

**POLİ(AKRİLAMİT) - SODYUM ALJİNAT,
POLİ(AKRİLAMİT- N-İZOPROPİLAKRİLAMİT)-SODYUM ALJİNAT,
POLİ(AKRİLAMİT - N-İZOPROPİLAKRİLAMİT) HİDROJELLERİNE
LAKKAZ İMMOBİLİZASYONU**

Özgür YAMAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2007
ANKARA**

Özgür YAMAK tarafından hazırlanan POLİAKRİLAMİT - SODYUM ALJİNAT, POLİ(AKRİLAMİT- N-İZOPROPİLAKRİLAMİT)-SODYUM ALJİNAT, POLİ(AKRİLAMİT - N-İZOPROPİLAKRİLAMİT) HİDROJELLERİNE LAKKAZ İMMOBİLİZASYONU adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Serpil AKSOY
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Muzaffer TALU

Üye : Prof. Dr. Serpil AKSOY

Üye : Prof. Dr. Semra BİLGİÇ

Tarih : 06.07.2007

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orjinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Özgür YAMAK

**POLİ(AKRİLAMİT)-SODYUMALJİNAT,
POLİ(AKRİLAMİT-N-İZOPROPİLAKRİLAMİT) -SODYUM ALJİNAT,
POLİ(AKRİLAMİT-N-İZOPROPİLAKRİLAMİT) HİDROJELLERİNE LAKKAZ
İMMOBİLİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

Özgür YAMAK

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2007**

ÖZET

Bu çalışmada, lakkaz enzimi (L), poliakrilamit-sodyum aljinat ,P(AAm)-NaAlj, poliakrilamit-N-izopropilakrilamit-sodyum aljinat, P(AAm-NİPA)-NaAlj ve poliakrilamit-N-izopropilakrilamit, P(AAm-NİPA), hidrojellerine hapsedme yöntemi ile immobilize edildi. Serbest lakkaz için optimum pH, 5,0, P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj ve P(AAm-NİPA) hidrojellerine immobilize edilen lakkaz için sırasıyla 6,0, 5,5 ve 5,5 bulundu. Serbest lakkaz, P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj ve P(AAm-NİPA) hidrojellerine immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 40 °C bulundu. Serbest L 4 °C da 56 gün depolandığında, başlangıç aktifliğinin % 42 sini korurken, P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj ve P(AAm-NİPA) hidrojellerine immobilize edilen lakkazın sırasıyla % 79, % 86 ve % 91' ini koruduğu gözlemlendi. P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj ve P(AAm-NİPA) hidrojellerine immobilize edilen enzimler 10 kez tekrar kullanıldıklarında başlangıç aktifliklerinin sırasıyla % 71,% 84 ve % 77' sini koruduğu gözlemlendi.

Serbest lakkaz, P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NiPA)-NaAlj, P(AAm-NiPA) hidrojellerine immobilize edilen lakkaz için K_m değerleri sırasıyla $6,7 \times 10^{-3}$ mM, $6,2 \times 10^{-2}$ mM, $1,9 \times 10^{-2}$ mM ve $1,0 \times 10^{-1}$ mM ve V_{mak} değerleri $1,8 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $1,7 \times 10^{-2}$ mM.dak⁻¹, $6,3 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ ve $2,9 \times 10^{-2}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Bilim Kodu : 405.1.117

Anahtar Kelimeler : Hapsetme, enzim immobilizasyonu, poliakrilamit, N izopropilakrilamit, sodyum aljinat, lakkaz

Sayfa Adedi : 93

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Serpil AKSOY

**IMMOBILIZATION OF LACCASE IN POLYACRYLAMIDE-SODIUM
ALGINATE, POLY(ACRYLAMIDE-N-ISOPROPYLACRYLAMIDE)-
SODIUM ALGINATE, POLY(ACRYLAMIDE-N-
ISOPROPYLACRYLAMIDE)HYDROGELS**

(M.Sc. Thesis)

Özgür YAMAK

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Haziran 2007**

ABSTRACT

In this study, laccase enzyme (L) was immobilized using entrapment method in poly(acrylamide)-sodium alginate, P(AAm)-NaAlj, poly(acrylamide-N-isopropylacrylamide)-sodium alginate, P(AAm-NİPA)-NaAlj and poly(acrylamide-N-isopropylacrylamide), P(AAm-NİPA) hydrogels. Optimum pH was determined as 5,0, 6,0 and 5,5 for free laccase and enzymes which are immobilized in P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj, P(AAm-NİPA) hydrogels, respectively. Optimum temprature was determined as 40 °C for free laccase and immobilized laccases. After 56 days of storage at 4 °C, free laccase, P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj and P(AAm-NİPA) immobilized enzymes retained 42 %, 79 %, 86 %, and 91 % of their original activities, respectively. P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj and P(AAm-NİPA) immobilized enzymes were retained 71 %, 84 % and 77 % of their original activities when they were used repeatedly 10 times.

K_m and V_{max} were calculated as $6,7 \times 10^{-3}$ mM, $6,2 \times 10^{-2}$ mM, $1,9 \times 10^{-2}$ mM, $1,0 \times 10^{-1}$ mM and $1,8 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $1,7 \times 10^{-2}$ mM.dak⁻¹, $6,3 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $2,9 \times 10^{-2}$ mM.dak⁻¹ for free and P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NiPA)-NaAlj, P(AAm-NiPA) immobilized laccase.

Science Code	:405.1.117
Key Words	:Entrapment, enzyme immobilization, polyacrylamide, N-isopropylacrylamide, sodyum alginate, laccase
Page Number	:93
Adviser	:Prof. Dr. Serpil AKSOY

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren Prof. Dr. Serpil AKSOY'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Yine tecrübelerinden ve yardımlarından faydalandığım Yrd. Doç. Dr. Haydar ALTINOK'a, Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman sabır ve anlayışla beni yalnız bırakmayan, desteğini ve yakın ilgisini esirgemeyen çok değerli aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xvi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hidrojeller.....	4
2.1.1. Hidrojellerin sınıflandırılması.....	4
2.2. Enzimler.....	7
2.2.1. Enzimlerin etkisi	8
2.2.2. Enzimlerin uygulama alanları	10
2.3. Enzim İmmobilizasyonu	11
2.4. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	17
2.4.1. Kimyasal metodlar.....	18
2.4.2. Fiziksel metodlar	20
2.5. İmmobilizasyon Metodunun Seçimi	24
2.6. Çalışmada Kullanılan Enzim, Substrat ve Destek Materyalinin Özellikleri	25

	Sayfa
2.6.1. Lakkaz.....	25
2.6.2. Siringaldazin.....	28
2.6.3. Destek materyali	29
2.7. Lakkazın İmmobilizasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar	31
3. DENEYSEL KISIM	38
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	38
3.2. Çözeltilerin Hazırlanması	40
3.2.1. Sodyum hidroksit çözeltisi.....	40
3.2.2. Siringaldazin çözeltisi.....	40
3.2.3. Sitrat tamponu.....	40
3.2.4. Fosfat tamponu.....	40
3.2.5. Lakkaz çözeltisi.....	40
3.2.6. TEMED çözeltisi.....	41
3.3. Siringaldazin Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	41
3.4. Enzim İmmobilizasyonu	42
3.4.1. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde enzim immobilizasyonu.....	42
3.4.2. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde enzim immobilizasyonu.....	43
3.4.3. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojelinde enzim immobilizasyonu.....	43
3.5. Lakkaz Derişimi ile Tepkime Hızının Değişimi	44
3.6. Substrat Derişimi ile Tepkime Hızının Değişimi	45
3.7. Aktivlik Tayini	46

	Sayfa
3.7.1. Serbest enzimin aktiflik tayini.....	46
3.7.2. İmmobilize enzimin aktiflik tayini.....	46
3.8. Tutuklanan Enzim Miktarı Tayini.....	47
3.9. Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi.....	48
3.9.1. Serbest enzim aktifliğine pH etkisi.....	48
3.9.2. İmmobilize enzim aktifliğine pH etkisi	48
3.10. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi	48
3.10.1. Serbest enzim aktifliğine sıcaklık etkisi.....	48
3.10.1. İmmobilize enzim aktifliğine sıcaklık etkisi	49
3.11. Enzim Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi	49
3.11.1. Serbest enzim aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	49
3.11.2. İmmobilize enzim aktifliğine substrat değişiminin etkisi	49
3.12. Enzim Aktifliğine Depolanma Süresinin Etkisi	50
3.12.1. Serbest enzim aktifliğine depolanma süresinin etkisi	50
3.12.2. İmmobilize enzim aktifliğine depolanma süresinin etkisi	50
3.13. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi.....	50
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	51
4.1.Tutuklanan Enzim Miktarı Tayini.....	51
4.2. Serbest Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi	51
4.3. İmmobilize Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi.....	53
4.3.1. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	53

Sayfa

4.3.2. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	54
4.3.3. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	56
4.4. Serbest Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi	58
4.5. Immobilize Lakkaz Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	59
4.5.1. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	59
4.5.2. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	61
4.5.3. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	62
4.6. Serbest Enzim Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi	64
4.7. Immobilize Lakaz Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi.....	67
4.7.1. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	67
4.7.2. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	68
4.7.3. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	70
4.8. Serbest Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	72
4.9. Immobilize Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi	73
4.9.1. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	73

Sayfa

4.9.2. Poli(akrilamit-N-izopropil Akrilamit)-sodyumaljinat hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	75
4.9.3. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	77
4.10. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi.....	79
4.10.1. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	79
4.10.2. Poli(akrilamit-N-izopropil Akrilamit)-sodyumaljinat hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi	80
4.10.3. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	82
5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	84
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ.....	93

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyalleri.....	14
Çizelge 3.1. Siringaldazin derişimi ile absorbansın değişimi.....	41
Çizelge 4.1. Serbest lakkaz enzimi aktifliğine pH nın etkisi.....	52
Çizelge 4.2. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH nın etkisi	53
Çizelge 4.3. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize lakkaz enzimi aktifliğine pH nın etkisi.....	55
Çizelge 4.4. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	56
Çizelge 4.5. Serbest enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi	58
Çizelge 4.6. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi	60
Çizelge 4.7. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi	61
Çizelge 4.8. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	63
Çizelge 4.9. Serbest enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi	66
Çizelge 4.10. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi	67
Çizelge 4.11. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi	69
Çizelge 4.12. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	70
Çizelge 4.13. Serbest enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi	72
Çizelge 4.14. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi	74

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.15. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojeline immobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi	76
Çizelge 4.16. P(AAm-NİPA) hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini.....	77
Çizelge 4.17. P(AAm)-NaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi	79
Çizelge 4.18. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi	81
Çizelge 4.19. P(AAm-NİPA) hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi	82

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli	10
Şekil 2.2. İmmobilizasyon prosesi	17
Şekil 2.3. İmmobilizasyon metodlarının şematik gösterimi	18
Şekil 2.4. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon	19
Şekil 2.5. Mikrokapsülleme ile immobilizasyon	23
Şekil 2.6. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması	27
Şekil 2.7. Siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime	27
Şekil 2.8. Semi IPN oluşumu	31
Şekil 3.1. Siringaldazin kalibrasyon eğrisi	42
Şekil 3.2. Tepkime hızının lakkaz derişimi ile değişimi	44
Şekil 3.3. Tepkime hızının substrat derişimi ile değişimi	45
Şekil 3.4. BSA kalibrasyon eğrisi	47
Şekil 4.1. Serbest lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi	52
Şekil 4.2. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi	54
Şekil 4.3. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi	55
Şekil 4.4. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi	57
Şekil 4.5. Serbest enzimin maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi	59
Şekil 4.6. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi	60

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. P(AAm-NİPA)-NaAlj' da immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	62
Şekil 4.8. P(AAm-NİPA) hidrojeline immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi	63
Şekil 4.9. Serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği	66
Şekil 4.10. P(AAm)-NaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın Lineweaver- Burk grafiği	68
Şekil 4.11. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği	69
Şekil 4.12. P(AAm-NİPA) hidrojeline immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği	71
Şekil 4.13. Serbest enzimin maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi.....	73
Şekil 4.14. P(AAm)-NaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi	75
Şekil 4.15. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojeline immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi	76
Şekil 4.16. P(AAm-NİPA) hidrojeline immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi	78
Şekil 4.17. P(AAm)-NaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	80
Şekil 4.18. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğinin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi	81
Şekil 4.19. P(AAm-NİPA) hidrojeline immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	83

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Lakkaz üreten <i>Trametes versicolor</i> mantarı	26
Resim 2.2. <i>Trametes versicolor</i> 'dan elde edilen lakkaz enziminin üç Boyutlu yapısı	28

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

ΔA

Absorbans değişimi

K_m

Michaelis-Menten sabiti

V_{mak}

Maksimum hız

V

Aktiflik (hız)

Kısaltmalar

Açıklama

L

Lakkaz

P(AAm)-NaAlj

Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojel

P(AAm-NİPA)-NaAlj

Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojel

P(AAm-NİPA)

Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojel

1.GİRİŞ

Çevre kirliliği olgusu son zamanlarda doğada düzenli işleyen dengeleri bozar duruma gelmiştir. Geçen yüzyıldan beri hızla gelişen ve ilerleyen endüstrileşme sonucu çevre kirliliği her geçen gün artmakta ve atıkların niteliği ve niceliği de değişmektedir. Doğa kendi içinde ekolojik dengesi ile bu kirliliği belli bir ölçüde yok edebilmektedir ancak çevre kirliliği için önlemlerin alınmaması ve kirlenmenin hızla artması sonucu ekolojik denge geri dönüşümü imkansız şekilde bozulmaktadır.

Çevre kirleticileri fiziksel, kimyasal ve biyolojik atıklar olarak sınıflandırılabilir. Doğadaki mikroorganizmalar, bazı kirleticileri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak zararlı etkileri azaltmaktadırlar, fakat bu atıklar mikroorganizmaların yıkabileceği kapasitenin üzerine çıkarsa, ekolojik dengeyi olumsuz yönde etkiler. Atıkların yaratacağı sorunların giderilmesi için çeşitli arıtma sistemleri geliştirilmiştir, ancak bu sistemlerin kurulması ekonomiye önemli bir yük getirmektedir. Bu nedenle, çevre kirliliğine yol açan bazı zararlı maddelerin giderilmesinde düşük maliyetli ve etkin metotların geliştirilmesi ekonomik açıdan önemlidir. Son yıllarda çevre kirliliğine yol açan atıkların daha etkin bir şekilde giderilmesi için geliştirilen yöntemler arasında biyolojik arıtım yöntemleri ön plana çıkmaktadır.

Biyoteknoloji, organizmaların, biyolojik sistemlerin ve bunların süreçlerinin pratik ve ticari amaçlar için kullanılması olarak tanımlanabilir. Biyoteknolojik teknikler, fermantasyon, enzim teknolojisi, hücre doku ve kültürü teknikleri gibi çeşitli aktiviteleri içermektedir. Biyoteknolojik süreçlerde temel kavram mikroorganizmaların atık maddeleri besin olarak kullanması ve çevreye zarar vermeyecek bileşiklere dönüştürmesidir [1].

Mikroorganizmalar, atık maddeleri enzimatik olarak parçalamaktadırlar. Ancak mikroorganizma yerine doğrudan onlardan elde edilen enzimlerin

kullanılması birçok avantaj sağlar [2]. Enzimlerin kullanıldığı proseslerde, enzim kaynağı olarak, mikroorganizmaların kullanılması ile diğer yöntemlerde kullanılan havalandırma ve çöktürme tanklarına ihtiyaç olmadığı için, yatırım masrafları azalır. Enzimler seçici ve aktif biyomoleküllerdir ve bir destek üzerine tutuklandıklarında, mikroorganizmalara göre daha geniş pH ve sıcaklık aralığında çalışabilmektedirler.

Yukarıda bahsedilen üstünlüklerine karşın, enzimlerin tekrar kullanılmaları ve reaksiyon ortamında bulunan tepken veya ürünlerden ayrılmasının zorluğu, yöntemin maliyetini oldukça arttırmaktadır. Bu problemi gidermek için, enzimler, bir destek içine yada üzerine, çeşitli yöntemlerle immobilize edilebilmektedirler. İmmobilizasyon ile enzimler, katalitik proseslerde aktifliklerini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanılabilirler.

Enzimler, canlı hücreler tarafından üretilip, biyokimyasal tepkimelerin ilerlemesini ve düzenlenmesini sağlarlar. Biyolojik katalizör olarak görev yapan enzimler, kimyasal tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürürler. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir. Pekçok endüstriyel, analitik ve klinik proseslerde enzimler substrat çözeltisi ile karıştırılır ve yüksek verim eldesini sağlarlar. Analitik reaktif olarak kullanılan enzimler deney şartlarına ve çevre koşullarına çok duyarlıdır. Pek çok enzim, pH sı 5 den küçük, 9 dan büyük çözeltielerde ve 40 °C nin üzerinde aktifliklerini kaybederler. Enzimlerin 2-5 °C de muhafaza edilmesi ile aktiflikleri daha uzun süre korunabilir.

İmmobilizasyon yönteminde destek olarak kullanılacak materyaller, kullanım amacına uygun şekilde seçilmelidir. Destek materyali, suda çözünmeme, gözenekli yapıda olma, mekanik, kimyasal, biyolojik ve termal kararlılığa sahip olma gibi özelliklere sahip olmalıdır. İstenen özelliklerde hazırlanabilmesi ve maliyetlerinin düşük olması nedeniyle, polimerik materyaller daha çok kullanılmaktadırlar.

Bu tez çalışması kapsamında, lakkaz enziminin, poli(akrilamit)-sodyum aljinat, poli(akrilamit-N-izopropilakrilamit)-sodyum aljinat ve poli(akrilamit-N-izopropilakrilamit) hidrojellerine, hapsetme yoluyla immobilizasyonu gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize lakkazın aktifliğine, pH, sıcaklık, depolama süresi, substrat derişimi gibi parametrelerin etkisi araştırıldı, termal kararlılık ve kinetik parametreler belirlendi ve immobilize lakkazın tekrar kullanılabilirliğı incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hidrojeller

Hidrojeller, su içerisinde çözünmeden şişebilme özelliğine sahip, çapraz bağlı, üç boyutlu ağ yapılı polimerlerdir [1]. Su içeriği kendi kütlesinin % 100 ünden fazla olan hidrojellere de süper absorbant denilir [2]. Su dışında çözücülerde en az % 20 ve daha fazla miktarda şişebilen jeller ise kserojel olarak adlandırılır [3]. Hidrojellerin üç boyutlu yapısı kimyasal bağlar yada iyonik etkileşim, hidrojen bağı, fiziksel etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşir. Hidrofobik etkileşimler, fiziksel çapraz bağ benzeri etkileşimler olduğundan jelin şişme davranışını doğrudan etkilemektedir. Fiziksel çapraz bağlı jellerin dış çevre derişimine fazlaca bağılı oldukları bilinmektedir [4]. Hidrojeller yapılarında çok fazla su bulundurmaları, yumuşak ve esnek yapıları gibi taşıdıkları birçok fiziksel özellik açısından canlı dokularla karşılaştırıldıklarında büyük bir benzerlik göstermektedir [5].

2.1.1. Hidrojellerin sınıflandırılması

Polimerik hidrojeller, hazırlama yöntemlerine, iyonik yüklerine, fiziksel yapılarına ve çapraz bağlanma durumlarına bağılı olarak sınıflandırılabilirler [6].

- Hazırlanma yöntemlerine göre
 - Homopolimer hidrojeller
 - Kopolimer hidrojeller
 - Çoklu polimer hidrojeller
 - IPN (interpenetrating networks) hidrojeller
- İçerdikleri yan guruplara göre
 - Nötral (iyonik olmayan) hidrojeller
 - İyonik hidrojeller (anyonik, katyonik, poliamfolitik)

- Fiziksel yapılarına göre
Amorf hidrojel
Yarı-kristalik hidrojel
Hidrojen bağlı hidrojel
- Çapraz bağlanma durumlarına göre
Fiziksel hidrojel
Kimyasal hidrojel
- Kaynaklarına göre
Doğal hidrojel
Sentetik hidrojel
- Su içeriklerine göre
Düşük şişme dereceli (20-50 %)
Orta şişme dereceli (50-90 %)
Yüksek şişme dereceli (90-99,5 %)
Süper absorbant ($\geq 99,5$ %)
- Kimyasal aralıklarına göre
Biobozunur
Biobozunmayan

Homopolimer hidrojel

Tek tür monomerdan oluşturulan hidrojelardir. Poli(2-hidroksi etil metakrilat)(PHEMA), poli(glisiril metakrilat), poli(3-hidroksi propil metakrilat) lar bu hidrojelere örneğ olarak verilebilir [6]. Yumuşak kontak lens yapımı ve kontrolü ilaç salım aparatları gibi önemli uygulama alanları vardır [7].

Kopolimer hidrojel

İki komonomerin çapraz bağlanması ile hazırlanırlar; ancak monomerlerden en az bir tanesi hidrofilik yapıda olmalıdır. Kopolimerik hidrojelde çapraz bağlanma kovalent yada iyonik olarak gerçekleşebilir [2].

Çoklu polimer hidrojeller

Üç yada daha fazla monomerden oluşan yapılardır [8]. Bu tür hidrojellere, hem pH ya hem de sıcaklığa duyarlı olan poli(N-izopropilakrilamit-ko-AA-ko-HEMA) örnek olarak verilebilir [9].

IPN veya iç içe geçmiş Polimerik ağ yapılı hidrojeller

Çapraz bağlı iki polimerik örgünün fiziksel olarak birleşmesi ile oluşur. Bu yapılardan en az biri diğerinin varlığında sentezlenir ve/veya çapraz bağlanır [10]. IPN yi oluşturan iki polimerik örgünün birbiriyle uyumlu olması IPN oluşumunu artırır, faz oluşumunu engeller. Ayrıca IPN yi oluşturan polimerler arasında kimyasal bağ bulunmadığından her iki bileşen de kendi özelliklerini korur ve arana şartlara sahip bir yapı oluşumunu sağlayabilir [2,6]. Yarı-IPN tipi hidrojellerde polimerlerden biri çapraz bağ içerirken diğeri içermez. Bu tür polimerlerde misafir polimer zincirleri, ev sahibi ağ yapının içinde kovalent bağlı veya kovalent bağısız olarak yer alabilirler [2].

İyonik olmayan hidrojeller

Yapılarında yüklü guruplar bulundurmayan homopolimerik veya kopolimerik nötr hidrojellerdir. Çözücünün ozmotik basıncı yan zincirin gerilme enerjisi ile dengelendiği zaman denge değerine kadar şişerler. Bu hidrojellerin şişme ve büzüşme durumları genellikle çevre sıcaklığındaki değişimin bir sonucu olarak meydana gelir [6].

İyonik hidrojeller

Polielektrolitler olarak da bilinen iyonik hidrojeller, iyonik yüklü monomerlerden hazırlanırlar. Bu hidrojeller monomer yüklerinin pozitif yada negatif olmasına göre katyonik yada anyonik hidrojeller olarak adlandırılır.

İyonik hidrojellerin ana zincirinde yüklü gurupların bulunması uyarılara duyarlılıkları artırır [11].

Anyonik hidrojeller

Anyonik hidrojeller, genellikle negatif yüklü asidik veya anyonik monomerlerin homopolimerlerden yada bir anyonik monomerle bir nötr monomerin kopolimerinden oluşur. Bunlar dış ortam pH sına bağlı olarak denge şişme davranışlarında ani değişimler gösterir [11].

Katyonik hidrojeller

Katyonik hidrojeller, pozitif yüklü bazik veya katyonik monomerlerin homopolimerlerinden yada bir katyonik monomerle bir nötr monomerin kopolimerinden oluşurlar. Katyonik hidrojellerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan monomerlerden bazıları aminoetil metakrilat ve türevleri, 4-vinil piridindir [6].

2.2. Enzimler

Katalizörler kendileri tepkimeye girmedikleri halde aktivasyon enerjisini düşürerek tepkime hızını artıran maddeler olarak tanımlanır. Enzimler genellikle 15 000 ile birkaç milyon arasında değişen yüksek molekül ağırlığına sahip protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Enzimler tepkimenin kinetiğini etkiler. Buna karşılık tepkimenin termodinamiği üzerinde etkisi yoktur. Enzimler diğer katalizörler gibi katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini (E_a) düşürürler [12].

