü mayadan farklı yollarla elde edilen ham invertaz enzimi üretimini kapsamaktadır. Artık maddenin içeriği *Saccharomyces cerevisiae* barındırmaktadır. Bu doğrultuda elde edilen ürünlerin tamamında maya tarafından doğal olarak üretilen invertaz enzimi varlığı söz konusudur.

Eleküstü mayanın hidrolizi aşamasının ardından yapılan püskürterek kurutma aşamasında ürün çokluğu avantajken, cihazın uzun sürede çalışıp az örnek vermesi dezavantaj haline gelmektedir. İşlem sonunda 1 lt süpernatant üründen 2 g örnek alınmıştır. Cihazın kullanım süresi daha çok olup daha fazla ürün elde edilmesi durumunda, aktivite ölçümü esnasında yapılan ürünün seyreltme işlemi yapılmadan sonuca ulaşmak mümkün olabilecektir.

Püskürterek kurutulmuş ürün ile yapılan invertaz ve DNS şeker analizi sonuçlarına bakıldığında; ilk olarak sıcaklığın sabit tutulup pH değerlerinin denemesi ile belirlenen aktivite tayininde optimum pH oranının bulunması açısından önemlidir. Sonuçlara göre, püskürterek kurutulmuş üründe pH 4.5'te optimum aktivitenin 2,90 u/ml olduğu gösterilmiştir. Bu değer, püskürterek kurutulmuş üründe seyreltme işlemi yapılmaması durumunda daha yüksek olacağı varsayılmaktadır. Fakat yine de bu şekilde kullanılması kabul edilebilir bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde en düşük aktivitenin pH 6 / 6,5 ve 7 de 0,48 u/ml olarak bulunduğu görülmektedir. Bu aktivite kaybının sebebi ortamdaki hidrojen iyonu konsantrasyonu değişimi ve buna bağlı olarak enzimlerin aktif merkezindeki iyonlaşma kuvvetinin bozulması ve substrat çözünürlüğünün değişmesiyle açıklanabilir.

Diğer bir deneme olan optimum pH sabit tutularak, farklı sıcaklık aralıkları denemesinde ise sıcaklık arttıkça püskürterek kurutulmuş ürünlerin aktivite değişimleri incelenmiştir. Buna göre, sıcaklık arttıkça püskürterek kurutulmuş ürünlerinin aktivite değerlerinin genellikle düşüş gösterdiği görülmektedir. Optimum pH ve optimum sıcaklığın tespit edildiği sıcaklık değeri 40°C'de 2,90 u/ml olduğu görülmektedir. Yüksek sıcaklıklar

enzimler üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Enzimler protein yapısına sahip olduklarından yüksek sıcaklık yapılarını denatüre etmektedir. Bu yüzden sonuçlara bakıldığında, 50°C’de aktivite değeri 0,28 u/ml olarak bulunmuştur.

Liyofilize ürün ile yapılan invertaz analizi ve DNS şeker analizi sonuçlarına göre; sabit sıcaklık değişen pH denemeleri sonucunda en yüksek aktivite değeri 40°C’de 2,91 u/ml olarak bulunmuştur. Liyofilize ürün yapısı gereği yapışkanimsi yapıda olduğundan dolayı püskürterek kurutulmuş ürün gibi seyreltilip kullanılmıştır. Seyreltilen yapıların aktivite değerleri normale göre daha düşük çıktığı söylenebilir. En düşük aktivite görülen pH değerleri 6,5 ve 7 olarak belirlenmiştir. Yüksek pH içerikleri aktif merkezindeki iyonlaşma kuvvetini bozarak substrat çözünürlüğü etkilemektedir. Optimum pH sabit tutulup, farklı sıcaklıklar denendiğinde 40°C de aktivite 2,91 u/ml tespit edilmiş olup, düşük aktivite gösteren sıcaklık ise 65°C olarak belirlenmiştir.

