

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

LAKKAZIN POLİAKRİLAMİT
VE POLİAKRİLAMİT - κ -KARRAGENAN
JELLERİNE İMMOBİLİZASYONU

MURAT GÖKGÖZ

TEMMUZ 2006

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

Prof. Dr. Yakup ARICA

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak Kimya Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

Yrd. Doç. Dr. Haydar ALTINOK

Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Serpil AKSOY

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Haydar ALTINOK

ÖZET

LAKKAZIN POLİAKRİLAMİT VE POLİAKRİLAMİT - κ -KARRAGENAN JELLERİNE İMMOBİLİZASYONU

GÖKGÖZ, Murat

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Haydar ALTINOK

Temmuz 2006, 56 Sayfa

Bu çalışmada, lakkaz enzimi (L), poliakrilamit (PAAm), poliakrilamit - κ -karragenan (PAAm-K1) ve poliakrilamit- κ -karragenan (PAAm-K2) jelleri içine hapsetme yoluyla immobilize edildi. Optimum pH Serbest lakkaz için 6,0, PAAm e immobilize edilen lakkaz (PAAm-L) için 9,0, PAAm-K1 e immobilize edilen lakkaz (PAAm-KL1) için 8,5 ve PAAm-K2 ye immobilize edilen lakkaz (PAAm-KL2) için 8,0 olarak bulundu. Optimum sıcaklık ise serbest L için 45 °C ve immobilize lakkaz için de 60 °C olarak belirlendi. Serbest L 15 gün 4 °C da depolama sonunda, başlangıç aktivitesinin ancak % 35 ini korurken, 60 gün 4 °C da depolamada PAAm-L % 44 ünü, PAAm-KL1 % 63 ünü ve PAAm-KL2 nin ise % 68 ini koruduğu gözlemlendi. Immobilize enzimler iki günde 35 kez tekrar kullanıldıklarında PAAm-L başlangıç aktivitesinin % 28 ini, PAAm-KL1 % 45 ini ve (PAAm-KL2) ise % 58 ini korumaktadır. Serbest L, PAAm-L, PAAm-KL1 ve PAAm-KL2 için K_m değerleri

sırasıyla 6,90, 7,30, 7,38 ve 7,40 μM ve V_{mak} değerleri 2,7, 1,37, 1,68 ve 1,70 $\mu\text{M.dak}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Hapsetme, enzim immobilizasyonu, poliakrilamit, karragenan, lakkaz

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF LACCASE IN POLYACRYLAMIDE AND POLYACRYLAMIDE - κ -KARRAGENAN JELS

GÖKGÖZ, Murat

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, M.Sc Thesis

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Haydar ALTINOK

July 2006, 56 pages

In this study, laccase enzyme (L) was immobilized by method of entrapment in polyacrylamide (PAAm), polyacrylamide - κ -Carragennan (PAAm-K1) and polyacrylamide - κ -Carragennan (PAAm-K2) gels. Optimum pH was determined 6,0 for free L, 9,0 for immobilized laccase in PAAm (PAAm-L), 8,5 for immobilized laccase in PAAm-K1 (PAAm-KL1) and for immobilized laccase in PAAm-K2 (PAAm-KL2). Optimum temperature was determined 45 °C for free L and 60 °C for immobilized laccases. Retained enzyme activities were found to be ca. 44 % for PAAm-L, 63 % for PAAm-KL1 and 68 % for PAAm-KL2 after storage for 60 days at 4 °C. But the free enzyme activity was found 35 % after storage for 15 days at 4 °C. PAAm-L, PAAm-KL1 and PAAm-KL2 were retained 28 %, 45 % and 58 % of their initial activities were used repeatedly 35 times in two days, respectively. Kinetic parameters were calculated as 6,90 μ M, 7,30 μ M, 7,38 μ M and 7,40 μ M for

K_m and 2,7, 1,37, 1,68 and 1,70 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ for V_{max} for free L, PAAm-L, PAAm-KL1 and PAAm-KL2, respectively.

Key Words: Entrapment, immobilization of enzyme, polyacrylamide, Carragennan, laccase

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bana her türlü imkanı sağlayan ve değerli bilgileriyle yol gösteren danışmanım Sayın Yrd.Doç.Dr. Haydar ALTINOK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca yardımlarını gördüğüm Sayın Prof.Dr. Serpil AKSOY'a, Sayın Yrd.Doç.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK'e, Sayın Arř.Gör. Gökhan DEMİREL'e ve Sayın Arř.Gör. Murat İNAL'a teşekkür ederim.

Tez süresince ve özellikle tezin yazılması sırasında her zaman ve her konuda yardımını gördüğüm Sevgili Eřim Zeliha GÖKGÖZ'e teşekkür ederim.

Bu güne kadar benden hiçbir desteđi esirgemeyen ve hep yanımda olan aileme teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler.....	3
1.1.1 Polimerler.....	3
1.1.1.1. Polimerlerin Sentezi.....	3
1.1.2. Poliakrilamid.....	4
1.1.3. Karragenan.....	7
1.1.4. Enzimler ve Genel Özellikleri.....	9
1.1.5. İmmobilizasyon.....	10
1.1.5.1. İmmobilize Enzimlerin Avantaj ve Dezavantajları.....	11
1.1.5.2.Enzim Destek Materyali.....	12
1.1.5.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	13
1.1.5.3.1. Kimyasal İmmobilizasyon Yöntemleri.....	14
1.1.5.3.1.1. Kovalent Bağlanma.....	15
1.1.5.3.1.2. Çapraz Bağlanma.....	16
1.1.5.3.2. Fiziksel İmmobilizasyon Yöntemleri.....	17

1.1.5.3.2.1. Adsorpsiyon İle İmmobilizasyon.....	17
1.1.5.3.2.2. Hapsetme ile İmmobilizasyon.....	18
1.1.5.4. İmmobilizasyon Yönteminin Seçimi.....	24
1.1.6. Lakkaz Enziminin Yapısı ve Özellikleri.....	25
1.1.6.1. Lakkaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	28
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
2.1. Materyal.....	33
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	33
2.2. Yöntem.....	34
2.2.1. Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanması.....	34
2.2.2. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	34
2.2.3. Poliakrilamid Jeline Enzim immobilizasyonu.....	35
2.2.4. Poliakrilamid - κ -Karragenan Jeline Enzim İmmobilizasyonu.....	35
2.2.5. Lakkazın Aktiflik Tayini.....	36
2.2.5.1. Serbest Lakkazın Aktiflik Tayini.....	36
2.2.5.2. İmmobilize Lakkazların Aktiflik Tayini.....	37
2.2.6. Enzim Aktifliğine pH nın Etkisi.....	37
2.2.6.1 Serbest Lakkazın Aktifliğine pH nın Etkisi.....	37
2.2.6.2. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine pH nın Etkisi.....	38
2.2.7. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	38
2.2.7.1. Serbest Lakkazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	38
2.2.7.2. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	38
2.2.8. Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi.....	39
2.2.8.1. Serbest Lakkazın Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi.....	39

2.2.8.2. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi....	39
2.2.9. Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	39
2.2.9.1. Serbest Lakkazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	39
2.2.9.2. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi...40	
2.2.10. Enzim Aktifliğine Tekrar Kullanılabilirliğin Etkisi.....	40
2.2.10.1. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine Tekrar Kullanım Sayısının Etkisi.....	40
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	41
3.1. Enzim Aktifliğine pH nın Etkisi.....	41
3.2. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	43
3.3. Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi.....	45
3.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Depolanma Kararlılığı.....	48
3.5. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanım Sayıları.....	49
4. SONUÇLAR	51
KAYNAKLAR.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

1.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri.....	12
1.2. Enzim hapsetme için kullanılan bazı destek maddeleri.....	19
3.1. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik sabitleri.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1. Akrilonitrilin hidroliz tepkimesi.....	4
1.2. Asetosiyanohidrinden akrilamid elde edilişi.....	4
1.3. Karboksilik asit türevlerinden akrilamid elde edilişi	5
1.4. Akrilamid polimerleşmesinde ilk radikal uç oluşumu.....	6
1.5. Akrilamidin polimerleşmesinde büyüme basamağı.....	6
1.6. Akrilamidin polimerleşmesinde sonlanma basamağı.....	7
1.7. κ-Karragenanın yapısı.....	8
1.8. Karragenanın sıcaklıkla çözünme mekanizması.....	9
1.9. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	14
1.10. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon.....	15
1.11. Mikrokapsülleme ile immobilizasyon.....	21
1.12. Polakrilamid jel içine enzim hapsedilmesi.....	23
1.13. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.....	24
1.14. Lakkaz üreten <i>Agaricus Bisporus</i> beyaz çürükçül mantarı.....	26
1.15. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması.....	27
1.16. Siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime	27
1.17. <i>Trametes versicolor</i> 'dan elde edilen lakkaz enziminin üç boyutlu yapısı.....	28
2.1. Siringaldazin kalibrasyon eğrisi.....	35
3.1. Serbest ve immobilize enzimler için % bağıl aktifliğinin pH ile değişimi.....	41

3.2. Serbest ve immobilize enzimler için % bağıl aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	44
3.3. Serbest ve immobilize enzimleri için Lineweaver-Burk grafiği.....	46
3.4. Serbest ve immobilize lakkazın % bağıl aktifliklerinin depolama süresi ile değişimi.....	48
3.5. Immobilize enzimlerin % bağıl aktifliklerinin tekrar kullanılabilirlikleri ile değişimi.....	50

SİMGELER DİZİNİ

SİMGELER

κ	Kappa
μm	Mikrometre
nm	Nanometre
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
g	Gram
V	Aktiflik (hız)
K_m	Michaelis-Menten sabiti
V_{mak}	Maksimum hız
k_i	İnaktivasyon sabiti
$t_{1/2}$	Yarılanma süresi

KISALTMALAR

L	Lakkaz
PAAm	Poliakrilamit
PAAm-K1	Poliakrilamit - κ -karragenan (0.05g)
PAAm-K2	Poliakrilamit - κ -karragenan (0.1g)
PAAm-L	Poliakrilamit jeline immobilize lakkaz
PAAm-KL1	Poliakrilamit - κ -karragenan (0.05g) jeline immobilize lakkaz
PAAm-KL2	Poliakrilamit- κ -karragenan (0.1g) jeline immobilize lakkaz

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 tekniklerini 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 kullanılmalari 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.

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, poliakrilamit ve poliakrilamit - κ -karragenan polimerik destek materyallerine, hapsetme yoluyla immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Serbest ve immobilize lakkazın aktifliğine, pH, sıcaklık, depolama süresi, substrat derişimi gibi parametrelerin etkisi araştırılmış, termal

kararlılık ve kinetik parametreler belirlenmiş ve immobilize lakkazın tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Polimerler

Polimerler, çok sayıda monomerin kimyasal bağlarla bağlanarak oluşturdukları büyük moleküllerdir.

Polimerler “monomer” denilen tekrarlanan birimlerden oluşurlar. Aynı tür monomer biriminin tekrarlanmasıyla oluşan polimerlere “homopolimer”, farklı tür monomer birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşan polimerlere “kopolimer” denir. Polimerler, düz zincirli, dallanmış veya çapraz bağlı olabilirler. Polimerler sentetik olarak elde edilebilirler veya doğal olarak bulunabilirler.

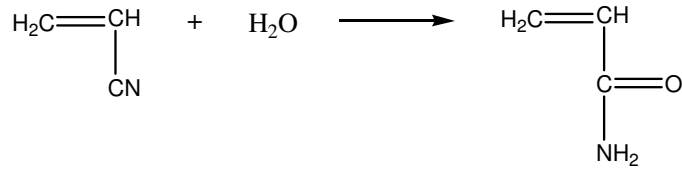
1.1.1.1. Polimerlerin Sentezi

Monomer birimlerinden, polimer moleküllerinin oluşması için gerçekleşen tepkimelere polimerleşme tepkimeleri denir. Sentetik polimerler, Carothers tarafından yapılan sınıflandırmaya göre kondenzasyon polimerleri ve katılma polimerleri olarak iki gruba ayrılırlar. Kondenzasyon polimerizasyonda, polimer oluşumunda, iki veya daha fazla fonksiyonel grup içeren monomerlerden küçük bir molekülün ayrılması söz konusudur. Katılma polimerizasyonunda ise monomerler doğrudan birbirine katılarak polimer zincirini oluştururlar. Katılma polimerizasyonu serbest radikaller ve iyonlar (anyon veya katyon) üzerinden yürüyebilir.⁽³⁾

1.1.2. Poliakrilamit

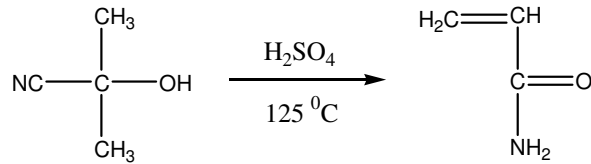
Amitler, karbonil grubunda üç değerli azot taşıyan zayıf bazik bileşiklerdir.⁽⁴⁾ Metanamit dışındaki bütün amitler, su, alkol ve asetonda çözünen, beyaz renkli katıdır.⁽⁵⁾ Bazı amit türevlerine örnek olarak, akrilamit, N,N-dimetilformamit, N-metilbenzamid, B vitamini (nikotinamid), kafein ve aspartam verilebilir.

Amitler, çeşitli şekillerde elde edilebilirler.⁽⁶⁾ Örneğin akrilamit, akrilonitrilin hidroliziyle sentezlenebilir. Hidroliz için, % 6-12 oranında hidrojen peroksit bulunan sulu sodyum hidroksit çözeltisi kullanılır.