Enzimi oluşturan amino asitlerin sayısı, dizilişi sırası ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir ve bu düzen enzimin substrata seçiciliğini sağlar. Bazı enzimler yalnızca proteinden oluşurken, bazıları protein yanında protein olmayan bir kısım içerirler. Bu tip enzimlerde, enzimin protein kısmına

“apoenzim”, protein olmayan kısmına, enzimden kolayca ayrılabiliriyorsa “koenzim” veya “kofaktör”, sıkıca bağlı ise “prostetik grup” adı verilir. Koenzimler genellikle vitamin türevleri, organik moleküller ve inorganik metal anyon veya katyonlardan oluşur. Apoenzim ve koenzim birlikte “haloenzim” diye adlandırılır. Haloenzimin büyük bir kısmını apoenzim oluşturur. Apoenzim tek başına katalitik aktiflik gösteremez. Enzime katalitik özelliğini veren koenzim, tek başına gerçek enzime göre çok daha düşük aktiflik gösterir. Enzimin gerçek aktifliğinin sadece koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda gözlenir [13,14].

Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli amino asitlerin oluşturduğu bir kısım bulunur. Protein zincirinin bu bölgesi enzimin katalitik etkisinden sorumlu olup “aktif bölge” olarak tanımlanır. Substrat ve eğer varsa koenzim bu merkeze, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar ve / veya kovalent bağlar ile bağlanır. Substratın dönüşüme katılan ve katalitik prosesi yürüten amino asitler de aktif merkezden sayılırlar [15-17].

2.2.1. Enzimlerin etkisi

Enzimlerin etki mekanizması iki farklı açıdan ele alınabilir. Bunlardan birincisi tepkime süresince gerçekleşen enerji değişikliklerinin, diğeri ise kataliz sırasında aktif bölgedeki yapısal değişikliklerin incelenmesi ile ilişkilidir.

Aktivasyon enerjisi

Moleküllerin birbirleri ile reaksiyona girebilmeleri için dışarıdan enerji almaları gereklidir. Bütün kimyasal tepkimelerde aktivasyon enerjisi olarak bir enerji engelinin aşılması gerekmektedir. Reaksiyonun hızını belirleyen en önemli faktör aktivasyon enerjisi (E_a) denilen bu enerji ihtiyacının büyüklüğüdür. Enerji engeli ne kadar yüksek olursa birim zaman içerisinde bu engeli aşan moleküllerin sayısı da o oranda az olacaktır. Reaksiyon hızını artırabilmek için sisteme kimyasal veya biyolojik bir katalizör ilave edilebilir. Bu durumda

katalizör substrat ile (ES) kompleksi yaparak aktivasyon enerjisini aşağılara çekebilir.

ES kompleksinin oluşması ile daha çok substrat aktivasyon enerji engelini aşabilmekte, reaksiyon hızı artmakta ve birim zamanda oluşan ürün miktarı artmaktadır. Reaksiyon sonunda serbest kalan enzim ortamdaki diğer substrat moleküllerine bağlanarak onların da aktivasyon enerjisini düşürecek ve onların da ürüne dönüşümünü hızlandıracaktır.

Hücrel koşullarda enzimler daha düşük aktivasyon enerjisi gerektiren alternatif yollar oluşturarak tepkimelerin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Enzimle katalizlenen reaksiyonların çoğu katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^3 ile 10^8 kere daha hızlı olarak gerçekleşir. Tipik olarak bir enzim molekülü saniyede 100-1.000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. Enzim başına düşen ürüne çevrilmiş substrat molekülü sayısına “Turnover sayısı” denir [14,15].

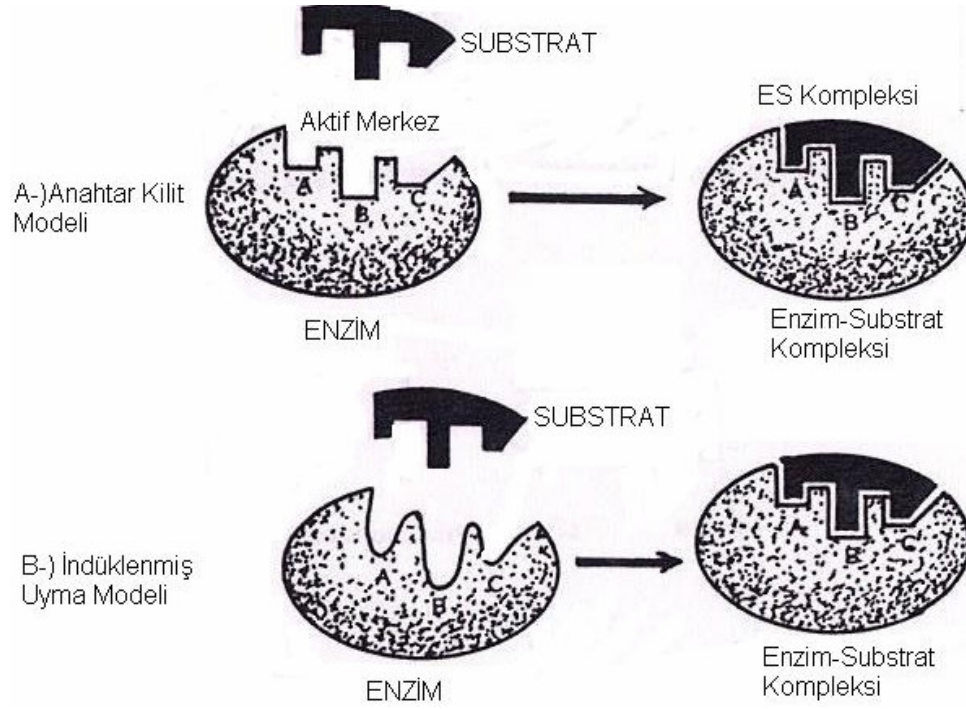
Aktif bölgedeki değişiklikler

Aktif yerler bir şerit, yarık, çatlak, oyuklardır ve kataliz için gerekli temel polar artıklar da içerirler. Yapıları bilinen enzimlerin hepsinde, substrat molekülleri suyun ayrılması ile yarık veya çatlaklara bağlanırlar. Aktif yerler bir enzimin toplam hacmine oranla küçük bir kısmını oluşturur.

Aktif merkez, bir enzimin substrata yapıştığı bölge, bir de kataliz olayının gerçekleştirildiği bölge (katalitik yer) olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Bir enzimin yapısındaki amino asit artıklarının çoğu substratla temas halinde değildir. Birçok enzimde katalitik yerde serin, sistin, histidin, tirozin ve lizin bulunur.

Aktif merkez ile substrat, bir anahtar ile kilit gibi birbirine uygunluk gösterir. Bu şekil Emil-Fischer’in tarif ettiği “anahtar ve kilit” durumuna uyar (Şekil 2.1).

Ancak substrat ile buluştuktan sonra enzim özel yapısını almakta ve substrat aktif bölgeye bağlanmaktadır. Bu dinamik tanıma olayına “indüklenmiş uyum” veya “sonradan olma uyum” denir [12,13,15].



Şekil 2.1. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli

2.2.2. Enzimlerin uygulama alanları

Enzimlerin endüstriyel analitik ve tıbbi uygulamaları gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Enzimlerin katalitik potansiyelleri yalnız analitik amaçlar için değil aynı zamanda sentetik amaçlar ve modifikasyonlar için de değerlendirilmektedir. Bu çerçevede başta gıda sektörü olmak üzere, ilaç sanayi, kimya sanayi, deri ve tekstil sanayi gibi birçok sanayi dalında enzimler geniş uygulama alanları bulmuşlardır.

Yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları enzimlerin doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır.

Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 30-35'i deterjan sanayiinde, % 20-25'i nişasta ile ilgili alanlarda, % 20'si süt ve süt ürünleri sanayiinde kullanılmaktadır. Bira, meyve ve şarap, unlu mamuller, tekstil, kağıt, deri ve yem sanayiinde kullanılan enzimler için her alanın yaklaşık % 1-5 arasında bir payı bulunmaktadır [17].

2.3. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon (tutuklama), enzimlerin katalitik aktifliklerini kaybetmeden sürekli ve defalarca kullanımlarını sağlamak üzere, fiziksel veya kimyasal olarak bir destek materyali üzerine tutturulması olarak tanımlanır.

Endüstriyel ve analitik proseslerin çoğu, sulu ortamda gerçekleşir. Bu proseslerde enzimler, substrat çözeltisi ile karıştırılır ve ortamda ürün elde edildikten sonra enzimler ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Ayrıca sürekli üretim proseslerinde serbest enzimler kullanılamazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları ve pahalı olmaları nedeniyle, bu proseslerin maliyetleri oldukça yüksektir. Bu nedenle enzimler suda çözünmeyen bir desteğe immobilize edilerek hem defalarca kullanılabilmekte hem de sürekli proseslere uygulanabilmektedir. Böylece, önemli miktarda ekonomik kazanç elde edilmektedir. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstride kullanılmaktadır [18].

Genel olarak immobilizasyon uygulamaları enzim sistemleri dışında, uygun destek materyallerine ilaç, protein, mikroorganizma, bitki ve hayvan hücreleri, biyosensör ve biyoreaktör uygulamaları ve kontrollü ilaç salınım sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [19].

Tarihte ilk enzim immobilizasyonu 1916 yılında Nelson ve Grifftin tarafından adsorpsiyon yöntemiyle yapılmıştır. Nelson ve Grifftin sakkarozu hidroliz etmek için maya invertazını mangal kömürüne adsorbe etmişlerdir. İmmobilize enzim sistemlerinin pratik olarak ilk kullanımı ise Grobhofer ve Scheilth (1954) tarafından yapılmıştır. Araştırmalarında; karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz enzimlerini poliaminostiren reçinesine kovalent bağlanma ile immobilize etmişler ve bu immobilize enzim türevlerinin kinetik parametrelerini incelemişlerdir. Daha sonra da immobilizasyon çalışmaları dünyanın her tarafında yaygınlaşmış ve çeşitli enzimler değişik amaçlarla immobilize edilmiştir [19].

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre pek çok işlevsel avantajları vardır. Bunlardan en önemlileri şu şekilde sıralanabilir [19-21].

1. Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) enzimin oluşan ürünü kirletmesi gibi bir sorun olmaz.
2. Sürekli proseslere uygulanabilir.
3. Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
4. Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı daha dayanıklıdır.
5. Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
6. Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
7. Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
8. Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.

İmmobilize enzimlerin bazı dezavantajları da vardır. Bunlar da şu şekilde sıralanabilir [22,23].

1. Immobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir veya kaybolabilir.
2. Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim karalılığı sınırlıdır.
3. Enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksektir.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan destek materyalinin önemi büyüktür. Uygun olarak seçilen bir destek materyali, üzerine immobilize edilen enzimin aktifliğini korumasını sağlar ve işlemsel kararlılığını artırır [24,25]. İyi bir destek materyali büyük yüzeysel alan, geçirgenlik, hidrofilik karakter, çözünmezlik, kimyasal, mekanik ve termal kararlılık, yüksek tutuculuk, uygun biçim ve parça büyüklüğü, mikrobiyolojik saldırılara karşı direnç gibi özelliklere sahip olmalıdır.

Organik destekler; doğal polimerler, proteinler, aktif karbon ve sentetik polimerler olmak üzere sınıflandırılabilir. Organik desteklere oldukça fazla sayıda ve çeşitli fonksiyonel gruplar katılabildiği için ticari olarak kullanılan pek çok immobilize enzim sistemi bu desteklerle hazırlanır [26]. Yaygın olarak kullanılan polisakkarit desteklerinden olan yosunlar ve selülozlar (agaroz, dekstran, selüloz türevleri) enzimleri bağlamada ve aljinat ile karregenan ise hapsetme amacıyla kullanılır [27,28]. Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan polisakkarit türevlerinin en büyük avantajı hidroksil gruplarına sahip olmasıdır. Polisakkarit desteklerde hidroksil grupları enzimlerin elektrofilik grupları ile etkileşerek enzim immobilizasyonu sağlar. Bununla birlikte polisakkarit desteklerin nükleofilik özelliklerinin zayıf olması nedeni ile aktivasyonu alifatik veya aromatik, karboksil veya tiyol grupları ilavesi ile sağlanır.

Sentetik polimerler fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak çok kullanılırlar. Sentetik polimerler mikroorganizmaların saldırılarına karşı dirençlidirler ve saflıklarını korurlar. Yaygın olarak kullanılan sentetik taşıyıcılar polistiren, vinil ve allil polimerler, poliamitler, poliakrilatlar, polimetakrilatlar ve bunların türevleridir. Akrilik polimerleri enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan asidik sentetik polimerlerdir. Bu polimerler, enzim hapsetme veya kovalent bağlama amacıyla kullanılmıştır. Poliakrilat ve polihidroksi alkil metakrilat ve bunların türevlerinin ticari olarak bulunması, enzim immobilizasyonu amacıyla kullanılmasına olanak sağlamıştır. Poliakrilat ve polimetakrilat, akrilik asit ve

metakrilik asitlerin polimerizasyonu ile elde edilir. Akrlatlar esas olarak daha hidrofobik veya negatif yüklü matriksler hazırlanmasında diğer organik bileşiklerle kopolimer oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Polihidroksialkil metakrilatlar, hidrofilik organik matriks olarak hidroksil gruplarının sayısına göre geliştirilmiş mekanik özelliklere sahiptirler ve biyolojik dirençleri yüksektir. Enzim bağlanmasında bu tip matriksler daha çok çözünür karbodiimitle aktiflenir. Makrogözenekli taşıyıcılar, bir çapraz bağlayıcı reaktif ve hidroksialkil metakrilatın radikalik süspansiyon kopolimerleşmesi ile küresel formda hazırlanırlar [29].

Enzim immobilizasyonunda destek olarak doğal ve sentetik birçok organik ve anorganik materyal kullanılmaktadır [30]. Çizelge 1.1’ de enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri verilmiştir.

Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri

Doğal Polimer	Sentetik Polimer	Anorganik
Selüloz	Stiren esaslı polimerler	Kil
Nişasta	Akrilamit esaslı polimerler	Cam
Aljinat	Naylon	Silikajel
Karragenan	Vinil ve allil polimerler	Ponza taşı
Kollagen	Akrilat esaslı polimerler	Aktif karbon
Jelatin	İyon değiştirici reçineler	Metaller
Albümin	Maleik anhidrit polimerleri	Metal oksitler
İpek		Bentonit

Enzimlerin immobilizasyonu sırasında aktif gruplar korunmalı ve enzim aktifliğini yitirmemelidir. Enzimlerin çeşitli yöntemlerle inert ve genellikle katı polimerik desteklere tutturularak immobilize edilmesi halen pek çok bilim

adamının ilgilendiği araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır. Belli destek malzemesi üzerinde tutuklanan enzimler immobilizasyon sırasında gerekli olan fizikokimyasal özelliklere sahip olmalıdır. Her uygulama için geçerli olabilen doğal makromoleküllerden hazırlanacak destek materyali bulmak kolay değildir. Ayrıca, gerekli özelliklere sahip destek materyallerini hazırlamak için protein ve polisakkaritleri modifiye etmek oldukça zordur.

Destek materyaline bağlanmada enzim molekülünün protein yapısından yararlanılır. Enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar bağlanmada etkilidir. Bunların yanında immobilizasyonda kullanılacak destek materyallerinde bazı özellikler de aranır, bunlar şu şekilde sıralanabilir [25].

1. Hidrofilik karakter
2. Suda çözünmeme
3. Gözenekli yapı
4. Mekanik dayanıklılık ve uygun partikül büyüklüğü
5. Kimyasal ve termal dayanıklılık
6. Mikroorganizmalara karşı dirençli olma
7. Ucuzluk
8. Zehirsizlik

İmmobilizasyon sırasında enzim molekülleri konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. İmmobilize enzimin zincir hareketleri çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar, immobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi, destekle enzimin karşılıklı etkileşmesi, aktifleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesi olarak belirtilebilir. Enzimler içinde bulundukları çevre tarafından etkilenirler. Enzimin katı destek üzerinde immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikro çevreyi etkileyebilir, bu da enzimin görünen davranışları üzerinde aşağıda belirtildiği gibi bazı değişiklikler oluşturur.

1. Bölme etkisi
2. Difüzyon sınırlaması
3. Yapısal değişiklikler
4. Sterik sınırlamalar
5. İnaktivasyon

Bölme etkisi: Poliiyonik destek kullanıldığında iyonik yapıya sahip substrat, tepkime ortamında homojen olarak dağılmaz ve enzim çevresinde farklı derişimde bulunabilir. Ölçülen derişim değerleri genellikle kütle fazından yapılır. Bölme etkisi çok gözlenen bir durumdur. Ayrıca, çözünen madde ile polimerik destek arasında hidrofobik etkileşmeler de olabilir.

Difüzyon sınırlaması: Difüzyonel sınırlama, fiziksel büyüklük ile ilgilidir. Eğer polimer desteğinin gözenek çapı substrat molekülünden küçük ise substratın destek içine difüzlenmesi ve enzim ile temasa geçmesi engellenir ve bunun sonucu olarakta herhangi bir tepkime meydana gelmez.

Yapısal değişiklikler: Enzim immobilizasyonunda, enzim yapısının belli bir pozisyonda uzun süre korunması ile enzim ve destek materyali arasında çok sayıda bağlanma oluşabilir. Enzimin katalitik aktifliği yapısal değişmelere bağlı olduğundan K_m ve/veya V_{mak} değerlerinde de farklılıklar, enzim aktifliğinde azalmalar olabilir.

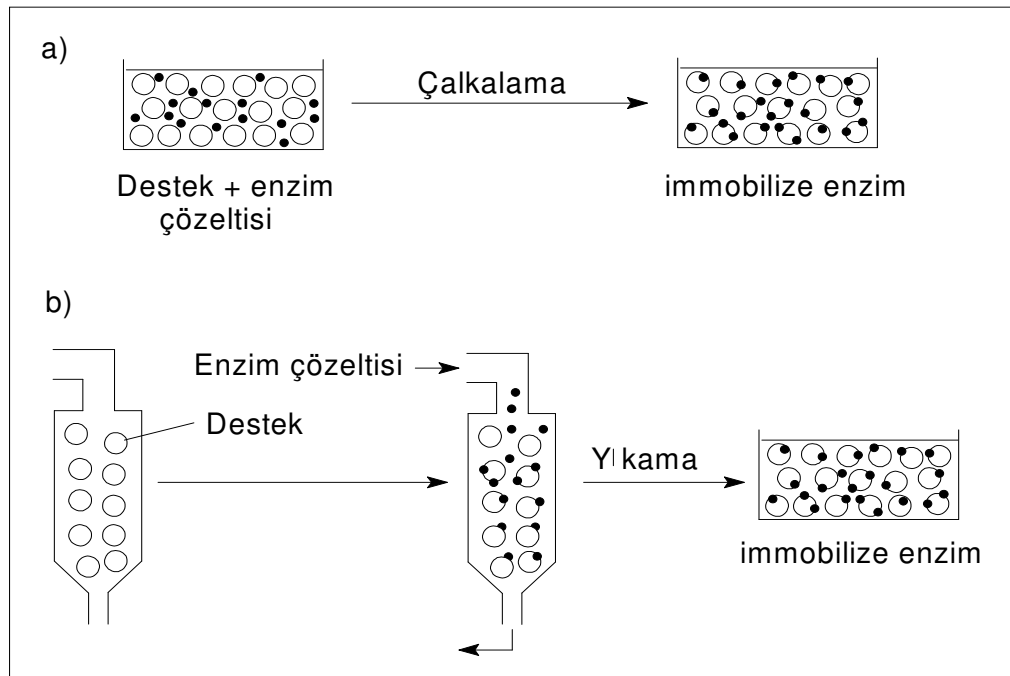
Sterik sınırlamalar: Eğer immobilize enzimin aktif uçları substrat molekülünün yaklaşmasına elverişli pozisyonda değil ise sterik problemler ortaya çıkar. Örneğin enzimin aktif gurupları destek maddesine dönük ise substratın aktif merkeze yaklaşması engellenir. Enzim polimerik kafeste hapsedildiğinde, substrat moleküllerinin enzime yaklaşıp direk temasa geçmesi matriks tarafından engellenebilir.

İnaktivasyon: Zor tepkime şartlarında (örneğin yüksek pH, ortamda serbest radikallerin, oksitleyici reaktiflerin varlığı gibi) gerçekleşen immobilizasyon

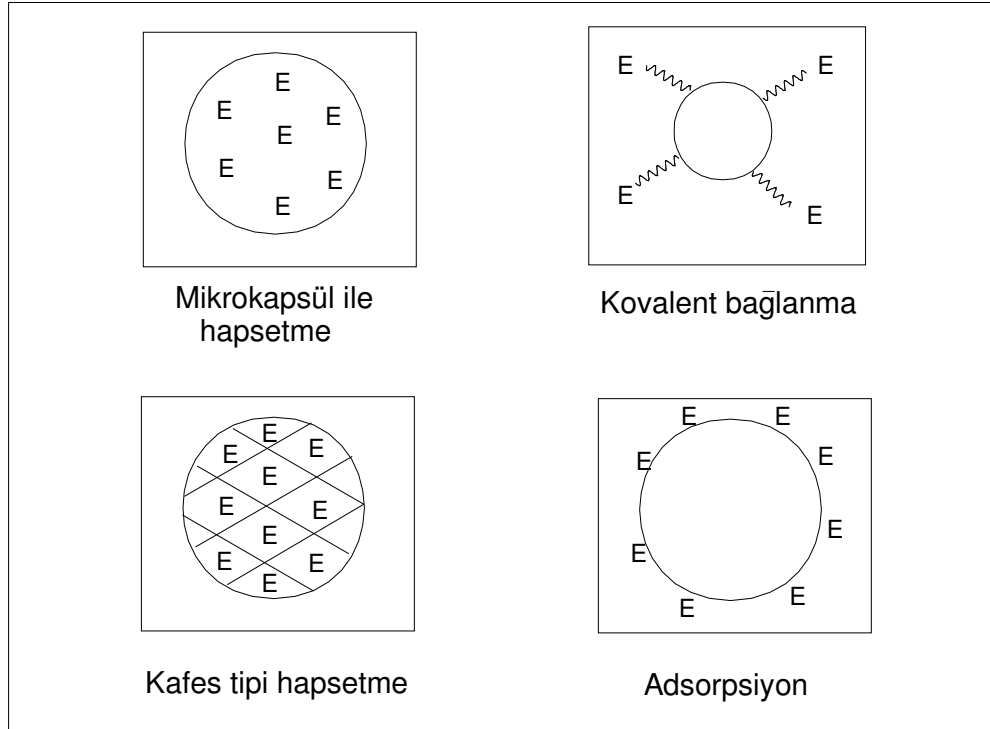
işlemleri enzimin bir kısmının veya tamamının aktifliğini yitirmesine sebep olabilir. Böylece immobilize edilmiş enzimin spesifik aktifliği, serbest enzimin aktifliğinden oldukça düşük olabilir. Enzim herhangi bir konformasyonel değişim olmaksızın aktifliğini kaybedebilir.

2.4. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu için kullanılan çeşitli yöntemler vardır. İmmobilizasyon prosesi ve immobilizasyon yöntemleri şematik olarak Şekil 2.2' de ve Şekil 2.3' de gösterilmiştir. Bu yöntemler kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir.



Şekil 2.2. İmmobilizasyon prosesi



Şekil 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

2.4.1. Kimyasal yöntemler

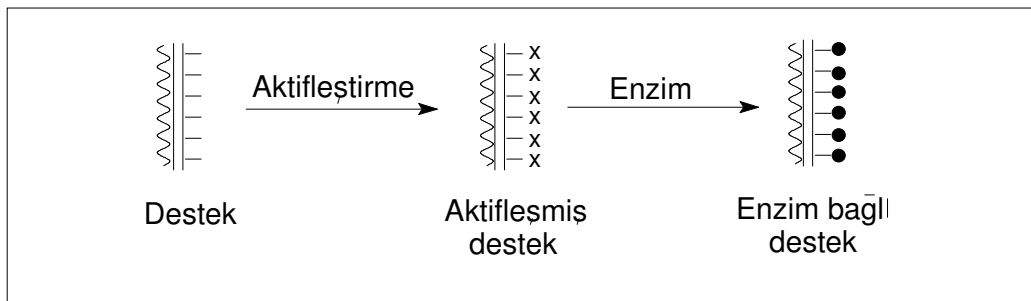
Kimyasal immobilizasyon yöntemleri, suda çözünmeyen aktifleştirilmiş polimer ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu veya birden fazla enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumunu gerektirir. Kimyasal yöntemler çoğunlukla tersinmezdir. Serbest enzimin yeniden geri kazanılması mümkün değildir [31,32]. Kimyasal bağlanma ile immobilizasyon yöntemlerinin, immobilize enzimin çok kararlı olması, destek maddesinin dayanıklı olması gibi önemli avantajları vardır. Bunun yanında immobilizasyon veriminin sınırlı olması, tepkime şartlarının çok özel olması, kimyasal olarak inert olan destek maddelerine uygulanamaması gibi bazı dezavantajları da vardır [30]. Kimyasal yöntemler kovalent ve çapraz bağlanma ile immobilizasyon olmak üzere iki gruba ayrılır.