Eleküstü maya ekstraktı ile yapılan invertaz analizi ve DNS şeker analizi ise; ilk olarak sıcaklık sabit tutulup pH aralıkları denemesi yapıldığında optimum pH 4,5 olup buradaki aktivite değeri 1,73 u/ml olarak bulunmuştur. Ekstraktın su fazının fazla oluşu aktivite düşüklüğünü açıklayabilir. En düşük aktivite değeri pH 6,5’te 0,43 u/ml olarak tespit edilmiştir. Diğer etmen olan optimum pH’da sıcaklık denemeleri sonuçlarına bakıldığında, ham enzimin optimum aktivite verdiği sıcaklık 40°C olarak bulunmuştur. En düşük aktivitenin olduğu sıcaklık ise 60/65°C sıcaklıklar olarak tespit edilmiştir.

Son olarak ticari örnekte invertaz aktivitesi ve DNS sonuçlarına baktığımızda; sıcaklık sabit olup pH aralıkları denenen analizde optimum pH 4,5 olup aktivite değeri 3,30 u/ml olarak bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde en düşük aktivite değeri pH 6,5’te 0,96u/ml olarak tespit edilmiştir. Bu durumun aksine optimum pH’da sıcaklık denemeleri yapıldığında 40°C sıcaklıkta aktivite değeri 3,30 u/ml olarak bulunmuştur. En düşük aktivitenin olduğu 65°C’de 0,43u/ml olarak tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında ulaşılan sonuçlara bakıldığında, invertaz enziminin farklı yollardan elde edilmesiyle ölçülen aktivite değerleri farklılık göstermektedir. Püskürterek kurutulmuş, liyofilize ve elek üstü maya ekstraktı örneklerinde ölçülen invertaz aktivite değerleri farklı çıkmıştır. Burdan yola çıkarak invertaz enziminin farklı işlemlere tabii tutulması aktivite sonuçlarını etkilemiştir yargısına varılabilir.

Literatür çalışmalarına bakıldığında, invertaz enziminin birçok kaynaktan elde edilerek aktivite ölçümü yapıldığı görülmüştür. İvertaz enzimi kullanıldığı kaynaklar göre farklılık göstererek aktivite sonuçları değişmektedir. Literatür çalışmaları çizelge 5.1.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Literatür Araştırmaları

Çalışma	Yöntem	Materyal	Optimum pH	Sıcaklık	İvertaz Aktivitesi
Sing M.B, Knox R.B 1984	Glikoz Oksidasyonu	Zambak	4,00/7,00 Optimum 4,50	40/50 °C	8,07 u/mg 2680 units
Varster and Botha 1998	Ref yöntemi	Şeker Kamışı	7,2		89,9 nkat 0,273 nkat/mg protein
Hashizune et al. 2003	İndirgen Şeker Tayini	Armut	4,5		7,61 nkat/mg
Isla et al. 1993	Adsorption kromotografi	Patates	3,00/8,00 5,25	37°C	0,067 u/mg 552 units
Benkeblia et al.2004	Anyon değişimi kromotografi si	Soğan		10/20°C	0,039/0,0 4 1 nkat/g
Liu et al. 2006	İzoelektrik fokuslama	Bambu	7,00	37°C	0,15 u/mg 48 units
M.J Alam et al. 2007	Mohademen ve Sridher yöntemi	Domates	3,50/7.00 5,00	10/80 °C 35/40 °C optimum	2,93 u/mg 3172,3 units
Sanaa T El- Sayed et al. 2017	Somogyi ve Nelson Yöntemi	Bezelye	5,00	50 °C	3,7 u/mg
Douglas C. et al 1987	Nelson yöntemi	Mısır	5,00	10/30 °C 30 °C	0,37 units 0,57 units 0,81 units 0,70 units