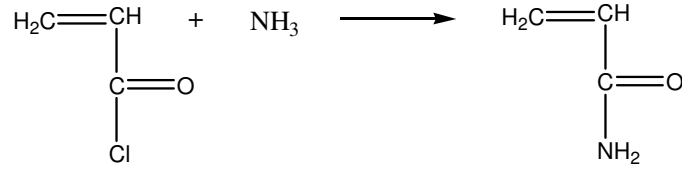
Şekil 1.1. Akrilonitrilin hidroliz tepkimesi

Akrilamit asetosiyanohidridinden asidik ortamda ve yüksek sıcaklıkta su çekilerek de akrilamit elde edilebilir.⁽⁶⁾ Asetosiyanohidrin ise, asetonun hidrojen siyanür ile tepkimesinden elde edilir.



Şekil 1.2. Asetosiyanohidridinden akrilamit elde edilişi

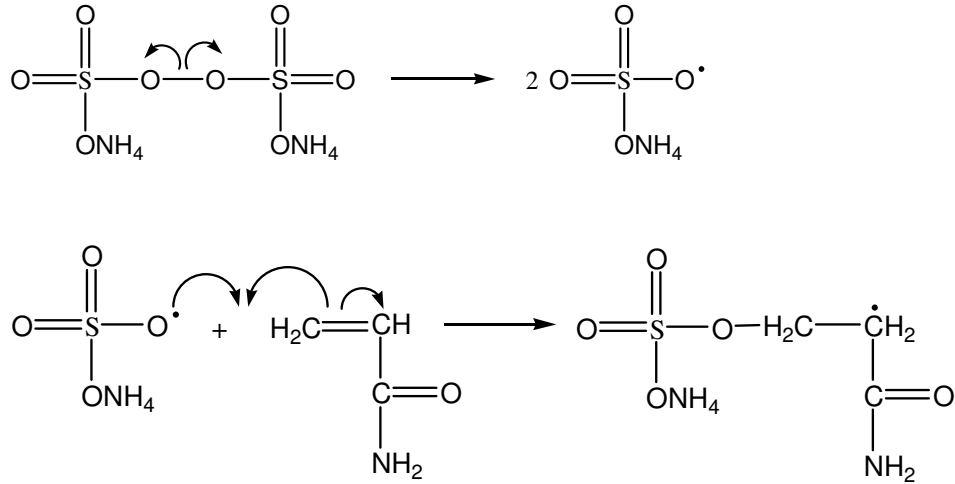
Amitlerin en önemli sentez yollarından biri de karboksilik asit türevlerinin amonyak yada uygun bir aminle tepkimesidir.



Şekil 1.3. Karboksilik asit türevlerinden akrilamid elde edilişi

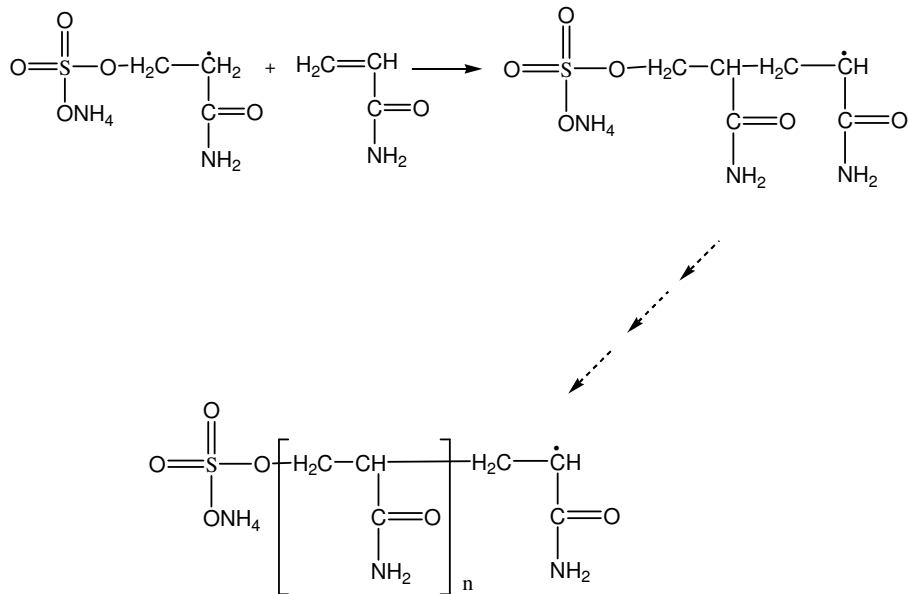
Amit türevleri çoğunlukla poliamit olarak kullanılırlar. Proteinler en önemli poliamitlerdir. Sentetik poliamitlerin en çok kullanılanı ise naylon türevleridir. Çok kullanılan bir başka amit türevi sentetik polimer de poliakrilamittir. Poliakrilamid, akrilamitin, peroksit başlatıcıları, redoks başlatıcıları veya γ -ışınları ile polimerleştirilmesinden elde edilir. Akrilamid katılma polimerizasyonu ile polimerleşir. Katılma polimerizasyonu üç basamakta gerçekleşir.⁽⁶⁾

Başlama basamağında, başlatıcının parçalanmasıyla oluşan serbest radikaller monomer molekülleriyle etkileşir. Başlatıcı olarak amonyum persülfat veya benzoil peroksit kullanılabilir. Amonyum persülfat kullanıldığında düşük sıcaklıkta radikal oluşup, bu radikal monomere bağlanarak monomer üzerinde aktif uç oluşturur.



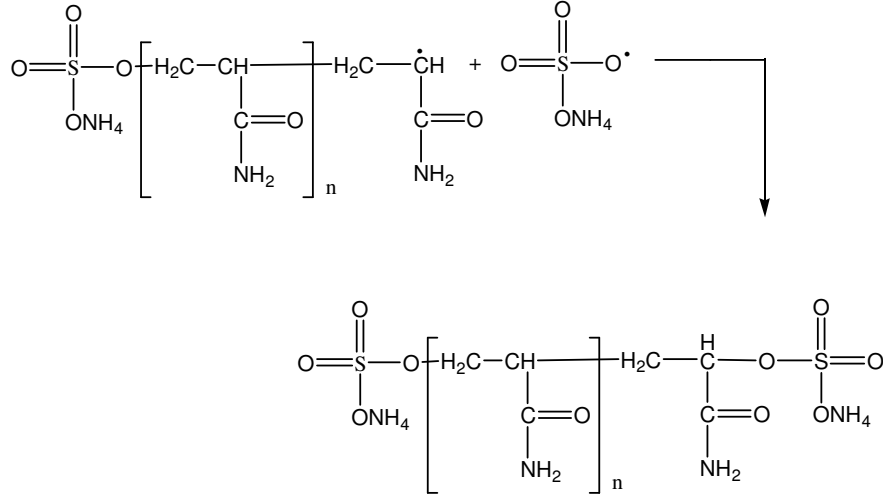
Şekil 1.4. Akrilamitin polimerleşmesinde ilk radikal uç oluşumu

Büyüme basamağı, aktif polimer zincirlerinin monomer moleküllerini katarak büyüdüğü basamaktır. Yani ilk monomerik aktif merkeze akrilamit molekülleri arka arkaya katılırlar.



Şekil 1.5. Akrilamitin polimerleşmesinde büyüme basamağı

Sonlanma basamağında ise aktif polimer zincirleri, ortamdaki başka bir molekülle etkileşerek aktifliklerini yitirirler. Yani poliakrilamid zincirleri sülfat radikalleriyle birleşerek sonlanabilir. Bunların yanında aktif polimer zincirleri birbirleriyle birleşerek veya ayrı ayrı sonlanabilirler.



Şekil 1.6. Akrilamitin polimerleşmesinde sonlanma basamağı

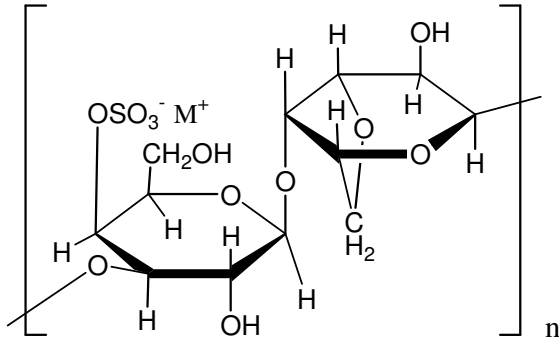
Bir polimer zincirinin sonlanması, zincir transfer tepkimeleri ile de mümkündür.⁽⁶⁾ Zincir transfer tepkimelerinde, zincirin aktifliği polimerizasyon ortamındaki başka bir moleküle aktarılır. Bu moleküller, başlatıcı, monomer, çözücü, zincirin üzerinde başka bir yer veya başka bir polimer zinciri olabilir.

1.1.3. Karragenan

Karragenan kırmızı deniz yosunlarından elde edilen lineer bir polisakkarittir. Karragenanın 3 değişik formu bulunmaktadır. Bunlar *kappa* (κ), *iota* (ι) ve *lambda*

(λ) karragenandır. *kappa* (κ) ve *iota* (ι) tipi karragenanların, soğuk sudaki çözünürlükleri düşüktür, sıcaklığın artmasıyla çözünürlükleri artar. λ -karragenan tipinin, soğuk sudaki çözünürlüğü yüksektir. Değişik tipteki karragenanlar jel haline getirilebilir. Jellerin akıcılığı ve esnekliği, sıcaklık ile değiştirilebilir. Karragenan çözeltisinin akışkanlığı; polimer derişimine, çözelti sıcaklığına ve karragenanın tipine bağlıdır.⁽⁷⁾

Karragenan türlerinin en fazla bulunanı ve kullanılanı κ -karragenandır. κ -Karragenan, (1,3)- β -D-galaktopiranoz-4-sülfat-(1,4)-3,6-anhidro- α -D-galaktopiranoz birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşmuştur.

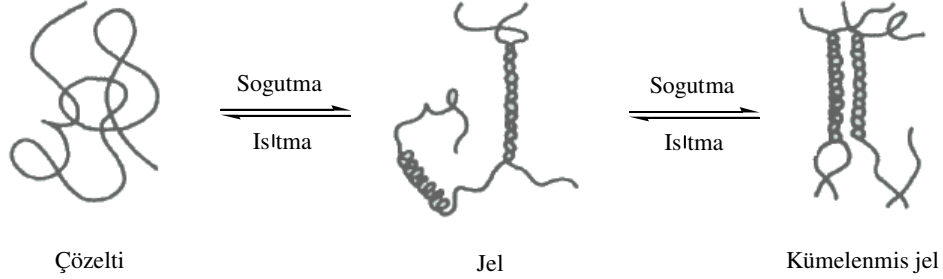


Şekil 1.7. κ -Karragenanın yapısı

Karragenan soğutulduğunda önce jel haline gelir, eğer biraz daha soğutulursa daha yoğun, kümelenmiş jel elde edilir. Bu kümelenmiş jel ısıtılırsa, yavaş yavaş çözünmeye başlar (Şekil 1.8.).

κ -Karragenanın elde edildiği algler arasında, *Rhodophyceae*, *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus* yer almaktadır. Karragenanlar, değişik proseslerle

elde edilmektedir. Bunlar; alkolle ekstraksiyon, potasyum klorür ile jel baskısı ya da çeşitli bazik ekstraksiyonlardır.



Şekil 1.8. Karragenanın sıcaklıkla çözünme mekanizması

1.1.4. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, canlı hücreler tarafından oluşturulan ve canlı hücrelerde gerçekleşen binlerce kimyasal reaksiyonu yürüten, protein yapısında, biyokimyasal katalizörlerdir.⁽⁸⁾ Enzim katalizli bir reaksiyonda, substrat enzimin aktif kısmına hidrojen bağları ve iyonik bağlarla bağlanır, daha sonra enzim, substratı reaksiyon ürünlerine çevirir. Bir enzim molekülü, dakikada binlerce kez reaksiyon döngüsüne girip, döngüyü yürütebilir.⁽⁹⁾

Enzimlerin en önemli özellikleri katalizleme güçleri, kararlı ve spesifik olmalarıdır.^(10,11) Enzimlerin yapısını oluşturan proteinlerdeki aminoasit sıralanışı, biyolojik aktivitelerinin en büyük nedenleri arasında sayılabilir.⁽¹²⁾ Enzimlerin kararlılıklarının arttırılabilmesi için, değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında kimyasal modifikasyonlar ve destek üzerine immobilizasyon sıklıkla kullanılmaktadır.⁽¹³⁾

Endüstride kullanılan enzimlerin % 75 i hidrolitik aktiviteye sahiptir ve doğal maddelerin depolimerizasyonu için kullanılırlar. Bunlar arasında, deterjan ve süt endüstrisinde kullanılan proteinazlar, tüm enzim satışlarının yaklaşık % 40 ını oluşturarak en yaygın kullanım alanına sahiptirler. İkinci en geniş kullanım alanına sahip olan karbohidrazlar, fırıncılık, bira sanayi, damıtma, nişasta ve tekstil sanayinde kullanılmaktadır. Bunların yanında enzimler, alkol, hayvan yemi, katı ve sıvı yağlar, protein, meyve ve şarap, kağıt sanayinde de, kullanılmaktadır.⁽¹³⁾

1.1.5. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon (tutuklama), enzimlerin katalitik aktivitelerini 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 kullanılabilen hem de sürekli proseslere uygulanabilmektedir. Böylece, önemli miktarda ekonomik kazanç elde edilmektedir. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstride kullanılmaktadır.⁽¹⁴⁾

Genel olarak immobilizasyon uygulamaları enzim sistemleri haricinde, uygun destek materyallerine ilaç, protein, mikroorganizma, bitki ve hayvan hücreleri,

biyosensör ve biyoreaktör uygulamaları ve kontrollü ilaç salınım sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.⁽¹⁵⁾

Tarihte ilk enzim immobilizasyonu 1916 yılında Nelson ve Grifin tarafından adsorpsiyon yöntemiyle yapılmıştır. Nelson ve Grifin 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.⁽¹⁵⁾

1.1.5.1. İmmobilize Enzimlerin Avantaj ve Dezavantajları

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre pek çok işlevsel avantajları vardır. Bunlardan en önemlileri şu şekilde sıralanabilir.^(16,17,18)

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) enzimin oluşan ürünü kirletmesi gibi bir sorun olmaz.
- Sürekli proseslere uygulanabilir.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı daha dayanıklıdır.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.

- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.

İmmobilize enzimlerin bazı dezavantajları da vardır. Bunlar da şu şekilde sıralanabilir.^(19,20)

- İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir veya kaybolabilir.
- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim karalılığı sınırlıdır.
- Enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksektir.

1.1.5.2. Enzim Destek Materyali

Enzim immobilizasyonunda destek olarak doğal ve sentetik birçok organik ve anorganik materyal kullanılmaktadır.⁽²¹⁾ Çizelge 1.1’de enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri verilmiştir.

Çizelge 1.1. Enzim immobilizasyonun da kullanılan bazı destek materyalleri

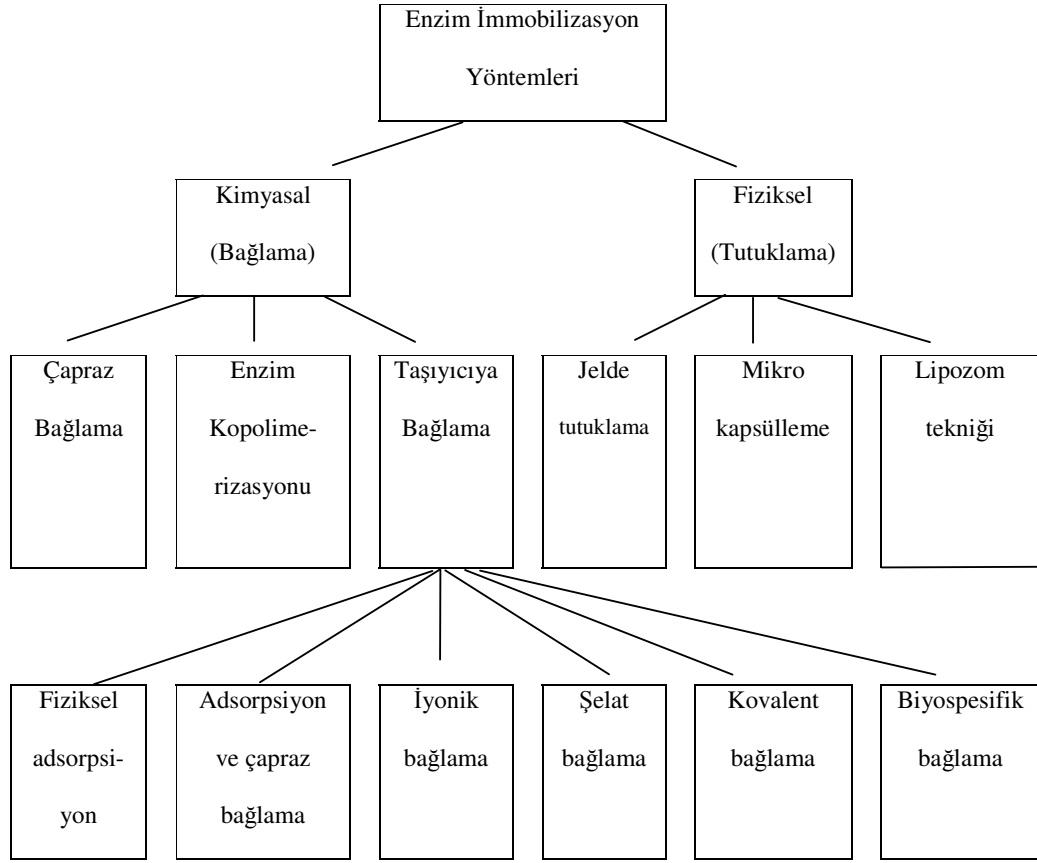
Doğal Polimer	Sentetik Polimer	Anorganik
Selüloz	Stiren esaslı polimerler	Kil
Nişasta	Akrilamit esaslı polimerler	Cam
Aljinat	Naylon	Silikajel
Karragenan	Vinil ve allil polimerler	Ponza taşı
Kollagen	Akrilat esaslı polimerler	Aktif karbon
Jelatin	İyon değiştirici reçineler	Metaller
Albümin	Maleik anhidrit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

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: ⁽¹⁴⁾

- Hidrofilik karakter
- Suda çözünmeme
- Gözenekli yapı
- Mekanik dayanıklılık ve uygun partikül büyüklüğü
- Kimyasal ve termal dayanıklılık
- Mikroorganizmalara karşı dirençli olma
- Ucuzluk
- Zehirsizlik

1.1.5.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler kimyasal veya desteğe bağlanma ve fiziksel veya destek içinde alıkonma olarak iki ana başlık altında incelenebilir. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması Şekil 1.9.'da ki gibi yapılabilir.



Şekil 1.9. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

1.1.5.3.1. Kimyasal İmmobilizasyon Yöntemleri

Kimyasal immobilizasyon yöntemlerinde suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek maddesi ile enzim arasında kovalent bağ oluşur veya birden fazla enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşur. Kimyasal yöntemler çoğunlukla tersinmezdir. Yani serbest enzimin tekrar geri kazanımı mümkün değildir.^(17,22)

Kimyasal yöntemlerle immobilizasyonda, enzimin çok kararlı olması ve destek maddesinin dayanıklı olması gibi avantajlar vardır. Ancak immobilizasyon veriminin sınırlı olması, özel reaksiyon şartları gerektirmesi, kimyasal olarak inert

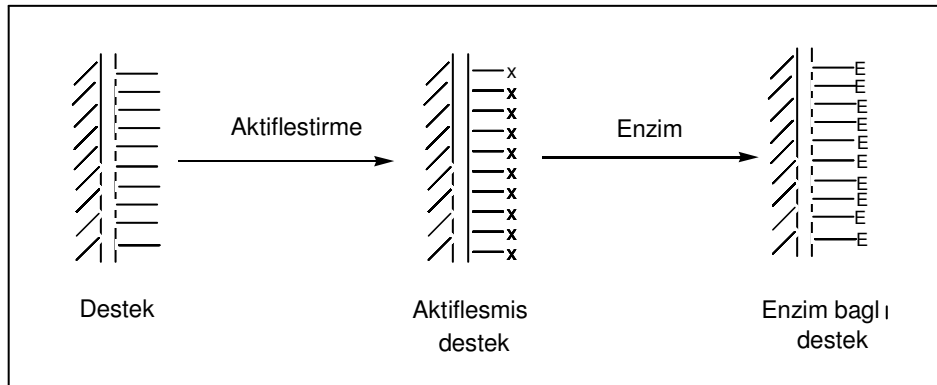
olan destek maddelerine uygulanması için aktivasyon işlemini gerektirmesi gibi sorunlar da söz konusudur.⁽²³⁾

1.1.5.3.1.1. Kovalent Bağlanma

Enzimlerin aktif taşıyıcı destek maddesine kovalent bağlanması çok kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem enzim türevlerinin çok kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiliye geçmesini önler.⁽¹⁷⁾ Kovalent bağlanma, genellikle enzimin yapısına uygun fonksiyonel gruplar bulunduğu kullanılır.

Enzim taşıyıcı destek maddesine bağlanırken, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplardan olmaması ve o gruplarda sterik etkinin artırılmamasına dikkat edilmelidir.

Kovalent bağlanma ile immobilizasyonda eğer taşıyıcı destek maddesi aktif değilse önce destek maddesi aktifleştirilir, daha sonra da enzimin kovalent bağlanması gerçekleştirilir (Şekil 1.10.).



Şekil 1.10. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon

Taşıyıcı destek maddesi; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar taşınmalıdır. Enzimin taşıyıcı destek maddesine bağlanan fonksiyonel grupları ise polipeptid zincirlerin α -amino grupları, arjinin ve lizinin α -amino grupları, glutamat ve aspartatinin α -karboksil grupları ve zincirlerin α -karboksil grupları, serin ve treaninin hidroksil grupları, tirozinin aromatik zincirleri, histidinin imidazol halkası, triptofanın indol halkası ve sisteinin sülfidril grupları gibi gruplardır. İmmobilizasyon reaksiyonunda aktifleştirciler, enzimin bu fonksiyonel grupları ile ve taşıyıcıların içerdiği diazonyum tuzu, asit azid, izosiyanat, imin, imido-ester ve halojenürler gibi reaktif gruplar ile kovalent bağ oluştururlar.⁽²⁴⁾

1.1.5.3.1.2. Çapraz Bağlanma

Enzim molekülleri herhangi bir taşıyıcı destek maddesine ihtiyaç duymadan, kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlanarak immobilize olabilirler. Bu metot 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 kurulması zordur.⁽²⁵⁾ Enzim aktifliği, reaksiyon süresi, sıcaklık, iyonik şiddet, pH, çapraz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu metodun en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki yada çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Bu metodun dezavantajı ise yüksek aktiflik gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki zorluklardır. Çapraz bağlayıcı olarak enzim immobilizasyonun da kullanılan çok fonksiyonlu maddeler, diazobenzidin, 1,5-

diflor-2,4-dinitro benzen, gluteraldehit, triklor-s-triazin, heksametilendiizosiyanat, 2,4-diizotiyosiyanotoluen dir.⁽²⁴⁾

1.1.5.3.2. Fiziksel İmmobilizasyon Yöntemleri

Fiziksel yöntemlerde enzim herhangi bir kimyasal bağ olmadan, destek maddesine tutturulur veya hapsedilir. Bu yöntemlerde enzim immobilizasyonu bazı fiziksel kuvvetlerin etkileştirilmesiyle (elektrostatik, protein-protein etkileşmesi, iyonik bağların oluşumu vb.) enzimin destek maddesindeki boşluklar içerisinde veya gözenekli membranlar da tutturulmasıyla sağlanır. Fiziksel immobilizasyon metotları tersinirdir. Ancak bazı çalışmalarda, tersinmez bağ oluşumları da gözlenmiştir.

Fiziksel metotlar adsorpsiyon ve hapsedme ile immobilizasyon olarak iki gruba ayrılabilir.

1.1.5.3.2.1. Adsorpsiyon İle İmmobilizasyon

Enzimin taşıyıcı destek üzerine fiziksel adsorpsiyonu, geniş uygulama alanı olan basit bir immobilizasyon yöntemidir.^(17,26) Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu katı destek taşıyıcı üzerinde enzimin fiziksel adsorpsiyonuna veya iyonik bağlanmasına dayanır. Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyonu sağlayan kuvvetler; hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir.⁽²⁷⁾ Adsorpsiyon yönteminde uygun bir çözelti içinde çözülmüş halde bulunan enzim, destek ile belli bir süre etkileştirilerek enzimin desteğe tutturulması sağlanır. İmmobilize enzimde hemen hemen hiçbir kimyasal değişiklik olmaz. Çünkü destek materyali ile kimyasal bir tepkime olmamaktadır. Etkin bir immobilizasyon işlemi

için, sıcaklık, adsorbanın miktarı, enzim derişimi, iyonik şiddet, pH ve çözücü karakteri gibi değişkenlere bağlıdır. Adsorpsiyon ortamının koşulları, enzimin fizyolojik koşullarına çok yakın olarak düzenlendiğinde, aktivite kaybı oldukça düşüktür.

Bu avantajların yanında optimum koşulların sağlanma güçlüğü ve enzimle destek arasında zayıf bir çekim varsa enzimin desorpsiyonu ile ürün kirlenmesi gibi dezavantajlar da söz konusu olabilir. Adsorpsiyon yönteminde en çok kullanılan adsorbanslar; anyon ve katyon değiştiricili reçineler, aktif karbon, sentetik ve doğal polimerler, silikajel, nişasta, killer, alümina, bentonit, seramikler ve gözenekli camlardır.⁽²⁸⁾

1.1.5.3.2.2. Hapsetme ile İmmobilizasyon

Bu yöntemle immobilizasyon, enzimin bir polimer matriksin örgü yapısı içinde veya etrafı çevrili bir membran içinde alıkonulması esasına dayanır.⁽²⁹⁾ Bu yöntemde polimerik matriksin yapısı, substrat ve ürün çıkışına izin verdiği halde enzimin dışarıya kaçmasını engelleyecek yapıdadır. Bu yöntemin kovalent ve çapraz bağlanma yöntemlerinden farkı enzimin jel matris ve membrana bağlı olmamasıdır. Bu yöntem her tür enzimi, biyokatalizörleri, bazı canlı hücreleri ve farklı büyüklükteki mikroorganizmaları hapsetmek için kullanılabilen genel bir yöntemdir.

Bu yöntem çok kolay uygulanabilen fiziksel bir yöntemdir. Kimyasal bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcılara ihtiyaç yoktur. Ancak enzimin immobilizasyon işlemi sırasında inaktive olabilmesi gibi sorunlar olabilir.

Enzim hapsedilmesi için organik ve anorganik yapıya sahip birçok taşıyıcı destek maddesi kullanılır. Bu taşıyıcılar partikül, tüp, membran ve fiber şeklinde olabilir. Çizelge 1.2.'de enzim hapsedilmesi yönteminde yaygın olarak kullanılan bazı polimerler gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Enzim hapsedilmesi için kullanılan bazı destek maddeleri

Doğal Destek Maddeleri	Sentetik Destek Maddeleri
Polisakkarit kökenliler - Selüloz - Aljinat - Karragenan	Poliakrilatlar Polistiren Vinil ve alil polimerler Poliamidler
Protein kökenliler - Kollajen	Maleik andrit bazlı kopolimerler

Enzim hapsedilmesi için taşıyıcı destek maddesi seçilirken çeşitli faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekir. Bunlar; fiziksel form, sertlik ve dayanıklılık gibi mekanik özellikler, kimyasal ve mikrobiyal etkilere karşı direnç, hidrofilik / hidrofobik uç oranı, geçirgenlik, yüzey alanı, maliyet ve kolay bulunabilirliktir.

