İSTANBUL UNIVERSITY PRESS

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE
Journal of Advanced Research in Health Sciences /
Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2022
DOI: 10.26650/JARHS2022-1105097

HYPOCREA JECORİNA'DAN ELDE EDİLEN B-GALAKTOZİDAZ'IN HİDROKSİAPATİT VE ALÜMİNA ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU

IMMOBILIZATION OF B-GALACTOSIDASE FROM HYPOCREA JECORINA ON HYDROXYAPATIDE AND ALUMINA

Fulya AYTAÇ TÜRKAN[1,2], Ayşegül PEKSEL[3]

[1]İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı, Kanser Biyokimyası Doktora Programı, İstanbul, Türkiye
[2]İstanbul Bilgi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Patoloji Laboratuvar Teknikleri Ön Lisans Programı, İstanbul, Türkiye
[3]Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Ana Bilim Dalı, İstanbul-Türkiye

ORCID ID: F.A.T. 0000-0003-4097-6756; A.P. 0000-0003-3881-8513

Citation/Atıf: Aytaç Türkan F, Peksel A.Hypocrea jecorina'dan elde edilen β-galaktozidaz'ın hidroksiapatit ve alümina üzerine immobilizasyonu. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2022;5(1):99-104. https://doi.org/10.26650/JARHS2022-1105097

ÖZ

Amaç: *Hypocrea jecorina* QM9414 küf mantarından elde edilen, kısmi olarak saflaştırılan β-galaktozidaz'ın alümina ve hidroksiapatit (HA) üzerine adsorbsiyon yöntemiyle immobilize edilmesi ve bu şekilde hareketsizleştirilmiş olan enzimin serbest enzime göre spesifik aktivite ve protein değerlerinin ölçülerek değerlendirilmesidir.
Gereç ve Yöntem: *Hypocrea jecorina* QM9414 küf mantarından elde edilen, kısmi olarak saflaştırılan β-galaktozidaz enzimi alümina ve hidroksiapatit taşıyıcıları üzerine adsorsiyon yöntemiyle fiziksel olarak bağlandı. Bunun için süzme, yıkama ve kurutma işlemleri yapıldı. Ölçümler için UV-spektrofotometre cihazından yararlanıldı.
Bulgular: HA üzerine gerçekleştirilen adsorbsiyon sonucunda immobilize olan enzimin verimi spesifik aktivite birimi (U/mg) açısından %88 bulunurken, protein miktarları (mg/ml) göz önüne alınarak hesaplandığında %18,6 sonucunu göstermiştir. Alümina üzerine gerçekleştirilen adsorbsiyon sonucunda immobilize olan enzimin verimi spesifik aktivite birimi (U/mg) açısından %36,8 bulunurken, protein miktarları (mg/ml) göz önüne alınarak hesaplandığında %22,4 sonucunu göstermiştir.
Sonuç: β-galaktozidazın, çok basit bir immobilizasyon protokolü aracılığıyla biyouyumlu HA üzerinde verimli bir şekilde immobilize edilebileceği, tekrarlanan enzimatik hidroliz reaksiyonlarını gerçekleştirmek için umut verici bir strateji sunduğu gösterildi. *Hypocrea jecorina* QM9414 küf mantarından kısmi olarak saflaştırılan β-galaktozidaz'ın alümina ve hidroksiapatit üzerine adsorbsiyon yöntemiyle immobilize edilmesi literatürde ilk defa yer alacak olması çalışmamızı özgün kılmaktadır.
Anahtar Kelimeler : β-galaktozidaz, İmmobilizasyon, adsorbsiyon, alümina, hidroksiapatit, *Hypocrea jecorina*

ABSTRACT

Objective: β-galactosidase obtained from the *Hypocrea jecorina* QM9414 mold fungus was immobilized on alumina and hydroxyapatite (HA) using the adsorption method, and the specific activity and protein values of the immobilized enzyme relative to the free enzyme were measured and evaluated.
Materials and Methods: Partially purified β-galactosidase enzyme obtained from the mold fungus Hypocrea jecorina QM9414 was physically bound to alumina and hydroxyapatite carriers with the adsorption method. For this, filtering, washing, and drying processes were carried out. A UV-spectrophotometer device was used for the measurements.
Results: The results of the adsorption on HA showed the efficiency of the immobilized enzyme to be 88% as specific activity unit (U/mg), while it was 18.6% when calculated considering the protein amounts (mg/ml). As the result of the adsorption on alumina, the efficiency of the immobilized enzyme was found to be 36.8% as specific activity unit (U/mg), while it was 22.4% when calculated considering the protein amounts (mg/ml).
Conclusion: It has been shown that β-galactosidase can be efficiently immobilized on biocompatible HA via a very simple immobilization protocol, offering a promising strategy to perform repeated enzymatic hydrolysis reactions. The fact that β-galactosidase, which is partially purified from Hypocrea jecorina QM9414 mold fungus, is immobilized on alumina and hydroxyapatite with the adsorption method, makes our study unique as this is the first time it appears in the literature.
Keywords : β-galactosidase, Immobilization, adsorption, alumina, hydroxyapatite, *Hypocrea jecorina*