(Tuz Konstrasyonlar ı)					0,51 units
Belcarz et al. 2002		Candida Utilis	3,6/5,00 Optimum4,0/4, 4	30/90 °C 70 °C	29,4 u/mg 10,680 units
Alvaro- Benito et al. 2007	DNS metodu	Schwanniomyc es accidentalis	5,50	30/70 °C Optimu m 45/55 °C	3-9 units
Bahar ve Tuncel 2004	Afinite kromotografi si	Sac. Cerevisiae'den	4,00/7,00 3,0/4,7 optimum		3,18 u/ml 4,08 u/ml 3,68 u/ml
QjanLi et al. 2018		Aspergillus foetidus	4,00/6,50		3,18 u/ml 4,08 u/ml 3,68 u/ml
Maíra N. de Almeid et al. 2018	DNS ve glikoz oksidaz	Aspergillus terreus	4,6/ 6,00 4,6	40/55 °C 55°C	2,5 u/mg 2,87 u/mg

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, invertaz enziminin bitki, hayvan ve mikroorganizma kaynaklı birçok üründen elde edildiği görülmektedir. İvertazlar doğada bitkisel kaynaklardan; üzüm, patates, bambu, tütün, ananas, havuç, mango, pirinç, arpa, yulaf, elma, portakal, şeftali, domates, kavun ve nohut vs. elde edilirken, mikrobiyal kaynaklardan; *Sacharomyces cerevisia*, *Aspergillus niger*'den elde edilmektedir (Hepokur 2007, Kat 2013). Mikrobiyal kaynaklı invertaz enzimleriyle yapılan çalışmaların daha çok endüstri alanında kullanımı yaygındır (Tomotani ve ark 2006, Bayramoğlu ve ark 2003, Sanjay ve ark 2006).

5.2 Sonuç

Eleküstü mayadan 3 farklı yolla elde edilen ham enzimlerin ticari muadili ile karşılaştırılması yapılmıştır. Bu ürünlerdeki aktivitelerin ticari enzimde bulunan aktiviteden düşük olduğu gözlenmiştir. Ancak ulaşılan sonuçların literatürler uyumlu olduğu ve eleküstü mayanın invertaz kaynağı olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Yapılan tez çalışmasından elde edilen verilerin ışığında daha ileri saflaştırma ve

karakterizasyon basamakları içeren çalışmaların yapılabileceği öngörülmektedir. Artık olarak değerdendirilen bir ürünün katma değeri yüksek başka bir ürüne dönüştürülmesi yönünde önemli sonuçlara ulaşılan bu tez çalışmasının invertaz enziminin endüstriyel üretiminde fayda sağlayabileceği düşünölmektedir.