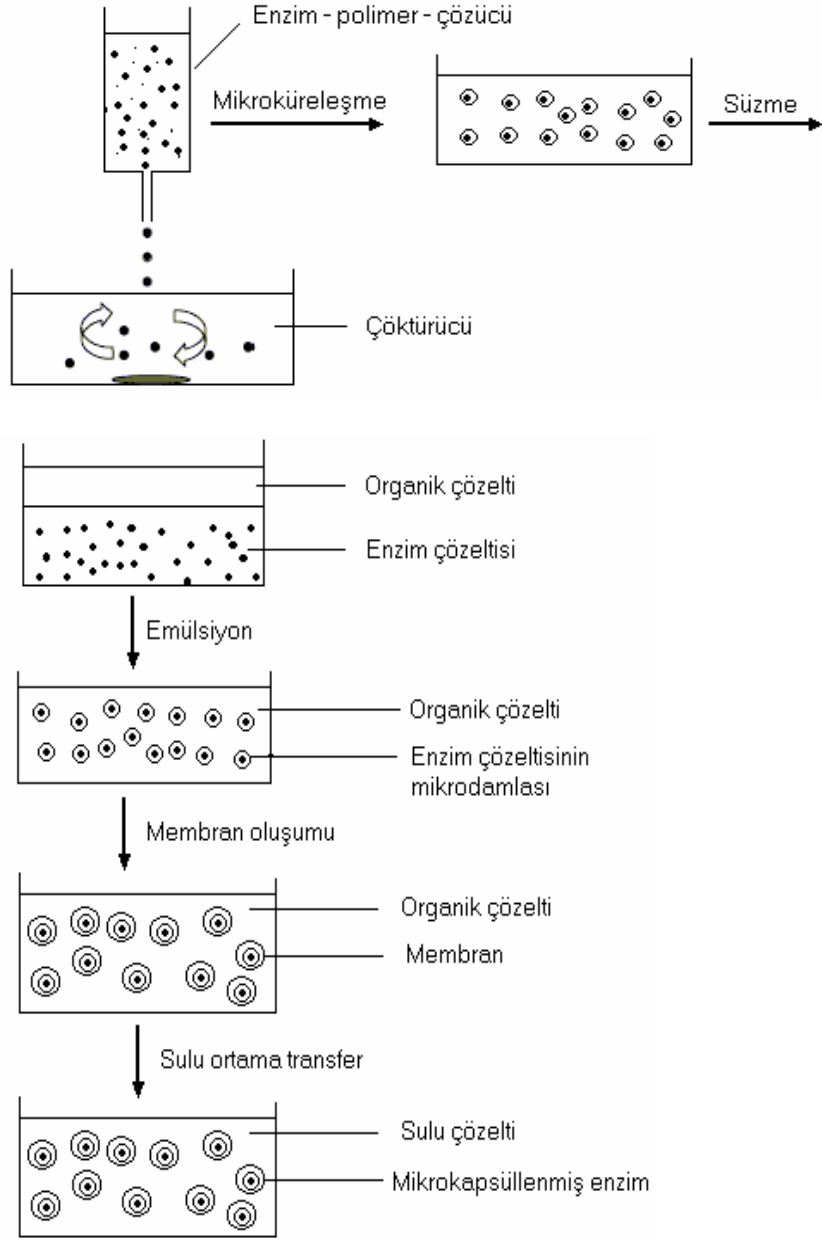
Hapsedilmesi ile immobilizasyon yöntemi, mikrokapsül ile hapsedilmesi, kafes tipi hapsedilmesi olarak iki şekilde yapılır.

a) Mikrokapsül ile Hapsedilmesi 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 mikrokapsüllemesi 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 mikrokapsüllemiş olur (Şekil 1.11.).

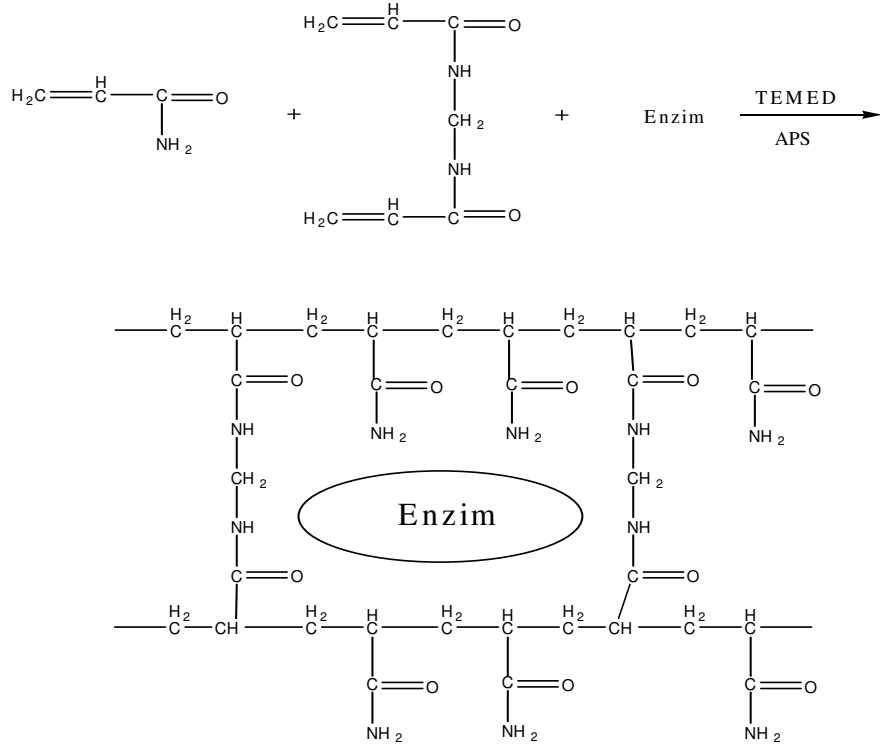
Mikrokapsülleme yönteminde herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır.⁽³⁰⁾ Bu oranının büyük olması da mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat reaksiyonunu olasılığını artırır. Bu yöntemde mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein konsantrasyonuna gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler gerektirmesi gibi dezavantajlar söz konusudur.



Şekil 1.11. Mikrokapsülleme ile immobilizasyon

b) *Kafes Tipi Hapsetme Yöntemi* : Kafes tipi hapsetme yöntemi, çapraz bağlı polimerlerin boşlukları içinde enzimin tutulması esasına dayanır. Bu yöntemde enzim içeren monomer yada polimer çözeltilerine uygun bir kimyasal başlatıcı, UV veya γ -ışınları uygulayarak yüksek oranda çapraz bağlı bir polimer ağı oluşturulur. Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisinde tutulur ve jel matriksin dışına çıkamaz, fakat substrat ve ürün sürekli kafes içine giriş-çıkış yapabilir. Enzim kimyasal değişime uğramaz ve enzimin intrinsik özelliklerinde herhangi bir değişim gözlenmez. Ayrıca bu yöntemde farklı fiziksel formlarda suda çözünmeyen enzim türevleri hazırlanabilir. Jelatinimsi yapıya sahip enzim türevleri, immobilize bir enzimin hem düzenli hem de düzensiz yüzeyler üzerinde kolayca depolamasını sağlar.

Çapraz bağlı polimer oluşturarak enzim hapsedilmesinde en çok kullanılan polimer, N,N-metilen-bis-akrilamit ile çapraz bağlanarak oluşturulan poliakrilamittir.⁽¹⁴⁾ Şekil 1.12.'de çapraz bağlı poliakrilamit matriksinde enzim hapsedilmesi gösterilmektedir.



Şekil 1.12. Polakrilamid jel içine enzim hapsedilmesi

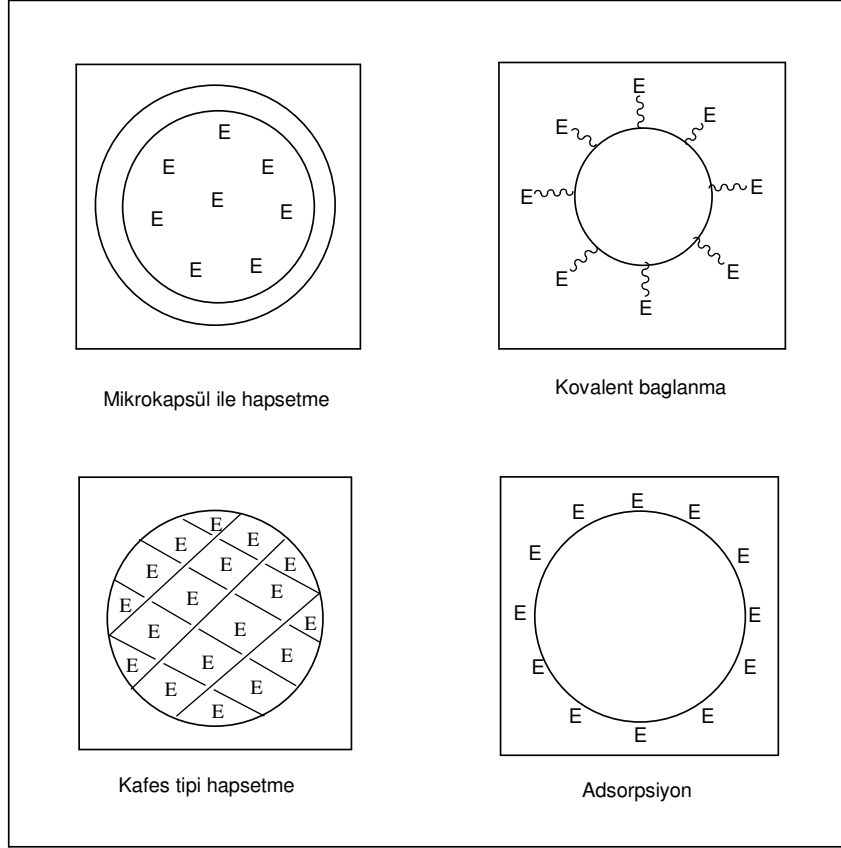
Bu yöntemin avantajları şu şekilde sıralanabilir. ^(31,32,33,34)

- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzimin yapısını ve aktifliğini kimyasal metotlara göre daha az etkiler.
- Ortamdaki monomer ve çapraz bağlayıcı derişimini değiştirerek farklı büyüklükte gözenek boyutuna sahip polimerik kafesler elde edilebilir.
- Polimerleşme kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleşebilmektedir.

Metodun dezavantajları ise,

- Çapraz bağlı polimer ağlarından enzimin sızması,
- Küçük hacimli substratlar için sınırlı olması ve
- Makromoleküler substrat için düşük aktiflik göstermesidir.

Yukarıda anlatılan enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik olarak gösterilmesi Şekil 1.13.de verilmiştir.



Şekil 1.13. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

1.1.5.4. İmmobilizasyon Yönteminin Seçimi

Yapılan enzim immobilizasyonunun başarılı olabilmesi aşağıdaki faktörlere bağlıdır.⁽¹⁶⁾

1. Enzim, immobilizasyon yapılacağı koşullarda kararlı olmalıdır.

2. Çapraz bağlayıcı reaktifler, enzimin aktif uçları ile reaksiyona girmemelidir. Enzimin aktif ucuna nüfuz etmemesi için çapraz bağlayıcı reaktif olabildiğince büyük olmalıdır.
3. İmmobilizasyonda enzimin aktif ucunun korunması gerekir. Örneğin sülfidril enzimleri, glutatyon veya sistein ile reaksiyona sokularak korunabilir ve daha sonra tekrar aktifleştirilebilir.
4. İmmobilize enzim, bazı kimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılacak ise immobilizasyon metodu seçilmeden önce reaksiyon doğası göz önünde bulundurulmalıdır.
5. İmmobilizasyon sonunda bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulanan yıkama işlemi enzimi etkilememelidir.
6. Destek materyalinin mekanik özellikleri, özellikle fiziksel formu ve mekanik kararlılığı göz önüne alınmasıdır.

1.1.6. Lakkaz Enziminin Yapısı ve Özellikleri

Lakkaz (L) enzimi, her molekülü dört bakır iyonu taşıyan bir oksidoredüktazdır. Lakkaz redoks enzimlerinin bir alt sınıfıdır. Karbohidraz ve proteazlar gibi hidrolitik enzimlerinin substrat özgüllüğünün aksine redoks enzimlerinin substrat özgüllüğü oldukça azdır.⁽³⁵⁾

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.^(36,37) 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. Şekil 1.14.de beyaz çürükçül mantarlardan biri olan *Agaricus Bisporus* görülmektedir.



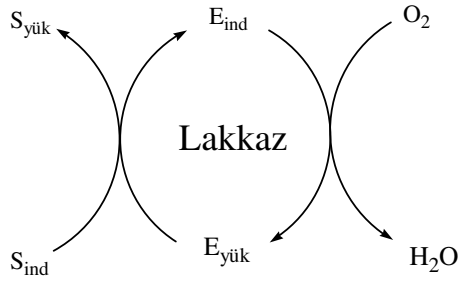
Şekil 1.14. Lakkaz üreten *Agaricus Bisporus* beyaz çürükçül mantarı

Bir L enzimi, kaynağından molekül ağırlığı, optimum pH, substrat özgülüğü 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.⁽³⁸⁾

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

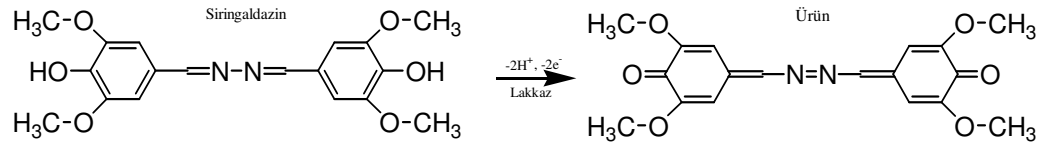
göstermektedir. L enziminin optimum pH değeri kullanılan substrata göre de değişmektedir.⁽³⁷⁾

L enzimi, aromatik substratı oksitlerken, aynı zamanda oksijen molekülünün suya indirgenmesini katalizler (Şekil 1.15.).^(39,40) L in aktif bölgesinde hidratlaşmış elektron, oksijen ve değişik tiplerde bakır atomları bulunur.



