

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

BAZI ENZİMLERİN MODİFİYE EDİLMİŞ POLİ(ETİLEN TEREFTALAT)
LİFLERE İMMOBİLİZASYON ŞARTLARININ ARAŞTIRILMASI VE
AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

ZÜLFİKAR TEMOÇİN

ARALIK 2008

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürünün onayı.

05 /12 / 2008

Doç. Dr. Burak BİRGÖREN
Müdür V.

Bu tezin Doktora tezi olarak Kimya Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Zeki ÖKTEM
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve Doktora tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Gülsu AKIN ÖKTEM

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA

Prof. Dr. Zeki ÖKTEM

Yrd. Doç. Dr. Nuran IŞIKLAN

ÖZET

BAZI ENZİMLERİN MODİFİYE EDİLMİŞ POLİ(ETİLEN TEREFTALAT) LİFLERE İMMOBİLİZASYON ŞARTLARININ ARAŞTIRILMASI VE AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

TEMOÇİN, Zülfikar

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Aralık 2008, 95 sayfa

α -Amilaz, lipaz ve peroksidaz enzimleri Hofmann dönüşüm tepkimesi ile hazırlanan akrilamid aşılınmış poli(etilen tereftalat) lif üzerine immobilize edilmiştir. Immobilize ve serbest enzimlerin aktivitesine pH, sıcaklık, termal kararlılık ve depolanma kararlılığı gibi değişkenlerin etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, immobilize ve serbest enzimlerin kinetik parametreleri olan K_m ve V_{mak} değerleri de belirlenmiştir. Enzimlerin optimum pH değerleri immobilizasyon nedeniyle α -amilaz için 5'den 6'ya, lipaz enzimi için 6'dan 7'ye, peroksidaz enzimi için, 8'den 7'ye değişim göstermiştir. Immobilize ve serbest enzimlerin

maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklıklar ise, α -amilaz için 50°C, lipaz için 40°C ve peroksidaz için 45°C olarak bulunmuştur. İmmobilize α -amilaz enzimi 4°C'de 60 gün boyunca aktivitesini korurken serbest α -amilaz enzimi 30 günün sonunda aktivitesini kaybetmiştir. İmmobilize lipaz enzimi 4°C'de 60 gün süresince aktivitesini %90 oranında korurken serbest lipaz enzimi aynı sürede aktivitesini %75 oranında korumuştur. İmmobilize peroksidaz enziminin serbest peroksidaz enzimine göre depolanma şartlarında kararlılığı artmıştır. İmmobilize α -amilaz 30 tekrar kullanım sonunda aktivitesini %40 oranında, immobilize lipaz 10 tekrar kullanım sonunda aktivitesini %25 oranında, immobilize peroksidaz 20 tekrar kullanım sonunda aktivitesini %54 oranında korumuştur.

Anahtar Kelimeler: α -Amilaz, Lipaz, Peroksidaz, İmmobilizasyon, Poli(etilen tereftalat).

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE IMMOBILIZATION CONDITIONS OF SOME ENZYMES ON MODIFIED POLY (ETHYLENE TEREPHTHALATE) FIBERS AND DETERMINATION OF THEIR ACTIVITIES

TEMOÇİN, Zülfikar

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

December 2008, 95 pages

α -Amylase, lipase and peroxidase were immobilized on the poly(ethylene terephthalate) grafted acrylamide fiber which was prepared through Hofmann reaction. The effect of such factors as pH, temperature, thermal stability and storage stability on the activity profiles of the free and immobilized enzymes was investigated. The kinetic parameters of the free and the immobilized enzymes, K_m and V_{max} were also determined. The optimum pH values of the enzymes were shifted from 5 to 6 for α -amylase, from 6 to 7 for lipase and from 8 to 7 for peroxidase by immobilization. The

maximum activity of the free and the immobilized enzymes occurred at 50°C for the α -amylase, at 40°C for the lipase and at 45°C for the peroxidase. The activity of the free α -amylase ended in 30 days, whereas the activity of the immobilized α -amylase lasted for 60 days at storage conditions. It was found that the immobilized lipase stored at 4°C retained 90% of its original activity after 60 days, whereas the free lipase stored at 4°C retained 75% of its activity after the same period. The immobilized peroxidase showed higher storage stability than the free peroxidase. α -Amylase immobilized on matrix maintained 40% of its original activity after 30 times of repeated use. The immobilized lipase maintained 25% of its original activity after 10 reuses. Peroxidase immobilized on matrix maintained 54% of its original activity after 20 times of repeated use.

Key Words: α -Amylase, Lipase, Peroxidase, Immobilization, Poly(ethylene terephthalate)

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinde ve çalıŐma sűrem boyunca yardımlarını esirgemeyen tez danıŐmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa YiĐitoĐlu'na teŐekkűrű bir borç bilirim. Ayrıca ilgilerinden dolayı tez izleme komitesi űyeleri Sayın Prof. Dr. Zeki Őktem'e ve Sayın Prof. Dr. Tuncer aykara'ya teŐekkűr ederim.

Bugűne kadar maddi ve manevi desteklerini gűrdűĐűm, űĐrenim hayatım boyunca sűrekli daha iyi bir eĐitim almam konusunda beni teŐvik eden ve bu yűnde yardımlarını esirgemeyen annem Zűleyha Temoin'e ve babam Ali Temoin'e űűkranlarımı sunarım.

ÇalıŐmalarım sűresince yardımını eksik etmeyen eŐim Őzden Temoin'e, bu sűrete kendilerine yeteri kadar zaman ayıramadıĐım ocuklarım Ali Osman Temoin ve Yusuf Berat Temoin'e teŐekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler.....	3
1.1.1. Enzim bilimi.....	4
1.1.2. Enzimlerin ekonomik önemi	5
1.1.3. Enzimlerin sınıflandırılması	6
1.1.4. Enzim kinetiği.....	7
1.2. Enzim İmmobilizasyonu.....	9
1.3. İmmobilizasyon Yöntemleri.....	11
1.3.1. Adsorpsiyon	13
1.3.2. İyonik bağlanma.....	14
1.3.3. Hapsetme	14
1.3.4. Kapsülleme	15
1.3.5. Çapraz bağlanma	16

1.3.6. Kovalent bağlanma	17
1.4. α -Amilaz	20
1.5. Lipaz.....	21
1.6. Peroksidaz.....	22
1.7. Poli(Etilen Tereftalat)	23
1.8. Tezin Amacı	24
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
2.1. Kimyasal Maddeler	25
2.2. Cihazlar	25
2.3. Destek Materyalin Hazırlanması.....	26
2.4. Enzim İmmobilizasyonu.....	27
2.5. Protein Analizi	28
2.6. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	29
2.6.1. α -Amilaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi	29
2.6.2. Lipaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi.....	30
2.6.3. Peroksidaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi	31
2.7. Deneysel Çalışmalar	32
2.7.1. AAm-g-PET lifin modifikasyonu	32
2.7.2. Amin gruplarının analizi	34
2.7.3. İmmobilizasyon şartlarının optimizasyonu	34
2.7.4. Enzim aktivitesine pH'nın etkisi.....	35
2.7.5. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	36
2.7.6. Enzim aktivitesine substrat derişiminin etkisi	36
2.7.7. Termal kararlılık	37
2.7.8. Depolanma kararlılığı.....	38