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Fulya AYTAÇ TÜRKAN **E-mail:** fulyaaytacbilgi@gmail.com

Başvuru/Submitted: 18.04.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 21.04.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 26.04.2022 • **Kabul/Accepted:** 26.04.2022 • **Online Yayın/Published Online:** 13.06.2022

This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

GİRİŞ

Enzimler canlı hücrelerde oluşan ve organizmalardaki tüm reaksiyonların çok yumuşak koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları düzenleyen biyolojik katalizörlerdir (1).

Enzimlerin endüstride kullanımları yüksek katalitik etkinlikleri ve özgüllükleri sayesinde avantaj getirmektedir. Avantajlarının yanı sıra; endüstrideki işlenme koşullarına olan hassasiyetleri, saflaştırma, elde edilen çözelti ortamından kullanım için geri kazanılamamaları, izole etme süreçlerinin maliyetinin yüksekliği, kısa kullanım zamanları ise engel durumlar arasındadır. Bunları ortadan kaldırmak için en başarılı yöntemlerden biri; immobilizasyondur. İmmobilize enzimler, "fiziksel olarak hapsedilmiş bir bölgeye, var olan katalitik aktiviteyi bozmadan yerleştirilmiş, sürekli olarak kullanılabilen enzimler" olarak tanımlanırlar (2).

Enzim immobilizasyonu fiziksel ve kimyasal immobilizasyon olarak 2'ye ayrılmaktadır. Adsorbsiyonla enzim immobilizasyonu fiziksel immobilizasyon metodudur.

Adsorbsiyonla enzim immobilizasyonu kolay olmakla birlikte optimum koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa, bu durumda desorbsiyon sonucu enzim serbest halde tepkime ortamına geçer ve ürünlerin kirlenmesine neden olur. Adsorpsiyon, basit ve uygun taşıyıcı kullanıldığı durumlarda maliyeti yüksek olmayan bir immobilizasyon yöntemidir (3, 4).

Enzim immobilizasyonu için mevcut birçok yöntemden katı bir destek üzerinde fiziksel adsorpsiyon en kolay, en ucuz ve en hızlı olanıdır. Gelecekteki çalışmalarda kullanım için daha büyük bir potansiyele sahip olduğu görünmektedir. Enzim hasarını en aza indirmek için fiziksel adsorpsiyon hafif koşullar altında gerçekleştirilebilir (5-9).

β-galaktozidaz, laktozun glikoz ve galaktoza hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfına ait, süt endüstrisinde önemli bir rol oynayan enzimdir. Laktoz intoleransı olan insanlar için endüstride sütteki laktozun uzaklaştırılmasında, ayrıca peynir altı suyundaki laktozun geri kazanılmasında, oligasakkaritlerin sentezlenmesinde kullanılır. Bununla birlikte, literatürde enzimin bu işlemlerde ve ürünlerde uygulanmak üzere immobilizasyonunu anlatan az sayıda çalışma bulunmaktadır (4,10). Yeni doğan bebekler için β-galaktozidaz'ın ince bağırsakta üretilmesi önem teşkil etmektedir. Çünkü; sindirilmemiş laktoz çocuklukta büyümeyi engelleyen bir durumdur.

Süt şekeri olan laktozun yeterli sindirilememesinden kaynaklı bir hastalık olan laktoz intoleransında, laktoz disakkariti ince bağırsaklardan kalın bağırsağa hareket etmektedir. Burayı biyokimyasal ve fiziksel olmak üzere iki mekanizma ile açıklamak mümkündür. Biyokimyasal mekanizmada; laktoz, bağırsaktaki bakteriler tarafından kullanılarak CO_2, organik asitler oluşur. Fiziksel mekanizmada ise; ince bağırsak sıvısındaki laktoz moleküllerinin tanecik sayısının artmasıyla beraber osmotik etki nedeniyle dokulardaki sıvı ince bağırsağa çekilir. Karın kısmında ağrı, dispepsi, gaz, diyare, kusma hissi gibi belirtilere sebep olmaktadır (11).