Kovalent bağlanma

Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Bu teknik enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiliye geçmesini engeller [32]. Kovalent bağlanma, genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Enzim immobilizasyonunda, enzimin özellikleri, aktif ucunun yapısı, pH, sıcaklık ve organik çözücüler gibi faktörlerden dolayı sınırlı sayıda yöntem kullanılabilir [33,34].

Kovalent bağlı destek-enzim kompleksinin aktifliği doğal enziminkinden farklı olabilir. Bu farkın büyüklüğü taşıyıcı materyalin biçim ve büyüklüğüne, etkileşme yönteminin doğasına, taşıyıcı materyalin bileşimine, enzim yapısına ve reaksiyon sırasındaki spesifik şartlara bağlıdır [24].

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir (Şekil 2.4.). Destek maddesi; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar taşımalıdır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak siyanojen bromür, epiklorhidrin, glutaraldehit, karbodiimit, siyanürik klorür gibi çeşitli aktifleyici maddeler kullanılabilir.



Şekil 2.4. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon

Çapraz bağlanma

Enzim molekülleri başka bir destek maddesi olmadan, kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlanarak immobilize olabilirler. Bu yöntem üç boyutlu çapraz bağlanmış enzim oluşumu esasına dayanmaktadır. Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulum zordur [35]. Enzim aktifliği, tepkime süresi, sıcaklık, iyonik şiddet, pH, çapraz bağlayıcı madde ve enzim derişimi gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu yöntemin en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki ya da çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Bu yöntemin dezavantajı ise yüksek aktivite gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki zorluklardır. Çapraz bağlayıcı olarak enzim immobilizasyonunda kullanılan çok fonksiyonlu maddeler, diazobenzidin, 1,5-diflor-2-4-dinitro benzen, glutaraldehit, triklor-s-triazin, hekzametilen diizosiyanat, 2,4-diizotiyosiyanotoluendir [36].

2.4.2. Fiziksel yöntemler

Fiziksel yöntemler kovalent bağ oluşumuna bağlı olmadan, enzimin belirli bir yere tutturulmasını içerir. Enzimlerin immobilizasyonu bazı fiziksel kuvvetlerin etkileşmesiyle (elektrostatik, protein-protein etkileşmesi, iyonik bağların oluşumu, v.b) enzimin destek maddesindeki mikrobölmeler içerisinde veya gözenekli membranlarda tutturulmasıyla sağlanır. Esas itibarıyla fiziksel immobilizasyon yöntemleri tamamen tersinirdir. Bununla birlikte çoğu özel örneklerde göz ardı edilemeyecek kadar tersinmez bağ oluşumları da gözlenir. Fiziksel yöntemler adsorpsiyon ve hapsetme ile immobilizasyon olmak üzere iki gruba ayrılır.

Adsorpsiyon ile immobilizasyon

Adsorpsiyon yöntemi en eski ve basit bir immobilizasyon yöntemidir [30,37]. Adsorpsiyon yöntemi ile enzimin immobilizasyonu katı matriks üzerinde enzimin fiziksel adsorpsiyonuna veya iyonik bağlanmasına dayanır. Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyondan sorumlu kuvvetler hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir [26]. İyonik bağlanma ile immobilizasyon, proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karşıt yükleri arasındaki çekim kuvvetlerine dayanır. Enzimin suda çözünmeyen materyallerde adsorpsiyonu, pH, çözücü karakteri, iyonik kuvvet, protein ve adsorbanın derişimi, sıcaklık gibi deney koşullarına bağlıdır. Enzim ile destek maddesi arasındaki zayıf bağlardan dolayı adsorblanan enzim kullanım esnasında taşıyıcıdan uzaklaşabilir ve bu da yöntemin bir dezavantajıdır. Adsorpsiyonla immobilizasyon yöntemin basit olduğu, çeşitli yüklü taşıyıcılar seçilebildiği ve taşıyıcılar farklı fiziksel şekillerde kullanılabildiği için avantajlıdır. Ayrıca bu yöntemde enzim, aktifliğini büyük ölçüde veya tamamıyla korur. Bu yöntem tersinirdir ve bu da destek maddesinin ve enzimin başka amaçlarda tekrar kullanımını sağlar [38]. Çeşitli aktif yüzeyli malzemeler enzim-adsorpsiyon komplekslerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. En çok kullanılanlardan bazıları anyon ve katyon değiştiricili reçineler, sentetik polimerler, aktif karbon, silikajel, diatomili topraklar ve killler, alumina, gözenekli camlar ve seramiklerdir [27].

Hapsetme ile immobilizasyon

Bu yöntem polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesine dayanır [39]. Enzim sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer oluşumu ve/veya çapraz bağlanma ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınlarıyla başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir [39-41]. Polimerik matriks yapısının, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeteri

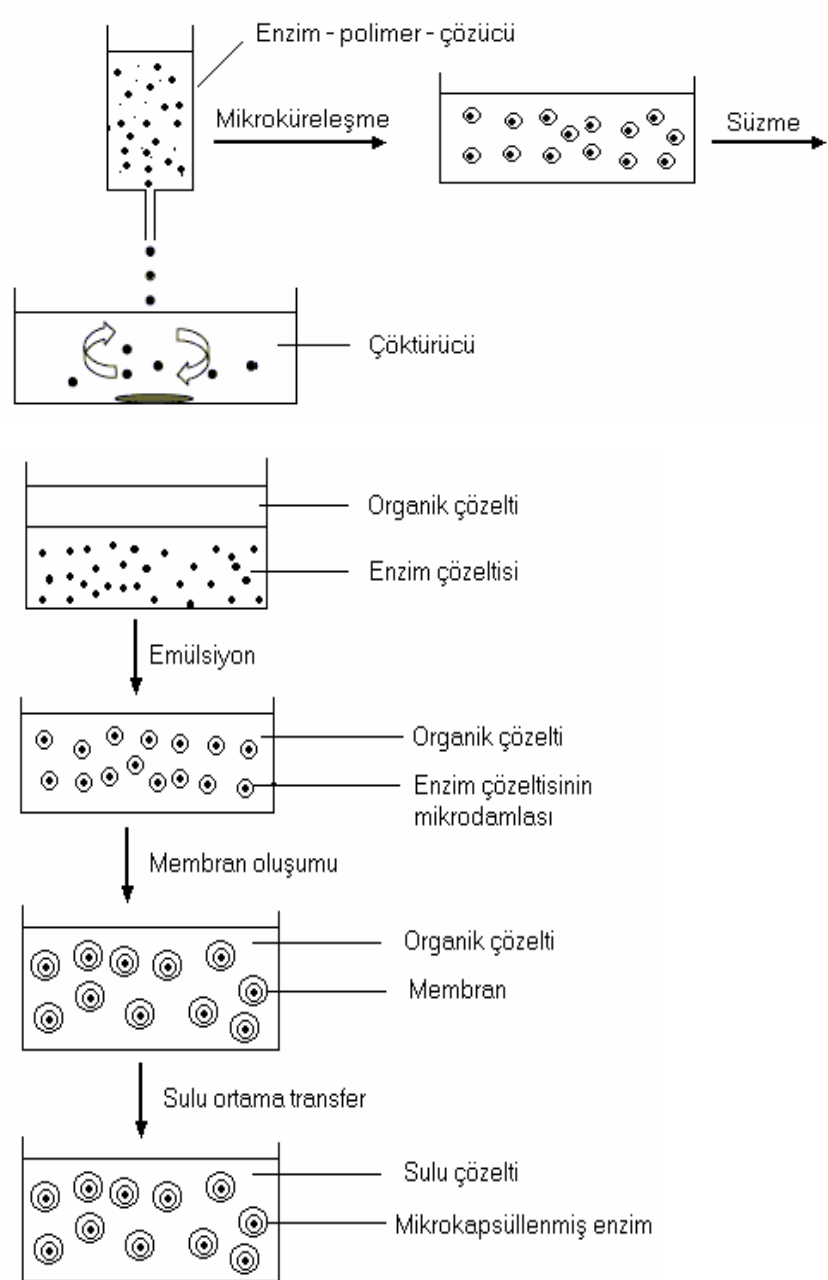
derecede sıkı olması gerekir. Bu yöntem her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsedmek için çok genel kullanılabilir [24]. Hapsetme yöntemi mikrokapsül ve kafes tipi olmak üzere iki gruba ayrılır.

Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi

Bu yöntemde enzim molekülleri 10-1000 μm çaplı küçük yarı geçirgen membranlara hapsedilir. Yarı geçirgen membran, büyük protein veya enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürün moleküllerinin serbestçe giriş-çıkışına izin verir. Enzimlerin mikrokapsüllenmesi için iki yöntem kullanılır. Bunlar faz ayrımı ve ara yüzey polimerizasyonudur.

Faz ayrımı yönteminde, enzim ve mikrokapsülü oluşturan çözelti damlalar şeklinde çöktürücüye ilave edilir. Ara yüzey polimerizasyonun da ise enzimin sudaki çözeltisi, suyla karışmayan organik çözelti içerisinde emülsiyeye edilir. Ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikro damlalarının etrafında membran oluşturur. Böylece enzim polimerik membran tarafından sarılarak mikrokapsüllenmiş olur (Şekil 2.5).

Mikrokapsülleme yönteminde herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır [42] . Bu oranının büyük olması da mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat reaksiyonunu olasılığını artırır. Bu yöntemde mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein konsantrasyonuna gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler gerektirmesi gibi dezavantajlar söz konusudur.



Şekil 2.5. Mikrokapsülleme ile immobilizasyon

Kafes tipi hapsetme yöntemi

Kafes tipi hapsetme yöntemi, suda çözünmeyen çapraz bağlı polimerlerin boşlukları içinde enzimin tutulması esasına dayanır. Bu yöntemde enzim içeren monomer veya polimer çözeltilerine UV veya gama ışınları uygulayarak yüksek oranda çapraz bağlı bir polimer şebekesi oluşturulur. Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisinde tutulur ve jel matriksin dışına çıkamaz, fakat substrat ve ürün bu şebeke içerisine sürekli olarak girip çıkabilir.

Bu yöntemin sahip olduğu avantajlar aşağıda verilmiştir.

1. Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzim yapısını ve aktifliğini kimyasal proseslerden daha az etkiler.
2. Ortamdaki çapraz bağlayıcı ve monomer derişimini değiştirmek suretiyle farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafes üretilebilir.
3. Polimerleşme genelde hem kolay hem de hızlı bir şekilde gerçekleştirilir [31,40,41,43].

Bu yöntemin dezavantajları çapraz bağlı polimer şebekesinden enzimin sızması, yalnızca küçük hacimli substratlar için sınırlı olması ve makromoleküler substratlar için çok düşük aktiflik göstermesidir.

2.5. İmmobilizasyon Yöntemin Seçimi

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde öncelikle enzimin bağlanacağı destek materyalinin yapısı dikkate alınmalıdır [44].

Başarılı bir immobilizasyon için aşağıdaki faktörler gözönünde bulundurulmalıdır [45].

1. Destek materyalinin mekanik özellikleri, özellikle fiziksel formu ve mekanik kararlılığı göz önünde bulundurulmalıdır.
2. Enzim, tepkimenin yürütüleceği koşullarda kararlı olmalıdır.
3. Çapraz bağlayıcı reaktifler, enzimin aktif uçları ile tepkimeye girmemelidir veya çapraz bağlayıcı reaktif, enzimin aktif ucuna nüfuz etmemesi için olabildiğince büyük olmalıdır.
4. Mümkünse enzimin aktif ucu bir şekilde korunmalıdır. Örneğin sülfidril enzimleri, glutatyon veya sistein ile tepkimeye sokularak korunabilir ve daha sonra enzim tekrar aktifleştirilebilir.
5. İmmobilizasyonda, bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulanan yıkama işlemi enzimi etkilememelidir.
6. İmmobilize enzim, bazı kimyasal tepkimelerde devamlı katalizör olarak kullanılacak ise immobilizasyon yöntemini seçmeden önce tepkimenin doğası göz önünde bulundurulmalıdır.

2.6. Çalışmada Kullanılan Enzim, Substrat ve Destek Materyalinin Özellikleri

Bu çalışmada enzim olarak lakkaz, substrat olarak siringaldazin, destek materyali olarak yarı-ağ yapılı hidrojel (yarı-IPN) kullanılmıştır.

2.6.1. Lakkaz

Lakkaz (L) (*Trametes versicolor*' dan elde edilen, E.C.1.10.3.2.) enzimi, her molekülünde dört bakır iyonu taşıyan bir oksidoredüktazdır. Lakkaz redoks enzimlerinin bir alt sınıfıdır. Karbohidraz ve proteazlar gibi hidrolitik enzimlerinin substrat özgünlüğünün aksine redoks enzimlerinin substrat özgünlüğü oldukça azdır [46].

L enzimi bilinen en eski enzimlerdendir, ilk olarak 1883 yılında Yoshida tarafından, *Rhus vernicifera*'nın öz suyundan izole edilmiştir. L enzimleri bakteriler, böcekler, yüksek yapılı bitkiler ve mantarlar olmak üzere 4 canlı

grubunda üretilmektedir [47,48]. L kaynağı olan mantarlara, *Trametes versicolor*, *Rhus vernicifera*, *Trametes hirsuta*, *Panus tigrinus*, *Flavodon flavus*, *Agaricus bisporus* örnek olarak verilebilir. Bunlardan beyaz çürükçül mantarlar daha çok kullanılmaktadır. Resim 2.1'de beyaz çürükçül mantarlardan biri olan *Trametes versicolor* görülmektedir.



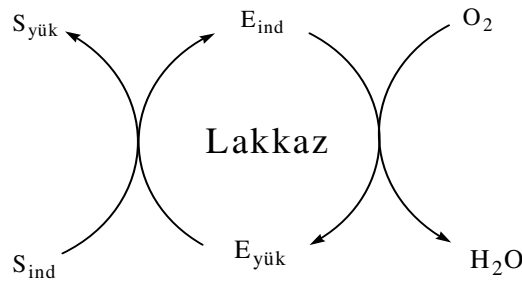
Resim 2.1. Lakkaz üreten *Trametes versicolor* mantarı

Bir L enzimi, kaynağından molekül ağırlığı, optimum pH, substrat özgüllüğü gibi özellikleri farklı olan, birkaç tipte elde edilebilir. L enzimi, glikoprotein yapısındadır. Enzimin karbonhidrat miktarı, ağırlıkça % 15-45 ini oluşturur. Enzim heksozamin, glukoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve arabinoz gibi karbonhidratları içerir [49].

Beyaz çürükçül mantarlardan elde edilen L ların çoğu 55-85 kDa molekül ağırlığındadır, yaklaşık 500 amino asitten oluşmaktadır. L enziminin optimum

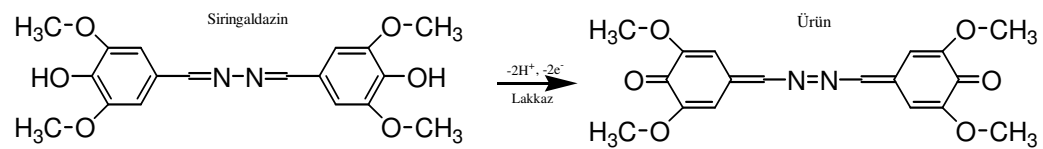
pH aralığı 3,0-7,5, optimum sıcaklık aralığı ise 40-80 °C arasında değişiklik göstermektedir. L enziminin optimum pH değeri kullanılan substrata göre değişmektedir [48].

L enzimi, aromatik substratı oksitlerken, aynı zamanda oksijen molekülünün suya indirgenmesini katalizler (Şekil 2.6.) [50,51]. L ın aktif bölgesinde hidratlaşmış elektron, oksijen ve değişik tiplerde bakır atomları bulunur.



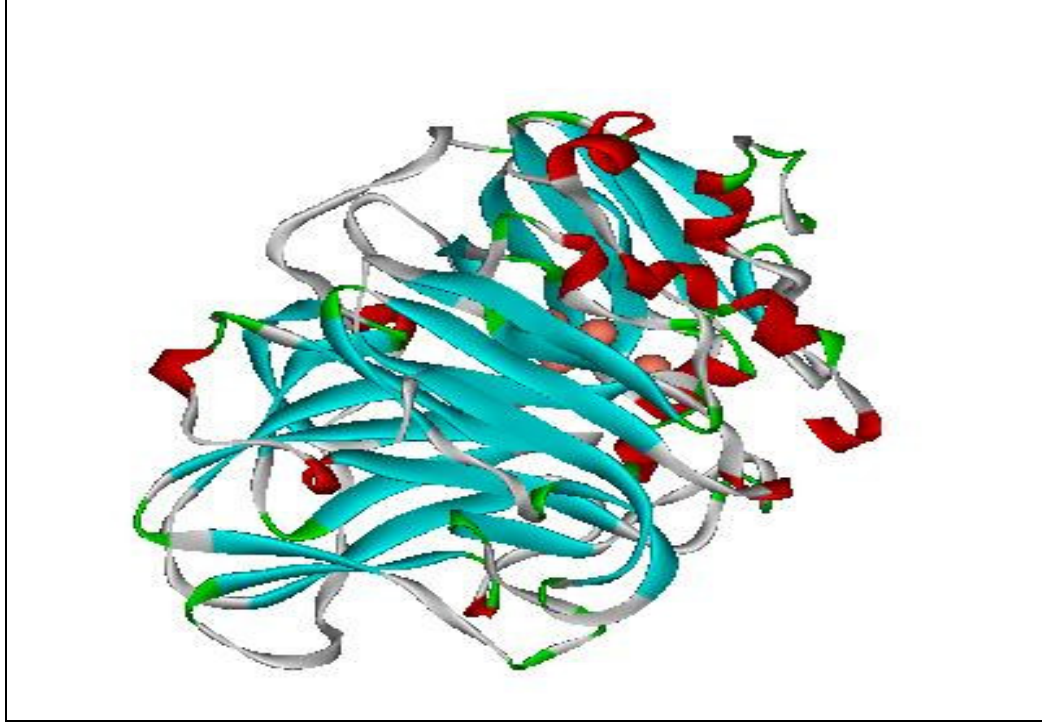
Şekil 2.6. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması

L enziminin reaksiyon verdiği substratlar, geniş bir aralıkta değişmektedir. Bu substratlardan bazıları 4-benzendiol, siringaldazin, naftol, diklorofenol, metoksifenol, askorbat, pirogallol, kresol, syringic asit vb. türevleridir [52]. Genel olarak fenoller, amino fenoller ve aromatik diaminler ile benzer özellikler gösteren substratlar, L enzimi tarafından oksitlenebilir [53]. Şekil 2.7' de siringaldazinin L ile verdiği tepkime ve sonuçta oluşan ürün gösterilmektedir [54].



Şekil 2.7. Siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime

Günümüzde enzimlerin 3 boyutlu yapıları ayrıntılı bir şekilde X-ışınları kristalografisiyle görüntülenebilmektedir. Bu şekilde pek çok enzimin üç boyutlu yapısı aydınlatılabilmektedir. Resim 2.2' de *Trametes versicolor*' dan elde edilen L enziminin üç boyutlu yapısı görülmektedir [55].



Resim 2.2. *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz enziminin üç boyutlu yapısı

2.6.2. Siringaldazin

4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin'nin molekül ağırlığı 360,3 g/mol dür. $C_{18}H_{20}N_2O_6$ kapalı formülüne sahip siringaldazin, yapısal özelliklerinin benzerliğinden dolayı genel olarak fenoller, amino fenoller ve aromatik diaminler ile benzer özellikler gösterir ve lakkaz enzimi tarafından kolayca oksitlenebilir.

2.6.3. Destek materyali

IPN yapılar ilk kez Millar tarafından ortaya atılan iç içe geçmiş ağ yapılı (interpenetrating network, IPN) en basit tanımıyla, doğal veya sentetik iki bileşenden en az bir bileşenin diğerinin varlığında çapraz bağlı olduğu yapılardır [56]. IPN oluşumu, polimerik bileşenlerin birbirleri ile uyumunu artırmak için mükemmel bir yoldur. Bir IPN , belirli bir uygulamada makromoleküler yapıdaki benzerine göre daha üstün performans gösterir [57].

Çok sayıda araştırmacının, IPN formu hazırlamak için, doğal ve sentetik polimerlerin çeşitli kombinasyonlarını kullandıkları kaydedilmiştir. Çeşitli yöntemler ile eşsiz topolojiye sahip IPN' ler üretilmektedir.

Ard arda gerçekleşen IPN sentezinin ilk basamağında, monomerlerden biri çapraz bağlanır ve ardından bu çapraz bağlı yapı; ikinci monomer, bu monomerin başlatıcısı ve çapraz bağlayıcısı varlığında şişerken ikinci monomer polimerleşir. Eş zamanlı gerçekleşen IPN sentezinde ise; her iki monomer, bu monomerlere özgü olan polimerizasyon başlatıcıları ve çapraz bağlayıcıları varlığında farklı sentetik modlarda (basamak ve zincir polimerizasyonu) eş zamanlı olarak polimerleşirler. İki polimer eş değer olduğu koşullarda her iki yöntemde kullanılarak, homo-IPN'ler hazırlanabilir.

Pek çok polimer termodinamik yönden düşük ya da yüksek oranda birbirleri ile uyumsuz olduklarından, IPN'lerin çoğu kısmen iç içe geçerek ağ yapıyı oluştururlar. Ferry (1980) tarafından bu tip IPN'ler, yarı uyumlu yada kısmi IPN'ler olarak sınıflandırılmaktadır. Polimer ağ yapılar, yalnızca tamamen birbiri içinde karışabildikleri durumda ideal iç içe geçmiş ağ yapıları oluştururlar [58].

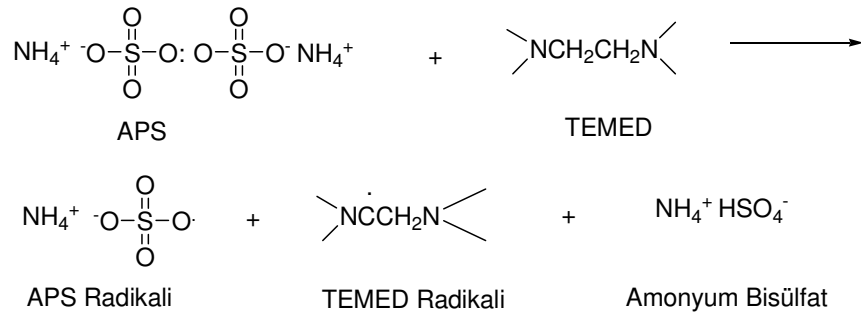
Bazı bilim adamları, sentez mekanizması yönünden IPN'leri, aşırı kopolimerlerinin paraleli olarak kabul etmektedirler. Ancak aşırı kopolimer sentezi çapraz bağlı polimerin; diğer monomer, bu monomerin çapraz

bağlayıcısı ve başlatıcısı içinde çözünmesi ile gerçekleşir. IPN sentezinde ise; polimer 1 çapraz bağlanır ve 2 karışımı içinde çözünmez. Ayrıca, polimerler arası kovalent zincirler oluşmaktadır.

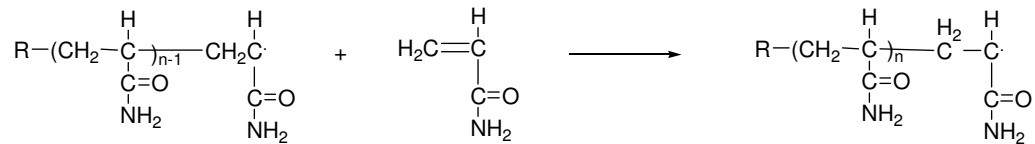
Yarı-IPN sistemlerde, polimerlerden biri çapraz bağlı iken, diğeri lineer ya da dallanmış yapıdadır. Ard arda IPN Sentezi ile 4 farklı, eş zamanlı IPN sentezi ile 2 farklı yarı-IPN hazırlanabilir.

Bu çalışmada, P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj yarı ağ yapılı hidrojelleri ve P(AAm)-NİPA kopolimeri destek materyali olarak kullanıldı. P(AAm)-Na Alj yarı-IPN oluşumu Şekil 2.8'de gösterildi.