2.7.9. İmmobilize enzimin tekrar kullanım kararlılığı	39
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	40
3.1. Materyalin Karakterizasyonu	41
3.2. AAm-g-PET Lifin Modifikasyonu	45
3.3. Enzim İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu.....	48
3.3.1. Enzim immobilizasyonuna pH'nın etkisi	48
3.3.2. Enzim immobilizasyonuna aşılama yüzdesinin etkisi	53
3.3.3. Enzim immobilizasyonuna protein derişiminin etkisi	55
3.4. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	58
3.4.1. Enzim aktivitesine pH'nın etkisi.....	58
3.4.2. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi	63
3.4.3. Enzim aktivitesine substrat derişiminin etkisi	67
3.4.4. Termal kararlılık	75
3.4.5. Tekrar kullanım kararlılığı	79
3.4.6. Depolanma kararlılığı.....	84
4. SONUÇ	89
KAYNAKLAR	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1. Enzimlerin endüstriyel alandaki kullanım oranları.....	6
1.2. Michaelis-Menten grafiği.....	8
1.3. Lineweaver-Burk grafiği.....	9
1.4. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	12
1.5. Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu.....	13
1.6. İyonik bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu.....	14
1.7. Hapsetme yöntemi ile enzim immobilizasyonu.....	15
1.8. Kapsülleme yöntemi ile enzim immobilizasyonu.....	16
1.9. Çapraz bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu.....	16
1.10. Kovalent bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu.....	17
1.11. Amin gruplarına sahip destek materyale kovalent bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu.....	18
1.12. Karboksil gruplarına sahip destek materyale kovalent bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu.....	18
1.13. Hidroksil gruplarına sahip destek materyale kovalent bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu.....	19
1.14. Enzimin destek materyale tekli ve çoklu kovalent bağ ile immobilizasyonu.....	19

1.15. PET'in kimyasal yapısı.....	24
3.1 Enzim immobilizasyon basamakları.....	40
3.2. SEM görüntüsü, PET lif (a), akrilamit aşılınmış PET lif (b).....	41
3.3. Üzerinde amin grupları oluşturulmuş PET lif (a), glutaraldehit bağlanmış PET lif (b)	42
3.4. FTIR Spektrumu.....	44
3.5. NaOCl derişiminin Hofmann dönüşüm tepkimesi üzerine etkisi.....	46
3.6. NaOH derişiminin Hofmann dönüşüm tepkimesi üzerine etkisi.....	47
3.7. Sürenin Hofmann dönüşüm tepkimesi üzerine etkisi.....	48
3.8. α -Amilaz immobilizasyonuna pH'nın etkisi.....	49
3.9. Lipaz immobilizasyonuna pH'nın etkisi.....	50
3.10. Peroksidaz immobilizasyonuna pH'nın etkisi.....	51
3.11. Enzim immobilizasyonunda bağlanma noktasının şematik modeli..	52
3.12. α -Amilaz immobilizasyonuna aşılama oranının etkisi.....	54
3.13. Lipaz immobilizasyonuna aşılama oranının etkisi.....	54
3.14. Peroksidaz immobilizasyonuna aşılama oranının etkisi.....	55
3.15. α -Amilaz immobilizasyonuna protein derişiminin etkisi.....	56
3.16. Lipaz immobilizasyonuna protein derişiminin etkisi	57
3.17. Peroksidaz immobilizasyonuna protein derişiminin etkisi.....	58
3.18. α -Amilaz enziminin aktivitesine pH'nın etkisi.....	59
3.19. Lipaz enziminin aktivitesine pH'nın etkisi.....	60
3.20. Peroksidaz enziminin aktivitesine pH'nın etkisi.....	62
3.21. α -Amilaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	64
3.22. Lipaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	65

3.23. Peroksidaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	67
3.24. İmmobilize α -amilaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	68
3.25. Serbest α -amilaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	68
3.26. İmmobilize lipaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	70
3.27. Serbest lipaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	71
3.28. İmmobilize peroksidaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	73
3.29. Serbest peroksidaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği.....	74
3.30. Peroksidaz immobilize edilmiş PET lif (a), bir kez kullanılmış PET lif (b), yirmi kez kullanılmış PET lif (c).....	75
3.31. α -Amilaz enziminin termal kararlılığı.....	76
3.32. Lipaz enziminin termal kararlılığı.....	77
3.33. Peroksidaz enziminin termal kararlılığı.....	79
3.34. İmmobilize α -amilaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı.....	80
3.35. İmmobilize lipaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı.....	81
3.36. İmmobilize peroksidaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı.....	83
3.37. α -Amilaz enziminin depolanma kararlılığı	85
3.38. Lipaz enziminin depolanma kararlılığı	86
3.39 Peroksidaz enziminin depolanma kararlılığı.....	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması.....	12
1.2. Kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonunun avantaj ve dezavantajları.....	20
3.1. α -Amilaz enziminin kinetik parametreleri.....	69
3.2. Lipaz enziminin kinetik parametreleri.....	71
3.3. Peroksidaz enziminin kinetik parametreleri.....	74

1. GİRİŞ

Biyolojik sistemlerde bileşiklerin sentezi, parçalanma ve kısmen dönüşüm tepkimeleri enzimler vasıtası ile katalizlenir. Enzimler oldukça etkili ve seçici biyolojik katalizörlerdir. Birçok tepkime ılıman koşullar olarak tanımlanan; düşük sıcaklık, normal basınç ve nötrale yakın pH değerlerinde enzimler aracılığı ile katalizlenir. Enzimler tepkimeleri 10^3 – 10^{17} kat hızlandırır. Enzimler çok yüksek substrat özgüllüğü olan proteinlerdir. Enzimler sadece bir substrata karşı etkin olduğu gibi bazıları ise substratın belirli bir fonksiyonel grubuna etkimektedir. Enzim katalizli tepkimeler ile canlı hücrelerde minimum enerji harcanarak tepkimelerin yürütülmesinin yanı sıra toksik ürünlerin oluşması da engellenmiş olur⁽¹⁾.

Bu özellikler enerji, kaynak tasarrufu ve düşük kirlilik oluşturan üretim prosesinin enzimler vasıtası ile dizayn edilebileceğini ortaya koymuştur. Çevre dostu katalizörler olarak tanımlanan enzimler günümüzde sadece biyolojik tepkimeler için katalizör olmakla kalmamışlar, aynı zamanda endüstriyel alanın önemli bir parçası haline gelmişlerdir. Enzimler atık sulardan organik kirleticilerin uzaklaştırılması, biyosensör teknolojisi, laktoz oranı düşük süt ürünlerinin üretimi, gıda ve fermantasyon endüstrisi gibi çeşitli endüstri dallarında kullanım alanı bulmuşlardır⁽²⁾.

Endüstriyel amaçlı kullanımı gün geçtikçe artan enzimlerin, kimyasal katalizörlere göre birçok üstün özellikleri vardır. Bunlardan bazıları⁽³⁾;

- Enzimler çok yüksek katalitik verime sahiptirler.

- Enzimler yüksek substrat özgülüğüne sahiptirler.
- Enzim katalizli tepkimelerde istenmeyen ürünler oluşmaz.
- Tepkime veriminin yüksek olmasından dolayı maliyet azalır.
- Tepkime düşük sıcaklıkta, atmosfer basıncında ve nötrale yakın pH değerlerinde yürür.
- Protein yapısında olmalarından dolayı pratikte enzim atıkları çevresel problem oluşturmaz. Çünkü proteinler biyolojik olarak parçalanabilirler ve kolayca atık sulardan ayrılabilirler.

Bu avantajlarla birlikte, katalitik aktivite için gerekli olan enzimlerin moleküler yapısı yüksek sıcaklık altında, organik çözücülerin varlığında, yüksek ve düşük pH değerlerinde bozulmaktadır. Serbest enzimlerin tepkime ortamından geri kazanılamaması diğer bir problemdir. Enzimlerin var olan bu dezavantajlarının bazılarını ortadan kaldırmanın bir yolu da enzim immobilizasyonudur⁽⁴⁾.