6.KAYNAKLAR

- Aehle, W. (2004). *Enzymes in Industry Production and Application*. Wiley VCH Verlag, Weinheim, 484s.
- Akpınar, A. (2004). Poliüretan köpüklere ekmeek mayası immobilizasyonu (Yüksek Lisans Tezi), Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- Álvaro-Benito, M., De Abreu, M., Fernández-Arrojo, L., Plou, F.J., Jiménez-Barbero, J., Ballasteros, A., Polaina, J., FernándezLobato, M., (2007), Characterization of a -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose, *Journal of Biotechnology*, 132: 7581.
- Atago- POLAX 2I polarimetre- el kitabı.
- Avcı, A. (2010). Bazı *Thermoanaerobacter* suşları ile siklodekstrin glikoziltransferaz (SGTaz) enzimi üretimi, karakterizasyonu ve siklodekstrin üretiminin optimizasyonu, Dokora Tezi. Ankara.
- Bailey, J.E and Ollis, F.D., (1977), *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill,Inc., New York.
- Başçı, N. E. (1985). Sakkarozun İvertaz ile hidroliz kinetiğinin ve invertaz deaktivasyonunun incelenmesi (Yüksek Lisans Tezi), Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bayramoğlu, G., Akgöl, S., Bulut, A., Denizli, A., Arıca, M.Y., (2003), Covalent immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system, *Biochemical Engineering Journal*, 14 (2):117-126.
- Bhat, M.K. (2000). *Cellulase and Related Enzymes in Biotechnology*, *Biotechnology Advances*, 18, India, 355-458.
- Bogdanov, S., Lüllman, C., Martin, P., Von Der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., Persano-Oddo, L., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Piro, R., Flamini, C., Morlot, M., Heritier, J., Borneck, R., Marioleas, P., Tsigouri, A., Kerkvliet, J., Ortiz, A., Ivanov, T., D_ Arcy, B., Mossel, B. and Vit, P. 1999. Honey quality and international regulatory standards. Review by the international honey commission. *Bee World* 80 (2): 61-69.
- Day, P.R., Genetic modification of plants: significant issues and hurdles to success. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63,651656,1996.
- Dhananjay ve Mulimani, 2008. Three-phase partitioning of α -galactosidase from fermented media of *Aspergillus oryzae* and comparison with conventional purification techniques. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2009 36:123-128.
- Douglas C. Doehlert and Frederick C. Felker (1987). Characterization and distribution of invertase activity in developing maize (*Zea mays*) kernels. *PHYSIOL. PLANTARUM* 70: 51-57. Copenhagen 1987.
- Duman ve Kaya 2014. Purification and recovery of invertase from potato tubers (*Solanum tuberosum*) by three phase partitioning and determination of kinetic properties of purified enzyme. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]* 2014; 39(4):443–448

- Garrett, RH. ve Grisham, CM. (1999). Biochemistry, Second Edition Saunders College Publishing: Harcourt Brace, Orlando. 426-427.
- Gascon, S. & Lampen, .I. O. 1968. Purification of the internal invertase of yeast. - J. Biol. Chem. 243: 1567-1572.
- Gidamis, A. B., Chove, B.E., Shayo, N. B., Nnko, S. A. and Bangu, N.T. 2004. Quality evaluation of honey harvested from selected areas in tanzania with special emphasis on hydroxymethyl furfural (HMF) levels. Plant Foods for Human Nutrition 59:129-132.
- Gözükara E.M. (1997). Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 113-122.
- Gözükara, E., (1989). Enzimler. Biyokimya. Ofset Repromat Ltd.Şti, 572-576 s, Ankara
- Gözükara, E.M.,(1989). Biyokimya,Ofset Repromat Ltd. Şti.,Ankara.
- Gözükara, M.E., Biyokimya 2, Nobel Tıp Kitabevleri, stanbul, 1997.
- Guimarães L.H.S., Terenzi H.F., Polizeli M.L.T., Jorge J.A., (2007), Production and characterization of a thermostable extracellular D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources, Enzyme and Microbial Technology, 42: 52-57.
- Hepokur, C.,invertazn Değişik Desteklere immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 2007.
- Hışıl, Y., (2008). Enstrümental Gıda Analizleri, Güncellenmiş Genişletilmiş 5. Baskı, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları Yayın No: 48, Bornova, İzmir 2.
- <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%205/enzymes.hotmail>, Aralık 2013.
- http://chemlab.truman.edu/chemlab_backup/PChemLabs/CHEM324Labs
- <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/assay-procedure-for-invertase.html>
- Janer, C., Rohr, L. M., Peláez, C., Laloi, M., Cleusix, V., Requena, T., Meile, L., 2004, Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant α -fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*, Systematic and Applied Microbiology, 27: 279-285
- Jones RC, Hough JS (1970).The effect of temperature on the metabolism of baker's yeast growing on continuous culture. J Gen Microbiol 60: 107-116.
- Karkaş 2009. İvertaz Enziminin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması İçin Sulu İkili-Faz Afinite Sistemlerinin Geliştirilmesi. (Y.Lisans Tezi). Biyokimya, İzmir.
- Kasavi, C. (2006). Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu. İstanbul Teknik Ü. FBE. Yüksek Lisans Tezi.
- Kat, B., İvertaz Enziminin I Faz Sistemi le Saflaştırılması ve DemirTanin Kompoziti üzerine immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya üniversitesi, Fen Bilimleri Entits, Sakarya, 2013.
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2010. Biyokimya. Aktif Yayınevi, 118, İstanbul
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. (2002), "Industrial Enzyme Applications", Current Opinion in Biotechnology, 13: 345-351.