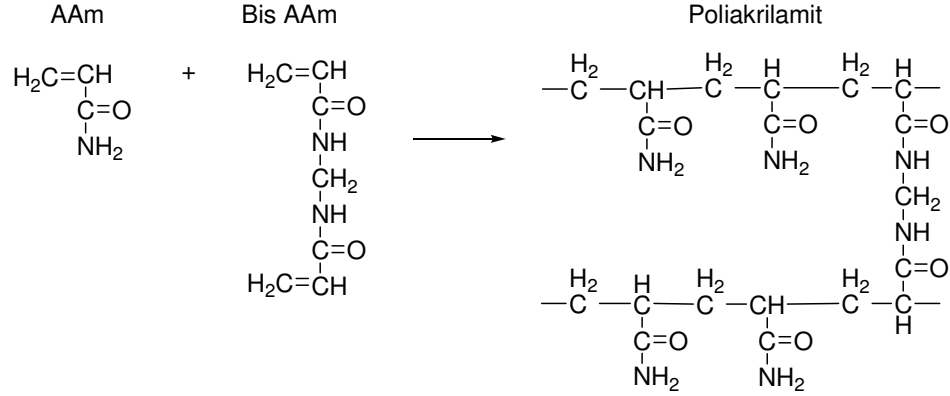
APS ve TEMED in radikallerinin oluşumu;



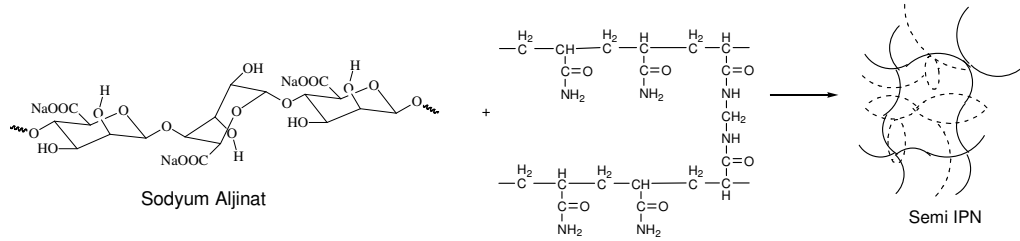
Radikalik katılma ile polimer zincirinin uzaması;



Çapraz bağlı polimerin oluşumu;



Yarı-IPN oluşumu;



Şekil 2.8. Semi IPN oluşumu

2.7. Lakkazın İmmobilizasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar

1995 yılında Rogalski, J. ve arkadaşları *Phlebia radiata* 'dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma yöntemi ile α -aminopropil-trietoksisilanla aktifleştirilmiş gözenekli cam üzerine immobilize etmişlerdir. Enzim bağlanma kapasitesini % 98 ve immobilize enzimin aktifliğini %96 olarak bulmuşlardır. Immobilize enzimin 4 °C de iki hafta süreyle depolandığında aktifliğini %100 koruduğunu belirtmişlerdir [59].

1998 yılında Luterek, J. ve arkadaşları *Cerrena unicolor* 'dan elde edilen lakkazı silanlanmış gözenekli cam boncuklar üzerine immobilize etmişlerdir. Substrat olarak siringaldazin kullanılmıştır. Enzim bağlanma kapasitesini % 94 immobilize enzim aktifliğini %100, immobilizasyonla optimum pH' nın 5,5 den 5,7' ye kaydığını belirlemişlerdir. Immobilize enzim 7 ay 4 °C de

saklandığında aktifliğinin %95' ini aynı koşullarda serbest enzimin % 40' ını koruduğunu bulmuşlardır [60].

1999 yılında D'Annibale, A. ve arkadaşları *Lentinula edodes*' ten elde edilen lakkazı glutaraldehit ile çapraz bağlanma ve adsorpsiyon yöntemini kullanarak kitosan üzerine immobilize etmişler, substrat olarak DMP (2,6-dimetoksifenol) kullanmışlardır. Optimum pH, serbest ve immobilize enzim için 4,0, optimum sıcaklık sırasıyla 50 °C ve 60 °C, K_m değerleri sırasıyla 77 μ M ve 256 μ M olarak bulunmuştur. Bu çalışmada zeytin yağı fabrikalarında atık sulardaki fenollerin uzaklaştırılması üzerine çalışılmıştır [61].

1999 yılında Rogalski, J. ve arkadaşları gözenekli cam yüzeyini iki polisakkarit tabakası ile kaplamışlar çapraz bağlanmış DEAE dekstran oluşturmuşlar ve *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkazı bu matrikse kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Substrat olarak siringaldazin kullanmışlardır. Immobilize enzimin organik çözücülerde güçlü aktiflik gösterdiğini tespit etmişlerdir [62].

2000 yılında Annibale ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Lentinula edodes*' ten elde edilen lakkazı Eupergite adsorbsiyon yöntemi ile immobilize ederek kinetik parametreler ve atık sulardaki fenol bileşikleri üzerine etkilerini incelenmiştir. Serbest lakkazın K_m sabiti 0,07 mM dan, Eupergite immobilize edildiğinde 0,15 mM' a artarken, V_{mak} değerinin $1,9 \times 10^{-2}$ mM.dak⁻¹ den $7,6 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ e düştüğü gözlenmiştir [63].

2000 yılında Schinner, F. ve arkadaşları yaptığı çalışmada *Plerotus ostreatus*' dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma yöntemi ile Eupergit üzerine immobilize etmişlerdir. Substrat olarak, siringaldazin, ABTS (2,2'-azinobis-3-metilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) , fenol ve DMP substratlarını kullanmışlardır. pH 5,8, 50 °C de 40 mM fosfat tamponunda siringaldazin substratı ile lakkazın en yüksek oksidasyonunu gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca immobilize lakkazın 25 °C de 10 gün boyunca depolandığında %2

oranında aktifliğini kaybettiğini belirlemişlerdir. İmmobilize enzim ile fenolik kirliliklerin giderilmesini araştırmışlardır [64].

2000 yılında Ruiz, A. ve arkadaşları *Aspergillus sp*'den elde edilen lakkazı adsorpsiyon yöntemiyle cam, silika jel, naylon-66 membran üzerine immobilize etmişlerdir. Enzimin dietil eter, etil asetat ve metilen klorür içinde aktifliğini ve kararlılığını belirlemişler, naylon-66 membrana immobilize edilen lakkazın organik çözücülerde yüksek aktifliğinin engellendiğini tespit etmişlerdir. Substrat olarak siringaldazin kullanmışlardır. Polivinil alkol, polivinil akrilat ve diğer polimerlere lakkazın immobilize edilmesi temizlik maddeleri için özellikle kumaş yumuşatıcı deterjanlarında kullanışlı bir işlemdir [65].

2000 yılında Lante, A. ve arkadaşları *Plerotus ostreatus*' dan elde edilen lakkazı adsorpsiyon yöntemi ile polietersülfon membrana immobilize etmişlerdir. Siringaldazin substratını kullanarak serbest enzim için optimum pH yı 6,3 immobilize enzim için ise pH 6,6, optimum sıcaklığıysa serbest enzim için 40 °C immobilize enzim için ise 35 °C olduğunu bulmuşlardır. Enzimin bağlanma kapasitesini %40 ve 32 °C de immobilize enzimin serbest enzime göre %18 daha aktif olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bu makalede immobilize enzimin atık sulardaki farklı fenol türevlerini uzaklaştırma yeteneği çalışılmıştır [66].

2001 yılında Freire, R.S. ve arkadaşları *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile aktifleştirilmiş karbon fiber mikro elektrotlar üzerine immobilize etmişlerdir. Substrat olarak katekol kullanmış ve optimum pH yı 5,0 olarak bulmuşlardır. 2 ay süresince immobilize lakkazın aktifliğini koruduğunu belirlemişlerdir [67].

2002 yılında Yinghui D. ve arkadaşları *Panus conchatus*' tan elde edilen lakkazı, N-hidroksisüksimid ile aktifleştirilmiş karboksillenmiş polivinil alkole kovalent bağlama ile immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon için optimum pH

yı 3,2 ve sıcaklığı 40 °C, süreyi 12 saat olarak bulmuşlardır, İmmobilize lakkazın 10 kez kullanımda aktifliğinin % 60' ını koruduğunu belirtmişlerdir. [68].

2002 yılında Al-Adhami, A.J.H. ve arkadaşları üç farklı beyaz çürükçül mantardan (*Trametes versicolor*, *Cerrena unicolor* ve *Heterobasidin annosun*), elde ettikleri lakkazı DEAE-Granocel 500, CM-Granocel ve akrilik taşıyıcılara kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. Siringaldazin substratı kullanarak *Cerrena unicolor'* dan elde edilen lakkazın optimum aktiflik gösterdiği pH yı 5,2, DEAE-Granocel üzerine immobilize edilmiş lakkazda ise optimum pH yı 5,0 olarak, optimum sıcaklığı ise serbest enzim ve immobilize enzim için 40 – 55 °C olarak bulmuşlardır. İmmobilize lakkazın 4 °C de 4 ay depolandığında aktifliğinin %90 ını koruduğunu tespit etmişlerdir [69].

2003 yılında Zamora, P.P. ve arkadaşları menşei *Trametes versicolor* olan lakkazı, silika temelli bazı destek materyallerine kovalent bağlama ve adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişler ve immobilize enzimle çeşitli boyar maddelerin renk giderimi üzerine çalışmalar yapmışlardır [70].

2004 yılında Quan, D. ve arkadaşları aktiveleştirilmiş platin elektrot üzerine lakkazı kovalent bağlamış ve biyosensör olarak kullanmış ve karakterizasyonunu incelemişlerdir. Bu çalışmada ayrıca platin yüzeyine immobilize edilmiş lakkazın K_m sabitini 85 μ M olarak bulmuşlardır [71].

2004 yılında Dodor, D. E. ve arkadaşları *Trametes versicolor'* dan elde edilen lakkazı kaolinit üzerine immobilize etmişler, İmmobilize enzim için optimum pH yı 4,5 olarak belirlemişlerdir. Asidik bileşiklerde serbest enzimin aktifliğinin %97 den fazlasını kaybettiğini, immobilize enzimin aktifliğini ise %40 ından fazlasının korunduğunu tespit etmişler, serbest enziminin optimum sıcaklığını 40 °C, immobilize enzimin ise 60 °C olduğunu bulmuşlardır. 4 °C de 4 ay depolandığında serbest enzimin aktifliğinin %90

ını koruduğunu, immobilize enzimde ise 4 °C de 90 gün depolama sonunda aktifliğinde kayıp olmadığını belirlemişlerdir. ABTS kullanıldığında K_m değerini serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 0,262 mM ve 0,165 mM olarak bulmuşlardır. Ayrıca immobilize enzimle PAHs (polisiklik aromatik hidro karbonlar; piren benzopiren benzoantrasen gibi...) uzaklaştırma çalışmaları yapmışlardır [72].

2004 yılında Quan,D. ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada silan ile modifiye edilmiş platin elektrot üzerine *Corilus hirsutus* 'dan elde edilen lakkazı kovalent bağlama yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Başka bir çalışmalarında ise lakkazı camı karbon elektrot üzerine kovalent bağlayarak immobilize etmişlerdir. Platin elektrot üzerine immobilize edilmiş lakkazın optimum sıcaklığını 60 °C olarak belirlemişlerdir. Substrat olarak ABTS, PPD (p-fenilendiamin) ve PAP (p-aminofenol) kullanıldığında optimum pH ları sırasıyla 3,5, 6,0 ve 5,0-5,5 olarak bulmuşlardır [73].

2005 yılında Aroujo, J.H. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Pleureatus ostreatus*, *Botryosphaeria sp*' dan elde edilen lakkazı ve *Aspergillus sp*' den elde edilen ticari lakkazı adsorpsiyon yöntemi ile kitosan üzerine immobilize etmişler, ABTS ve DMP olarak iki substrat kullanarak enzim aktifliğini araştırmışlardır. En yüksek aktifliğe 1.0 mg/ml *Botryosphaeria sp*' den elde edilen enzimatik lakkaz ve 1g destek kullanarak ulaşmışlardır. Bu işlem beyaz şarapta istenilmeyen fenolik bileşiklerin giderilmesi için uygulanmıştır [74].

2006 yılında Yang, Y. ve arkadaşları *Rhus vernicifera* 'dan elde edilen lakkazı glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünen kitosan, kitosan mikroküreler ve Fe^{+3} geçiş metali kelatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Substrat olarak ABTS, hidroksibenzotriazol (HBT), 3-hidroksiantranilik asit kullanmışlar. Kitosan üzerinde %56 immobilizasyon, mikroküreler üzerinde ise %70 immobilizasyon elde etmişlerdir. Immobilize lakkaz için optimum pH yı 8,0, optimum sıcaklığı ise 45 °C olarak belirlemişlerdir. 4 °C de 3 ay sonunda kelat üzerine immobilize edilmiş enzim

ve suda çözünen kitosan üzerine immobilize edilmiş enzimin aktifliğinin %10 unu kaybettiğini , mikro küreler üzerine immobilize edilmiş enzimin ise aktifliğinin %15 ini kaybettiğini bulmuşlar, ayrıca 15 kullanımdan sonra ise suda çözünebilen kitosan üzerine immobilize edilmiş enzim aktifliğinin % 80 ini , kelat üzerine immobilize edilmiş enzimin aktifliğinin ise % 85 ini koruduğunu tespit etmişlerdir [75].

2006 yılında Hu, X. ve arkadaşları *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile nanopartiküller (hegzagonal mezogözenekli silika) ve kaolinit üzerine immobilize etmişlerdir. Substrat olarak ABTS yi kullanmışlardır. Kaolinit üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş enzimin optimum pH sı 5,5 optimum sıcaklığı 50 °C, kaolinit ve nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiş enzimin ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilmiş enzimin optimum pH sınırı 6,0 optimum sıcaklığını ise 45 °C olarak belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada immobilize enzimin ısı kararlılıklarının serbest enzime göre daha iyi olduğunu bulmuşlardır [76].

2006 yılında Xiao,H. ve arkadaşları *Pcynoporus sanguineus*' dan elde edilen lakkazı gutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile amin sonlu nanokompozitler (Cu TPAC)-Fe₃ O₄, bakır tetraamin ftalosiyanın) üzerine iki basamaklı reaksiyon üzerinden immobilize etmişlerdir. Birinci basamakta çapraz bağlanma koşulları ikinci basamakta ise enzimin nanokompozitlere kovalent bağlanması koşulları incelenmiştir. Ayrıca lakkazın 5 kez art arda kullanımından sonra aktifliğinin % 80 ini koruduğunu tespit etmişlerdir [77].

2006 yılında Zawisza, I. ve arkadaşları *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkazı altın elektrotlar üzerine biriktirilen terametoksilan' dan oluşturulan ince hidrofilik silika jelde mikrokapsülleme yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin maksimum performans gösterdiği pH yı 4,2 – 5,2 , sıcaklığı ise 40 – 50 °C olarak tayin etmişler ve bu çalışmada hidrofilik silika

filmlerinde immobilize edilen lakkazın biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerinin serbest lakkazla aynı olduğunu bulmuşlardır [78].

3. DENEYSEL KISIM

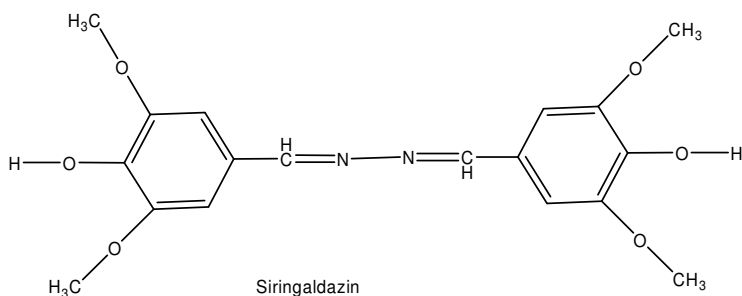
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Lakkaz : (EC 1.10.3.2. 27,5 U/mg, *Trametes Versicolor*' dan elde edilen): Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.

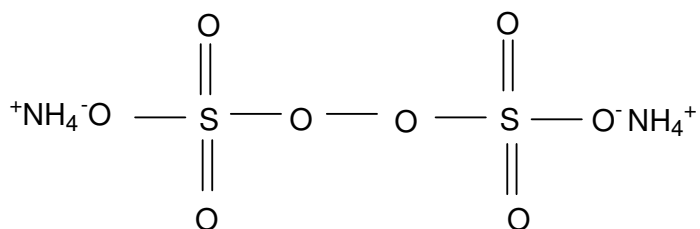
N,N'-Metilen-bis-akrilamit: ($C_7H_{10}N_2O_2$, MA:154,16 g/mol), Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.

Akrilamit : ($H_2C=CHCONH_2$, MA:71,0 g/mol) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin (Siringaldazin) : ($C_{18}H_{20}N_2O_6$, MA:360,3 g/mol) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



Amonyum persülfat : ($(NH_4)_2S_2O_8$, MA:228,19 g/mol) Analar (İngiltere) firmasından temin edildi.



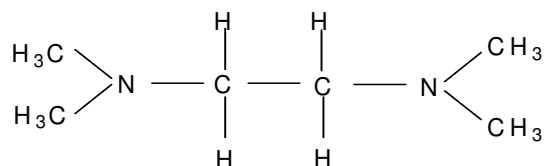
Etil alkol (Mutlak) : ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, MA:46,06 g/mol) Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edildi.

Fosforik asit: (H_3PO_4 , MA:98,0 g/mol) Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edildi.

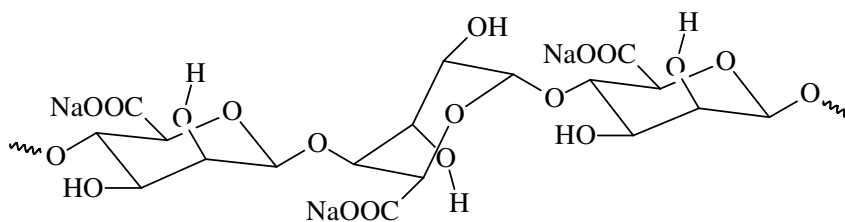
Sitrik asit : ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, MA:192,13 g/mol) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

Sodyum hidroksit: (NaOH , MA:40,0 g/mol) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED) : ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$, MA:116,21 g/mol) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.



Sodyum aljinat : Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



N-izopropil akrilamit : ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}$, MA:113,16 g/mol) Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.

3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. Sodyum hidroksit çözeltisi

8,0 g sodyum hidroksit deiyonize suda çözöldü, hacmi 100 mL ye tamamlandı (2,0 M).

3.2.2. Siringaldazin çözeltisi

0,0090 g siringaldazin mutlak etil alkol ile çözölererek hacmi 50 mL ye tamamlandı (0,5 mM).

3.2.3. Sitrat tamponu

2,104 g sitrik asit deiyonize suda çözölererek hacmi 250 mL ye tamamlandı. 2,0 M sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 5,3 e ayarlandı (0,04 M, pH: 5,3).

3.2.4. Fosfat tamponu

1,35 mL fosforik asit deiyonize suda çözölererek hacmi 500 mL ye tamamlandı. 2,0 M NaOH ile pH 6,5 e ayarlandı.

3.2.5. Lakkaz çözeltisi

0,0100 g lakkaz enzimi alınarak fosfat tamponu (0,04 M pH: 6,5) ile hacmi 100 mL ye tamamlandı. Hazırlanan enzim çözeltisinden 1 mL alınarak fosfat tamponu (0,04 M pH: 6,5) ile hacmi 10 mL e tamamlandı (0,01 mg/mL).

3.2.6. TEMED çözeltisi

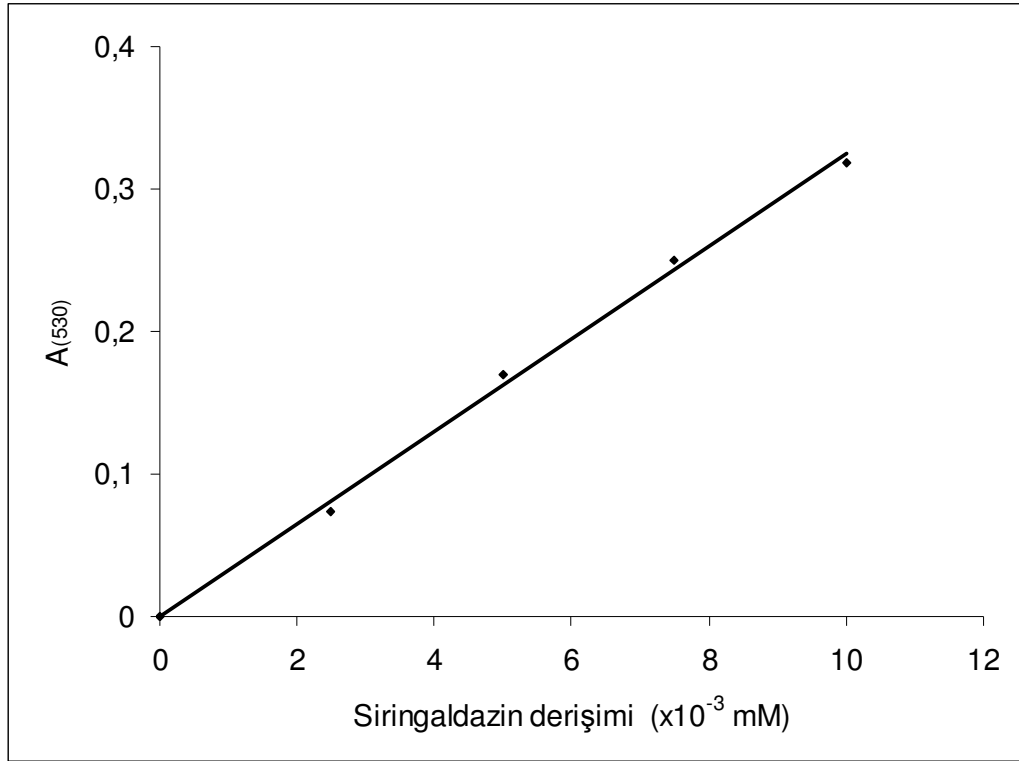
1 mL TEMED alınarak üzerine 4 mL fosfat tamponu (0,04 M, pH: 6,5) eklenerek % 20 lik çözeltisi hazırlandı.

3.3. Siringaldazin Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Siringaldazin kalibrasyon eğrisini hazırlamak amacıyla farklı derişimlerde (0,100mM, 0,075mM, 0,050mM, 0,025mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, tepkime balonuna 9 mL sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5.3) ve farklı derişimler de hazırlanan 1 mL siringaldazin çözeltisi eklendi.Çözeltilere 0,1 mL Lakkaz enzimi (0,01mg/mL) ilave edilerek tepkime balonları 10 dakika 25 C⁰ deki çalkalamalı su banyosunda tutulduktan sonra çıkarılarak 12. dakikada UV-görünür bölge spektrofotometresi (Shimadzu Pharmaspec 1700) kullanılarak 530 nm dalga boyunda absorbsansları okundu. Siringaldazin derişimlerine karşılık gelen absorbsans değeri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği hazırlandı (Çizelge 3.1, Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Siringaldazin derişimi ile absorbsansın değeri

Siringaldazin derişimi (x10 ⁻³ mM)	Absorbsans değeri (ΔA_{530})
0,0	0,000
2,5	0,074
5,0	0,170
7,5	0,250
10,0	0,318



Şekil 3.1. Siringaldazin kalibrasyon eğrisi

3.4. Enzim İmmobilizasyonu

3.4.1. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde enzim immobilizasyonu

Lakkaz enzimi poliakrilamit-sodyum aljinat, (P(AAm)-NaAlj) yarı-iç içe geçmiş ağ yapılı hidrojeline hapsedme yöntemi ile immobilize edildi. 0,05 g sodyum aljinat 22 mL fosfat tamponunda (0,04 M, pH: 6,5) çözöldü. Bu çözeltiye 0,05g Lakkaz enzimi ilave edilerek çözünme sağlanana kadar karıştırma işlemine devam edildi. Bu çözeltiye sırası ile 2,85 g akrilamit , 0,15 g çapraz bağlayıcı N,N'-metilen-bis-akrilamit ve 0,03 g amonyum persölfat (APS) eklenerek homojen bir karışım elde edildi. Elde edilen çözeltiye 50 µL TEMED (%20v/v) çözeltisinden eklenip 5 dakika karıştırıldıktan sonra etanol ile yıkanmış plastik tüplerde oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek elde edilen silindirik hidrojeller kesilerek, 4 °C de buzdolabında saklandı.