Dünya popülasyonunun %70'inde intestinal β-galaktozidaz eksikliği olduğu tahmin edilmektedir. Sadece süt ve süt ürünleriyle beslenen bebekler için, intestinal β-galaktozidazın varlığı büyük önem taşımaktadır. Bu enzimin eksikliğinde bebeklerde laktoz hidroliz edilemediğinden glukoz ve galaktozun emilmesi olanaksız hale gelir. β-galaktozidaz eksikliği bulunan bebeklerin beslenme bozukluğunu gidermek üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla çeşitli kaynaklardan elde edilen β-galaktozidaz sıvı halde süte katılmış ve kapsül veya enterik tablet halinde verilerek laktoz intoleransı önlenerek sütten yarar sağlanmıştır (5).

GM1 Gangliozidozis hastalığı lizozomal bir enzim olan β-galaktozidaz eksikliği sonucu ortaya çıkan otozomal çekinik kalıtım gösteren hastalıklardan biridir. Hastalık baba ve annenin her ikisinden de geçiş gösterir. Erken bebeklik formunda (Tip1) zayıf kas gücü, ödem, sinir sistemi gelişiminde durma, retinada kiraz lekesi, skolyoz gibi bulgular görülmektedir. Geç ortaya çıkan formunda (Tip2) eklem yerlerinin sertleşmesi (spastisite) nedeniyle ayakta durmakta, yürümede oldukça güçlük görülür. Beyaz kan hücrelerinde ve kültür cilt fibroblastlarında β-galaktozidaz eksikliğinin saptanmasıyla hastalık tanımlanmaktadır (12).

Enzim veya destek malzemesinde kimyasal bir değişim gerçekleşmeyen immobilizasyon yöntemlerinden biri adsorbsiyondur (3,4). Birçok enzimi immobilize etmek için çeşitli organik ve inorganik destek malzemeleri kullanılmıştır (13-19). İnsan vücudundaki canlı dokunun işlevlerini karşılayan veya işlevlerine yardımcı olan doğal ya da sentetik malzemelere biyomalzemeler denilmektedir (20).

HA, enzim immobilizasyonu için mükemmel fizikokimyasal özelliklere sahip bir malzemedir ve ayrıca hayvan yemlerinde inorganik bir fosfor ve kalsiyum kaynağı olarak işlev görebilir (21). İnsan vücudunda bulunan kemikler kortikal ve trabeküler kısımlardan oluşmakta ve hidroksiapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) ile trikalsiyum fosfat ($Ca_3(PO_4)_2$) içermektedir. HA; lokal büyüme faktörlerine karşı kuvvetli kimyasal bağlanma eğiliminde esnekliği minimum düzeyde olan biyouyumlu, toksik olmayan, kokusuz, tatsız ve elmastan sonra bilinen en sert maddedir (22).

Meme kanseri hücreleri ile yapılan çalışmalarda; kemoterapi ilacı paklitakselin (PTX) bir tutucu ajan görevinde biyopolimer kitosana immobilizasyonunda, hidroksiapatit nanopartiküller (n-HAP) kullanılarak basit bir yöntem olan adsorbsiyon uygulanmıştır. Sonuç olarak 72 saat sonra, n-HAP varlığında küçük bir PTX içeriği bile, apoptotik fenotipin uyarılması ve hayatta kalma uyaranlarının baskılanması yoluyla kanser hücrelerin canlılığını azaltabildiği bulunmuştur (23).

Alümina (Al_2O_3); seramik yapımı ve tıbbi cihazlarda yaygın olarak kullanılmaktadır, biyouyumluluğu iyi bilinmektedir. Biyomalzemelerin biyouyumluluğunu tanımlayan ISO 10993-1 Uluslararası Standardı ile ilgili olarak alüminanın biyouyumluluğu araştırıldığında; sitotoksisite, sensitizasyon, implantasyon ve genotoksisite gibi biyolojik etkiler için, hayvanlarda ve insanlarda yapılan in vivo ve in vitro testler herhangi bir anormal biyolojik tepki göstermemiştir (24).