Enzimlerin suda çözünmeyen katı desteklere tutturulmasına immobilizasyon denir. Maliyeti oldukça yüksek olan enzimlerin endüstriyel alanda daha da yaygınlaşması için onların geri kazanılması ve tekrar kullanılabilmesi oldukça önem kazanmıştır. Enzimlerin immobilizasyonu, tekrar kullanımının yanı sıra reaktör tasarımının kolaylaşmasına, sürekli sistemde üretime, ürünün enzimler tarafından kirlenmemesine, enzim kararlılığının artmasına ve tepkimenin kontrolüne de imkân sağlar. Bu nedenle immobilizasyon genel olarak bu çözünebilir katalizörlerin endüstriyel alanda kullanılabilmesi için önemli bir yöntem olarak görülmektedir. Bununla

birlikte immobilize enzimin tekrar kullanım esnasında oldukça kararlı olması ulaşılması gereken en önemli amaçtır⁽²⁾.

Bu çalışmada α -amilaz, lipaz ve peroksidaz enzimleri akrilamit aşılanmış poli(etilen tereftalat) (AAM-g-PET) lif üzerine immobilize edilmişlerdir. Enzim immobilizasyonunun gerçekteşmesi için AAM-g-PET lif üzerinde Hofmann dönüşüm tepkimesi ile amin grupları oluşturulmuştur. Daha sonra amin grupları glutaraldehit ile aktive edilerek, destek materyale enzim immobilizasyonu gerçekteştirilmiştir. Immobilize ve serbest enzimlerin aktivitesine pH'nın, sıcaklığın ve substrat derişiminin etkisi incelenmiştir. Ayrıca enzimlerin depolanma kararlılığı, termal kararlılığı ve immobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılığı araştırılmıştır.

1.1. Enzimler

Protein yapısında olan biyokimyasal katalizörlere enzim denir. Enzimlerin hücre ve canlı metabolizmasındaki işlevi oldukça önemlidir. Bu nedenle de tıp, biyokimya ve biyoteknolojide oldukça yaygın araştırma alanı bulmuşlardır. Enzimlerin canlılardaki bazı hastalıklar ile çok yakın ilişkisi vardır. Bu nedenle kanda ve diğer biyolojik ortamlardaki enzimlerin aktivitesinin belirlenmesi, tıpta teşhis yönünden kolaylıklar sağlamaktadır⁽⁵⁾.

1.1.1. Enzim bilimi

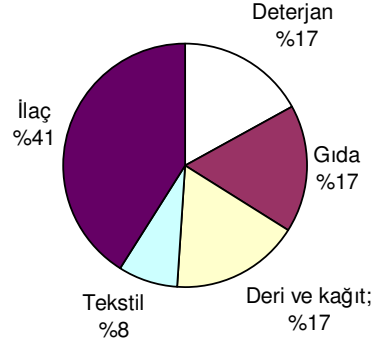
1878 yılında Willy Künhe biyolojik tepkimeleri hızlandıran biyokatalizörler için “mayada bulunan” anlamına gelen “enzim” terimini ilk kez kullanmıştır. Mikroorganizmalar gibi enzim özütlerinin de besin ve fermentasyon endüstrisinde kullanılmaları oldukça eskidir. Arpadan elde edilen malt özütünün nişastayı çözünürleştirdiği çok eskiden beri biliniyor ve besin endüstrisinde kullanılıyordu. 1883 yılında Payen ve Persoz, nişastanın çözünürleştirilmesinde malt özütü içerisinde bulunan diastazın etken olduğunu bulmuşlar ve malt özütünün kaynatılması ile bu etkinliğin ortadan kalktığını, özüt içerisindeki diastazın alkolle çöktürülmesi sonucunda ise geri kalan karışımın aynı etkinliği göstermediğini gözlemlemişlerdir. 1885 yılında Blumenthal peynir yapımında kullanılmak üzere ilk kez rennin enziminin özütünü teknolojik boyutlarda üretmeyi başarmıştır⁽⁵⁾.

1908 de Wallenstein, malt diastazının kalsiyum sülfat ile kararlı duruma getirilebileceğini ve endüstriyel amaçlarla kullanılmasının daha kolaylaşacağını göstermiştir. 1915 yılında ise Rohm; lipaz ve proteaz enzimlerinin çamaşır yıkama sularına katılarak çok etken bir temizleyici olarak kullanılabileceğini saptamıştır. 1926 yılında Sumner, ilk kez üreaz enzimi kristallerini elde ederek molekülün büyük bir kısmının proteinden oluştuğunu bulmuştur. Bunu izleyen yıllarda protein yapıları hakkındaki bilgilerin artması ve giderek yeni enzim türlerinin bulunması sonucu enzim bilimi (enzimoloji) adı verilen bir bilim dalı doğmuştur. Yeni enzimlerin bulunması; enzimleri ayırma saflaştırma ve tanıma yöntemlerinin gelişmesine bağlı olarak yıldan yıla giderek büyük oranda artmıştır. 1930 yılına kadar

tanımlanan enzim sayısı 80 civarında iken, bu sayı 1947 yılında 200, 1968 yılında ise 1300'e ulaşmıştır. Günümüzde 2000'e yakın enzim bilinmekte ve bunların pek çoğu da biyolojik ortamlardan izole edilerek satışa sunulmuş bulunmaktadır⁽⁵⁾.

1.1.2. Enzimlerin ekonomik önemi

Enzimler, 1960 yılından itibaren endüstriyel alanda mikrobiyal kaynaklı olarak üretilmeye başlanmıştır. Üretim teknolojilerinin gelişmesi ve yeni kullanım alanlarının oluşmasına paralel olarak endüstriyel enzim üretimi sürekli artmaktadır. 2004 yılında endüstriyel enzim pazarı 2,5 milyar dolara ulaşmış ve yıllık büyüme %5–14 aralığında gerçekleşmiştir. Enzim pazarının 2012 yılına kadar 2,7 milyar doları aşması beklenmektedir. Şekil 1.1'de enzimlerin uygulanma alanı bulduğu endüstri dallarının dağılımı görülmektedir. Enzimler en fazla tıpta, tekstil, gıda ve içecek endüstrisinde ayrıca son zamanlarda analitik amaçlarla kullanılmaktadır. Enzimlerin tıbbi, endüstriyel ve çevresel analizlerde biyosensör olarak kullanımı hızla artış göstermektedir. Bütün bunların yanı sıra enzim üretiminin ve saflaştırılmasının yüksek maliyeti endüstriyel alandaki kullanımını sınırlamaktadır⁽⁶⁾.



Şekil 1.1. Enzimlerin endüstriyel alandaki kullanım oranları

1.1.3. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler işlev bakımından altı ana başlık altında toplanabilir⁽¹⁾.

- Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme indirgenme tepkimelerini katalizleyen enzimler.
- Transferazlar: Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transfer tepkimelerini katalizleyen enzimler.
- Hidrolazlar: Hidroliz tepkimelerini katalizleyen enzimler.
- Liyazlar: Eliminasyon tepkimelerini katalizleyerek yeni çift bağlı bileşikler oluşturan enzimler.
- İzomerazlar: İzomerleşme tepkimelerini katalizleyen enzimler.
- Ligazlar: İki molekülün birleşmesini katalizleyen enzimler.

1.1.4. Enzim kinetiği

Emil Fischer enzimi sıkı bir kalıp veya kilit ve substratı onun anahtarı olarak tanımlamıştır. Buna göre bir enzim molekülünün aktif merkezine özgül olduğu bir substrat molekülü bağlanarak enzim-substrat kompleksini oluştururlar. Oluşan kompleks yüksek hızda ürüne dönüşür.