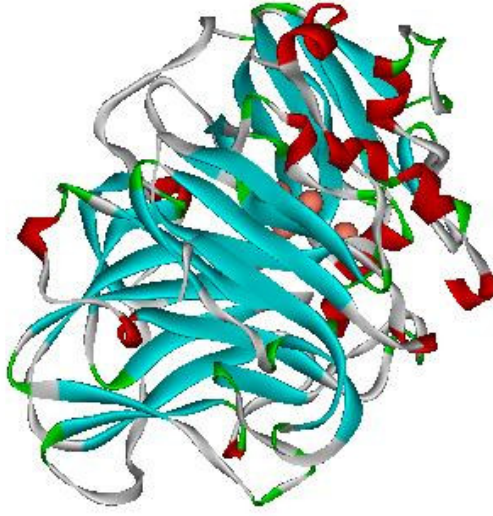
Şekil 1.15. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması

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.⁽⁴¹⁾ Genel olarak fenoller, amino fenoller ve aromatik diaminler ile benzer özellikler gösteren substratlar, L enzimi tarafından oksitlenebilir.⁽⁴²⁾ Şekil 1.16. da siringaldazinin L ile verdiği tepkime ve sonuçta oluşan ürün gösterilmektedir.⁽⁴³⁾



Şekil 1.16. 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. Şekil 1.17.'de *Trametes versicolor*'dan elde edilen L enziminin üç boyutlu yapısı görülmektedir.⁽⁴⁴⁾



Şekil 1.17. *Trametes versicolor* dan elde edilen lakkaz enziminin üç boyutlu yapısı

1.1.6.1. Lakkaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

L enziminin substratındaki çeşitlilik ve pek çok reaksiyonu katalizleyebilmesi nedeniyle, biyoteknolojide yaygın olarak kullanılmaktadır.

L enzimi, serbest haldeyken veya bir desteğe immobilize edildiğinde farklı çalışmalarda kullanılmıştır. L enziminin, immobilizasyon özelliklerinin incelenmesiyle ilgili bazı çalışmalar şöyle sıralanabilir.

Al-Adhami ve arkadaşları, üç farklı beyaz çürükçül fungusun elde ettikleri L₁ DEAE-Granocel 500, CM- Granocel 500 ve akrilik taşıyıcılara kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. Siringaldazin substratı kullanarak immobilize enzimlerin aktifliği üzerine pH, sıcaklık ve inkübasyon zamanını etkisini incelemişlerdir.⁽⁴⁵⁾

Delanoy ve arkadaşları *T. Versicolor* dan elde edilen L₁, farklı miktarlardaki kitosan ile konjuge etmişler ve konjuge L₁ ların aktivitelerine pH ve sıcaklığın etkisini inceleyip, kinetik parametreleri belirlemişlerdir.⁽³⁶⁾

Jiang ve arkadaşları, süspansiyon yöntemi ile kitosan mikro kürelerini gluteraldehit ile çapraz bağlayarak hazırlamışlar ve kürelerin üzerine L₁ enzimini immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin, immobilizasyon şartları incelenmiş ve bunlarla bağlantılı olarak pH, sıcaklık ve kinetik parametreler tayin edilmiştir.⁽⁴⁶⁾

Rogalski ve arkadaşları, *Cerrena unicolor*'dan üretilen L₁ poroz cam yüzeyine immobilize etmişler ve immobilize enzimin 8 farklı substrata göre aktifliğini etkileyen parametreleri incelemişlerdir.⁽³⁵⁾

L₁ enzimi çeşitli alanlarda biyosensör olarak da kullanılmaktadır. Biyosensör; fizyolojik ve biyokimyasal bir değişim hakkında bilgileri saptayan, nakleden ve kaydeden bir cihazdır. Teknik olarak biyosensör, biyolojik bir kısımla elektronik bir iletim sisteminin birbirini tamamladığı, biyokimyasal bir sinyali, miktarı ölçülebilir elektriksel akıma dönüştüren bir probtur. Bir biyosensörün fonksiyonu biyolojik olarak aktif materyalin biyokimyasal özgülüğüne bağlıdır. Aromatik amin ve fenolik bileşiklerin saptanması amacıyla L₁ içeren pek çok biyosensör geliştirilmiştir.

De Quan ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, silan ile modifiye edilmiş platin elektrot yüzeyine L₁ kovalent bağlamışlar ve elektrodun sıcaklık ve pH duyarlılığı,

kararlılığı ve farklı substratlar üzerine etkilerini incelemiştir.⁽⁴⁷⁾ De Quan ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada L camsı karbon elektrotta kovalent bağlanarak immobilize edilmiştir.⁽⁴¹⁾

Timur ve arkadaşları L 1 polianilin matriksine immobilize ederek ince film hazırlamışlar ve farklı fenoller kullanarak bu sensörün özelliklerini incelemiştir.⁽⁴⁸⁾

Cabrita ve arkadaşları n-hidroksi süksinimit ile modifiye edilmiş altın elektrot üzerine L 1 kovalent bağ ile immobilize etmişler ve bu sensörün özelliklerini incelemiştir.⁽⁴⁹⁾

Çeşitli fabrikalardan çevreye verilen atık sular, farklı türlerde kirleticiler içermektedirler. Pek çok ticari işletme atık sularını herhangi bir arıtıma tabi tutmadan direkt olarak doğaya boşaltmakta, bu atık sularda gerek alıcı çevrede gerekse o çevrede bulunan çeşitli canlılar üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bazı işletmeler ise kimyasal yollarla atık sularını arıtmaktadır. Ancak arıtmada kullanılan kimyasalların kendileri de birer kirleticidir. Bu nedenle atık suların arıtılmasında kullanılabilecek en akıllıca yöntem biyolojik arıtım yöntemidir. Atık sulardaki kirleticilerin L enzimi kullanılarak uzaklaştırılması bu enzimin diğer bir kullanım alanıdır.

D'Annibale ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, L eupergite üzerine immobilize edilmiş ve enzimin aktifliğine pH, sıcaklık ve iyonik şiddetin etkisi incelenmiş ve kinetik parametreler belirlenmiştir. Ayrıca bu immobilize enzim kullanılarak zeytin fabrikası atık sularında bulunan 12 farklı fenolik bileşiğin uzaklaştırılma özellikleri incelenmiştir.⁽⁵⁰⁾

Lante ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada L enzimi polietersülfon membrana immobilize edilmiştir. Siringaldazin substratı kullanılarak enzimlerin aktifliği üzerine pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Ayrıca immobilize enzimin atık sularındaki farklı fenol türevlerini uzaklaştırma yeteneği çalışılmıştır.⁽⁵¹⁾

Dodor ve arkadaşları *T. Versicolor* dan elde edilen L 1 kaolinit üzerine immobilize etmişler ve immobilizasyon özelliklerini incelemişlerdir. Ayrıca immobilize enzimle poli aromatik hidrokarbonların (PAH) uzaklaştırma çalışmaları yapmışlardır.⁽⁵²⁾

Dias ve arkadaşları, serbest L enzimi kullanarak zeytin fabrikası atık sularındaki fenollerin uzaklaştırılması ve renk giderilmesi üzerine çalışmalar yapmışlardır.⁽⁵³⁾

Zamora ve arkadaşları, silika temelli bazı destek materyallerne L 1 immobilize etmişler ve immobilize enzimle çeşitli boyar maddelerin renk giderimi üzerine çalışmalar yapmışlardır.⁽⁵⁴⁾

İndigo, tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılmakta olup çevre kirliliğine neden olan biyolojik yıkıma dirençli bir maddedir. Bu boya tekstil endüstrisinde özellikle kot kumaşlarının boyanmasında kullanılmakta olup, bazı kotların belirli bölgelerinde boyanın renginin açılması için taşlama yapılmaktadır. İndigo boyanın L enzimiyle kot kumaşının belirli bölgelerinde enzimatik olarak kısmi yıkımıyla kumaşa sürtünmeden dolayı meydana gelen dejenerasyon ortadan kaldırılmış olur.

Couto ve arkadaşları, *Trametes hirsuta*'dan elde edilen L 1 gözenekli paslanmaz çeliğe immobilize etmişler ve bu enzim ile tekstil boyalarının renklerinin giderilmesi çalışılmıştır.⁽⁵⁵⁾

Şıra ve şarap; etanol, organik asitler, tuzlar ve fenolik bileşikler gibi bir çok farklı kimyasal bileşiğin kompleks karışımlarıdır. Renk ve tat şarapta farklı türlerde bulunan belli fenolik bileşiklere bağlıdır. Fenolik bileşiklerin pek çok grubu şarapta bulunur. Süksinik asit türevleri ve kateşinler tüm şaraplarda farklı miktarda bulunurlar. Şarapta bulunan tüm fenolik bileşikler şarabın yillanması sırasında çeşitli değişimlere uğrarlar ve çeşitli reaksiyonlarla birlikte bazı problemler ortaya çıkabilir. Bu sebeple şarabı ve şırayı fenol bağımlı renksizleşme ve tatsızlaşmadan korumak için farklı metotlar geliştirilmiştir. Bunlardan biri L ile polifenol oksidasyonunu sağlamaktır.⁽⁵⁶⁾

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Lakkaz (EC 1.10.3.2) (from *Agaricus Bisporus*, 6,5 U/mg), N,N,N'N'-tetrametiletildiamin (TEMED): (C₆H₁₆N₂, 116,20 g/mol), κ-karragenan, Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.

N,N'-Metilen-bis-akrilamit: (C₇H₁₀N₂O₂, 154,16 g/mol), Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.

4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin (siringaldazin): (C₁₈H₂₀N₂O₆, 360,36 g/mol), Sigma (Almanya) firmasından elde edildi.

Amonyum persülfat: ((NH₄)₂S₂O₈, 228,19 g/mol), BDH (İngiltere) firmasından temin edildi.

Etanol: (C₂H₅OH, 46,06 g/mol) ve fosforik asit: (H₃PO₄, 98,0 g/mol), Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edildi.

Akrilamit: (H₂C=CHCONH₂, 71,08 g/mol), sitrik asit (C₆H₈O₇, 192,13 g/mol) ve sodyum hidroksit (NaOH, 40,0 g/mol) ise Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

Kullanılan bütün kimyasallar, analitik saflıktadır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanması

L enzimi, 1 mg/mL derişiminde olacak şekilde, pH 6,0, 0,04 M fosfat tamponunda çözümlenerek hazırlandı. Bu çözeltiler sadece serbest enzim deneylerinde kullanıldı.

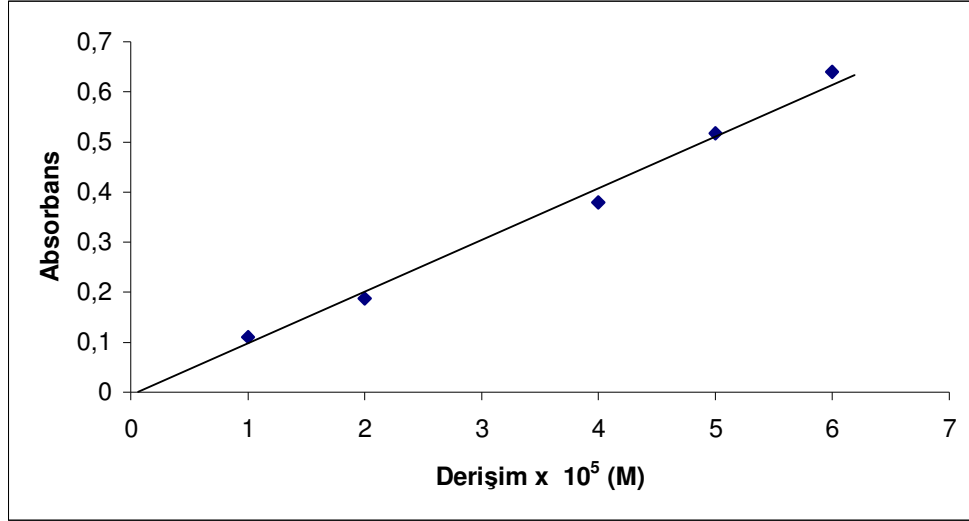
Siringaldazin çözeltileri 0,5 mM derişiminde, etanolde çözümlenerek hazırlandı. Substrat derişiminin etkisi incelenirken 0,1-0,6 mM aralığında hazırlandı.

Fosfat tamponu, fosforik asit çözeltilerinden 0,4 M sodyum hidroksit eklenerek derişimi 0,04 M ve pH 6,0 olacak şekilde hazırlandı.

Sitrat tamponu, sitrik asit çözeltilerinden 0,4 M sodyum hidroksit eklenerek derişimi 0,04 M ve pH 5,3 olacak şekilde hazırlandı.

