

α -Amilazın Manyetik Özelliğe Sahip Aljinat Küreler İçerisine İmmobilizasyonu

Ayla Şener¹, Yasemin Mısırlı², F. Banu Erdem Çetin², Emir B. Denkbaş², Ayhan Temiz¹

¹Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Beytepe 06800, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Beytepe 06800, Ankara
ayla@hacettepe.edu.tr

Özet

Bu çalışmada, α -amilazın manyetik özelliğe sahip aljinat küreler içerisine immobilizasyonu gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Aljinat kürelere manyetik özellik vermek amacıyla Fe_3O_4 kullanılmıştır. Manyetik aljinat küreler içerisine immobilize edilen α -amilaz enzim aktivitesi, substrat olarak nişasta kullanılarak spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. İmmobilize enzim aktivitesi üzerine pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu ve iyonik şiddet konsantrasyonunun etkileri araştırılmıştır. V_{max} değeri serbest enzim için $15.0 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ve immobilize enzim için $3.58 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ olarak, K_m değeri ise serbest enzim için 1.19 g L^{-1} ve immobilize enzim için 9.57 g L^{-1} olarak belirlenmiştir. Optimum pH değeri hem serbest hem immobilize α -amilaz için pH 7.0 olarak bulunmuştur. Serbest enzim için optimum sıcaklık 60°C , immobilize enzim için 80°C olarak belirlenmiştir. Hazırlanan kürelerin manyetik özellikleri elektron spin rezonans tekniği ile belirlenmiş ve yaklaşık 3.300 Gauss değerinde manyetik alan büyüklüğüne sahip oldukları bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: α -amilaz, Aljinat, Magnetik taşıyıcı, İmmobilizasyon

Giriş

Birçok endüstriyel alanda kullanılmakta olan immobilize enzimler, serbest formlarına göre çeşitli avantajlar sağlarlar (1-4). İmmobilize enzimler proseslerin sürekli düzende çalışmasını olanak verirler, sistem denetimini kolaylaştırırlar, birçok kez ve uzun süre kullanılabilirler. İmmobilize enzimler reaksiyon ortamından ayrılabilmeleri nedeniyle enzimin ürüne karışması engellenebilmekte ve ürün kalitesini olumsuz yönde etkileyebilecek ileri reaksiyonların önüne geçilebilmektedir. İmmobilize enzimlerin pH, sıcaklık ve iyonik şiddet gibi çevre koşullarına karşı serbest enzimlere göre daha dayanıklı olması da önemli kullanım üstünlükleridir.

Enzimlerin farklı destek materyallerine immobilizasyonu amacıyla çeşitli immobilizasyon yöntemlerinden yararlanılmaktadır (1, 2, 3, 4). İmmobilize enzimlerin reaksiyon ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi ve tekrar kullanabilmelerini sağlamak amacıyla son yıllarda “manyetik taşıyıcı teknolojileri” uygulamalarına yönelik çalışmalar dikkati çekmektedir. Farklı tipte doğal ve sentetik polimerler (aljinat, polistiren, poliakrilamid, polivinil alkol, nitroselüloz, polivinil bütiral ve kitozan gibi) kullanılarak manyetik taşıyıcıların hazırlanmasına yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (5, 6, 7, 8).

Bu çalışmada, enzim immobilizasyonlarında kullanılmak üzere manyetik özellikli aljinat taşıyıcıların hazırlanmasında model enzim olarak α -amilaz kullanılmıştır. Amilazın manyetik aljinat küreler içerisine immobilizasyonu gerçekleştirilmiş, serbest ve immobilize α -amilaz aktivitesi substrat olarak nişasta kullanılarak spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Manyetik aljinat küreler içerisine enzim immobilizasyonu: α -amilaz immobilize edilmiş aljinat küreler, süspansiyon çapraz bağlama tekniği ile hazırlanmıştır. Bu amaçla, %1 (v/v) oranında α -amilaz içerecek şekilde sodyum aljinat jeli (%1, w/v) hazırlanmış ve jel içerisine %0.5 (w/v) düzeyinde Fe_3O_4 ilave edilmiştir. Elde edilen bu karışım %20 (w/v) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ çözeltisi içerisine şırınga yardımıyla damla damla aktarılmış ve 2000 rpm karıştırma hızında 2 saat karıştırılmıştır.

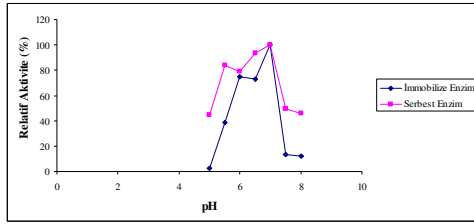
Manyetik özelliklerinin değerlendirilmesi: Kürelerin manyetik özellikleri “Elektron Spin Rezonans (ESR)” spektroskopisi ile değerlendirilmiştir.

Serbest ve immobilize α -amilaz aktivitesinin belirlenmesi: α -amilaz aktivitesi; iyot çözeltisi ile nişastanın oluşturduğu renkteki (mavi-mor) yoğunluğun, nişastanın α -amilaz aktivitesiyle enzimatik parçalanmasına bağlı olarak azalma miktarının 600 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlenmiştir. pH 5-8 arasında değişen farklı pH ortamlarında enzim aktivitesi belirlenerek pH’nın enzim aktivitesi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi, 4-100°C arasında değişen farklı sıcaklıklar kullanılarak belirlenmiştir. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi ise, reaksiyon ortamında farklı konsantrasyonlarda nişasta (%0.25-4 w/v) kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen değerler kullanılarak serbest ve immobilize enzim için K_m ve V_{max} kinetik sabitleri belirlenmiştir.