Enzimatik tepkimenin hızı substrat ve enzim derişimine bağlıdır. Enzimatik tepkimelere ait ilk hız denklemleri, 1900'lü yılların başında tepkime hızına substrat derişiminin etkisi incelenerek türetilmiştir. Bu konudaki gözlemlere göre, yüksek substrat derişiminde enzimin substrat tarafından doyurulduğu için hızın substrat derişiminden bağımsız olduğu sonucu elde edilmiştir. Doygun substrat derişimindeki hız, maksimum hız (V_{mak}) olarak tanımlanmıştır. Düşük substrat derişimlerinde ise tepkimenin birinci derece kinetiği takip ettiği belirlenmiştir. Substrat derişiminin artışı ile birinci ve sıfırıncı derece kinetiğin bir karışımının gerçekleştiği belirtilmiştir. Tepkime hızının substrat derişimine karşı grafiğe aktarılması hiperbolik bir eğri vermiştir (Şekil 1.2). Hiperbolik eğri eşitliğini enzim kinetiğine uygulayan Leonor Michaelis ve Maud Menten kendi isimleri ile anılan aşağıdaki eşitliği türetmişlerdir⁽⁷⁾.

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

Michaelis-Menten eşitliğinde;

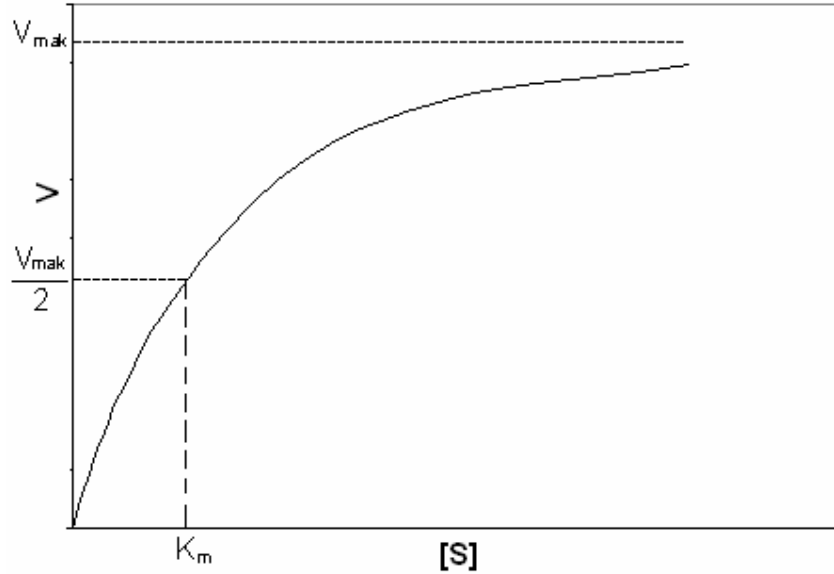
V_{mak} : Maksimum hız

[S]: Substrat derişimi

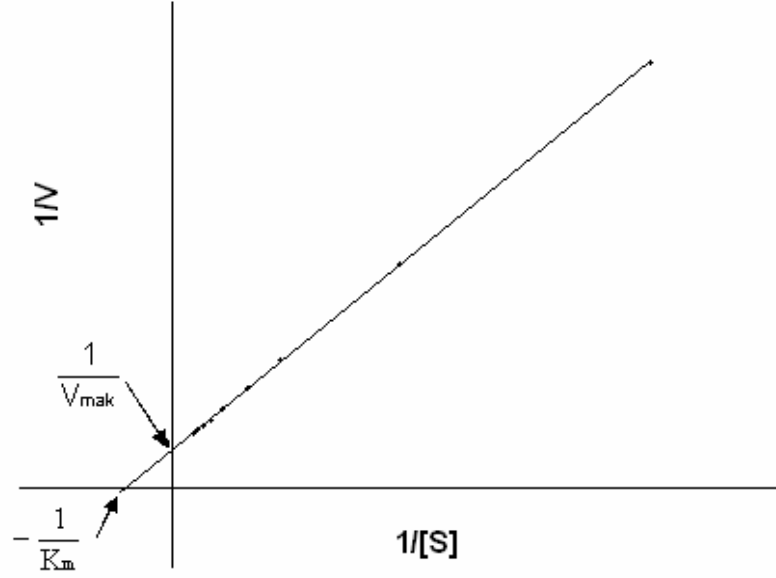
K_m : Michaelis sabiti olarak isimlendirilir ve enzimin substrata olan özgülüğünü temsil eder. V_{mak} değerinin yarısına karşılık gelen substrat derişimidir.

Değişen substrat derişimine karşı elde edilen tepkime hızının grafiğe aktarılması ile elde edilecek hiperbolden K_m ve V_{mak} değerlerini hesaplamak oldukça zor bir işlemdir. Michaelis-Menten eşitliğinin yeniden düzenlenmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk eşitliğine göre çizilen grafik bir doğru vermiştir (Şekil 1.3). Elde edilen doğrudan faydalanılarak K_m ve V_{mak} değerleri kolayca hesaplanabilmıştır⁽⁷⁾.

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



Şekil 1.2. Michaelis-Menten grafiği



Şekil 1.3. Lineweaver-Burk grafiği

1.2. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim katalizli tepkimelerin düşük sıcaklıkta ve nötrale yakın pH değerlerinde gerçekleşmesi, enerji, kaynak tasarrufu ve düşük kirlilik oluşturan üretim prosesinin enzimler vasıtası ile dizayn edilebileceğini ortaya koymuştur⁽³⁾.

Enzimlerin sayılan bu avantajlarının yanı sıra, biyokatalizör olarak uygulama aşamasında birçok problem ortaya çıkmaktadır. Bunlardan bazıları⁽³⁾;

- Enzimin ayırma ve saflaştırma maliyetinin yüksek olması,
- Enzimin doğal çevresinden izolasyonu ile yapıda meydana gelen kararsızlık,

- Enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olan moleküler yapının yüksek sıcaklık, asidik veya bazik pH değerlerinde ve organik çözücülerin varlığında bozunması,
- Uygulama aşamasında enzimin eser miktardaki bazı maddeler tarafından inhibe edilmesi ve kullanım ömrünün sınırlı olması,
- Suda çözündükleri için tepkime ortamından geri kazanılamaması, bu nedenle tekrar kullanılamaması ve oluşan ürünün kirlenmesidir.

Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için önerilen yöntemlerden bir tanesi de immobilizasyondur. İmmobilizasyon enzimlerin bir katı yüzeyine tutturulması veya içerisine hapsedilmesi ile gerçekleştirilir. Sonuçta heterojen bir immobilize enzim sistemi elde edilir. Enzimler doğal ortamlarında genelde hücre zarına bağlanmış durumdadır ve bu hali ile enzimler kararlđdır ve aktiftirler. İmmobilizasyon işlemi bu yapının bir benzeridir. Bu nedenle katı desteğe immobilize edilen enzimler serbest enzimlere göre daha kararlđdır ve çevresel değişimlere daha dirençlidirler. Daha önemlisi enzimlerin immobilize edilmesi ile oluşan heterojen sistem, enzimin kolayca geri kazanılmasına, enzimlerin tekrar kullanımına, sürekli üretim sistemine, tepkimenin kolayca sonlandırılmasına ve çeşitli reaktör dizaynına olanak sağlar. Bundan başka immobilizasyon ürünlerin enzimi inhibe etmesini önler ve daha iyi fonksiyonel özellikler göstermesini sağlar^(3,4).

İmmobilizasyonda kullanılan destek materyallerin bazı özellikleri aşağıda sıralanmıştır^(3,8,9).

- Kovalent bağlanma için fonksiyonel gruba sahip olmalıdır.
- Suda çözünmemelidir.