2.2.2. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisi çizmek için farklı derişimlerde (0,1-0,6 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 1'er mL alınarak üzerlerine 3 mL sitrat tamponu (pH 5,3) ve 5 mL L çözeltileri eklendi ve 20 °C'da 20 dakika çalkalamalı su banyosunda çalkalandıktan sonra oluşan pembe renkli çözeltilerin toplam hacmi 10 mL ye tamamlandıktan sonra UV-görünür bölge spektrofotometresi (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) kullanılarak 525 nm de absorbanları ölçüldü. Siringaldazin derişimlerine karşı elde edilen absorban değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Siringaldazin kalibrasyon eğrisi

2.2.3. Poliakrilamit Jeline Enzim İmmobilizasyonu

L enzimi poliakrilamit jeline hapsedme yoluyla immobilize edildi. 22 mL enzim çözeltisi üzerine 2,85 g akrilamit, çapraz bağlayıcı olarak 0,15 g N,N'-metilen-bis-akrilamit ve 10 mg amonyum persülfat eklendi. Karışım içindeki bileşenlerin tamamen çözünüp homojen bir hal alması için 1 saat magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Bu çözelti üzerine 1 mL TEMED eklendi ve 25 °C da 5 dakikada polimerleşme tamamlandı.⁽²⁶⁾ Elde edilen hidrojel 4 °C da saklandı.

2.2.4. Poliakrilamit - κ-Karragenan Jeline Enzim İmmobilizasyonu

L enzimi poliakrilamit – κ-karragenan jeline hapsedme yoluyla immobilize edildi. 22 mL enzim çözeltisi üzerine 0,05 g κ-karragenan (PAAm-K1) veya 0,1 gκ-

karragenan (PAAm-K2) , 2,85 g akrilamit, çapraz bağlayıcı olarak 0,15 g N,N'-metilen-bis-akrilamit ve 10 mg amonyum persülfat eklendi. Karışım içindeki bileşenlerin tamamen çözünüp homojen bir hal alması için 1 saat magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Bu çözelti üzerine 1 mL TEMED eklendi ve 25 °C da 5 dakikada polimerleşme tamamlandı. Elde edilen iç içe geçmiş polimerik ağ yapısındaki jel 4 °C da saklandı.

2.2.5. Lakkazın Aktiflik Tayini

2.2.5.1. Serbest Lakkazın Aktiflik Tayini

Serbest L in aktiflik tayini Leonowicz ve Grzywnowicz tarafından önerilen yöntemle yapıldı.⁽⁵⁷⁾ Aktiflik tayininde 3 mL sitrat tamponu (pH:5,3) üzerine 1 mL siringaldazin çözeltisi (0,5 mM) ve 5 mL L çözeltisi (1 mg/mL) eklenerek tepkime başlatıldı. Çözelti çalkalamalı su banyosunda 20 °C da 20 dakika (t) çalkalandı. Tepkime sonunda oluşan pembe renkli ürünün, UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak 525 nm de absorbans değeri (A) ölçüldü. Tepkime hızı ölçülen absorbans değerleri ve kalibrasyon eğrisinin eğiminden ($\Delta A_{525}/\Delta c$) faydalanarak aşağıdaki bağıntıya göre hesaplandı.

$$\text{Aktiflik} = \text{Hız (V)} = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{525}}{\Delta t} \times \frac{\Delta c}{\Delta A_{525}}$$

Bütün ölçümler üç kez tekrarlanmış ve her bir absorbans değeri 2 kez okunmuştur.

1 unit enzim; 25 °C da ve pH: 6 da 1 µmol benzendiölü kinona çeviren enzim miktarıdır.

2.2.5.2 İmmobilize Lakkazın Aktiflik Tayini

İmmobilize L in aktiflik tayini Leonowicz ve Grzywnowicz tarafından önerilen yöntemle göre yapıldı.⁽⁵⁷⁾ 4 mL sitrat tamponuna (pH:5,3), 0,3 mL siringaldazin (0,5 mM) ve 3 mg enzim hapsedilmiş 0,1 g jel eklendi. Karışım çalkalamalı su banyosunda 20 °C da 20 dakika çalkalandı. Tepkime sonucunda oluşan pembe renkli ürünün UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak absorpsiyon değerleri ölçüldü. Ölçülen absorpsiyon değerlerinden aktiflik hesabı Bölüm 2.2.5.1. anlatıldığı gibi hesaplandı. Bu işlemler her bir kompozisyondaki jel için yapılmıştır. Bütün ölçümler üç kez tekrarlanmış ve her bir absorpsiyon değeri 2 kez okunmuştur.

2.2.6. Enzim Aktifliğine pH nın Etkisi

2.2.6.1 Serbest Lakkazın Aktifliğine pH nın Etkisi

Serbest L in aktifliğine pH nın etkisini belirleyebilmek amacıyla farklı pH larda (4,0-8,0) fosfat tamponları hazırlandı. Her bir pH da aktiflik Bölüm 2.2.5.1.'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresi (20 dakika), sıcaklık (20 °C), L derişimi (1 mg/mL) ve siringaldazin derişimi (0,5 mM) sabit tutulmuştur.

2.2.6.2. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine pH'nın Etkisi

İmmobilize L'in aktifliğine pH'nın etkisini belirleyebilmek için farklı pH larda (4,0-11,0) fosfat tamponları hazırlandı. Her bir pH da aktiflik tayini Bölüm 2.2.5.2.'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresi (20 dakika), sıcaklık (20 °C), jel miktarı (0,1 g) ve siringaldazin derişimi (0,5 mM) sabit tutulmuştur.

2.2.7. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

2.2.7.1. Serbest Lakkazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Serbest L'in aktifliğine sıcaklığın etkisi farklı sıcaklıklarda (20-60 °C) araştırılmıştır. Her bir sıcaklık için aktiflik tayini Bölüm 2.2.5.1.'de anlatılan yöntemle göre yapılmıştır. Tepkime süresi (20 dakika), pH (5,3), L derişimi (1 mg/mL) ve siringaldazin derişimi (0,5 mM) sabit tutulmuştur.

2.2.7.2. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

İmmobilize L'in aktifliğine sıcaklığın etkisi farklı sıcaklıklarda (20-70 °C) araştırılmıştır. Her bir sıcaklık için aktiflik tayini Bölüm 2.2.5.2.'de anlatılan yöntemle göre yapılmıştır. Tepkime süresi (20 dakika), pH (5,3), jel miktarı (0,1 g) ve siringaldazin derişimi (0,5 mM) sabit tutulmuştur.

2.2.8. Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

2.2.8.1. Serbest Lakkazın Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest L ın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 5 farklı konsantrasyonda (0,1-0,6 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 2.2.5.1.'de anlatılan yöntemle göre yapılmıştır. Tepkime süresi (20 dakika), pH (5,3), L derişimi (1 mg/mL) ve sıcaklık (20 °C) sabit tutulmuştur.

2.2.8.2. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

İmmobilize L ın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 5 farklı konsantrasyonda (0,1-0,6 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 2.2.5.2.'de anlatılan yöntemle göre yapılmıştır. Tepkime süresi (20 dakika), pH (5,3), jel miktarı (0,1 g) ve sıcaklık (20 °C) sabit tutulmuştur.

2.2.9. Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

2.2.9.1. Serbest Lakkazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest L ın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için pH 6,0 fosfat tamponunda, 1 mg/mL derişiminde enzim çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler buzdolabında 4 °C da saklandı ve bu çözeltilerden 5'er gün arayla 5 mL örnek alınarak Bölüm 2.2.5.1.'de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapılmıştır. Tepkime süresi (20 dakika), pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,5 mM) ve sıcaklık (20 °C) sabit tutulmuştur.

2.2.9.2. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

İmmobilize L in aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için Bölüm 2.2.3 ve Bölüm 2.2.4 de anlatıldığı gibi içerisine enzim hapsedilerek hazırlanan jeller buzdolabında 4 °C da saklandı. Bu jellerden 5 er gün arayla 0,1 g örnek alınarak Bölüm 2.2.5.2.'de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapılmıştır. Tepkime süresi (20 dakika), pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,5 mM) ve sıcaklık (20 °C) sabit tutulmuştur.

2.2.10. Enzim Aktifliğine Tekrar Kullanım Sayısının Etkisi

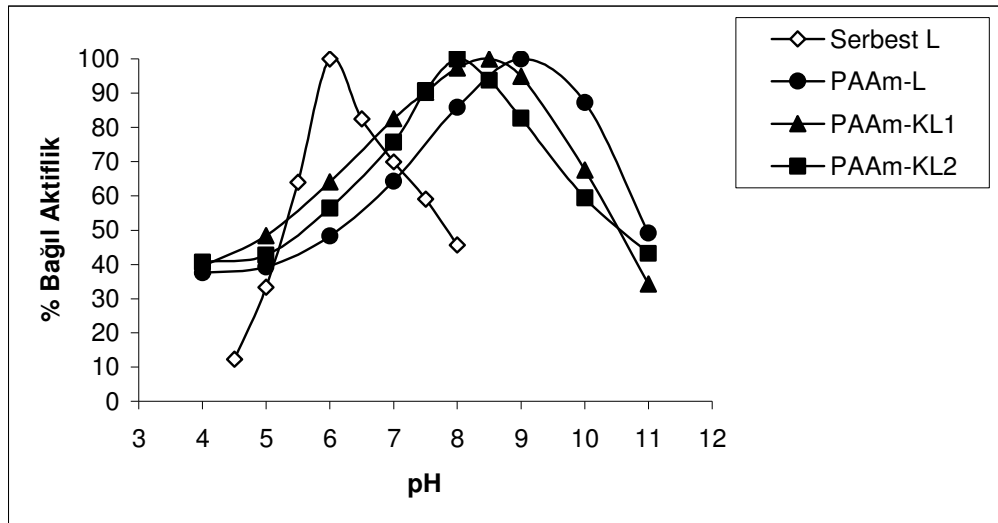
2.2.10.1. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine Tekrar Kullanım Sayısı Etkisi

İmmobilize L in tekrar kullanılabilirliğini incelemek için 0,5 g enzim hapsedilmiş jel kullanılarak Bölüm 2.2.5.2.'de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapılmıştır. Tepkime süresi (20 dakika), pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,5 mM) ve sıcaklık (20 °C) sabit tutulmuştur. Deney 2 günde tamamlanmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. Enzim Aktifliğine pH'nın Etkisi

Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 2.2.5.1.ve 2.2.5.2.'de anlatıldığı gibi aktiflikler belirlenmiş ve bu değerlerden hesaplanan % bağıl aktiflik değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.1.). Serbest enzim için maksimum aktiflik pH 6,0'da görülürken, PAAm-L için 9,0, PAAm-KL1 için 8,5 ve PAAm-KL2 için pH 8,0 de görülmüştür.



Şekil 3.1. Serbest ve immobilize enzimler için % bağıl aktifliğinin pH ile değişimi

Enzimler, elektrolit karakterli olduklarından, enzim aktifliği pH ile değişme gösterir.⁽⁵⁸⁾ Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik ve bazik grupların varlığı ve pH değişimi ile enzim-substrat (ES) kompleksinin kararlılığını etkiler. Kararlı ES kompleksi oluştuğunda tepkime hızı maksimumdur. Bunun için enzimler

için tepkime hızının maksimum olduğu optimum pH değerleri belirlenir. Genellikle lakkaz enzimlerin optimum pH değerleri 3-10 arasındadır. Çok asidik veya çok bazik ortamlarda enzimler denatüre olacağından reaksiyon hızı tersinmez olarak azalır ve sifıra kadar düşebilir.⁽⁴⁵⁾

Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi immobilize enzimlerin optimum pH ları serbest enzime göre daha bazik bölgeye kaymıştır. Bunun nedeni, çözeltideki pH koşullarının jel matriksinin gözenek alanındaki pH koşullarından farklı olmasıdır. Optimum pH daki bu değişme iyonik ve polar etkileşimler veya hidrojen bağı ve dipol-dipol etkileşimi gibi ikincil etkileşimler olabilir.⁽⁵⁹⁾ Ayrıca poliiyonik matriksler enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak kullanıldığında, enzimin mikro çevresi ile tepkimenin ana çözeltisi arasında protonların farklı derişimlerde bulunmasına neden olurlar. Polianyonlar enzim etrafındaki protonları çekme eğiliminde iken polikasyonlar bunları iterler. Dolayısıyla polimerik destek çevresindeki pH, ana çözeltinin pH değerinden farklı olabilir.^(60,61,62)

Şekil 3.1.de immobilize enzimlerin pH larının da kendi aralarında farklılıklar gösterdiği görülmektedir. Poliakrilamit jeline karragenan eklenerek elde edilen jellerde de pH nın poliakrilamit jeline göre daha düşük değere kaydığı görülmüştür. Bu da, ortama eklenen karragenanın, jel matriksindeki ve dolayısıyla enzim çevresindeki hidrojen iyonu konsantrasyonunu arttırmasından kaynaklanabilir.⁽⁶³⁾

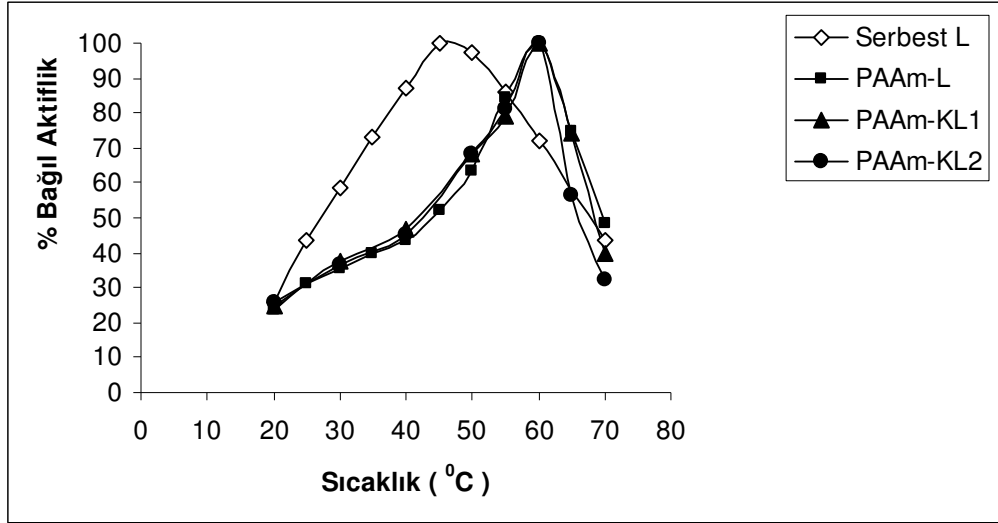
İmmobilize enzimlerin pH aralığının serbest enzimden daha geniş olması immobilizasyonun enzim aktivitesini daha geniş pH alanında koruduğunun ve immobilize enzimlerin daha yüksek pH da bile aktif olduğunun bir göstergesidir.