Günümüz tıp dünyasında, mükemmel biyomekanik ve biyouyumluluk özellikleri nedeniyle alümina bazlı biyomalzemeler biyomedikal mühendisliğinde önemli bir rol oynamaktadır (25).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı; *Hypocrea jecorina* QM9414 küf mantarından elde edilen, kısmi olarak saflaştırılan β-galaktozidaz'ı sırasıyla hidroksiapatit ve alümina üzerine adsorbsiyon yöntemiyle immobilize edip, immobilize olan enzimin etkinliğini ölçmek için immobilizasyon işleminin öncesi ve sonrasında enzimin protein miktarı, total ünite ve spesifik aktivitesini kıyaslamaktır. Böylece hangi adsorbanın β-galaktozidaz ile yüksek verimde immobilize olabileceğinin tespit edilmesi hedeflendi. Gelecekte bu çalışma genişletilip immobilize edilen enzimin stabilite çalışmaları yapılarak endüstride uygulanabilirliği açısından değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan mikroorganizma *Hypocrea jecorina* QM9414, Viyana Teknik Üniversitesi, Biyokimyasal Teknoloji ve Mikrobiyoloji Enstitüsü tarafından temin edildi. Substrat olarak kullanılan o-nitrofenil-β-Dgalaktopiranozid (ONPG) Sigma tarafından sağlandı. Kullanılan diğer tüm kimyasallar ve reaktifler analitik kalitedeydi.

Hypocrea jecorina QM9414 dan kısmi olarak saflaştırılan β-galaktozidaz adsorbsiyon yöntemiyle alümina ve hidroksiapatit üzerine immobilize edildi.

100 mg Hidroksiapatit 0,2987 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı ile karıştırıcı üzerinde 2 saat boyunca muamele edildi. Hidroksiapatit ve enzim preparatı içeren bu karışım süzüldü. İmmobilize enzimi içeren hidroksiapatit +4° C' de dondurulduu. Donmuş olan hidroksi apatite bağlanmayan protein moleküllerini ortamdan uzaklaştırmak için hidroksi apatit su ile yıkandı, süzüldü. Süzülen, yıkanan ve tekrar süzülen hidroksiapatit bir gece boyunca vakumlu desikatörde +4° C'de buzdolabına yerleştirildi. Bu şekilde kurutulan, adsorbe enzim içeren hidroksiapatit 24 saat sonunda 10 mg tartıldı. Adsorbe enzim içeren 10 mg adsorban 1 ml substrat çözeltisi ile 10 dakika kadar inkübe edildikten sonra, dekantasyonu sağlandı. Enzim aktivite tayini ve protein tayini yöntemleri yapılarak, immobilizasyon verimleri hesaplandı.

Adsorban olarak kullanılan alümina ile immobilizasyon işlemi yapılmadan önce, alüminanın nem çekici özelliğinden dolayı; 5 gram alümina sıcaklığı 100° C' ye getirilmiş etüvde 2 saat boyunca kurutuldu. Kurutulan alümina sıcaklığının, oda sıcaklığı değerine inene kadar soğuması için beklenildi. 100 mg alümina tartıldı ve 0,2987 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı ile 3 saat boyunca muamele edildi. Karışımın içine 3 saat tamamlandıktan sonra, soğuk asetondan 2-3 ml kadar ilave edildi, 1 saat daha karıştırılmaya devam edildi. Süzme işlemi yapılarak, alümina soğuk aseton ile yıkandı. Süzülüp yıkanan alümina, bir gece boyunca vakumlu desikatörde, +4°C 'de buzdolabında kuruması için bekletildi. 24 saatin sonunda, immobilize enzim içeren kurumuş olan alüminadan 10 mg tartılarak 1 ml substrat çözeltisine alındı. İmmobilize enzim çözeltisi ve yıkama sularında aktivite ve protein tayinleri yapıldı, immobilizasyon verimleri hesaplandı.

β-galaktozidaz aktivitesi Fekete ve ark. tarafından (2002) kullanılan metoda göre, spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu yöntemde substrat olarak o-nitrofenil-β-Dgalaktopiranozid (ONPG) kullanıldı. Total ünite değerleri mL'deki protein miktarına bölünerek spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Spesifik aktivite U/mg protein olarak verildi.

Sığır serum albumin (BSA) standart olarak kullanılarak Bradford (1976) yöntemine göre protein miktarının tayini yapıldı. Protein miktarı mg/mL olarak hesaplandı.