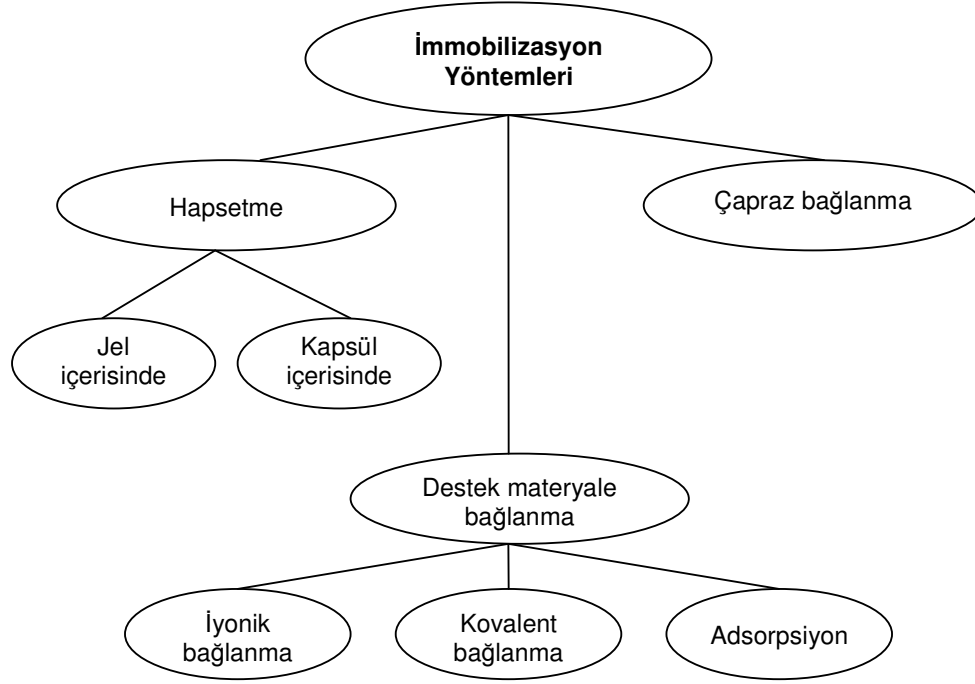
- Mekanik dayanıklılığı olmalıdır.
- Fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak kararlı olmalıdır, ayrıca toksik etki göstermemelidir.
- Farklı tip reaktörlerde kullanılabilmelidir.
- Geniş yüzey alanına sahip olmalıdır.
- Ekonomik olmalıdır.

1.3. İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri üç ana sınıfa ayrılabilir. Enzimin destek materyale bağlanması, hapsetme ve çapraz bağlanma olarak belirtilebilir. Enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 1.4'de şematik olarak gösterilmiştir^(10,11).

Uygulanan immobilizasyon yöntemleri çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Adsorpsiyon basit, ucuz ve etkilidir ancak tersinir bir immobilizasyon yöntemidir. Kovalent bağlanma ve çapraz bağlanma etkili ve kararlı fakat pahalı ve enzim aktivitesini azaltan bir immobilizasyon yöntemidir. Hapsetme ve kapsülleme ise difüzyon problemi doğuran bir yöntemdir. İmmobilize enzimler serbest enzimler ile karşılaştırıldığında aktivitede azalma gözlenir ve Michaelis sabiti artar. Aktivitedeki azalma uygulanan immobilizasyon yöntemi sonucu enzimde meydana gelen konformasyon değişiminden ve enzimin çözelti içerisinde aktivite gösterdiği çevreden farklı bir mikro çevreye sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca immobilize enzimin heterojen bir ortamda aktivite göstermesi kütle transferi sorununu da beraberinde

getirmiştir^(3,10). Enzim immobilizasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları Çizelge 1.1'de değerlendirilmiştir⁽¹¹⁾.



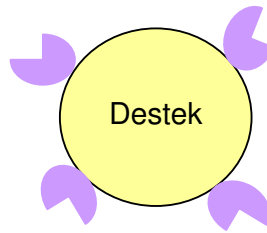
Şekil 1.4. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Özellikler	İmmobilizasyon yöntemleri				
	Adsorpsiyon	İyonik bağlanma	Kovalent bağlanma	Çapraz bağlanma	Hapsetme
Hazırlama	Kolay	Kolay	Zor	Zor	Zor
Aktivite	Düşük	Yüksek	Yüksek	Değişken	Yüksek
Özgüllük	Değişmez	Değişmez	Değişir	Değişir	Değişmez
Tutulma kuvveti	Zayıf	Değişebilir	Kuvvetli	Kuvvetli	Kuvvetli
Destegin tekrar kullanımı	Kullanılabilir	Kullanılabilir	Kullanılamaz	Kullanılamaz	Kullanılamaz
Kullanım	Düşük	Orta	Orta	Düşük	Yüksek
Maliyet	Düşük	Düşük	Yüksek	Orta	Düşük

1.3.1. Adsorpsiyon

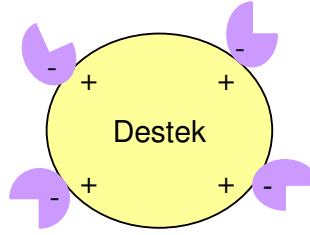
Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski yöntemdir. İlk kez, Nelson ve Griffin, invertaz enzimini aktif kömür üzerine adsorbe ederek özelliklerini incelemişlerdir. Bu yöntem enzimlerin taşıyıcı yüzeyinde adsorplanmaları ilkesine dayanır. Bu yöntemin en büyük dezavantajı enzim ile destek materyal arasındaki etkileşimin zayıf olmasıdır. Enzimler genelde destek materyale hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim ve Van der Waals kuvvetleri ile fiziksel olarak bağlanırlar. İmmobilizasyon esnasında enzimler herhangi bir modifikasyona uğramazlar. Enzim molekülleri ve destek materyal arasındaki etkileşimin zayıf olması nedeni ile sıcaklık, pH, iyonik şiddet ve çözücü türü gibi çevresel şartların değişmesi enzimin destek materyalden desorbe olmasına neden olabilir. Bu yöntemde destek materyalin tekrar kullanımı sağlanabilir^(5,10). Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu şematik olarak Şekil 1.5'de verilmiştir.



Şekil 1.5. Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu⁽¹¹⁾

1.3.2. İyonik bağlanma

Uygulanması oldukça basit olan, destek materyalin tekrar kullanılabilirdiği ve enzimin immobilizasyon esnasında herhangi bir modifikasyona uğramadığı bir yöntemdir. Enzimin destek materyale bağlanması kullanılan tampon çözeltiden, pH'dan, iyonik şiddetten ve sıcaklıktan etkilenir. Bağlanma tersinir olduğu için destek materyalin tekrar kullanımı mümkündür. Çeşitli selüloz ve çapraz bağlı dekstran türevlerinden ayrıca iyon değıştirici reçinelerden destek materyal olarak faydalanılmıştır^(2,4). İyonik bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu şematik olarak Şekil 1.6'da verilmiştir.

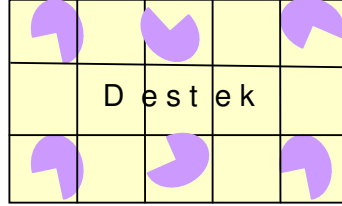


Şekil 1.6. İyonik bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu⁽⁵⁾

1.3.3. Hapsetme

Bu yöntemde enzimler, yapay veya doğal polimerlerdeki kafesler içerisinde tutuklanmaktadır. Enzimler polisakkaritler, proteinler veya sentetik polimerlerden hazırlanan jellerde hapsedilebildikleri gibi fosfolipitlerden hazırlanan sıvı membran içerisinde de hapsedilebilirler. Hapsetme yönteminde enzimler önemli bir modifikasyona uğramazlar. Yüksek molekül kütleli substratın enzim moleküllerine ulaşması güçleşir. Destek materyal tekrar

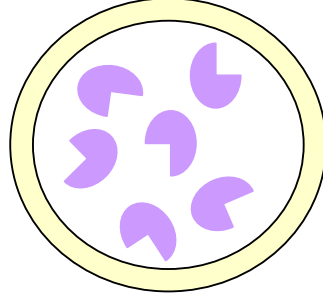
kullanılmaz. Örgü içerisinde hapsetme yöntemi yaygın olarak kullanılan hapsetme yöntemidir^(4,5). Hapsetme yöntemi ile enzim immobilizasyonu şematik olarak Şekil 1.7'de verilmiştir.