3.4.2. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojeline enzim immobilizasyonu

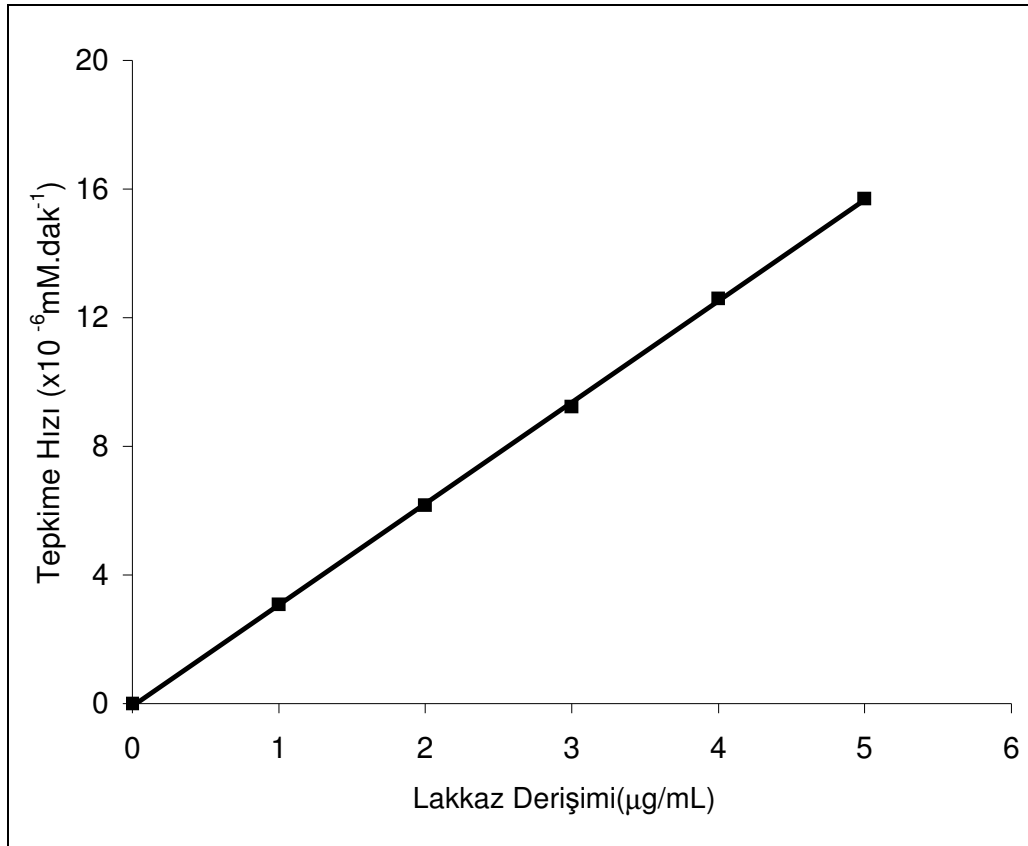
Lakkaz enzimi poliakrilamit-N-izopropil akrilamit-sodyum aljinat, (P(AAm-NİPA)-NaAlj) yarı-iç içe geçmiş ağ yapılı hidrojeline hapsedme yöntemi ile immobilize edildi. 0,05 g sodyum aljinat 11 mL fosfat tamponunda (0,04 M, pH: 6,5) çözüldü. Bu çözeltiye 0,05g Lakkaz enzimi ilave edilerek çözünme sağlanana kadar karıştırma işlemine devam edildi. Bu çözeltiye sırası ile 3 mL akrilamit (%50w/v), 1,485 g N-izopropil akrilamit (NİPA), 6 mL çapraz bağlayıcı N,N'-metilen-bis-akrilamit (%2,5w/v) ve 0,2 mL amonyum persülfat (APS) (%20w/v) eklenerek homojen bir karışım elde edildi. Elde edilen çözeltiye 50 µL TEMED (%20v/v) çözeltisinden eklenip 5 dakika karıştırıldıktan sonra etanol ile yıkanmış plastik tüplerde oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek elde edilen silindirik hidrojeller kesilerek, 4 °C de buzdolabında saklandı.

3.4.3.Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojeline enzim immobilizasyonu

Lakkaz enzimi poliakrilamit-N-izopropil akrilamit, (P(AAm-NİPA) yarı-iç içe geçmiş ağ yapılı hidrojeline hapsedme yöntemi ile immobilize edildi. 11 mL fosfat tamponu (0,04 M, pH: 6,5) üzerine 0,05g Lakkaz enzimi ilave edilerek çözünme sağlanana kadar karıştırma işlemine devam edildi. Bu çözeltiye sırası ile 3 mL akrilamit (%50w/v), 1,485 g N-izopropil akrilamit (NİPA), 6 mL çapraz bağlayıcı N,N'-metilen-bis-akrilamit (%2,5w/v) ve 0,2 mL amonyum persülfat (APS) (%20w/v) eklenerek homojen bir karışım elde edildi. Elde edilen çözeltiye 65 µL TEMED çözeltisinden eklenip 5 dakika karıştırıldıktan sonra etanol ile yıkanmış plastik tüplerde oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek elde edilen silindirik hidrojeller kesilerek, 4 °C de buzdolabında saklandı.

3.5. Lakkaz Derişimi ile Tepkime Hızının Değişimi

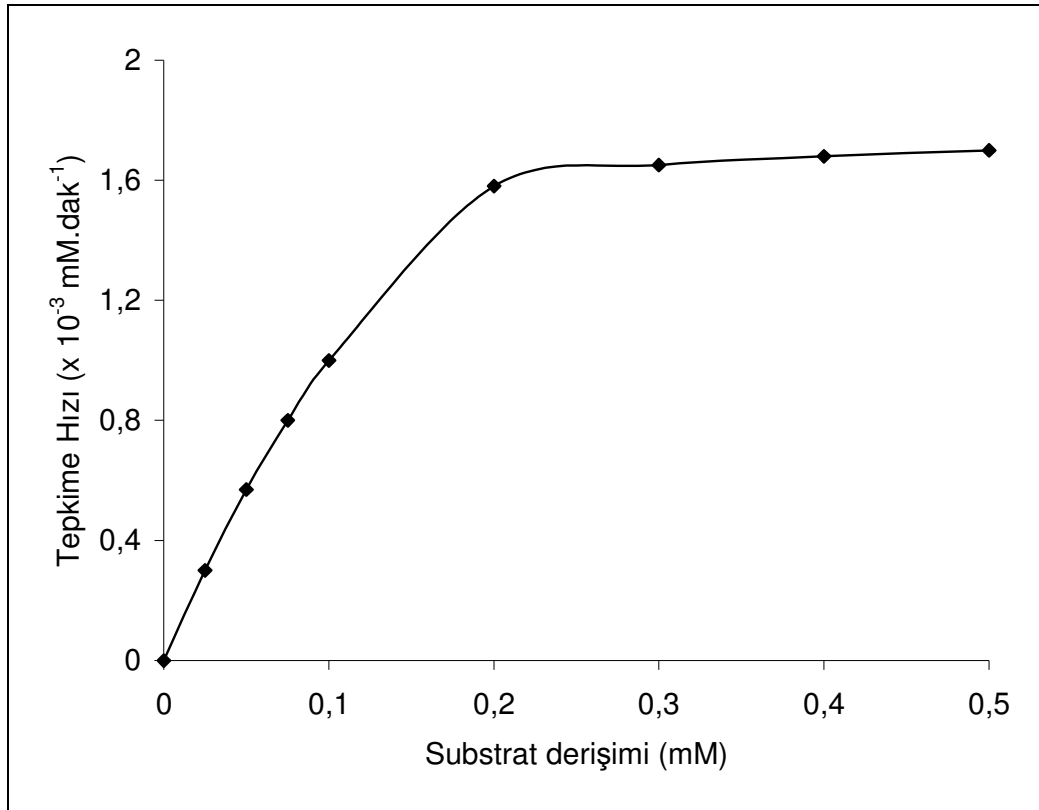
Enzim derişiminin absorbansa etkisini incelemek amacı ile Bölüm 3.2.5' te anlatıldığı gibi lakkaz enzimi çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan lakkaz enzimi çözeltilerinden farklı hacimlerde (0,1-0,5 mL) alınarak 1 mL siringaldazin (0,1 mM) ilave edildi ve sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5,3) ile hacimleri 10 mL' ye tamamlandı. 530 nm de absorbans değerleri okundu ve tepkime hızları hesaplandı. Tepkime hızının enzim derişimiyle değişimi Şekil 3.2' de verildi. Aktivlik yani tepkime hızının lakkaz derişimi ile doğrusal olarak değiştiği görüldü.



Şekil 3.2. Tepkime hızının lakkaz derişimi ile değişimi

3.6. Substrat Derişimi ile Tepkime Hızının Değişimi

Siringaldazin derişiminin tepkime hızına etkisini incelemek amacıyla farklı derişimde (0,025 mM – 0,3 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.7.1.'de anlatılan yöntemle göre aktiflikler tayin edildi ve tepkime hızları hesaplandı. Tepkime hızının substrat derişimi ile değişimi Şekil 3.3' de gösterildi. Aktiflik tayininde lakkaz çözeltisinin derişimi 0,01 mg/mL, siringaldazin çözeltisinin derişimi 0,1 mM olarak alındı.



Şekil 3.3. Tepkime hızının substrat derişimi ile değişimi

3.7. Aktiflik Tayini

3.7.1. Serbest enzimin aktiflik tayini

Serbest lakkazın aktiflik tayini Leonowicz ve Grzywnowicz tarafından verilen yönteme göre yapıldı [79]. Aktiflik tayininde 9 mL sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5,3)  zerine 1 mL siringaldazin çözeltisi (0,1 mM) ve 0,1 mL lakkaz çözeltisi (0,01 mg/mL) eklenerek tepkime başlatıldı. Çözelti çalkalamalı su banyosunda 25  C da 10 dakika çalkalandı ve 12. dakikada 530 nm de absorbens değeri     ld . Tepkime hızı,     len absorbens değerleri ve kalibrasyon eğrisinin eğiminden ($\Delta A_{530}/\Delta c$) faydalanarak aşağıdaki bağıntıya göre hesaplandı.

$$\text{Hız (V)} = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{530}}{\Delta t} \times \frac{\Delta C}{\Delta A_{530}}$$

Bu eşitlikte ΔC , mM olarak siringaldazin deşi imindeki, ΔA_{530} ($A_0 - A_t$) absorbanstaki, Δt zamandaki değişimi gösterir. Bütün aktiflik tayinlerinde deneyler iki kere yapıldı ve     mler iki kere okundu ve ortalamaları alındı.

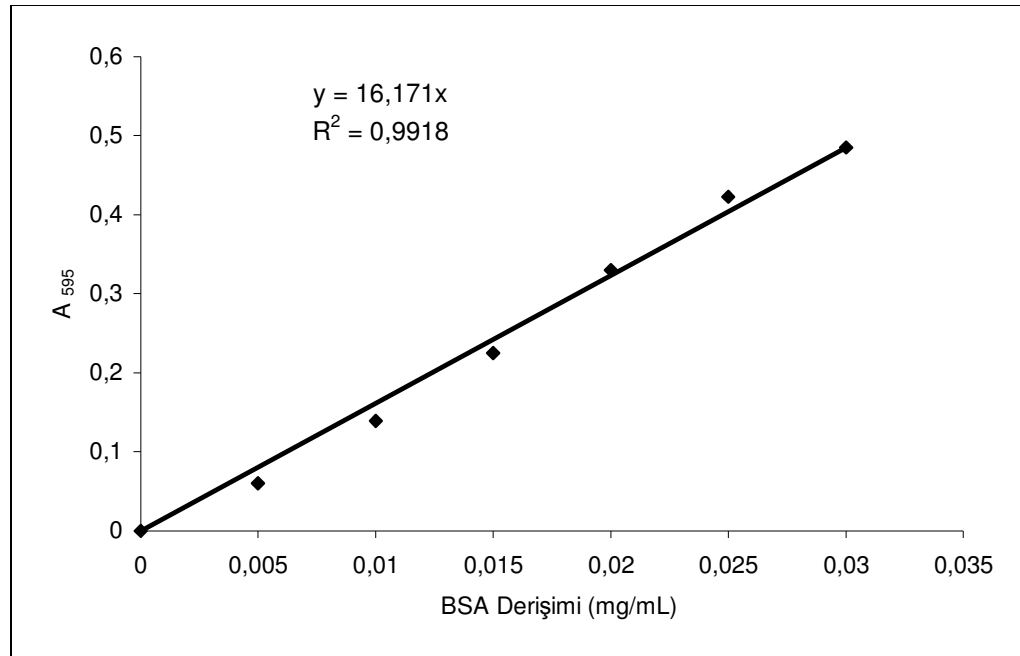
3.7.2. İmmobilize enzimin aktiflik tayini

İmmobilize lakkazın aktiflik tayini için 0,05 g ((P(AAm)-NaAlj), (P(AAm-NİPA)-NaAlj), (P(AAm)-NİPA)) immobilize lakkaz enzimi üzerine 9 mL sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5,3), 1 mL siringaldazin çözeltisi (0,1 mM) eklendi. Karışım çalkalamalı su banyosunda 25  C da 10 dakika çalkalandı ve 12. dakikada absorbens değerleri     ld .     len absorbens değerlerinden aktiflikler Bölüm 3.7.1' de anlatıldığı gibi hesaplandı.

3.8. Tutuklanan Enzim Miktarı Tayini

Tutuklanan enzim miktarının tayini Bradford yöntemine göre yapıldı [80]. Bovin Serum Albumin (BSA) kalibrasyon eğrisi oluşturmak için değişik hacimlerde (5-40 μL) BSA (0,5 mg/mL) çözeltileri üzerine sırası ile 100 μL sodyum klorür(0,15 M) ve 1000 μL Bradford Reaktifi eklenerek çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin oda sıcaklığında 2 dakika bekletildikten sonra 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri (UV-Görünür Spektrofotometre, Hitachi U 1800) okundu. Derişime karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek BSA kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 3.4).

0,05 g P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj, P(AAm-NİPA) hidrojelleri 2-3 kere fosfat tamponu (0,04M, pH:6,5) ile yıkanarak, süzüntünün hacmi fosfat tamponu (0,04M, pH:6,5) ile 1000 μL ' ye tamamlandı. Süzüntüden 100 μL örnekler alınarak üzerine 100 μL sodyum klorür ve 1000 μL Bradford Reaktifi ilave edilerek absorbans değerleri okundu.



Şekil 3.4. BSA kalibrasyon eğrisi

3.9. Enzim Aktifliğine pH Etkisi

3.9.1. Serbest enzim aktifliğine pH etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine pH'nın etkisini belirleyebilmek amacıyla farklı pH'larda (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) fosfat tamponları hazırlandı. Her bir pH'da aktiflik Bölüm 3.7.1' de anlatılan yöntemle göre tayin edildi. Tepkime süresince, sıcaklık (25 °C) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

3.9.2. İmmobilize enzim aktifliğine pH etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla 0,05 g P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj, P(AAm-NİPA) immobilize lakkaz enzimleri ve farklı pH'larda (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) fosfat tamponları hazırlanarak, her bir pH'da aktiflik tayini Bölüm 3.7.2'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince, sıcaklık (25 °C) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

3.10. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

3.10.1. Serbest enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi farklı sıcaklıklarda (25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 80 °C) araştırıldı. Her bir sıcaklık için aktiflik tayini Bölüm 3.7.1' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

3.10.2. İmmobilize enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile 0,05 g P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj, P(AAm-NİPA) immobilize lakkaz enzimleri hazırlanarak farklı sıcaklıklarda (25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 80 °C) aktiflik tayini Bölüm 3.7.2' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

3.11. Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

3.11.1. Serbest enzimin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 4 farklı derişimde (0,025 mM, 0,050 mM, 0,075 mM, 0,100 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 3.7.1.'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu.

3.11.2. İmmobilize enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 0,05 g P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj, P(AAm-NİPA) immobilize lakkaz enzimleri ve 4 farklı derişimde (0,025 mM, 0,050 mM, 0,075 mM, 0,100 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 3.7.2' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu.

3.12. Enzim Aktifliğine Depolanma Süresinin Etkisi

3.12.1. Serbest enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için 0,04 M, pH 6,5 fosfat tamponunda, 0,01 mg/mL derişiminde enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti buzdolabında 4 °C da saklandı ve bu çözeltiden belirli aralıklarla (0.,3., 9., 15., 20., 28., 35., 39., 46., 52., 58., 65. gün) 0,1 mL örnek alınarak Bölüm 3.7.1.'de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu.

3.12.2. İmmobilize enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla hazırlanan P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj, P(AAm-NİPA) immobilize hidrojeller buzdolabında 4 °C da saklandı. Bu hidrojellerden belirli aralıklarla (0.,7.,14.,21.,28.,35.,42.,49.,56.gün) 0,05 g örnek alınarak Bölüm 3.7.2.'de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu.

3.13. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

İmmobilize lakkazın tekrar kullanılabilirliğini incelemek için 1 günde 10 kez tekrar kullanıldı. Bu amaçla 0,05 g (P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj, P(AAm-NİPA) immobilize lakkazın Bölüm 3.7.2' de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Tutuklanan Enzim Miktarı Tayini

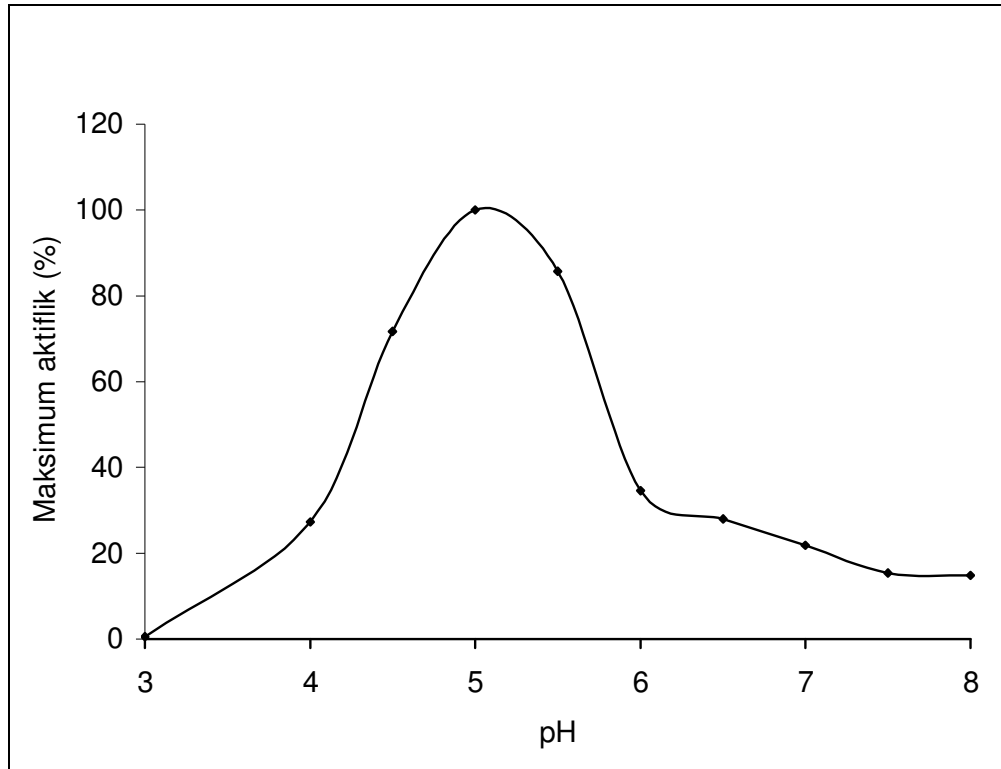
P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj, P(AAm-NİPA) hidrojellerinde tutuklanan lakkaz molarları BSA kalibrasyon eğrisinden sırasıyla $1,28810^{-3}$ mg/mL, $1,32910^{-3}$ mg/mL ve $1,37510^{-3}$ mg/mL olarak okundu ve tutuklanan enzim yüzdeleri yaklaşık %98 olarak bulundu. Literatürde, *Phlebia radiata* 'dan elde edilen lakkaz kovalent bağlanma yöntemi ile gözenekli cam üzerine immobilize edildiğinde tutuklanan enzim yüzdesini %98 olarak bulunmuştur [64]. *Rhus vernicifera* 'dan elde edilen lakkazı glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünabilen kitosan, kitosan mikroküreler ve Fe^{+3} geçiş metali kelatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde kitosan üzerinde %56 immobilizasyon, mikroküreler üzerinde ise %70 immobilizasyon elde edilmiştir [75].

4.2. Serbest Enzim Aktivliğine pH nın Etkisi

Serbest lakkaz aktivliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla çeşitli pH'larda Bölüm 3.6.1' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktivlik değerleri Çizelge 4.1' de verildi. Serbest lakkaz enzimi için optimum pH 5,0 olarak bulundu ve maksimum aktivliğin pH ile değişimi Şekil 4.1' de gösterildi.

Çizelge 4.1. Serbest lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,003	0,07	1
4,0	0,150	3,85	27
4,5	0,394	10,11	71
5,0	0,550	14,11	100
5,5	0,471	12,09	86
6,0	0,190	4,88	35
6,5	0,154	3,95	28
7,0	0,120	3,07	22
7,5	0,075	1,92	13
8,0	0,082	2,10	15



Şekil 4.1. Serbest lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

Literatürde menşei farklı olan lakkaz ve farklı substratlar kullanıldığında optimum pH'nın 5,0-6,3 arasında değiştiği belirtilmiştir [66,69].

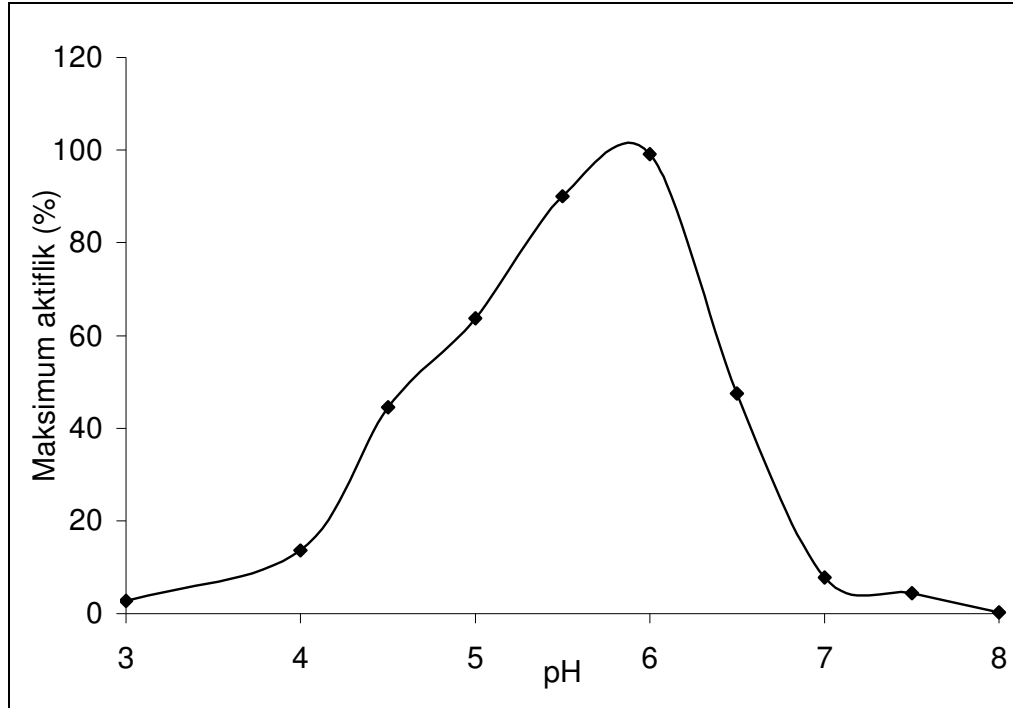
4.3. İmmobilize Enzim Aktifliğine pH'nın Etkisi

4.3.1 Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi

P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.6.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.2' de verildi. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 6,0 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.2' de gösterildi.