- Krajewska, B. (2003). Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations, A Review, *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126-139.
- M. C. F. Silveira, E. Carvajal, and E. P. S. Bon (1996). Assay for *in Vivo* Yeast Invertase Activity Using NaF. Janeiro, Rua Saõ Francisco Xavier, 524, CEP 20559-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- Mensonides F, Brul S, Hellingwerf KJ, Bakker BM, Teixeira de Mattos MJ (2014) A kinetic model of catabolic adaptation and protein reprofiling in *Saccharomyces cerevisiae* during temperature shifts. *FEBS J* 281: 825-841
- Michaelis, L., Menten, M.L., 1913, Die kinetik der invertin-wirkung, *Biochemische Zeitschrift*, 49: 333–396.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 1959;31(3):426-428
- Mouhoubi-Tafinine, Z., Ouchemoukh S., Bachir bey M., Louaileche, H. and Tamendjari, A. (2018). Effect of storage on hydroxymethylfurfural (HMF) and color of some Algerian honey. *International Food Research Journal* 25(3): 1044-1050.
- Nakamura, M., Hagimori, M., Matsumoto, T., 1988, Purification and characterization of acid invertase from cultured tobacco cells, *Agricultural and Biological Chemistry*, 52 (12): 3157-3158.
- Nalbantolu, S., Azol Türevi Moleküllerin Proteaz Enzimleri üzerindeki inhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2013.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. - *J. Biol. Chern* 153: 375-380.
- Özçömlekçi, E. (2006). Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi, İTÜ, FBE, Yüksek Lisans Tezi.
- Pekin, B., (1979), *Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)*, Birinci Kitap: Kısım:1, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir.
- Reddy, V.A., Maley, F., 1990, Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labeling and site-directed mutagenesis, *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 10817-1082
- Sanjay, G., Sugunan, S., (2006), Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10, *Food Chemistry*, 94: 573-579.
- Sümengen, M. (2011). Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanakları, Ç.Ü. FBE. Yüksek Lisans Tezi.
- Şahin 2015. İntertaz Enziminin Ak Duttan (*morus alba*) Üçlü Faz Sistemi ile Saflatırılması ve Karakterizasyonu. (Y.Lisans Tezi), *Biyokimya, Sakarya*.
- Telefoncu, A., (1986). Temel ve uygulamalı Enzimoloji. Ege üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (Der), 59 s, İzmir.
- Telefoncu, A., 1986 *Enzimolojiye Genel Bak: Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, E.. Yayınlar, İzmir.

- Tomotani, E.J., Vitolo, M., 2006, Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic Exchange resin, *Process Biochemistry*, 41 (6): 1325-1331
- Warchol, M., Perin, S., Gril, J.-P., Schneider, F., 2002, Characterization of a purified - fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697, *Letters in Applied Microbiology*, 35: 462-467.
- Yetim H., Çam M. 2009. Enstrümental Gıda Analizleri. Erciyes Üniversitesi Yayınları. No:175,Kayseri.
- Yücekan 2008. İnvertz Enziminin Afiniteye Dayalı Teknikler ile Saflaştırılması. (Y.Lisans Tezi). Biyokimya, İzmir.

ÖZGEÇMİŞ

Neşe ÖZDİNÇ 1993 yılında Kırklareli’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kırklareli’de tamamladı. Lisans öğrenimi 2011 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü’ne girdi. Bu bölümden 2016 yılında mezun oldu. Eylül 2016’da Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.