Şekil 1.7. Hapsetme yöntemi ile enzim immobilizasyonu⁽¹¹⁾

1.3.4. Kapsülleme

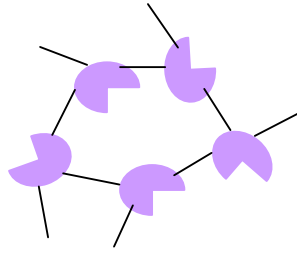
Bu yöntemde enzimler doğal veya yapay polimerlerden hazırlanan yarı geçirgen mikrokürelere hapsedilirler. Enzimi çevreleyen polimerik membranın substratın küre içerisine ve ürününde küre dışarısına taşınmasına engel oluşturmaması en önemli amaçtır. Kapsülleme yöntemi ile enzim immobilizasyonu şematik olarak Şekil 1.8'de verilmiştir.



Şekil 1.8. Kapsülleme yöntemi ile enzim immobilizasyonu⁽¹¹⁾

1.3.5. Çapraz bağlanma

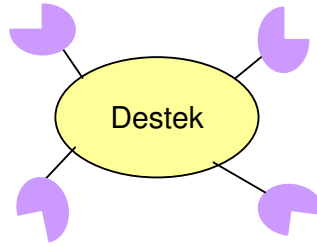
Bu yöntemde enzimler, bis-diazobenzidin-2,2'-disülfonik asit, diizotiyosiyanatlar ve glutaraldehit gibi bi-fonksiyonel özellikteki bileşiklerle çapraz bağlanarak çözünmez bir yapı oluştururlar. Bu yöntemde elde edilmiş enzimler jelâtinimsi özellik gösterdikleri için mekanik özellikleri düşük olmakta ve tekrar kullanımlarında güçlükler ortaya çıkmaktadır⁽⁵⁾. Çapraz bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu şematik olarak Şekil 1.9'da verilmiştir.



Şekil 1.9. Çapraz bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu⁽¹¹⁾

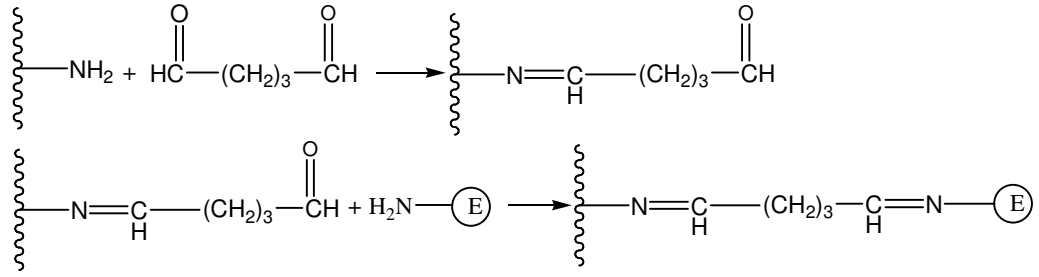
1.3.6. Kovalent bağlanma

Bu yöntemde enzimler, çeşitli taşıyıcılara genellikle organik polimerlere kovalent bağ ile bağlanırlar. En önemli olgu enzimin destek materyale bağlandığı amino asitlerin aktif merkezden uzak olmasıdır. Bu durumu sağlamak zordur, bu nedenle enzimlerin kovalent bağlanma ile immobilize edilmesi aktivite kaybına neden olur^(11,12). Kovalent bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu şematik olarak Şekil 1.10'da verilmiştir.

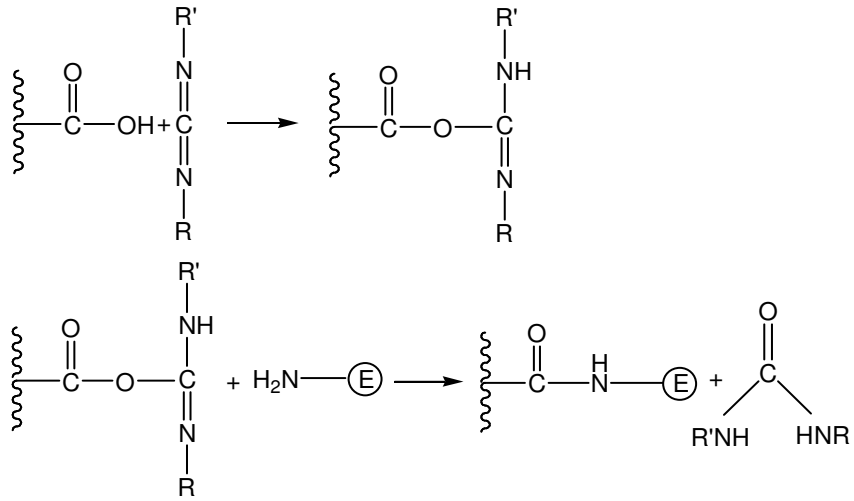


Şekil 1.10. Kovalent bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu⁽¹¹⁾

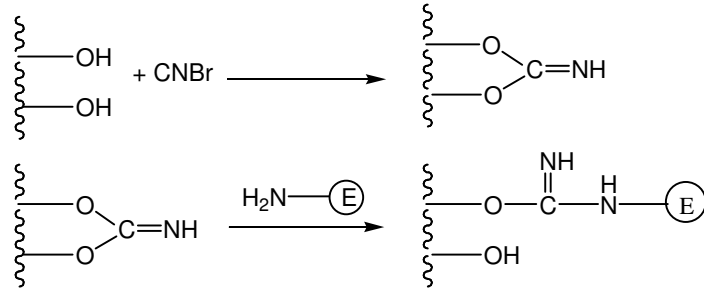
Enzimlerin destek materyale kovalent olarak bağlanabilmesi için destek materyalin amin⁽¹³⁾, hidroksil⁽¹⁴⁾, karboksil⁽¹⁵⁾ ve epoksi⁽¹⁶⁾ grupları gibi fonksiyonel gruplara sahip olması gerekmektedir. İlk aşamada destek materyal üzerindeki fonksiyonel gruplar aktive edilmelidir. Aktive edilmiş destek materyal enzim proteinindeki bazı gruplar ile tepkimeye girebilmektedir^(11,17). Aşağıda enzimlerin başlıca amin, karboksil ve hidroksil gruplarına sahip destek materyale kovalent bağlanma ile immobilizasyonu sırasıyla Şekil 1.11, 1.12 ve 1.13'de verilmiştir.



Şekil 1.11. Amin gruplarına sahip destek materyale kovalent bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu⁽¹⁷⁾

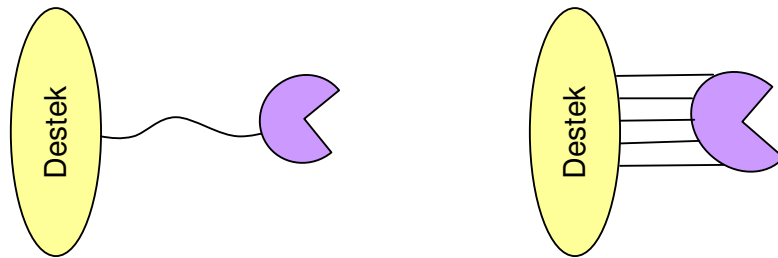


Şekil 1.12. Karboksil gruplarına sahip destek materyale kovalent bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu⁽¹¹⁾



Şekil 1.13. Hidroksil gruplarına sahip destek materyale kovalent bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu⁽¹¹⁾

Enzimin ile destek materyal arasında oluşan kovalent bağ uzunluğunun kısa olması ve sayısının fazla olması enzimin sertliğini artırmaktadır. Bu tür kovalent bağlanma modelinde enzimin konformasyonel kararlılığı arttığı için, enzimin termal, pH ve organik çözücülere karşı kararlılığı artmaktadır^(18,19). Enzimin destek materyale tekli ve çoklu kovalent bağ ile bağlanması ile ilgili şematik model Şekil 1.14'de verilmiştir.