Çizelge 4.2. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,027	0,7	3
4,0	0,135	3,5	14
4,5	0,441	11,3	44
5,0	0,630	16,2	63
5,5	0,954	24,5	97
6,0	0,981	25,2	100
6,5	0,470	12,1	48
7,0	0,077	1,9	8
7,5	0,044	1,1	4
8,0	0,003	0,7	3



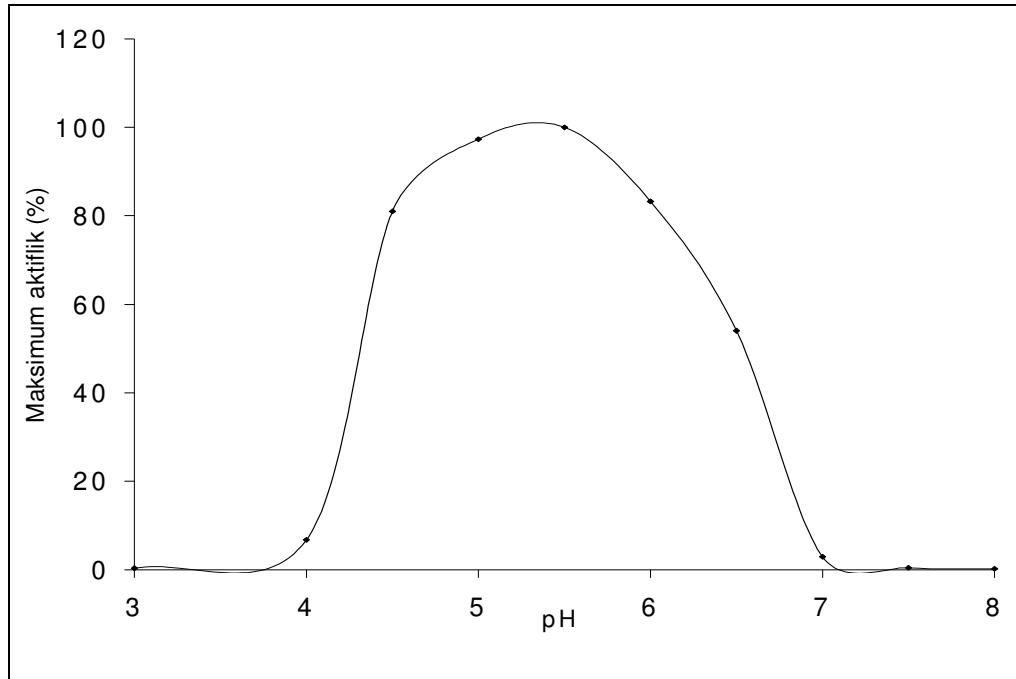
Şekil 4.2. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

4.3.2 Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize lakkaz enzimi aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.6.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.3' de verildi. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,5 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.3' de gösterildi.

Çizelge 4.3. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,003	0,07	0
4,0	0,060	1,54	7
4,5	0,720	18,47	81
5,0	0,865	22,19	97
5,5	0,889	22,81	100
6,0	0,740	18,98	83
6,5	0,480	12,31	54
7,0	0,006	0,15	1
7,5	0,004	0,10	0
8,0	0,001	0,05	0



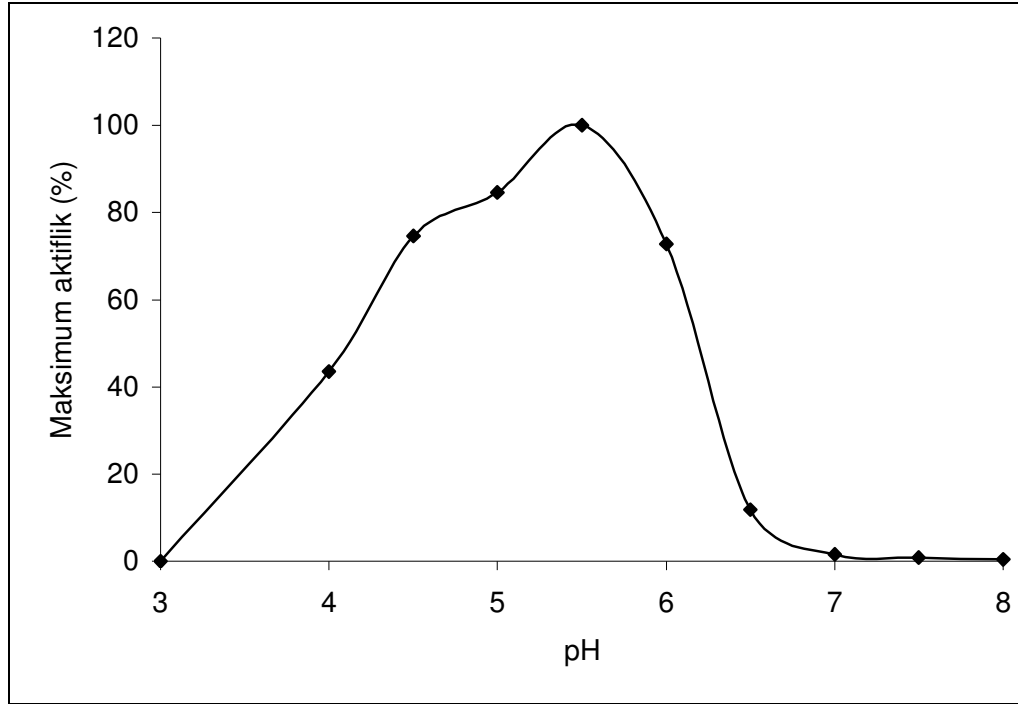
Şekil 4.3. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişim

4.3.3. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi

P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.6.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.4' de verildi. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,5 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.4' de gösterildi.

Çizelge 4.4. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,000	0,0	0
4,0	0,424	10,8	43
4,5	0,727	18,6	75
5,0	0,825	21,1	85
5,5	0,975	25,0	100
6,0	0,710	18,2	73
6,5	0,115	2,9	11
7,0	0,009	0,2	1



Şekil 4.4. P(AAm-NiPA) hidrojelinde immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

Literatürde adsorpsiyon yöntemi ile gözenekli cam boncuklar üzerine immobilize edilen lakkazın optimum pH sınırının 5,7 olduğu tespit edilmiştir [60]. Adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile karbon fiber mikro elektrotlar üzerine immobilize edilen lakkazın optimum pH sı 5,0 olarak bulunmuştur [67]. Adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile lakkaz nanopartikül (hegzagonal mezogözenekli silika) ve kaolinit üzerine immobilize edilmiş ve substrat olarak ABTS kullanılmıştır. Kaolinit üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilen enzimin optimum pH sı 5,5, kaolinit ve nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen enzimin ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimin optimum pH sı 6,0 olarak bulunmuştur [76]. Çalışmamızda bulunan sonuçlar ile literatürde bulunan sonuçlar birbirine yakındır.

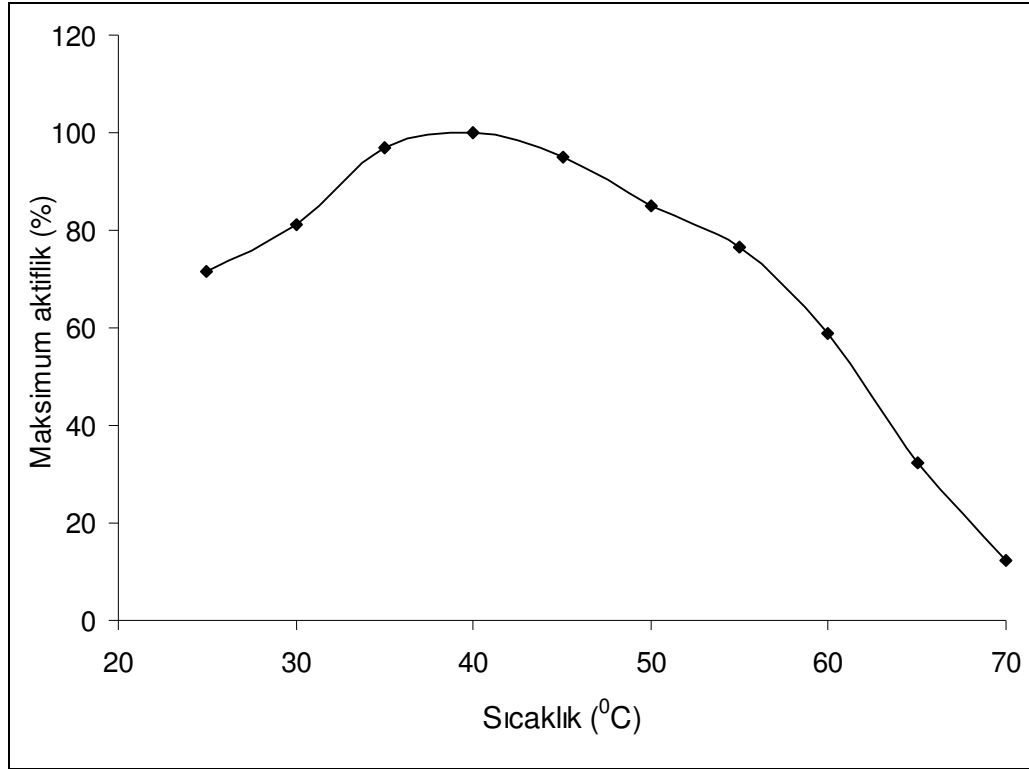
4.4. Serbest Enzim Aktivliğine Sıcaklığın Etkisi

Serbest enzimin aktifliğinin üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.7.1'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.5' de verildi. Serbest enzim için optimum sıcaklık 40°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.5' de gösterildi.

Serbest enzim için optimum sıcaklık 40 °C bulundu, bu sıcaklığın altındaki ve üstündeki sıcaklıklarda enzim aktifliğinde azalmalar gözlemlendi. Bütün kimyasal tepkimelerde olduğu gibi enzimatik tepkimelerde de tepkime hızı sıcaklıkla artar. Ancak yüksek sıcaklıklara çıkıldığında enzim yapısında meydana gelen denatürasyon nedeni ile aktiflikte düşüş gözlenir [14]. Sıcaklık arttıkça enzim molekülünün önce tersiyer yapısı, sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapısı) bozulur. Bu olaylardan enzimin aktif merkezi de etkilenir ve enzim aktifliğini yitirir [45].

Çizelge 4.5. Serbest enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
25	0,417	10,70	71
30	0,475	12,20	81
35	0,565	14,50	97
40	0,584	15,00	100
45	0,555	14,20	95
50	0,497	12,80	85
55	0,496	11,40	76
60	0,344	8,80	59
65	0,189	4,80	32
70	0,071	1,80	12



Şekil 4.5. Serbest enzimin maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

Literatürde *Cerena unicolor*'dan elde edilen lakkazın optimum sıcaklığı 40 °C, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazın optimum sıcaklığının 40 °C olduğu bulunmuştur [69,72].

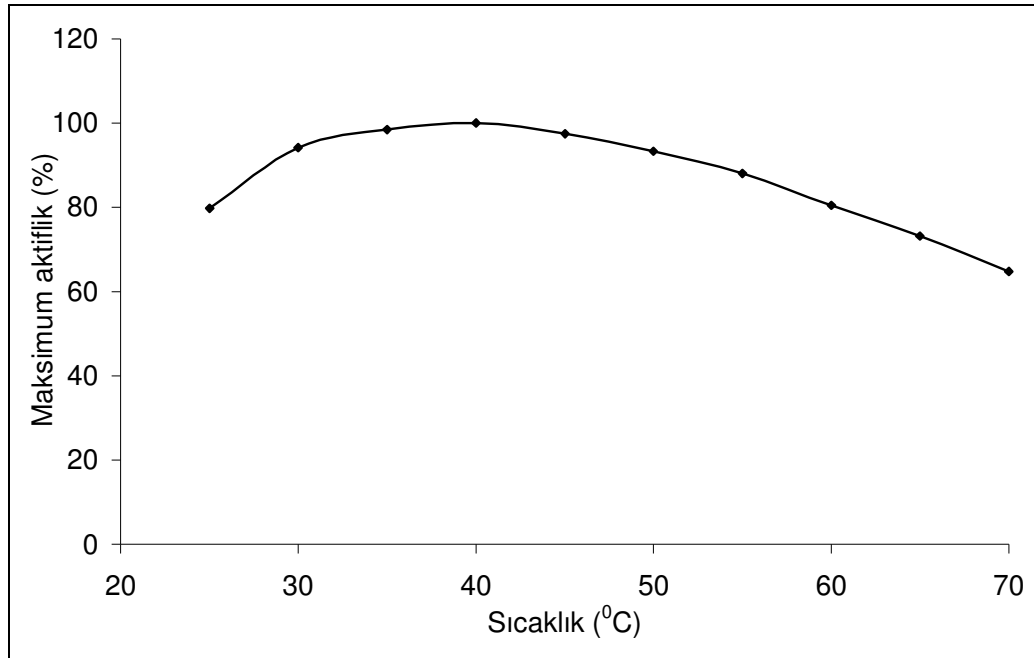
4.5. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

4.5.1. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 3.7.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.6' da verildi. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.6' da gösterildi.

Çizelge 4.6. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
25	0,783	20,10	80
30	0,924	23,70	94
35	0,959	24,60	98
40	0,981	25,10	100
45	0,956	24,50	97
50	0,915	23,50	93
55	0,863	22,10	87
60	0,790	20,30	80
65	0,718	18,40	73
70	0,635	16,30	64



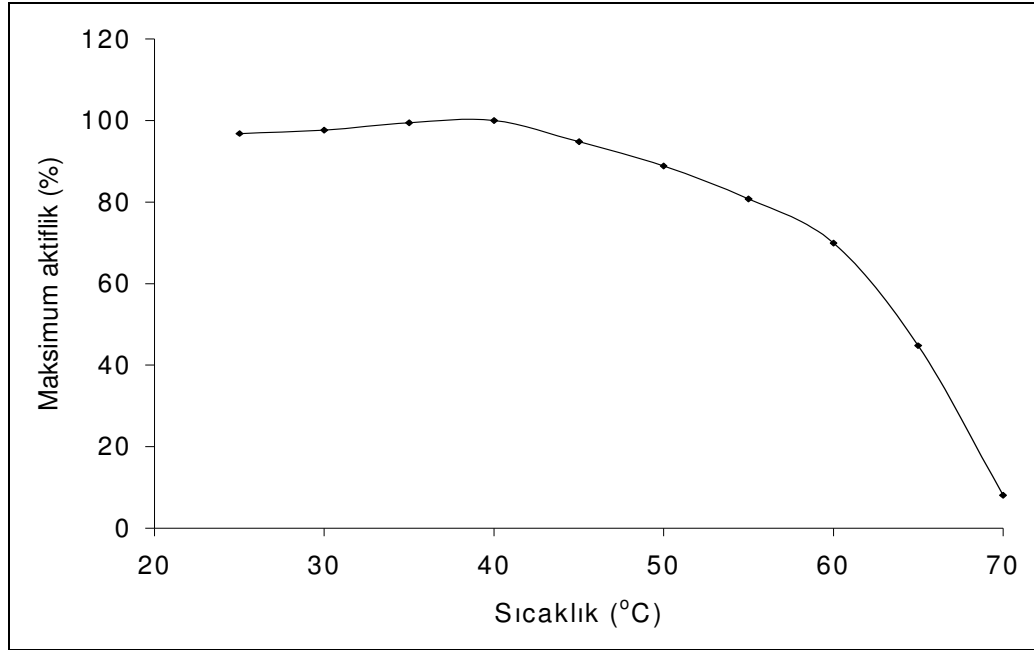
Şekil 4.6. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

4.5.2. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 3.7.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.7' de verildi. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.7' de gösterildi.

Çizelge 4.7. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
25	0,899	23,1	96
30	0,907	23,2	97
35	0,924	23,7	99
40	0,929	23,8	100
45	0,880	22,5	94
50	0,825	21,1	88
55	0,751	19,2	80
60	0,650	16,6	69
65	0,416	10,7	44
70	0,075	1,9	8



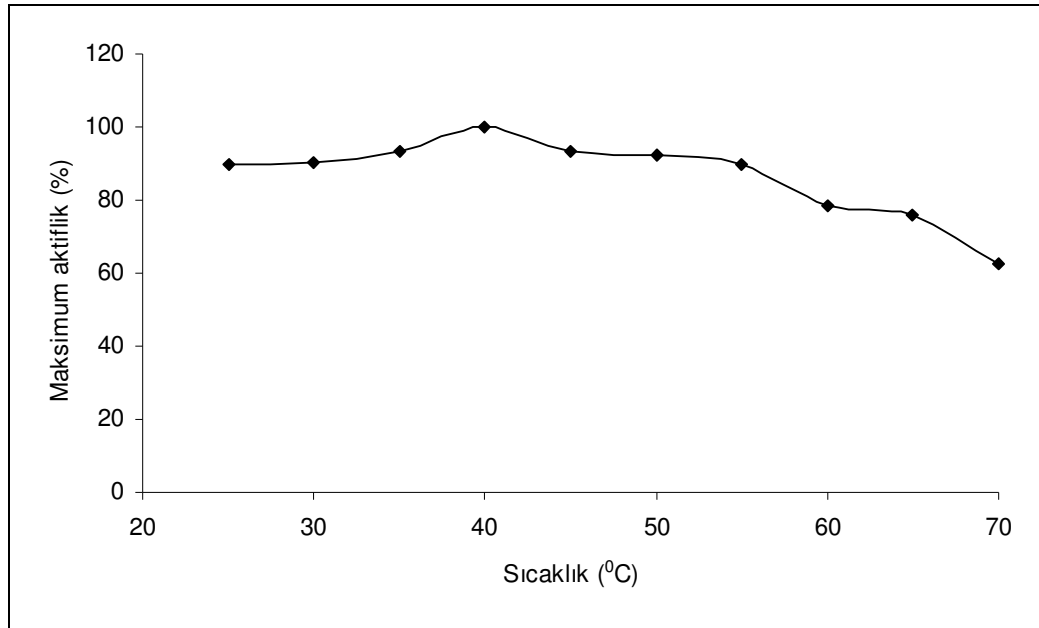
Şekil 4.7. P(AAm-NiPA)-NaAlj’ da immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

4.5.3. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojelinde immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

P(AAm)-NiPA hidrojelinde immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 3.7.2’ de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.8’ de verildi. P(AAm-NiPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.8’ de gösterildi.

Çizelge 4.8. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
25	0,824	21,1	89
30	0,830	21,3	90
35	0,861	22,0	93
40	0,920	23,6	100
45	0,859	22,0	93
50	0,847	21,7	92
55	0,825	21,2	90
60	0,721	18,5	78
65	0,699	17,9	76
70	0,575	14,7	62

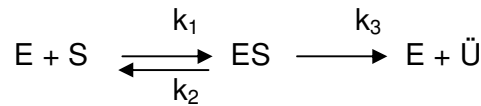


Şekil 4.8. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

Literatürde, kovalent bağlanma yöntemi ile Eupergit üzerine immobilize edilen lakkazın optimum sıcaklığı 50 °C olarak bulunmuştur [64]. Glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünebilen kitosan, kitosan mikroküreler ve Fe⁺³ geçiş metali kelatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilen lakkazın optimum sıcaklığı ise 45 °C olarak belirlenmiştir [75]. Kaolinit üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen lakkazın optimum sıcaklığı 50 °C, kaolinit ve nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen enzimin ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı 45 °C olarak belirlenmiştir [76]. Serbest enzim için bulunan optimum sıcaklık değeri literatürde bulunan değer ile aynı çıkmıştır.

4.6. Serbest Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

Enzim – substrat tepkimesi aşağıda verildiği gibi gösterilir



Bu eşitlikte; E enzimi, S substratı, ES enzim – substrat kompleksini, $\ddot{U}$ ürünü belirtir. Enzim tepkime hızı Michaelis – Menten Eşitliği ile verilir.

$$V_O = \frac{V_{\text{mak}} \times S}{K_m + S} \quad (4,1)$$

Bu mekanizmaya göre Michaelis-Menten sabiti aşağıda verilmiştir.

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (4,2)$$

V_O : Başlangıç hızı

V_{mak} : Maksimum hız

K_m : Michaelis-Menten sabiti

S: Substrat derişimi

Michaelis-Menten Eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk Eşitliği elde edilir:

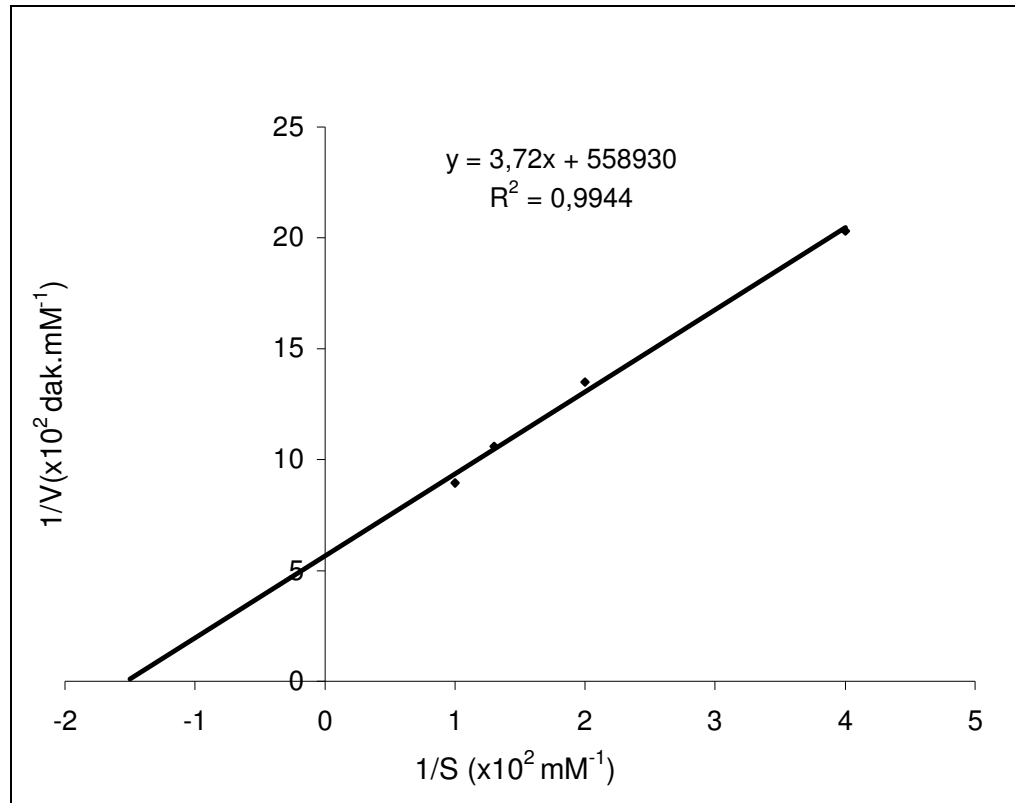
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{mak}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{mak}} \quad (4,3)$$

Lineweaver-Burk Eşitliğine göre, $1/S$ nin $1/V$ ye karşı çizilen grafiği bir doğru verir. Bu doğrunun y-kayması $1/V_{mak}$ değerini verir ve maksimum hız hesaplanır. Maksimum hız bulunduktan sonra eğimden (eğim= K_m/V_{mak}) veya x-kaymasından K_m hesaplanır.

Serbest lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 4 farklı derişimde (0,100-0,025 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 3.7.1' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu. Çizelge 4.9' da verilen $1/S$ ve $1/V$ değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.9.). Serbest enzimin K_m değeri $6,7 \times 10^{-3}$ mM ve V_{mak} değeri $1,8 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 4.9. Serbest enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM $^{-1}$)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM $^{-1}$)
10	1,0	0,436	11,12	8,94
7,5	1,3	0,368	9,44	10,60
5	2,0	0,288	7,39	13,50
2,5	4,0	0,192	4,93	20,30



Şekil 4.9. Serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiğı

Literatürde D'Annibale ve arkadaşları *Lentinula edodes*' ten elde edilmiş serbest lakkazın K_m değerini 0,07mM ve *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkaz için K_m 77 μ M olarak bulmuşlardır [62,63]. Yinghui ve arkadaşları

Panus conchatus' tan elde edilen lakkazın K_m ve V_{mak} değerlerini sırası ile 37×10^{-3} mM ve $5,9 \text{ mM.dak}^{-1}$ olarak bulmuşlardır [68].