Bu çalışmada, poliakrilamit ve poliakrilamit - κ -karragenan karışımlarına hapsedme yoluyla L immobilize edildiğinde optimum pH nın arttığı gözlenmiştir. Al-

Adhami ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada L, divinil sülfonla modifiye edilmiş selüloza kovalent bağlanma yoluyla immobilize edilmiş ve serbest enzimde 5,2 olan optimum pH'nın selülozda 8,0'a çıktığı görülmüştür.⁽⁴⁵⁾ Başka bir çalışmada, Lante ve arkadaşları, polietersülfon membrana immobilize edilen L serbestken 6,3 olan pH'sı immobilize edilince 6,6'ya yükselmiştir⁽⁵¹⁾ Yinghui ve arkadaşları L₁ polivinilalkole kovalent bağla immobilize ettiklerinde optimum pH'sını 3,2 bulurken⁽⁶⁴⁾, D'Annibale ve arkadaşları L₁ euperгите immobilize ettiklerinde optimum pH'yı 4,0 olarak bulmuşlardır.⁽⁵⁰⁾ D'Annibale ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada kitosan gluteraldehit ile çapraz bağlanmış ve üzerine L adsorpsiyonla immobilize edilmiş, optimum pH'nın 4,0 olduğu ve değişmediği görülmüştür.⁽⁶²⁾ Durante ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise L, glisidil metaktilat, heksametilendiamin ve gluteraldehit ile aşılınmış naylon membrana immobilize edildiğinde pH'nın değişmediği ve 7,5 olduğu bulunmuştur.⁽¹⁹⁾

3.2. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 2.2.8.1. ve 2.2.8.2.'de anlatıldığı gibi aktiflikler belirlenmiş ve bu değerlerden hesaplanan % bağıl aktiflik değerleri sıcaklığa karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Serbest ve immobilize enzimler için % bağıl aktifliğin sıcaklık ile değişimi

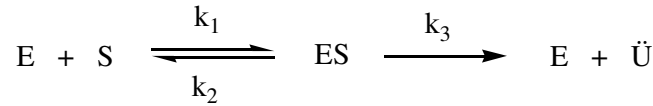
Şekilde görüldüğü gibi serbest enzim için maksimum aktiflik 45 °C da gözlenirken immobilize enzimler için 60 °C da gözlenmiştir. Dolayısıyla enzim immobilizasyon işlemi ile sıcaklığa daha dayanıklı hale getirilmiştir. Optimum sıcaklıktaki bu artış, hapsedilen enzim moleküllerinin konformasyonel esnekliğinin azalması ve dolayısıyla enzim molekülünün görevini yapıp substrata bağlanmak için uygun bir konformasyona gelmesi ve yeniden düzenlenmesi için daha yüksek bir sıcaklık gerektirmesinden dolayıdır. Enzim katalitik aktifliğini gösterebilmek için daha büyük aktifleşme enerjisine sahip olmalıdır.⁽⁵⁹⁾

Yapılan çalışmalarda, sıcaklığın enzim aktifliği üzerine etkisi farklı şekillerde bulunmuştur. Al-Adhami ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada serbest ve selüloza kovalent bağlanma ile immobilize edilen L ın optimum sıcaklıkları 60 °C olarak belirlenirken⁽⁴⁵⁾, D'Annibale ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada eupegite

immobilize edilen L in optimum sıcaklığı 55 °C olarak bulunmuştur.⁽⁵⁰⁾ Dodor ve arkadaşları, kovalent bağlanma yoluyla L i kaolinite immobilize etmişler ve optimum sıcaklıkları serbest ve immobilize enzimler için sırasıyla 40 ve 60 °C olarak belirlemişlerdir.⁽⁵²⁾ Lante ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, polietersülfon membrana immobilize edilen L in ve serbest L in optimum sıcaklıkları, sırasıyla 35 ve 40 °C olarak bulunmuştur.⁽⁵¹⁾ D'Annibale ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada L enzimi, kitosana immobilize edildiğinde optimum sıcaklıkları 50 °C dan 60 °C a yükselmiştir.⁽⁶²⁾ Rogalski ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, L poroz cam yüzeyine immobilize edilmiş ve optimum sıcaklığı 60 °C olarak bulunmuştur.⁽³⁵⁾

3.3. Enzim Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi

Serbest ve immobilize enzimlerin aktifliğine substrat değişiminin etkisinin incelenmesi için Bölüm 2.2.8.'de anlatılan deneyler yapılmıştır. K_m ve V_{mak} sabitlerinin hesaplanması için de şu yol izlenmiştir.



Bu eşitlikte E:enzim, S:substrat, ES:enzim-substrat kompleksi, \ddot{U} :ürünü ve k_1 , k_2 , ve k_3 de tepkime hız sabitlerini göstermektedir.

Yukarıdaki enzim tepkimesi için reaksiyon hızı Michaelis-Menten Eşitliği ile verilir.

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

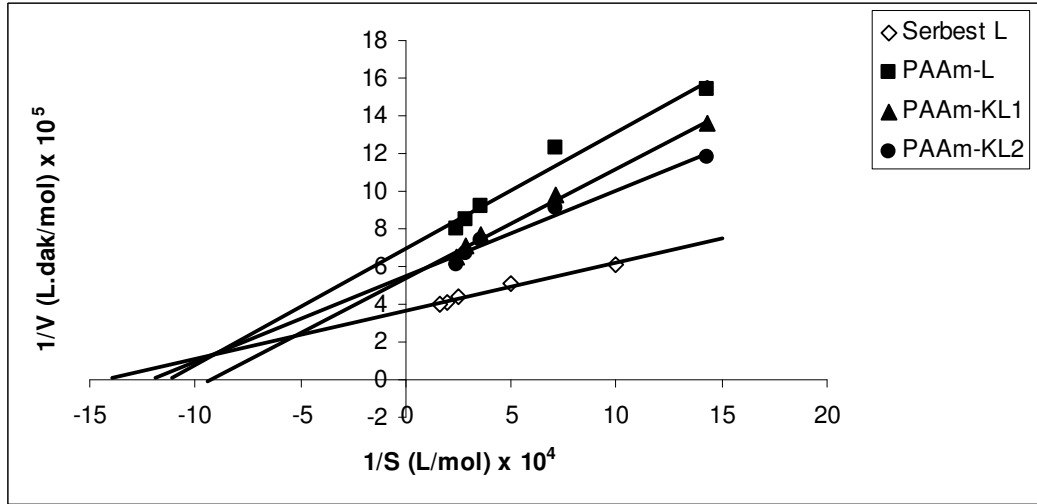
Eşitlikte V reaksiyon hızını, S substrat derişimini, V_{\max} maksimum reaksiyon hızını, K_m ise Michaelis-Menten sabitini göstermektedir.

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

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Bu eşitliğe göre; $1/V$, $1/[S]$ 'e karşı grafiğe geçirildiğinde yeni bir doğru elde edilir.

Bu doğrunun eğiminden K_m/V_{\max} değeri ve y-eksenini kestiği noktadan ise $1/V_{\max}$ değeri hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Serbest ve immobilize enzimleri için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge3.1. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik sabitleri

Enzimler	K_m (μM)	V_{mak} ($\mu\text{M.dak}^{-1}$)
Serbest L	6,90	2,70
PAAm-L	7,30	1,37
PAAm-KL1	7,38	1,68
PAAm-KL2	7,40	1,70

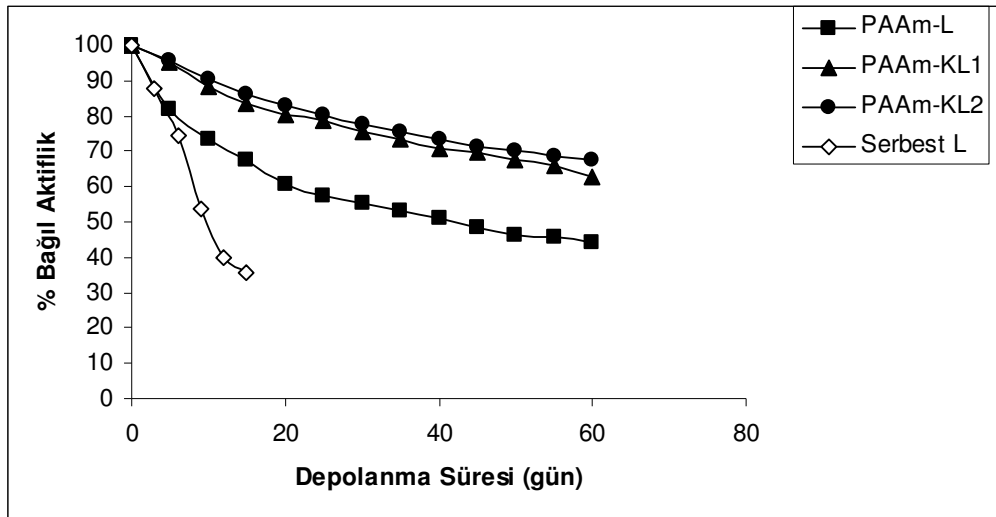
Genellikle immobilize enzimlerin kinetik sabitleri, difüzyon sınırlamaları, sterik etkiler ve iyonik güç nedeniyle serbest enziminkilerden farklılık gösterirler. Bunun yanında immobilize olan enzimin yapısındaki değişiklikler ve substratın immobilize enzimin aktif bölgelerine daha zor ulaşabilmesi de bu farklılığa neden olmaktadır.⁽⁶⁵⁾ 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.

Kinetik parametreler ile ilgili yapılan çalışmalarda şu sonuçlar bulunmuştur. Gupta ve arkadaşları L 1 altın yüzeyine, gluteraldehit ile immobilize etmişler ve serbest ve immobilize enzimler için K_m değerlerini sırasıyla 0,65 mM ve 5,4 mM olarak bulmuşlardır⁽⁶⁶⁾ D'Annibale ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, serbest L in K_m sabiti 70 μM dan, euperгите immobilize edildiğinde 150 μM ye artarken ve V_{mak} değeri ise 190 IUmg^{-1} den 76 IUmg^{-1} e düştüğü gözlenmiştir.⁽⁵⁰⁾ Rogalski ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada L cam yüzeyine immobilize edildiğinde K_m sabitinin 80 μM dan 124 μM a yükseldiği görülmüştür.⁽³⁵⁾ Cabrita ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, L kaolinite immobilize edildiğinde K_m sabitinin 262 μM den 165 μM e düştüğü belirtilmiştir.⁽⁴⁹⁾ De Quan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada L

platin yüzeyine immobilize edilmiş ve K_m sabiti $85 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur⁽⁴⁷⁾ Lante ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, lakkaz kitosana konjuge edilmiş ve serbest enzimin 42 mM olan K_m sabiti konjuge olduğunda 85 mM ve 95 mM olarak gözlenmiştir.⁽⁵¹⁾ Yine Jiang ve arkadaşlarının kitosan ile yaptığı bir çalışmada K_m sabiti serbestken $37 \mu\text{M}$ iken, immobilize edildiğinde $1171 \mu\text{M}$ ye artmış ve V_{mak} değeri ise $5,9 \text{ mmol dak}^{-1}$ den $6,6 \text{ mmol dak}^{-1}$ e düşmüştür.⁽⁶⁴⁾ D'Annibale ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, L in serbestken $77 \mu\text{M}$ olan K_m sabitinin, kitosana immobilize edildiğinde $256 \mu\text{M}$ a çıktığı gözlenmiştir.⁽⁶²⁾

3.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Depolama Kararlılığı

Enzim immobilizasyonunda ki en önemli parametrelerden biri de immobilize edilmiş enzimin depolama kararlılığıdır. Serbest L, pH 6,0 fosfat tamponu ($0,04 \text{ M}$) içinde, immobilize L lar ise $+ 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ da depolanarak kararlılıkları belirlenmiştir. Depolama kararlılıklarının, depolama süresi ile değişimi Şekil 3.4.de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Serbest ve immobilize lakkazın % bağıl aktifliklerinin depolama süresi ile değişimi

Serbest enzimle yapılan 15 günlük çalışma sonunda serbest enzimin Başlangıç aktivitesinin % 35 ini koruduğu gözlenmiştir.