Şekil 1.14. Enzimin destek materyale tekli ve çoklu kovalent bağ ile immobilizasyonu⁽¹⁹⁾

Kovalent bağlanma ile immobilize edilen enzimlerin avantaj ve dezavantajları Çizelge 1.2'de verilmiştir. Kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonunun var olan dezavantajlarına rağmen enzimlerin kovalent immobilizasyonu analitik amaçlar için genel olarak uygulanan bir yöntemdir⁽⁴⁾.

Çizelge 1.2. Kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonunun avantaj ve dezavantajları

Avantajları	Dezavantajları
<ul style="list-style-type: none">* Enzim ve destek arasında kuvvetli bir bağ oluştuğu için kullanım esnasında enzim destek yüzeyinden uzaklaşmaz.* İmmobilize enzimler destek materyalin yüzeyinde bulunduğu için substrat ile kolayca etkileşirler.* Termal kararlılıkta artış gözlenir.	<ul style="list-style-type: none">* Kovalent bağlanma sonucu enzimin aktif merkezi kısmen bloke olabilir.* Enzim molekülleri ve destek materyal arasındaki kuvvetli etkileşim enzimin serbest hareketini engellediğinden aktivitede azalma ortaya çıkar.* İmmobilizasyonun optimum şartlarını bulmak zordur.* Destek materyalin tekrar kullanımı mümkün değildir.

1.4. α -Amilaz

α -Amilaz (1,4- α -glukan-glukanohidrolaz), α -1,4-glikozit bağlarını hidroliz eden enzimdir. α -Amilaz birçok bakteri ve mantar tarafından üretilir. α -Amilaz nişastanın ve maltooligosakkaritlerin glikozit bağlarını rasgele kırarak daha küçük oligosakkaritler ve az miktarda da glikoz oluşturur. Bu nedenle

nişastayı sıvılaştırıcı enzim olarak bilinir⁽⁴⁾. Nişastanın hidrolizi ile elde edilen düşük molekül kütleli ürünler en önemli endüstriyel ticari enzim uygulamalarından biridir. Hidroliz ürünleri gıda, kâğıt ve tekstil endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır⁽²⁰⁾.

Endüstriyel önemi olan α -amilaz enzimi, poli(N-izopropilakrilamit)⁽²¹⁾, $ZrOCl_2$ partikülleri⁽²²⁾ ve silika⁽²³⁾ gibi destek materyallere immobilize edilmiştir. α -amilaz enziminin poli(N-izopropilakrilamit)⁽²¹⁾ üzerine immobilize edilen çalışmada, immobilizasyon ile enzimin termal kararlılığının arttığı ve destek materyalin substrat transferine herhangi bir engel oluşturmadığı belirtilmiştir. $ZrOCl_2$ partikülleri üzerine α -amilaz enziminin immobilize edilmesinin, enzimin optimum pH değerinde değişim meydana getirdiği bildirilmiştir⁽²²⁾.

1.5. Lipaz

Lipaz (gliserol ester hidrolaz) enzimi yağları hidroliz ederek gliserol, di veya monogliserit ve yağ asitleri oluştururlar. Mantarlar ve bakteriler tarafından üretilirler. Lipaz enzimi, yağların hidrolizinde, sindirimi kolaylaştırıcı ilaçların yapımında, süt ürünlerinin koku ve tatlarının geliştirilmesinde, organik sentez tepkimelerinde, deri ve kâğıt endüstrisinde yaygın kullanım alanına sahiptir^(24,25). Ayrıca son yıllarda lipaz katalizli biyodizel üretimi ile ilgili araştırmalar hızlı bir artış göstermiştir^(26,27).

Lipaz enzimi $AlPO_4$, sepiolit ve $Al(OH)_3$ den oluşan inorganik destekler⁽²⁸⁾, akrilamit içeren hidrojel⁽²⁹⁾ ve poli(akrilonitril-maleik asit)⁽³⁰⁾ gibi materyallere immobilize edilmiştir. Yapılan çalışmalarda destek

materyale bağlı olarak enzim aktivitesinde ve kararlılığında farklılıklar görüldüğü belirtilmiştir⁽²⁸⁾. Ayrıca enzimin immobilize edilmesi ile serbest enzime göre daha geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktivite gösterdiği⁽²⁹⁾ ve termal kararlılığında artış gözleendiği bildirilmiştir⁽³⁰⁾.

1.6. Peroksidaz

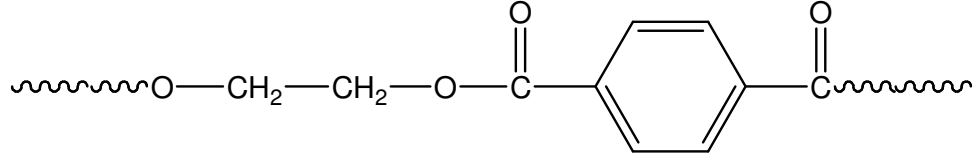
Peroksidaz enzimi oksidoredüktazlar sınıfına giren bir enzimdir. Aktivitesini gerçekleştirmesi için hidrojen peroksida gereksinim duymaktadır. Birçok organizmada bulunmaktadır, çünkü hücre metabolizmasının ürünü olan toksik hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasında rol alır. Ayrıca bitki hücrelerinde hücre duvarlarının lignifikasyon ve modifikasyonu için bitki hormonlarının metabolizmasında işlevi vardır. Peroksidazlar hidrojen peroksidi indirgerken, fenol, aromatik amin ve yağ asitleri gibi bileşikleri oksitlerler. Horseradish peroksidaz atık sulardan fenollerin uzaklaştırılmasında, organik sentezlerde ve analitik amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır^(31,32).

Peroksidaz enziminin immobilizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda selüloz⁽³³⁾, organik polimerler⁽³⁴⁾ ve cam boncuk⁽³⁵⁾ gibi destek materyaller kullanılmıştır. Peroksidaz enziminin selüloz üzerine immobilize edildiği çalışmada, Immobilize ve serbest enzim ile fenol ve 4-bromofenol'ün sulu ortamdaki uzaklaştırılma şartları araştırmıştır. Enzim aktivitesine immobilize olan protein derişiminin etkisi, hidrojen peroksit derişiminin etkisi ve kolondan çözeltili akış hızının etkisi incelenmiştir⁽³³⁾. Peroksidaz enziminin

immobilizasyonu üzerine yapılan bir başka çalışmada, enzimin immobilize edilmesi ile substrata olan özgülüğünde azalma olduğu ancak termal kararlılığında artış gözlemlendiği belirtilmiştir⁽³⁴⁾.

1.7. Poli(Etilen Tereftalat)

Poli(etilen tereftalat) (PET) endüstriyel olarak üretilen, granül, elyaf ve lif şeklinde piyasadan temin edilebilen bir poliesterdir. PET, tereftalik asit ya da dimetil tereftalatın etilen glikol ile polimerizasyonundan elde edilir. PET'in kimyasal yapısı Şekil 1.15'de verilmiştir. PET tekstil endüstrisinde ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan önemli sentetik polimerlerden bir tanesidir. PET asitlerin, birçok organik çözücünün, oksitleyici kimyasalların, güneş ışığının ve mikroorganizmaların etkilerine karşı dayanıklı ve doğrudan toksik etkisi olmayan bir polimerdir. Bu iyi özelliklerin yanında nem tutuculuğunun düşük olması ve boyanabilirliğinin güç olması dezavantaj oluşturur. PET makromoleküllerinin aktif fonksiyonel gruplar taşıması bu zayıf özelliklerinden sorumludur. PET lifin sahip olduğu özellikleri geliştirmek veya life yeni özellikler kazandırmak amacıyla başvurulan yöntemlerden birisi liflerin modifikasyonudur. PET liflerin modifikasyonunda kullanılan yöntemlerden biri de aşırı kopolimerizasyon yöntemidir⁽³⁶⁻³⁸⁾. Modifiye edilmiş PET lifler sulu çözülden ağır metal iyonlarının⁽³⁹⁻⁴²⁾ ve boyar maddelerin⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ uzaklaştırılması amacı ile destek materyal olarak kullanılmıştır.