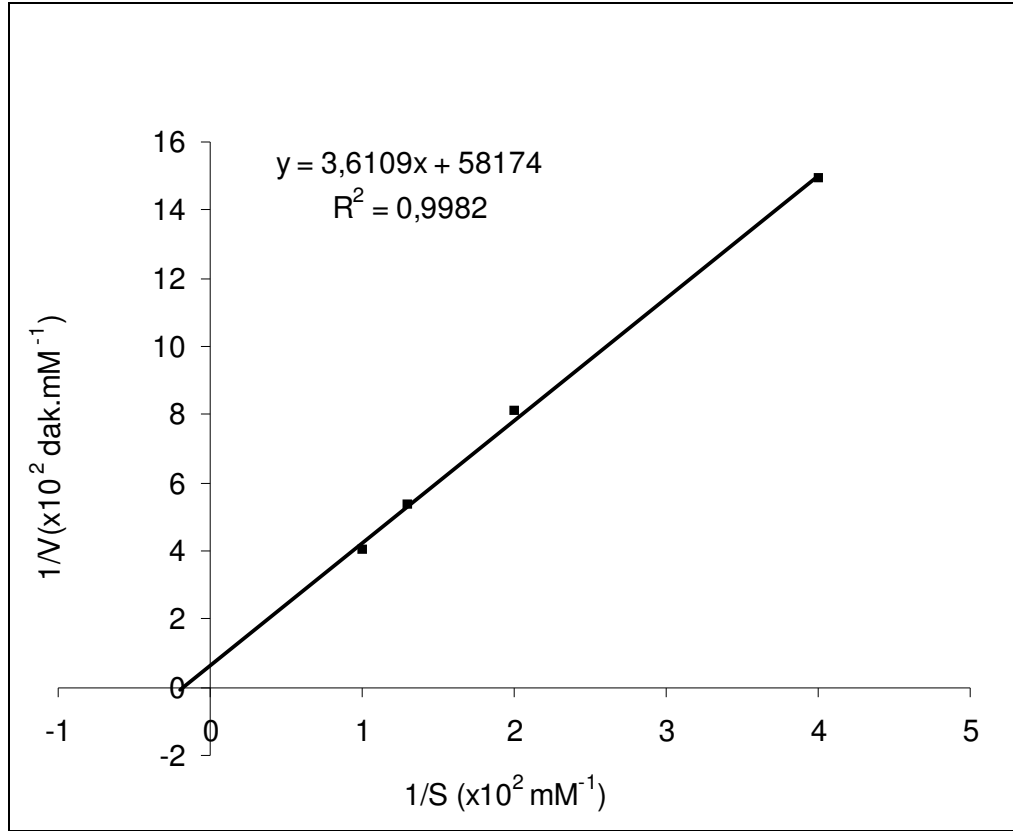
4.7. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

4.7.1. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 3.7.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 4.10' da verilen $1/S$ ve $1/V$ değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.10). P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için K_m değeri $6,2 \times 10^{-2}$ mM ve V_{mak} değeri $1,7 \times 10^{-2} \text{ mM.dak}^{-1}$ olarak bulundu.

Çizelge 4.10. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2 \text{ mM}^{-1}$)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4} \text{ mM.dak}^{-1}$)	1/V ($\times 10^2 \text{ dak.mM}^{-1}$)
10,0	1,0	0,965	24,76	4,04
7,5	1,3	0,729	18,70	5,35
5,0	2,0	0,481	12,34	8,11
2,5	4,0	0,261	6,69	14,93



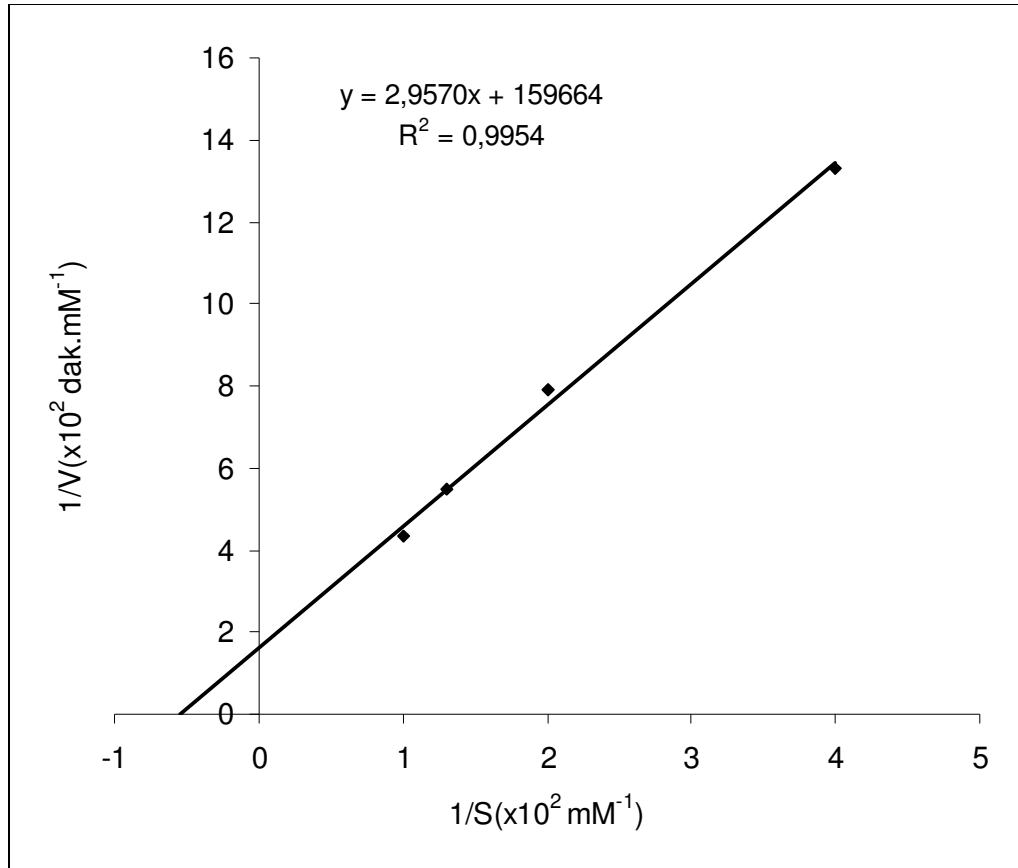
Şekil 4.10. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

4.7.2 Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 3.7.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu. Çizelge 4.11' de verilen $1/S$ ve $1/V$ değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.11). P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için, K_m değeri $1,9 \times 10^{-2}$ mM ve $V_{\max}$ değeri $6,3 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 4.11. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM $^{-1}$)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM $^{-1}$)
10,0	1,0	0,896	22,99	4,34
7,5	1,3	0,712	18,26	5,47
5,0	2,0	0,493	12,65	7,9
2,5	4,0	0,293	7,51	13,3



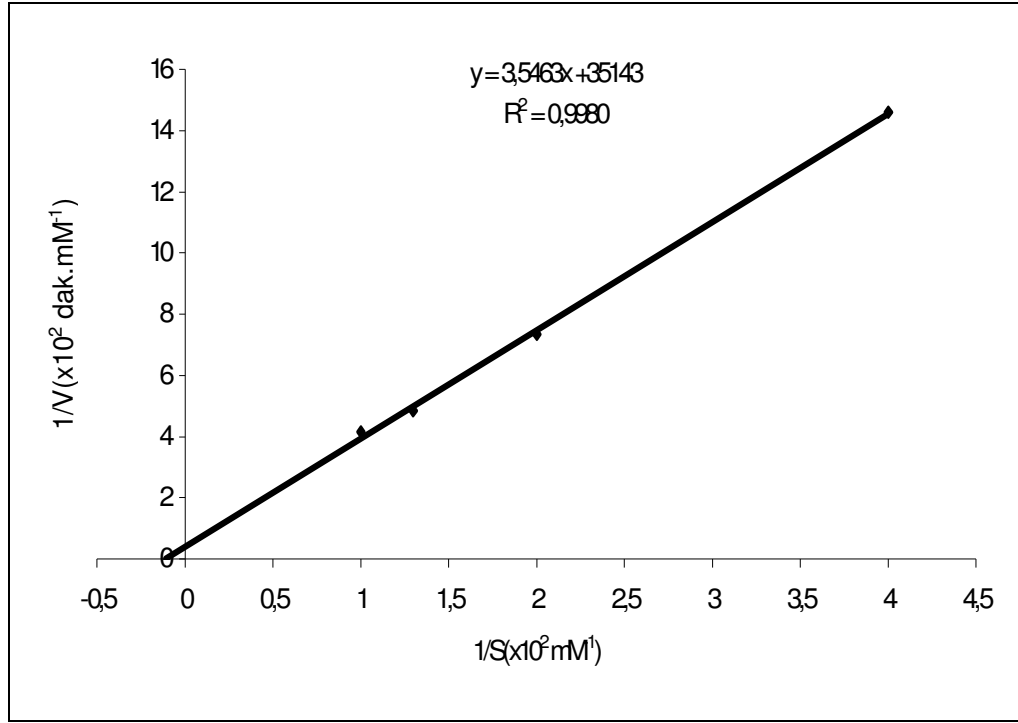
Şekil 4.11. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiğı

4.7.3. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 3.7.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu. Çizelge 4.12' de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.12). P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için, K_m değeri 0,1 mM ve V_{mak} değeri $2,9 \times 10^{-2}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 4.12. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM ⁻¹)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM ⁻¹)
10,0	1,0	0,936	22,99	4,34
7,5	1,3	0,802	18,26	5,47
5,0	2,0	0,531	12,65	7,9
2,5	4,0	0,267	7,51	13,3



Şekil 4.12. P(AAm-NiPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

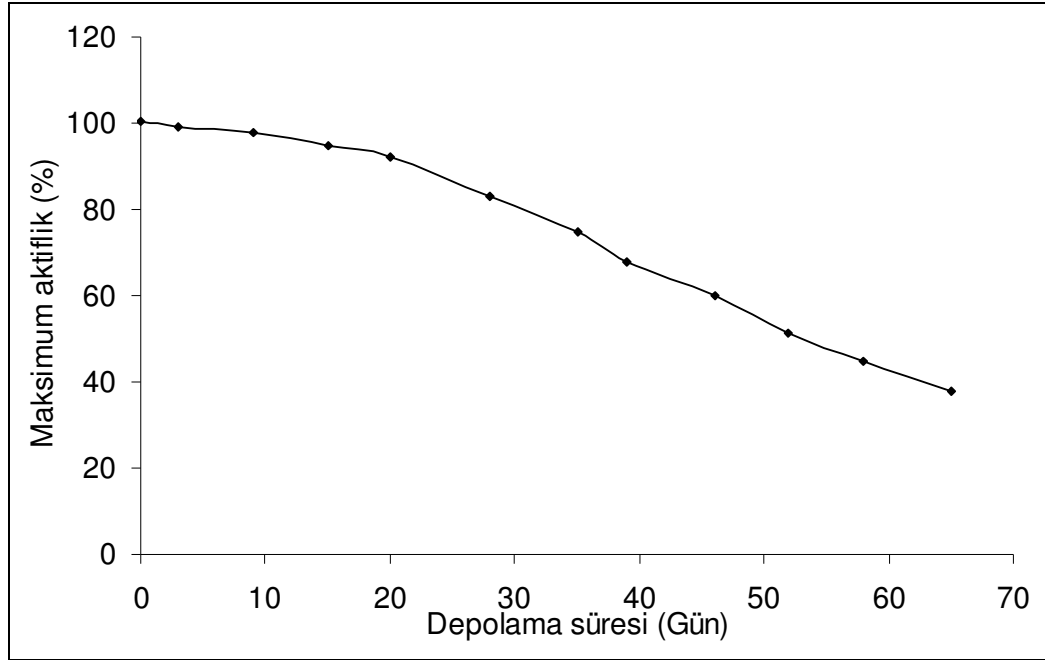
Substrat ve polimerik destek arasındaki etkileşmeyle, substrat-enzim kompleks oluşumunun ihtimalini düşüren enzimdeki yapısal değişmelerle, sterik etkilerle, diffüzyonel sınırlamalarla K_m değişebilir. K_m sabiti enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür. Deney sonuçlarında enzim immobilize edildiğinde K_m değerinin arttığı yani enzimin substrata olan ilgisinin azaldığı görülmektedir. Literatürde D'Annibale ve arkadaşları *Lentunile edudes*' ten elde edilen lakkazın K_m sabitinin, kitosana immobilize edildiğinde $256 \mu\text{M}$ olarak bulmuşlardır [61]. Eupergite immobilize edildiğinde K_m nin $0,150 \text{ mM}$ ve V_{mak} değerinin $7,6 \times 10^{-3} \text{ mM.dak}^{-1}$ olduğunu tespit etmişler [63]. Dodor, D.E. ve arkadaşları *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı kaolinit üzerine immobilize ettiklerinde ABTS substratını kullanarak K_m değerini $0,165 \text{ mM}$ olarak bulmuşlardır [72].

4.8. Serbest Enzimin Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest enzimin aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla, 4 °C de saklanan lakkaz çözeltilerinin 65 gün boyunca Bölüm 3.9.1' de anlatıldığı gibi aktiflikleri tayin edildi. Serbest enzimin maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.13 ve Şekil 4.13' de gösterildi.

Çizelge 4.13. Serbest enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,586	15,0	100
3	0,574	14,7	98
9	0,573	14,7	98
15	0,571	14,7	98
20	0,553	14,2	94
28	0,541	13,9	92
35	0,416	10,7	71
39	0,386	9,9	66
46	0,351	9,0	60
52	0,301	7,7	51
58	0,226	5,8	38
65	0,221	5,7	37



Şekil 4.13. Serbest enzimin maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Serbest enzimin 4 °C de depolamada 56. günde başlangıç aktifliğinin % 42 sini koruduğu gözlemlendi. Literatürde Dodor, D.E. ve arkadaşları *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazın 4 °C de 4 ay depolandığında serbest enzimin aktifliğinin %90 ını kaybettiğini bulmuşlardır [72].

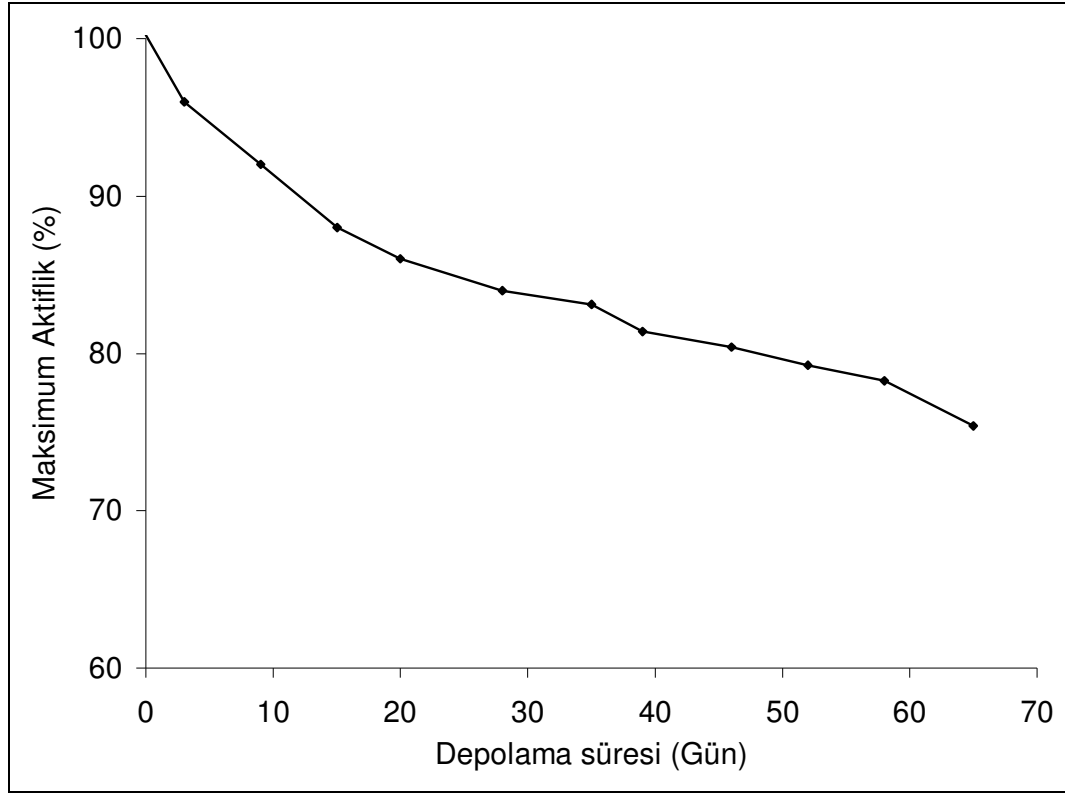
4.9. İmmobilize Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

4.9.1. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

P(AAm)-NaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4 °C de saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 65 gün boyunca Bölüm 3.9.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojeline immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.14 Şekil 4.14' de gösterildi.

Çizelge 4.14. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,703	18,1	100
3	0,646	17,5	92
9	0,605	16,1	86
15	0,601	15,9	85
20	0,596	15,7	84
28	0,581	15,3	83
35	0,583	15,5	83
39	0,571	14,7	81
46	0,564	14,5	80
52	0,556	14,3	79
58	0,549	14,1	78
65	0,529	13,6	75



Şekil 4.14. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

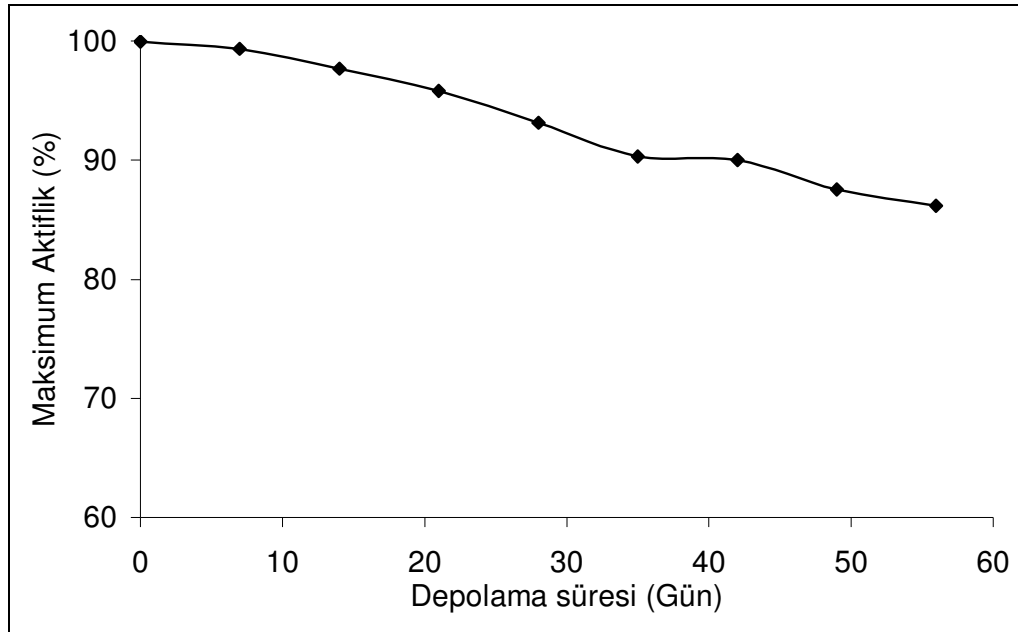
İmmobilize enzimin 4 °C de depolamada 56. günde başlangıç aktifliğinin % 79'unu koruduğu gözlemlendi.

4.9.2 Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4 °C de saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 56 gün boyunca Bölüm 3.9.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.15 Şekil 4.15' de gösterildi.

Çizelge 4.15. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojeline immobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,966	24,8	100
7	0,960	24,6	99
14	0,946	24,2	97
21	0,926	23,8	95
28	0,900	23,1	93
35	0,873	22,4	90
42	0,870	22,3	90
49	0,846	21,7	87
56	0,833	21,4	86



Şekil 4.15. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojeline immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

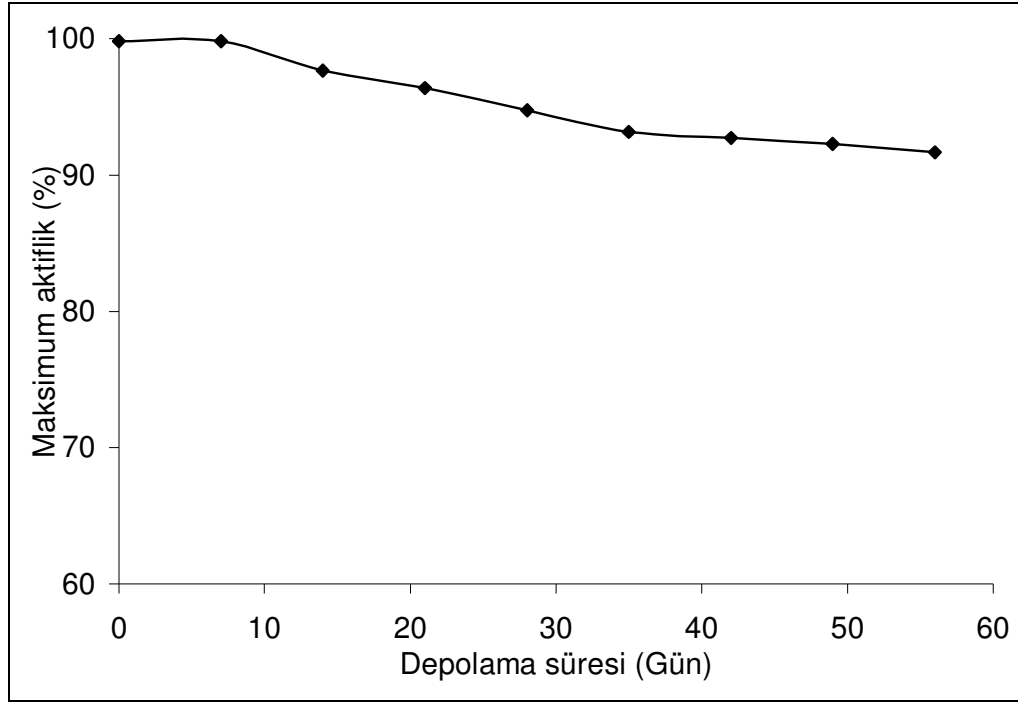
İmmobilize enzimin 4 °C de depolamada 56. günde başlangıç aktifliğinin % 86'sını koruduğu gözlemlendi.

4.9.3. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4 °C de saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 56 gün boyunca Bölüm 3.9.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.16 Şekil 4.16' da gösterildi.

Çizelge 4.16. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,926	23,8	100
7	0,926	23,8	99
14	0,906	23,2	97
21	0,894	22,9	96
28	0,879	22,6	94
35	0,864	22,2	93
42	0,860	22,1	93
49	0,856	22,0	92
56	0,850	21,8	91



Şekil 4.16. P(AAm-NiPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

İmmobilize enzimin 4 °C de depolamada 56. günde aktifliğinin % 91'ini koruduğu gözlemlendi. Literatürde, lakkaz DEAE-Granocel 500, CM-Granocel ve akrilik taşıyıcılara kovalent bağlanma ile immobilize edildiğinde, 4 °C de 4 ay depolandığında immobilize lakkazın aktivitesinin %90 ını koruduğu belirtilmiştir [69]. Bizim bulgularımız da bu sonuçla uyum göstermektedir. Lakkazı glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünen kitosan, kitosan mikroküreler ve Fe^{+3} geçiş metali kelatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde, 4 °C de 3 ay sonunda kelat üzerine immobilize edilmiş enzim ve suda çözünebilen kitosan üzerine immobilize edilmiş enzimin aktifliğinin %10 unu kaybettiğini , mikro küreler üzerine immobilize edilmiş enzimin ise aktifliğinin %15 ini kaybettiği verilmiştir [75].