BULGULAR ve TARTIŞMA

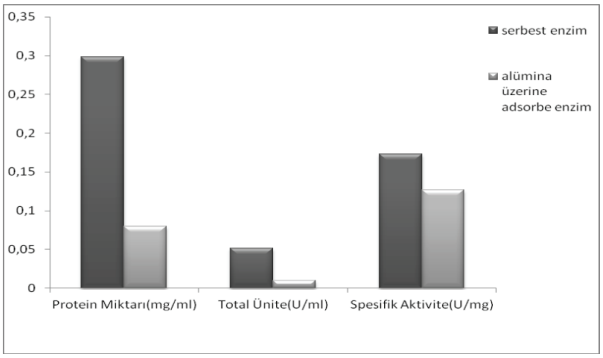
β-Galaktozidazın alümina üzerine adsorbsiyonu sonucunda elde edilen total ünite ve spesifik aktivite değerlerinin, serbest enzimin spesifik aktivite ve total ünite değerlerinden düşük olduğu belirlenmiştir (Tablo 1 ve Şekil 1). Buna karşılık hidroksiapatit kullanılarak yapılan immobilizasyon sonucunda enzimin spesifik aktivite değerinin serbest enzimin spesifik aktivite değerine oldukça yakın olduğu gösterilmiştir (Tablo 2 ve Şekil 2). HA üzerine gerçekleştirilen adsorbsiyon sonucunda immobilize olan enzimin verimi spesifik aktivite birimi (U/mg) açısından %88 bulunurken, protein miktarları (mg/ml) göz önüne alınarak hesaplandığında %18,6 sonucunu göstermiştir. Alümina üzerine gerçekleştirilen adsorbsiyon sonucunda immobilize olan enzimin verimi spesifik aktivite birimi (U/mg) açısından %36,8 bulunurken, protein miktarları (mg/ml) göz önüne alınarak hesaplandığında %22,4 sonucunu göstermiştir.

Tablo 1: Alümina üzerine adsorbe edilmiş β-galaktozidazın spesifik aktivite ve protein yönünden immobilizasyon verim yüzdeleri

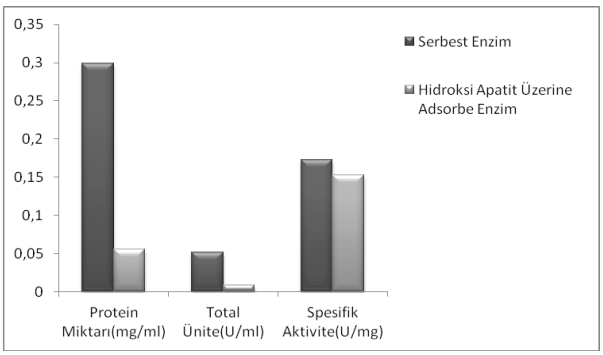
Aktivite ve Protein Değerleri	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite yönünden)	% Verim (Protein yönünden)
Serbest Enzim	0,2987	0,0516	0,1727	-	-
İmmobilize Edilmiş Enzim	0,0669	$4,38.10^{-3}$	0,0636	36,8	22,4

Tablo 2: Hidroksiapatit üzerine adsorbe edilmiş β-galaktozidazın spesifik aktivite ve protein yönünden immobilizasyon verim yüzdeleri

Aktivite ve Protein Değerleri	Enzimin Protein Miktarı (mg/ml)	Enzimin Total Ünitesi (U/ml)	Enzimin Spesifik Aktivitesi (U/mg)	% Verim (Spesifik Aktivite yönünden)	% Verim (Protein yönünden)
Serbest Enzim	0,2987	0,0516	0,1727	-	-
İmmobilize Edilmiş Enzim	0,0558	$8,5.10^{-3}$	0,1523	88,0	18,6



Şekil 1: Alümina Üzerine β-galaktozidaz'ın immobilizasyonu



Şekil 2: Hidroksiapaptit Üzerine β-galaktozidaz'ın immobilizasyonu

Literatürde benzer çalışmalar incelendiğinde; 2019 yılında katalaz makro gözenekli imidazolat üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilerek, hareketsizleştirme verimliliği %58, protein yükleme kapasitesi %29 olarak bulunmuştur (26).

2021 yılında adsorpsiyon ve kovalent bağlanma ile endoglukanaz'ın kaoline immobilizasyonundan sonra geri kazanılan aktiviteler sırasıyla %60±2.5 ve %65±3.5 olarak bulunmuştur (27).