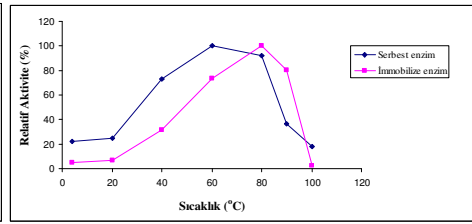
Bulgular ve Tartışma

Aljinat kürelerin manyetik özellikleri ESR spektroskopisi ile belirlenmiş ve 1 g aljinat kürenin yaklaşık 3.300 Gauss değerinde manyetik alan büyüklüğüne sahip oldukları bulunmuştur. Serbest ve immobilize α -amilaz için, optimum pH değeri

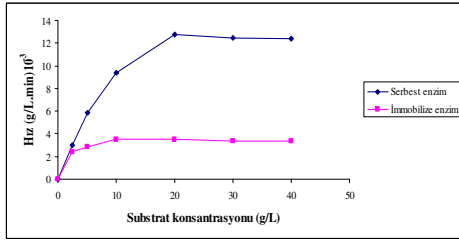
7.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Serbest ve immobilize α -amilazın, $\text{pH} < 5.0$ ve $\text{pH} > 8.0$ değerlerinde enzim aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Enzim aktivitesinde optimum sıcaklık serbest enzim için 60°C , immobilize enzim için 80°C olarak bulunmuştur (Şekil 2). Farklı substrat konantrasyonlarında serbest ve immobilize α -amilaz aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 3). Elde edilen değerler Lineweaver-Burk grafiğinde kullanılarak serbest ve immobilize α -amilaz için V_{max} ve K_m kinetik sabitleri hesaplanmıştır (Şekil 4 ve Şekil 5).



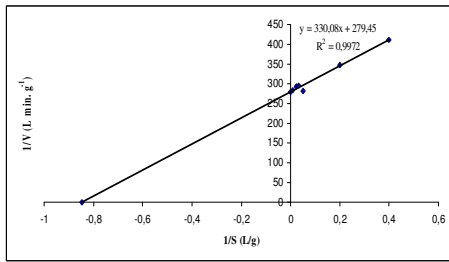
Şekil 1. Serbest ve immobilize α -amilaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi



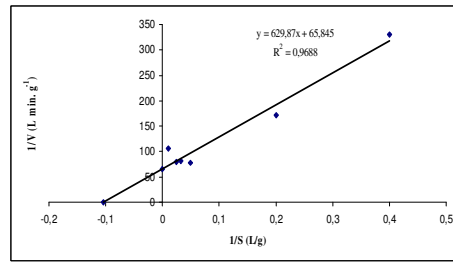
Şekil 2. Serbest ve immobilize α -amilaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi



Şekil 3. Serbest ve immobilize α -amilaz enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi



Şekil 4. Serbest α -amilaz için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 5. İmmobilize α -amilaz için Lineweaver-Burk grafiği

Serbest α -amilaz için, V_{max} değeri daha yüksek, K_m değeri ise daha düşük bir değer olarak belirlenmiştir. Bulunan V_{max} değerleri serbest α -amilaz için $15.0 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1} \text{ min}^{-1}$, immobilize α -amilaz için $3.58 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ şeklindedir. K_m değerleri ise, serbest ve immobilize α -amilaz için sırasıyla 1.19 g L^{-1} and 9.57 g L^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Kaynaklar

1. Bayramoğlu G, Akgöl S, Bulut A, Denizli A, Arıca MY. 2003. Covalent immobilization 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.
2. Bayramoğlu G, Yılmaz M, Arıca MY. 2004. Immobilization of a thermostable alpha-amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. *Food Chemistry*, 84 (4): 591-599.
3. Betancor L, Fuentes M, Dellamora-Ortiz G, Lopez-Gallego F, Hidalgo A, Alosa-Morales N, Mateo C, Guisan J M, Fernandez-Lafuente R. 2005. Dextran aldehyde coating of glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles prevents its inactivation by gas bubbles. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 32 (3): 97-101.
4. Arıca MY, Öktem HA, Öktem Z, Tuncel A. 1999. Immobilization of catalase in poly(isopropylacrylamide-co-hydroxyethylmethacrylate) thermally reversible hydrogels. *Polymer International*, 48 (9): 879-884.
5. Akgöl S, Kacar Y, Denizli A, Arıca MY. 2001. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chemistry*, 74 (3): 281-288.
6. Tanyolaç D, Özdural AR. 2000. A new low cost magnetic material: Magnetic polyvinylbutyral microbeads. *Reactive & Functional Polymers*, 43: 279-286.
7. Tanyolaç D, Özdural AR. 2000. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads. *Reactive & Functional Polymers*, 45: 235-242.
8. Denkbay EB, Kiliçay E, Birlıkseven C, Öztürk E. 2002. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization. *Reactive & Functional Polymers*, 50: 225-232.