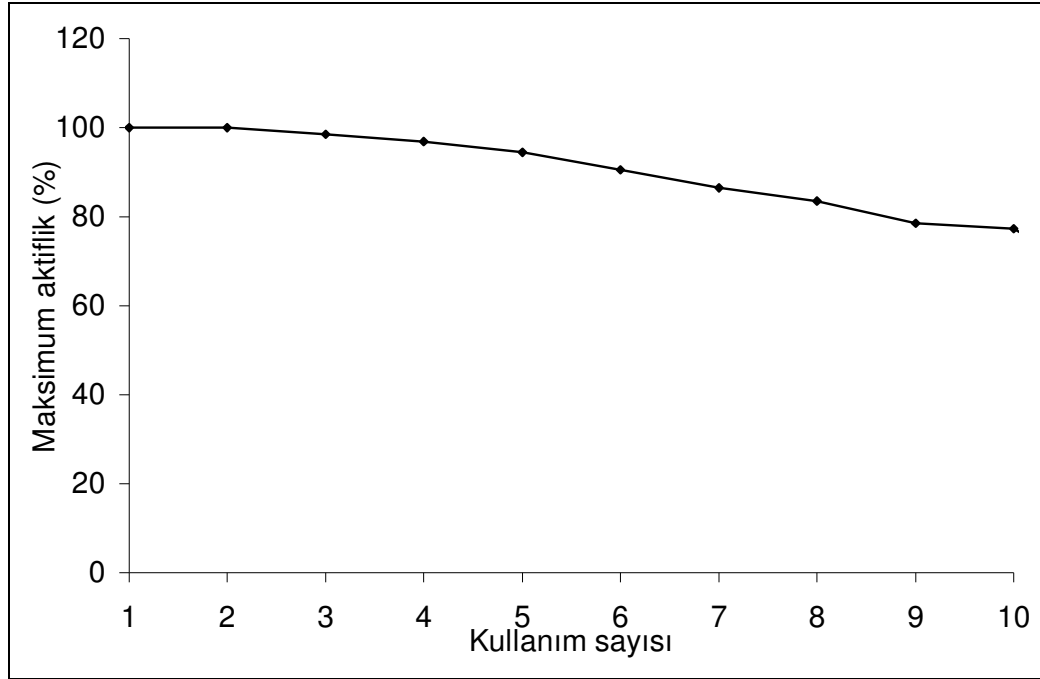
4.10. İmmobilize Enzim Aktivliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

4.10.1. Poli(akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktivliğinin kullanım sayısı ile değişimi

P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 10 kez kullanılarak Bölüm 3.10.1' de anlatıldığı gibi aktivliği tayin edildi. İmmobilize enzimin maksimum aktivliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 4.17 Şekil 4.17' de gösterildi.

Çizelge 4.17. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktivliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktivlik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktivlik (%)
1	0,990	25,35	100
2	0,987	25,31	99
3	0,983	25,22	98
4	0,952	24,43	96
5	0,941	24,15	95
6	0,875	22,45	89
7	0,836	21,45	85
8	0,827	21,22	84
9	0,792	20,32	80
10	0,703	18,04	71



Şekil 4.17. P(AAm)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

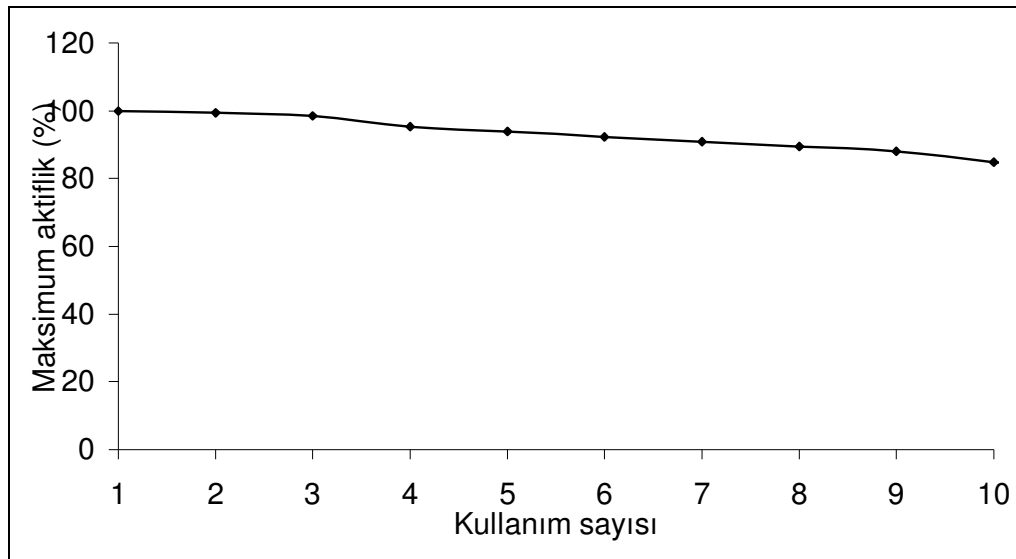
İmmobilize enzimin 10 kez kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 71' ini korunduğu gözlemlendi.

4.10.2. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit)-sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 10 kez kullanılarak Bölüm 3.10.1' de anlatıldığı gibi aktifliği tayin edildi. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 4.18 Şekil 4.18 ' de gösterildi.

Çizelge 4.18. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
1	0,697	17,88	100
2	0,693	17,78	99
3	0,687	17,62	98
4	0,664	17,03	95
5	0,654	16,78	93
6	0,644	16,52	92
7	0,634	16,26	90
8	0,624	16,01	89
9	0,614	15,75	88
10	0,591	15,16	84



Şekil 4.18. P(AAm-NİPA)-NaAlj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

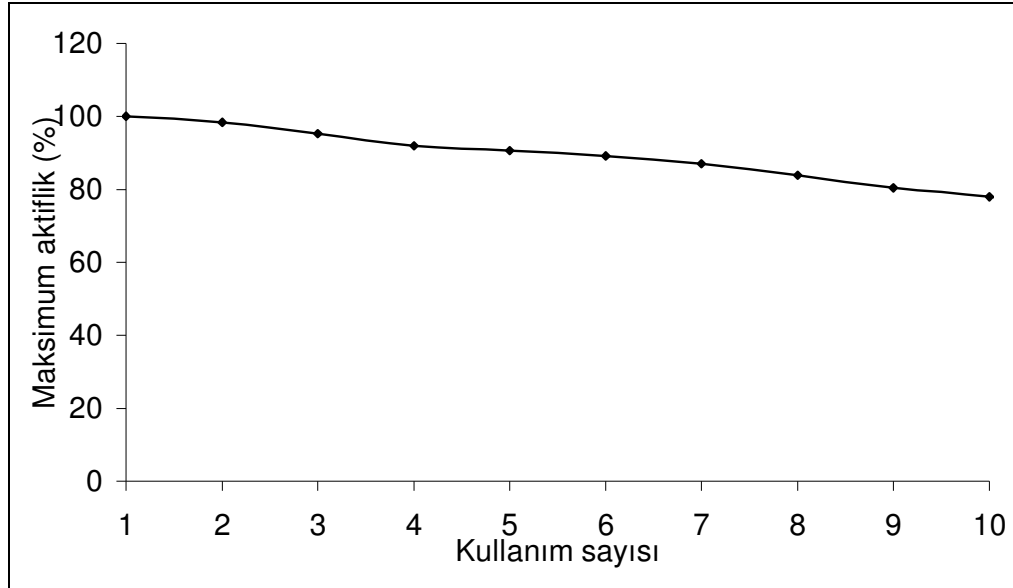
İmmobilize enzimin 10 defa kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 84' ünü korunduğu gözlemlendi

4.10.3. Poli(akrilamit-N-izopropil akrilamit) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 10 defa kullanılarak Bölüm 3.10.1' de anlatıldığı gibi aktifliği tayin edildi. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 4.19 Şekil 4.19' da gösterildi.

Çizelge 4.19. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
1	0,675	17,3	100
2	0,664	17,0	98
3	0,643	16,5	95
4	0,621	15,9	92
5	0,612	15,7	90
6	0,602	15,4	89
7	0,588	15,0	87
8	0,566	14,5	83
9	0,543	14,0	80
10	0,526	13,5	77



Şekil 4.19. P(AAm-NİPA) hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

İmmobilize enzimin 10 defa kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 77'sini korunduğu gözlemlendi.

Literatürde, lakkaz aktive edilmiş karboksillenmiş PVA üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edildiğinde immobilize enzimin 10 kullanımdan sonra aktifliğinin %60 ını koruduğu belirtilmiştir [68]. Lakkaz gulutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile amin sonlu nanokompozitler (Cu TPAC)-Fe₃O₄ (bakır tetraamin ftalosiyenin) üzerine iki basamaklı reaksiyon üzerinden immobilize edildiğinde, 5 kez ard arda kullanımından sonra aktivitesinin % 80 ini koruduğu belirtilmiştir [77].

5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj, P(AAm-NİPA) hidrojellerinde tutuklanan yüzde lakkaz miktarları yaklaşık %98 olarak bulundu.

2. Serbest lakkaz için optimum pH değeri 5,0 , P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj, P(AAm-NİPA) hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH değerleri sırasıyla 6,0, 5,5 ve 5,5 olarak bulundu.

3. Serbest lakkaz ve P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj, P(AAm-NİPA) hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum sıcaklık 40 °C, olarak bulundu.

4. Serbest lakkaz için K_m değeri $6,7 \times 10^{-2}$ mM, V_{mak} değeri $1,8 \times 10^{-2}$ mM.dak⁻¹, P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj ve P(AAm-NİPA) hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enzimi için K_m değerleri sırasıyla $6,2 \times 10^{-2}$ mM $1,9 \times 10^{-2}$ mM ve 0,1 mM V_{mak} değerleri sırasıyla $1,7 \times 10^{-2}$ mM.dak⁻¹, $6,3 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ ve $2,9 \times 10^{-2}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

5. Serbest lakkazın, 4 °C de depolamada 56. günde başlangıç aktifliğinin % 42 sini koruduğu gözlemlendi. P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj ve P(AAm-NİPA) hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enziminin, 4 °C de depolamada 56. günde başlangıç aktifliğinin sırasıyla % 79, % 86 ve % 91 ini koruduğu gözlemlendi.

6. P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NİPA)-NaAlj ve P(AAm-NİPA) hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enziminin, 10 kez kullanımı sonunda başlangıç aktifliğinin sırasıyla % 71, % 84 ve % 77 sini koruduğu bulundu. Literatürde PVA üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edildiğinde immobilize enzimin 10 kullanımdan sonra aktifliğinin %60 ını koruduğu belirtilmiştir [57].

Bu sonuçlara göre P(AAm)-NaAlj, P(AAm-NiPA)-NaAlj, P(AAm-NiPA) hidrojellerine immobilize edilen lakkaz 4°C da depolamada ve geniş bir sıcaklık aralığında serbest enzime göre oldukça yüksek aktiflik göstermektedir. Ayrıca immobilize lakkazın tekrar kullanılabilirliği sonuçlarından da hazırlanan immobilize lakkaz besin, tekstil, kağıt, sentetik kimya ve kozmetik gibi çeşitli endüstri alanlarında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Qui, Y., Park, K., "Environment-sensitive hydrogels for drug delivery", **Adv. Drug Deliver. Rev.**, 53: 321-339 (2001)
2. Park, K., Shalaby, S.W.W., Park, H., "Biodegradable hydrogels for drug delivery", **Technomic Publishing Co. Inc.**, 1-12, 35-66 (1993)
3. Akçakaya, İ., "İyonik poli(N,N dimetilakrilamid-ko-akrilamid) hidrojenlerinin sentezi ve şişme davranışları", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 3-5, 13-17 (2005)
4. Zhang, X.Z., Yang, Y.Y., Chung, T.S. and Ma, K.X., "Preparation and characterization of response macroporous poly(N-isopropyl acrylamide) hydrogels", **Langmuir**, 17: 6094-6099 (2001)
5. Karadağ, E., Saraydin, D., Çetinkaya, S., Güven, O., "In vitro swelling studies and preliminary biocompatibility evaluation of acrylamide-based hydrogel", **Biomaterials**, 17: 67-70 (1996)
6. Swami, S.N., "Radiation synthesis of polymeric hydrogels for swelling-controlled drug released studies", **Doctor of Philosophy, University of Western Sydney**, New South Wales, Australia 120-149 (2004)
7. Hoffman, A.S., "Hydrogels for biomedical applications", **Adv. Drug Deliver. Rev.**, 54: 3-12 (2002)
8. Uysal, İ., "Poli(vinil eter) bazlı ampifilik idrojellerin sentezi ve kontrollü ilaç salım uygulamaları" Yüksek Mühendislik Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 5-7 (2001)
9. Vakkalanka, S.K., Brazel, C.S., Peppas, N.A., "Temperature and pH-sensitive terpolymers for modulated delivery of streptokinase", **J.Biomed.Materials Sci. Polym. Edn.**, 8: 119-129 (1996)
10. Szila'gyi, A., Zrínyi, M., "Temperature induced phase transition of interpenetrating polymer networks composed of poly(vinyl alcohol) and copolymers of N-isopropylacrilamide with acrilamide or 2-acrilamido-2-methylpropyl-sulfonic acid", **Polymer**, 46: 10011- 10016 (2005)
11. Am Ende, M.T., Hariharan, D., A., "Factors influencing drug and protein transport and released from ionic hydrogels", **React. Polym.**, 25: 127-137 (1995)
12. Onat T., Emerk K., Sözmen, E.Y., "İnsan Biyokimyası", **Palme Yayıncılık**, Ankara, 197-202 (2002).

13. Aksoy, C., Yanardağ, R., "Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu" Yüksek Lisans Tezi, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 1-2 (2003).
14. Tekman, Ş., Öner, N., "Genel Biyokimya", **İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi**, İstanbul, 47-49 (1994).
15. Tüzün, C., "Biyokimya", **Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi**, Ankara, 131-133 (1997).
16. Bailey, J. E., Gllis, F.D., "Biochemical Engineering Fundamentals", **Mc Graw Hill**, New York, 984-985 (1986).
17. Telefoncu, A., "Enzimoloji", **Ege Üniversitesi Fen Fakültesi**, İzmir, 1-305 (1997).
18. Karadağ, H., "Soya Fasulyesi Lipoksijenazının Poliakrilamid Jel Üzerine İmmobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **Çukurova Üniversitesi**, Adana, 26-28 (2001).
19. Aksoy, C., "Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **İstanbul Üniversitesi**, İstanbul, 26-28 (2003).
20. Mosbach, K., "Methods in Enzymology", **Academic Press**, New York, 1-284 (1976).
21. Zaborsky, O., "Adsorption Immobilized Enzyme", **Ed. by Weast, R. C., CRC Press**, Ohio, 37-44 (1973).
22. Durante D, Casadio R, Martelli PL, Tasco G, Portaccio M, De Luca P, Bencivenga U, Rossi S, Di Martino S, Grano V, Diano N, Mita DG., "Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*", **J Mol Catal B-Enzym**, 27: 191-206 (2004)
23. Trevan, M.D., "Techniques of immobilization, Immobilized Enzyme", **John Wiley and Sons**, New York, 37-44 (1980).
24. Dumitriu, S., Popa, M. and Dumitriu, M., "Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers", **J. Bioact. Compat. Pol.**, 3: 243-312 (1988).
25. Carr, P. W. and Bowers, L. D., "Support considerations in chemical analysis" Enzymes, **Academic Press**, New York, 56: 167-170 (1980).

26. Chen, S., Liu, Y. and Yu, P., "Study on column reactor of chitosan immobilized", **Chem. Abstr.**, 127 (4): 127-129 (1996).
27. Bachman S., Gebicka, M.L., Gasyna, Z." Some properties of whole-cell glucose isomerase immobilized in polyacrylamide gel by radiation", **Inter Science** 33 (11): 366 – 369 (2006)
28. Cabral, J. M. S., Kennedy, J. F. and Kalogerakis, B. "Covalent and coordination immobilization of proteins", **Bioprocess Technol.**, 14:73-138. (1991).
29. Kennedy, J. F. and Cabral, J. M. S., "Immobilized enzymes cells", Immobilization of enzyme, (Woodward, 2nd ed.), **Oxford Press**, U.K., 19-37 (1985).
30. Kaetsu, I., Kamura, M. and Yoshida, M., "Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low temperature", **Biotechnol. Bioeng.**, 21: 847-849 (1979).
31. Saburo, F. and Atsuo, T., "Application of biocatalyst immobilized by polymer methods", Enzyme Engineering, **Plenum Press**, New York, 201-203 (1985).
32. Carr, P. W. and Bowers, L. D., "Support considerations in chemical analysis", Enzymes, **Academic Press**, New York, 56: 167-170 (1980).
33. Glick, D., "Methods of Biochemical Analysis", Enzyme Immobilization, **Academic Press**, New York, 25: 135-201 (1979).
34. Srere, P. A. and Uyeda, K., "Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices", Methods in Enzymology, (Edited by Mosbach, K.), **Academic Press, Inc.**, New York, 44: 11-19 (1976).
35. Sanjay, G. and Sugunan, S., "Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10", **Food Chem.**, 94: 573-579 (2006).
36. Gürsel, A., Alkan, S., Toppare, L. and Yağcı, Y., "Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers", **React. Funct. Polym.**, 57: 57-65 (2003).
37. Yildiz, H. B., Kiralp, S., Toppare, L. and Yağcı, Y., " Immobilization of invertase in conducting polypyrrole/PMMA-co-PMTM graft copolymers", **J. Appl. Polym. Sci.**, 96: 502-507 (2005).

38. Zaborsky, O., "Adsorption immobilized enzyme", Ed. by Weast, R. C., **CRC Press**, Ohio, 75-78 (1973).
39. Arica, Y. M. and Hasirci, V. N., "Immobilization for the production of membranes", **Biomaterials**, 8: 489-495 (1987).
40. Cinderalla, M., Canteralla, L. and Alfani, F., "Entrapping of acid phosphatase in HEMA: Preparation and kinetic properties", **Birit. Polym. J.**, 20: 477-485 (1988).
41. Michael, D. T., "Immobilized enzyme" *Methods in Enzymology*, **John Wiley and Sons**, New York, 80-85 (1980).
42. İnam, R., Çaykara, T. and Özyürek, C., "Polarographic determination of uranyl ion adsorption on poly(2-hydroxyethyl methacrylate-itaconic acid) hydrogels", **Sep Sci Technol**, 36(7): 1451-1461 (2001).
43. Kaetsu, I., Kamura, M. and Yoshida, M., "Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low temperature", **Biotechnol. Bioeng.**, 21: 847-861 (1979).
44. D'Souza, S. F. and Godbole, S. S., "Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine", **J. Biochem. Bioph. Meth.**, 52: 59-62 (2002).
45. Mosbach, K., "Methods in enzymology", *Enzymology*, **Academic Press**, New York, 44-49 (1976).
46. Taylor, P.B., Ashman, S., Baddeley, M.S., Bartram, L.S., "Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases", **J Biomol Screen.** 7: 537-543 (2002)
47. Delanoy, G.; Li, Q.X. and Yu, J. "Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan.", **Int J Biol Macromol.**, 35: 89-95 (2005).
48. Birhanlı, E., "Mikroorganizmaların lakkaz üretimine çeşitli faktörlerin etkisi", Yüksek Lisans Tezi, **İnönü Üniversitesi**, Malatya, 37-44 (2003).
49. Bayralı, M., "Resorsinol'ün enzimatik polimerizasyon kinetiğinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, **Hacettepe Üniversitesi**, Ankara, 37-44 (2003).
50. Daigle, F., Trudeau, F., Robinson, G., Smyth, M.R. and Leech, D., "Mediated reagentless enzyme inhibition electrodes", **Biosens. Bioelectron**, 13: 417-425 (1998).

51. Freire, R.S., Durán, N. and Kubota, L.T., "Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol", **Talanta**, 54: 681-686 (2001).
52. Durán, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A. and Gianfreda, L., "Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports a review", **Enzyme Microb Tech**, 31: 907-931 (2002).
53. Quan, D. and Shin, W., "Modification of electrode surface for covalent immobilization of laccase", **Mat. Sci. Eng. C-Bios**, 24: 113-115 (2004).
54. Cuadrado, M. U., Perez-Juan, P. M., Luque de Castro, D., Gomez-Nieto, M. A., "A fully automated method for in real time determination of laccase activity in wines", **Anal. Chim. Acta**, 553: 99-104 (2005).
55. Piontek, K. and Biol J., "Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers", **J.Biol.Chem**, 277: 37663-37669 (2002).
56. Şolpan, D. and Torun, M., "Synthesis and characterization of sodium alginate/acrylamide semi-interpenetrating polymer networks", **J. Appl. Polym. Sci.**, 100: 335-342 (2006).
57. Kusktham, B., "Preparation of interpenetrating polymer network gel beads for dye absorption", **J. Appl. Polym. Sci.**, 102: 1585-1591 (2006).
58. Ma, J., Xu, Y., Zhang, Q., Zha, L. and Liang, B., "Preparation and characterization of pH- and temperature-responsive semi-IPN hydrogels of carboxymethyl chitosan with poly (*N*-isopropyl acrylamide) crosslinked by clay", **Colloid Polym. Sci.**, 285: 479-484 (2007).
59. Rogalski, J., Jozwik, E., Hatakka, A. and Leonowicz, A., "Immobilization of laccase from *Phlebia radiata* on controlled porosity glass", **J Mol Catal A-Chem**, 95: 99-108 (1995).
60. Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N., Rogalski, J., Jaszek, M., Malarczyk, E., Staszczak, M., Fink-Boots, M. and Leonowicz, A., "Activity of free and immobilized extracellular *Cerrena unicolor* laccase in water miscible organic solvents", **Cat.Inist**, 52: 589-595 (1998).
61. D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E. and Sermanni, G.G., "Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment", **Process Biochem**, 34: 697-706 (1999).

62. Rogalsky, J., Dawidowicz, A., Jozwik, E. and Leonowicz, A., "Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass" **J Mol Catal B-Enzym**, 6: 29-39 (1999).
63. D'Annibale, A., Stazi, A., Vinciguerra, S.R. and Giovannozzi, V.G., "Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater", **Biotechnol**, 77: 265-273 (2000).
64. Hublik, G. and Schinner, F., "Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of fenolic pollutants", **Enzyme Microb Tech**, 27: 330-336 (2000).
65. Ruiz, A., Malave, A.J., Felby, C. and Griebenow, K., "Improved activity and stability of an immobilized recombinant laccase in organic solvent", **Biotechnol. Lett.**, 22: 229-233 (2000).
66. Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A. and Spettoli, P. "Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor", **Process Biochem**, 36: 51-58 (2000).
67. Freire, R.S., Duran, N. and Kubota, L., "Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds", **Talanta**, 54: 681-686. (2001).
68. Yinghui, D., Qiuling, W. and Shiyu, F., "Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier", **Lett. Appl. Microbiol**, 35: 451-456 (2002).
69. Al-Adhami, A.J.H., Bryjak, J., Markiewicz, B.G. and Chozch, W.P., "Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers", **Process Biochem**, 37: 1387-1394 (2002).
70. Zamora, P.P., Pereira, M.C., Tiburtius, R.L., Rosa, M.A., Minussi, C.R. and Duran, N., "Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase", **Appl Catal B-Environ**, 42: 131-144 (2003).
71. Quan, D., Kim, Y. and Shin, W., "Sensing characteristics of tyrosinase immobilized and tyrosinase, laccase co-immobilized platinum electrodes", **Bull. Korean Chem. Soc.** 25 (8): 1195-1201 (2004),
72. Dodor, D.E., Hwang, H. and Ekunwe, S.I.N., "Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*", **Enzyme Microb Tech**, 35: 210-217 (2004).

73. De Quan. and Shin, W., "Modification of electrode surface for covalent immobilization of laccase", **Mat Sci Eng C-Bio S**, 24: 113-115 (2004).
74. Araujo, J.H., Uemura, V., Moraes, F., Barbosa, A. and Zanin, G., "A comparative study on fungal laccases immobilized on chitosan", **Biology and Tecnology**, 48: 1-6 (2005).
75. Yang, W.Y., Min, D.Y., Xiao, S.W., Jin, L., Rong, L., Tetsuo, M. and Bo, C., "Immobilization and characterization of laccase from Chinese Rhus vernicifera on modified chitosan", **Process Biochem**, 41: 1378-1382 (2006).
76. Hu, X., Zhau, X. and Hwang, H., "Comparative study of immobilized Trametes versicolor laccase on nonoparticles and kaolinite", **Chemosphere**, 66: 1618-1626 (2007).
77. Xiao, H., Huang, J., Liu, C. and Jiang, D., "Immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutaraldehyde crosslinking method", **T Nonferr Metal Soc**, 16: 414-418 (2006).
78. Zawisza, I., Rogalsky, J. and Opallo, M., "Electrocatalytic reduction of dioxygen by redox mediator and laccase immobilized in silicate thin film", **J Electroanal Chem**, 588: 244-252 (2006).
79. Leonowicz, A. and Grzywnowicz, K., "Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate", **Enzyme Microb Tech**, 3: 55-58 (1981).
80. Bradford, M.M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding", **Anal. Biochem**, 72: 248-254 (1976).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YAMAK, Özgür
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 30.01.1977 Ankara
 Medeni hali: : Evli
 Telefon : 0 (505) 253 41 40
 e-mail : ozguryamak@mynet.com

Eğitim Derece

Eğitim Birimi

Mezuniyet tarihi

Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2007
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	1999
Lise	İncirli Lisesi	1993

İş Deneyimi Yıl

Yer

Görev

1995-1999	Aktaş Boya	Satış Pazarlama
2000-2001	CarrefourSA	Satış Pazarlama
2001-2002	Nike Ankara	Satış Pazarlama
2002-2006	Milli Eğitim Bakanlığı	Öğretmen

Yabancı Dil

İngilizce