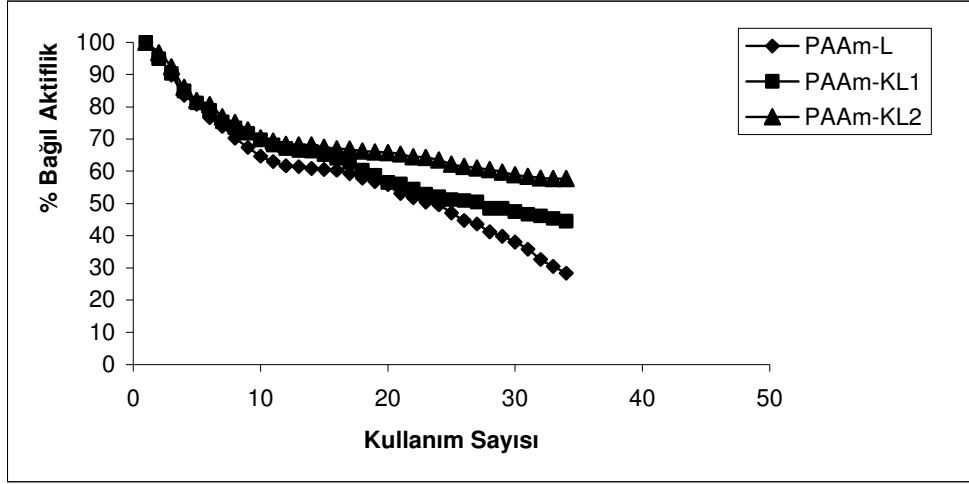
PAAm-L jeline hapsedilmiş L 60 günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 44 ünü korurken, karragenan eklenen jellerden PAAm-KL1 yaklaşık olarak % 63 ünü, PAAm-KL2 ise yaklaşık olarak % 68 ini korumaktadır. Aynı depolama şartları altında, immobilize L in serbest L dan çok daha yavaş aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir. Bu da immobilizasyonun enzimi daha kararlı hale getirdiğini gösterir.

Daha önce yapılan çalışmalarda da, immobilize L in, serbest L dan daha kararlı olduğu görülmektedir. Al-Adhami ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada DEAE-Granocele immobilize edilen L in 4 ay sonunda başlangıç aktivitesinin % 98 ini koruduğu belirtilmiştir.⁽⁴⁵⁾ D'Annibale ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada L eupergite immobilize edilmiş ve 2 ayda % 85 aktivitesini korurken 6 ay sonunda aktivitesi % 53 e düşmüştür.⁽⁵⁰⁾ Dodor ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, serbest L 4 ayda % 10 kadar bir aktivite kaybı gözlenirken, immobilize olduğunda aktivite kaybı gözlenmemiştir.⁽⁵²⁾ Başka bir çalışmada D'Annibale ve arkadaşları, 6 ayda % 17 ye düşen serbest L aktivitesinin, kitosana immobilize olduğunda % 60 a düştüğü belirtmişlerdir.⁽⁶²⁾ Quan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, L platin yüzeyine kovalent bağlandığında 2 ayda aktivitesinin % 80 ini koruduğu görülmüştür.⁽⁴⁷⁾

3.5. Immobilize Enzimlerin Tekrar Kullanım Sayıları

Enzimlerin immobilizasyonunda ki en önemli parametrelerden biri de tekrar kullanım sayısıdır. Serbest enzim sadece bir kez kullanılabilir, ancak bu enzim uygun

bir desteğe immobilize edildiğinde defalarca kullanılabilir. Bu çalışmada enzimler hapsetme yoluyla immobilize edilmiş ve bu enzimlerin tekrar kullanım sayısını incelemek amacıyla Bölüm 2.2.8.1.'de anlatılan aktiflik tayini deneyleri yapılmıştır.



Şekil 3.5. İmmobilize enzimlerin % bağlı aktifliklerinin tekrar kullanım sayıları ile değişimi

Bu deneylerin sonuçlarına göre, PAAm-L 35 kullanımda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 28 ini korurken, PAAm-KL1 % 45 ini ve PAAm-KL2 de % 58 ini korumaktadır. Bu sonuçlara göre tekrar kullanım için en iyi immobilizasyon PAAm-K2 ye immobilizasyondur.

4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Serbest L enzimi, PAAm , PAAm-K1 ve PAAm-K2 jelleri içine hapsetme yoluyla immobilize edilmiştir.
2. Serbest L ve PAAm-L, PAAm-KL1 ve PAAm-KL2 için optimum pH lar sırasıyla 6,0, 9,0, 8,5 ve 8,0 olarak bulunmuştur.
3. Serbest L için optimum sıcaklık 45 °C ve immobilize edilen bütün L için de 60 °C dur.
4. Serbest L için K_m sabiti ve V_{mak} değeri sırasıyla, 6,9 μM ve 2,7 $\mu M.dak^{-1}$ olarak bulunmuştur.
5. İmmobilize L lar için, PAAm-L, PAAm-KL1 ve PAAm-KL2 sırasına göre K_m sabitleri 7,30, 7,38 ve 7,40 μM ve V_{mak} değerleri 1,37, 1,68 ve 1,70 $\mu M.dak^{-1}$ olarak bulunmuştur.
6. Serbest L 15 gün depolaması sonunda başlangıç aktivitesinin % 35 ini korumuştur.
7. İmmobilize L lardan PAAm-L, 60 günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 44 ünü, PAAm-KL1 % 63 ünü ve PAAm-KL2 ise yaklaşık olarak % 68 ini korumaktadır.
8. İmmobilize L lar iki gün içerisinde 35 defa kullanıldığında, PAAm-L başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 28 ini korurken, PAAm-KL1 % 45 ini ve PAAm-KL2 ise % 58 ini korumaktadır.

KAYNAKLAR

1. C. O'Neil, F.R. Hawkes, S. Esteves and S.J. Wilcox, Water Research, **34**, 2355(2000).
2. J. Karam and A.J. Nicel, J. Chem. Tech. Biot., **69**, 141(1997).
3. G. Akovalı, Temel ve Uygulamalı Polimer, A.Ü.F.F. Basımevi, Ankara, (1984).
4. R.J. Fessenden, J.S. Fessenden, Organic Chemistry, Barooks, Cole Publishing Company, California, (1990).
5. D.L.Zor, Organik Kimya, A.Ö.F. Yayınları, Eskişehir, (1991)
6. M. Saçak, Polimer Kimyası, Gazi Kitabevi, Ankara, (2002).
7. <http://www.fmcbiopolymer.com>
8. N. Özer, Biyokimya 1, Palme Yayıncılık, Ankara, (2000).
9. S. Şık and A. Ünyayar, Tr. J. Biology, **22**, 287(1998).
10. H. Harper, Enzyme Review of Physiological Chemistry, los Atlos 15th. Edition, California, (1975).
11. A.L. Lehninger Enzymes Priciples of Biochemistry, Worth Publishers Inc, New York, (1982).
12. S. Bernhnard, The Structure and Function of Enzyme, W.A. Benjamin Inc., New York, (1968).
13. N. Türkoğlu, Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Selulaz, Lakkaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Funguslardan Üretimini Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, (1999).
14. H. Karadağ, Soya Fasulyesi Lipoksijenazının Poliakrilamid Jel Üzerine İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, (2001)

15. C. Aksoy, Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, (2003).
16. K. Mosbach, Methods in Enzymology, Academic Press, New York, (1976).
17. O. Zaborsky, Adsorption Immobilized Enzyme, Ed. by Weast, R. C., CRC Press, Ohio, (1973).
18. W.H. Pitcher, Jr. Ford, Immobilized lactase for whey hydrolysis; stability and operating strategy, Enzyme Engineering, Ed. by Brown, G. B., Ganeeke, Wingard, L. B., Jr., Plenum Press, New York, (1978).
19. D. Durante, R. Casadio, L. Martelli, G. Tasco, M. Portaccio, P. De Luca, U. Bencivenga, S. Rossi, S. Di Martino, V. Grano, N. Diano and D.G. Mita, J. Mol. Catal. B-Enzym, **27**, 191(2004).
20. M.D.Trean, Techniques of immobilization, Immobilized Enzyme, John Wiley and Sons, New York, (1980).
21. J.F. Kennedy, J.M.S. Cabral, Immobilized Enzymes Cells, (Woodward, 2nd ed.), Oxford Press, U.K., (1985).
22. P.A. Srere, K. Uyeda, Functional Groups on Enzymes Suitable for Binding to Matrices, Methods in Enzymology, Academic Press Inc., New York, (1976).
23. E.S. John, Biotechnology Principle I, Van Nostran Reinhold Co. Ltd., U.K., (1985)
24. A. Telefoncu, İmmobilize Enzimler, Enzimoloji (Yaz Okulu), Ed. A. Telefoncu, (1997).
25. E.F. Jansen, Y. Tomimatsu and A.C. Olsan, Arch. Biochem. Biophys., **144**, 394(1979).
26. J. Woodward, Immobilised Cells and Enzymes, Irl Pres, England, (1985).
27. M.H.B. Skovby, J. Kops, J. Appl. polym Sci, **39**, 169(1990).

28. P.W. Carr, L.D. Bowers, Support Considerations in Chemical Analysis, Academic Press, New York, (1980).
29. S. Dumitriu, M. Popa, M. Dumitriu, M., J. Bioact. Compat. Poly., **3**, 243(1988).
30. T.M.S. Chang, Microencapsulation of Enzyme and Biological Methods in Enzymology, Ed. by Mosback, K., Academic Press Inc., New York, (1976).
31. M.Y. Arica and V.N. Hasırcı, Biomaterials, **8**, 489(1987).
32. D.T. Michael, Immobilized Enzyme, John Wiley and Sons, New York, (1980).
33. F. Saburo and T. Atsuo, Application of Biocatalyst Immobilized by Polymer Methods, Enzyme Engineering, Plenum Press, New York, (1985).
34. I. Kaetsu, M. Kamura and M. Yoshida, Biotechnol. Bioeng., **21**, 847(1979).
35. J. Rogalski, A. Dawidowicz, E. Joź'wik and A. Leonowicz, J. Mol. Catal. B-Enzym, **6**, 29(1999).
36. G. Delanoy, Q. Li and J. Yu, Int. J. of Biol. Macromol., **35**, 89(2005).
37. E. Birhanlı, Mikroorganizmaların Lakkaz Üretimine Çeşitli Faktörlerin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, (2003).
38. M. Bayralı, Resorsinol'ün Enzimatik Polimerizasyon Kinetiğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, (2003).
39. F. Daigle, F. Trudeau, G. Robinson, M.R. Smyth and D. Leech, Biosens. Bioelectron., **13**, 417(1998).
40. R.S. Freire, N. Duran and L.T. Kubato, Talanta, **54**, 681(2001).
41. N. Durán, M.A. Rosa, A. D'Annibale and L. Gianfreda, Enzyme Microb. Tech., **31**, 907(2002).
42. D. Quan and W. Shin, Mat. Sci. Eng. C-Bios, **24**, 113(2004).
43. M. U. Cuadrado, P. M. Perez-Juan, D. Luque de Castro, M. A. Gomez-Nieto', Anal. Chim. Acta, **553**, 99(2005).

44. K. Piontek, *J. Biol. Chem.*, **277**, 37663(2002).
45. A.J.H. Al-Adhami, J. Bryjak, B. Greb-Markiewicz, W. Peczyn'ska-Czoch, *Process Biochem.*, **37**, 1387(2002).
46. D. Jiang, S. Long, J. Huang, H. Xiao and J. Zhou, *Biochem. Eng. J.*, **25**, 15(2005).
47. D. Quan, Y. Kim and W. Shin, *J. Electroanal. Chem*, **561**, 181(2004).
48. S. Timur, N. Pazarlıođlu, R Pilloton and A. Telefoncu, *Sensor. Actuat. B-Chem*, **97**, 132(2004).
49. J.F. Cabrita, L.M. Abrantes, A.S. Viana, *Electrochim. Acta*, **50**, 2117(2005).
50. A. D'Annibale, S.R. Stazi, V. Vinciguerra, E.D. Mattia and G.G. Sermanni, *J. Biotechnol.*, **77**, 265(2000).
51. A. Lante, A. Crapisi, A. Krastanov and P. Spettoli, *Process Biochem.*, **36**, 51(2000).
52. D.E. Dodor, H. Hwang and I.N. Ekunwe, *Enzyme Microb. Tech.*, **35**, 210(2004).
53. A.A. Dias, R.M. Bezerra and A.N. Pereira, *Bioresource Technol.*, **92**, 7(2004).
54. P.P. Zamora, C.M. Pereira, E.R.L. Tiburtius, S.G. Moraes, M.A. Rosa, R.C. Minussi and N. Durán, *Appl. Catal. B-Environ.*, **42**, 131(2003)
55. S.R. Couto, M.A. Sanroman, D. Hofer and G.M. Gübitz, *Bioresource Technol.*, **925**, 67(2004).
56. <http://www.winenet.com.au>
57. A. Leonowicz and K. Grzywnowicz, *Enzyme Microb. Tech.*, **3**, 55(1981).
58. D.T. Michael, *Immobilized enzyme*, John Wiley and Sons., New York, (1980).
59. M.Y. Arica, G. Alaeddinoğlu, V.N. Hasırcı, *Enzyme Microb. Tech.*, **22**, 152(1998).

- 60.** D.H. Strumeyer, A. Constantinides, and I. Freudenberger, *J. Food. Sci.*, **39**, 498(1974).
- 61.** E.M. Kiseleva, O. A. Mirgorodskaya, N.N. Momot, V. Avizhenis, B.V. Moskvichev, And G. V.Samsonov, *Prikl. Biochim. Microbial.*, **13**, 577(1977).
- 62.** A. D'Annibale, S.R. Stazi, V. Vinciguerra, E.D. Mattia, G.G. Sermanni, *Process Biochem.*, **34**, 697(1999).
- 63.** G. Pamieri, P. Giardina, B. Desdeio, L. Morzulb and G. Sannia, *Enzyme Microb. Tech.*, **16**, 151(1994)
- 64.** D. Yinghui, W. Qiuling and F. Shiyu, *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 451(2002).
- 65.** M.Y. Arıca, S. Şenel, N.G. Alaeddinoğlu, S Patır and A. Denizli, *J. Appl. Polym. Sci.*, **75**, 1685(1994).
- 66.** G. Gupta, V. Rajendran ad P Atanassov, *Electroanal.*, **15**, 1577(2003).