2021 yılında işlevselleştirilmiş alümina malzemesi *Candida antarctica* lipaz B enzimi immobilizasyonu için kullanıldı. Alümina malzemesi üzerine adsorbsiyon yöntemiyle immobilize edilen lipaz B'nin, spesifik enzim aktivitesi >%97 olarak verilmiştir (28).

2021 yılında kitosan/montmorillonit ve kitosan-altın nanoparçacıkları/montmorillonit üzerine adsorbsiyon metodu kullanılarak polifenol oksidaz immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimin sırasıyla immobilizasyon verimleri ve spesifik aktivitesi; %50,16 %1,46 × 10^4 U/mg ve %63,35 %3,01 × 10^4 U/mg olarak belirtilmiştir (29).

2021 yılında kitosan/organik rektorit kompozitleri hazırlanmış olup polifenol oksidaz, fiziksel adsorpsiyon ve kovalent bağlanma immobilize edilmiştir. Adsorbsiyonla enzim immobilizasyonunda enzim aktivitesi 16.37×10^3 iken, kovalent bağlanmada 8.92×10^3U/g olarak bulunmuştur (30).

Benzer çalışmalarda farklı enzimler nano boyuttaki HA taşıyıcısına immobilize edilmiştir. Bu çalışmalarda da immobilizasyon verimi yüksektir (31,32). Bizim çalışmamızda da %88 oranındaki immobilizasyon verimi ölçülmesi HA taşıyıcısının enzim immobilizasyonu için uygun bir taşıyıcı olabileceğini göstermektedir.

2020 yılında ksilanaz HA nanopartikülleri, HA-bakır (Cu^{+2}) ve HA-nikel (Ni^{+2}) destekler üzerine immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon verimleri maksimum olarak HA nanopartikülü için %73,2, HA-bakır (Cu^{+2}) modifiye desteği için %95 ve HA-nikel (Ni^{+2}) modifiye desteğinde ise; %60,7 olarak bulunmuştur. Farklı immobilizasyon verimleri farklı pH ve NaCl (mM) konsantrasyonlarında hesaplanmıştır (31).

2020 yılında lipaz manyetik nanokompozit olan HA-$CoFe_2O_4$ üzerine adsorbsiyon yöntemiyle immobilize edilmiş olup 35 °C koşulunda %99' dan fazla ürün verimi elde edilmiştir (32).

2011 yılında β-galaktozidaz, zirkonyum dioksit içeren karma matrisli bir membran üzerinde adsorpsiyon ile immobilize edilmiştir. Hareketsizleştirilme öncesi ve sonrasında enzimin optimum sıcaklığında (5 °C) fazla değişiklik olmamıştır. İmmobilizasyondan sonra optimal pH'da 0,5 birimlik bir kayma gözlemlenmiştir (pH 6,5 ila 7). En etkileyici sonuçlar immobilize enzimin kinetik parametreleridir; Michaelis sabiti (Km) değeri serbest enzime göre yaklaşık sekiz kat artarken, maksimum enzim hızı (Vmax) hemen hemen sabit kalmıştır (3). Bu çalışma, gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda kullanılan hidroksiapatit adsorbanı ile zirkonyum dioksit membranını kaplayıp yeni bir adsorban oluşturma fikrini oluşturmuştur. Bu şekilde oluşturulan adsorbana immbolize edilecek olan β-galaktozidaz'ın spesifik aktivite birimi (U/mg) bakımından % veriminin 88 'in üstünde bir değerde olabileceği düşünülmektedir. Yine bu çalışmada immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı (5 °C) çalışmamız boyunca Hypocrea *jecorina* QM9414 küf mantarından elde edilen, kısmi olarak saflaştırılan β-galaktozidaz enzimi için koruduğumuz 4 °C sıcaklığı doğrular niteliktedir.

2021 yılında *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β-galaktozidaz genipinle aktive olan kitosanda seyreltilmiş UHT sütte çapraz bağlanma yöntemiyle immobilize edilmiş, stabilite araştırması yapılmıştır. Bir genipin ile aktive olan kitosan desteğinde immobilize edilmiş β-galaktozidaz için maksimum immobilizasyon verimi %84,13 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada termal stabilite 10 ve 37 °C'de artırılmış seyreltilmiş UHT sütte dört ardışık laktoz hidrolizi döngüsü sağladığı gözlenmiştir, gıda endüstrisi uygulamaları için büyük bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir (10). HA üzerine immobilize ettiğimiz β-galaktozidaz 'ın gelecekteki uygulamalarına olanak tanıdığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda kullandığımız HA adsorbanı veriminin %88 olarak sonuçlanması, ileriki aşamada çalışabilecek olan immobilize enzimin stabilite ve optimizasyon başlıkları için umut vadedicidir.

Çalışmamızdan edilen sonuçlar değerlendirildiğinde alümina üzerine β-Galaktozidazın immobilizasyon çalışması, enzimin aktivitesinin düştüğünü, istenilen verimin sağlanamadığını göstermiştir. Bu durumda immobilize enzimin serbest enzime göre oldukça düşük aktivite gösterme sebebi; ilk olarak işlem sırasında enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetleri zayıf (hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleriyle) olduğundan

adsorplanmış enzim taşıyıcıdan sızmış olabileceği düşünülmektedir. İkinci sebep olarak da alüminanın enzimi inhibe ederek, aktivite göstereceği katalitik bölgelerini inaktif ettiği kanısına varıldı. HA; β-Galaktozidazın immobilizasyonu için alüminaya kıyasla daha uygun bir taşıyıcı malzemedir. Çünkü; alüminanın aksine; hidroksiapatit üzerine gerçekleştirilen adsorbsiyon sonucunda immobilize β-Galaktozidazın spesifik aktivite birimi (U/mg) bakımından % veriminin 88 olması, çalışmayı bir sonraki aşamaya taşıyacak bir kanıttır.

Laktoz; özellikle bebeklerde beyin ve sinir dokularının oluşumu ve gelişimi için önemlidir. Kemik ve diş gelişiminde de etkin olan laktoz çocukların fizyolojik gelişiminde ve diş gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Laktoz intolerans hastalığı olan çocuklarda laktozsuz besin yerine, laktozu parçalayacak olan enzimi biyouyumlu bir metaryale immobilize edip besinden yüksek derecede fayda sağlanması hedeflenebilir. Hidroksiapatit üzerine immobilize edilen β-Galaktozidazın katalitik verimliği hesaplanıp, yeniden kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı çalışılması onu endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalara uygun hale getirebilir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- A.P.; Veri Toplama- A.P.; Veri Analizi/Yorumlama- A.P.; Yazı Taslağı- A.P.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- A.P.; Son Onay ve Sorumluluk- A.P.; Malzeme ve Teknik Destek- A.P.; Süpervizyon A.P.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study-A.P.; Data Acquisition- A.P.; Data Analysis/Interpretation- A.P.; Drafting Manuscript- A.P.; Critical Revision of Manuscript- A.P.; Approval and Accountability- A.P.; Material and Technical Support- A.P.; Supervision- A.P.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Telefoncu A. Enzimoloji, Yüksek Lisans Yaz Okulu Ders Notları. Kuşadası: Aydın; 1997.
2. Özçömlekçi E. Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyonunda Optimum şartların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü. 2006.
3. Peter J, Yamini S, Sandra V, Wim D, Ludo D, Winnie D. Characterization and Optimization of β-Galactosidase Immobilization Process on A Mixed-matrix Membrane. Enzyme Microb Technol 2011;49(6-7):580-8.
4. Kasavi C. Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2006.
5. Lima JS, Boemo APFI, Araujo PHH, Oliveira D. Immobilization of endoglucanase on kaolin by adsorption and covalent bonding. Bioprocess Biosyst Eng 2021;44(8):1627-37.
6. Jia J, Zhang W, Yang Z, Yang X, Wang N, Yu X. Novel magnetic cross-linked cellulase aggregates with a potential application in lignocellulosic biomass bioconversion. Molecules 2017; 22(2):269.
7. Husain Q. Nanomaterials immobilized cellulolytic enzymes and their industrial applications: a literature review. JSM Biochem Mol 2017; 4(3):1029.
8. Califano V, Costantini A. Immobilization of cellulolytic enzymes in mesostructured silica materials. Catalysts 2020;10(6):706.
9. Khoshnevisan K, Vakhshiteh F, Barkhi M, Baharifar H, Poor-Akbar E, Zari N, et al. Immobilization of cellulase enzyme onto magnetic nanoparticles: applications and recent advances. Mol Catal 2017;442:66-73.
10. Pâmela CL, Isadora G, Alexandra MGC ,Daniela B, Darlene C, Déborade O, et al. β-galactosidase from Kluyveromyces lactis in genipin-activated chitosan: An investigation on immobilization, stability, and application in diluted UHT milk. Food Chem 2021;349:129050. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129050.
11. Francesc C, Anna A, Maite C, Purificacian R, Juan R.M. Subjective Perception of Lactose Intolerance Does Not Always İndicate Lactose Malabsorption. Clin Gastroenterel Hepatol 2010;8(7):581-6.
12. Uyanık A. Beta-galaktosidaz Enziminin Mikrobiyal Hücrelerden İzolasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2008.
13. Kermasha S, Eskin MNA. Enzymes: Novel Biotechnological Approaches for the Food Industry, Academic Press, London; 2021.
14. Ureta MM, Martins GN, Figueira O, Pires PF, Castilho PC, Gomez-Zavaglia A. Recent advances in β-galactosidase and fructosyltransferase immobilization technology. Crit Rev Food Sci Nutr 2021;61(16):2659-90.
15. Panesar PS, Kumari S, Panesar R. Potential applications of immobilized β-galactosidase in food processing industries. Enzyme Res 2010;2010:473137. doi:10.4061/2010/473137.
16. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support material.3 Biotech 2013;3(1):1-9.
17. Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. Adsorption 2014;20(5-6):801-21.
18. Zdarta J, Meyer AS, Jesionowski T, Pinelo M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. Catalysts 2018;8(2):92.
19. Atyaksheva LF, Dobryakova IV, Pilipenko OS. Adsorption of β-galactosidase on silica and aluminosilicate adsorbents. Russ J Phys Chem A 2015;89(3):497-501.
20. Bulut B. Ticari İnert Cam Katkılı Hidroksiapatit-alümina Ve Hidroksiapatit-zirkonya Kompozitlerinin Üretimi Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.2014.
21. Coutinho TC,Tardioli PW,Farinas CS. Phytase Immobilization on Hydroxyapatite Nanoparticles Improves Its Properties for Use in Animal Feed. Appl Biochem Biotechnol 2020;190(1):270-92.
22. Akça SG. Doğal hidroksiapatit toz üretimi, karakterizasyonu ve antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi.

Sakarya: Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.2016.

23. Martins ML, Pinto TS, Gomes AM, Jr Franchi GC, Zambuzzi W, Rodrigues CG, et al. Immobilization of Paclitaxel on Hydroxyapatite for Breast Cancer Investigations. Langmuir 2020;36(30):8723-32.
24. Denes E, Barrière G, Poli E, Lévêque G. Alumina Biocompatibility. J Long Term Eff Med Implants 2018;28(1):9-13.
25. Maryam R, Masoud M, Biocompatibility of alumina-based biomaterials-A review. J Cell Physiol 2019;234(4):3321-35.
26. Neupane S, Patnode K, Li H, Baryeh K, Liu G, Hu J, et al. Enhancing Enzyme Immobilization on Carbon Nanotubes via Metal-Organic Frameworks for Large-Substrate Biocatalysis. ACS Appl Mater Interfaces 2019;27;11(12):12133-41.
27. Souza Lima J, Boemo APSI, Araújo PHH , Oliveira D. Immobilization of endoglucanase on kaolin by adsorption and covalent bonding. Bioprocess Biosyst Eng 2021;44(8):1627-37.
28. Kujawa J, Głodek M, Koter I, Ośmiałowski B, Knozowska K, Al-Gharabli S, et al. Molecular Decoration of Ceramic Supports for Highly Effective Enzyme Immobilization-Material Approach. Materials (Basel) 2021;3;14(1):201.
29. Li S, Zhong L, Wang H, Li J, Cheng H, Ma Q. Process optimization of polyphenol oxidase immobilization: Isotherm, kinetic, thermodynamic and removal of phenolic compounds. Int J Biol Macromol 2021;185:792-803.
30. Zhong L, Li J, Tian D, Cai J, Wang H, Ma Q. Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan/organic rectorite composites for phenolic compounds removal. Water Sci Technol 2021;83(4):906-21.
31. Coutinho CT, Tardioli PW, Farinas CS. Hydroxyapatite nanoparticles modified with metal ions for xylanase immobilization. Int J Biol Macromol 2020;150:344-53.
32. Saire-Saire S, Garcia-Segura S, Luyo C, Andrade LH, Alarcon H. Magnetic bio-nanocomposite catalysts of $CoFe_2O_4$/hydroxyapatite-lipase for enantioselective synthesis provide a framework for enzyme recovery and reuse. Int J Biol Macromol 2020;148:284-91.