Şekil 1.15. PET'in kimyasal yapısı

1.8. Tezin Amacı

Yukarıda belirtilen özelliklerin yanı sıra PET lifler mikro boyuttaki çaplarından dolayı geniş yüzey alanına sahiptirler. Ayrıca lif formunun çözelti ortamından kolayca ayrılması kullanım kolaylığı sunmaktadır. Bu özellikler nedeni ile PET liflerin enzim immobilizasyonu için destek materyal özelliğinin araştırılmasının önemli olacağı düşünülmüştür. Bu çalışmada modifiye edilmiş PET lifler üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile enzimlerin immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Endüstriyel önemi olan α -amilaz, lipaz ve çevresel ve analitik amaçlar için yaygın olarak kullanılan peroksidaz enzimleri model enzim olarak seçilmiştir. İmmobilize ve serbest enzimlerin aktiviteleri ve kararlılıkları belirlenerek karşılaştırmaları amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler aşağıda verilmiştir.

Poli(etilen tereftalat) lif SASA (Adana) firmasından temin edilmiştir. *Aspergillus oryzae* kaynaklı α -Amilaz (EC 3.2.1.1), *Candida rugosa* kaynaklı Lipaz (EC 3.1.1.3), Horseradish kaynaklı Peroksidaz (EC 1.11.1.7), Glutaraldehit ve Sodyum hipoklorit Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır. Çözünebilir nişasta, Sodyum hidroksit, Akrilamit, Hidroklorik asit, Sitrik asit, Sodyum asetat, Asetik asit, Bakır(II) sülfat, Piridin, Bovin serum albumin, Sodyum sülfat, Sodyum potasyum tartarat, Benzoil peroksit, 1,2-Dikloreten, Maltoz, Fosforik asit ve Borik asit Merck firmasından temin edilmiştir. Pirogallol, Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, Bakır(II) asetat, Oleik asit ve Dinitro salisilikasit Fluka firmasından satın alınmıştır. İzooktan, Potasyum dihidrojen fosfat ve Aseton Riedel deHaen firmasından sağlanmıştır. Potasyum monohidrojen fosfat Carlo Erba firmasından satın alınmıştır. Zeytinyağı (asitlik, en fazla %1) ticari olarak temin edilmiştir. Deneysel çalışmalarda deiyonize su kullanılmıştır.

2.2. Cihazlar

Bu çalışmada, çözeltilerin renk yoğunluğu Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 model UV-Visible spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.

İnfrared spektrumları Thermo-Nicolet 6700 model FTIR spektrofotometresi ile ATR (attenuated total reflection) tekniği kullanılarak elde edilmiştir.

Taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri JEOL JSM 5600 model elektron mikroskobu ile elde edilmiştir.

Deneylerde, çözeltilerin pH değerlerini belirlemek için Hanna 221 model pH metre kullanılmıştır.

Serbest yağ asitlerinin analizlerinde Heidolph marka girdaplı karıştırıcı kullanılmıştır.

2.3. Destek Materyalin Hazırlanması

PET lif 6 saat aseton ile Sokslet ekstraksiyon düzeneğinde yıkanmış ve 50°C'de kurutulmuştur. Yıkanmış PET lif (0,30 g) 1,2-dikloreten içerisinde 90°C'de 2 saat süre ile şişirilmiştir⁽³⁶⁾. Bu süre sonunda PET lif ortamdan alınarak, yüzeydeki dikloreten süzgeç kâğıdına adsorbe edilmek sureti ile uzaklaştırılmıştır.

Şişirilmiş PET lif 100 mL'lik polimerizasyon tüpüne yerleştirildikten sonra, üzerine toplam hacmi 20 mL olan akrilamidin sulu çözeltisi ve 2 mL asetonunda çözülmüş benzoil peroksit çözeltisini içeren karışım eklenmiştir. Polimerizasyon tüpü su banyosuna (85°C) yerleştirilerek 2 saat süre ile azot atmosferi altında aş polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir⁽⁴⁶⁾. Bu süre sonunda aşılınmış lif, yüzeyindeki homopolimerin uzaklaştırılması için 50°C'de

çalkalamalı karıştırıcıda 100 mL su içerisinde 100 rpm hızda karıştırılarak yıkanmıştır. Yıkama işlemi, 5 saat süre ile ve yıkama suyu 5 kez değiştirilerek yürütülmüştür. Homopolimerden ayrılan aşılınmış lif 50°C'de kurutulmuştur. Aşılama oranı (%A), aşılınmış lifin ağırlık artışından faydalanılarak aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\% A = \frac{W_a - W_o}{W_o} \times 100$$

Eşitlikte;

W_a : Aşılınmış lifin ağırlığı,

W_o : Orijinal lifin ağırlığı olarak tanımlanmıştır.

Akrilamit aşılınmış PET (AAm-g-PET) lif Hofmann dönüşüm tepkimesi kullanılarak modifiye edilmiştir^(47,48). AAm-g-PET lif (0,03 g) 15 mL hacimli, NaOH ve NaOCl içeren çözelti içerisinde eklenerek, 20°C'de 100 rpm hızda karıştırılmıştır. Daha sonra PET lif deiyonize su ile 4 kez karıştırıcıda yıkanmıştır. Optimum tepkime şartlarını belirlemek için, NaOH ve NaOCl derişiminin ve karıştırma süresinin Hofmann tepkimesine etkisi araştırılmıştır.

2.4. Enzim İmmobilizasyonu

Modifiye edilmiş PET lif, %2 (m/m) derişimli 5 mL hacimli glutaraldehit çözeltisi ile 18 saat 100 rpm hızda karıştırılarak aktive edilmiştir^(49,50). Aktivasyon işleminden sonra PET lif deiyonize su ile dört kez yıkanarak tepkimeye girmemiş glutaraldehit yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Aktive edilmiş PET lif ile 5 mL enzim çözeltisi 18 saat süre ile 100 rpm hızda karıştırılarak,

enzimin immobilize olması sağlanmıştır. Daha sonra PET lif 10 mL tampon çözelti ile (pH=7) dört kez karıştırıcıda yıkanmıştır.

2.5. Protein Analizi

PET life immobilize olmuş enzim miktarı, enzim çözeltisinin başlangıçtaki protein derişimi ile immobilizasyon işleminden sonra çözeltide kalan protein derişimi arasındaki farktan yararlanılarak belirlenmiştir. Enzim çözeltisindeki protein derişimi Lowry yöntemi kullanılarak belirlenmiştir⁽⁵¹⁾.

Kalibrasyon grafiği için Bovin serum albumin kullanılarak 0,04–0,3 mg/mL derişim aralığında bir seri protein çözeltisi hazırlanmıştır. Deney tüpüne 1 mL protein çözeltisi alınmıştır. Üzerine 0,9 mL reaktif A eklenerek 50°C su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan çözeltiye 0,1 mL reaktif B eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra çözeltiye 3 mL reaktif C eklenerek 10 dakika 50°C su banyosunda inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığına soğuyan çözeltinin renk yoğunluğu 650 nm dalga boyunda spektrofotometre ile belirlenmiştir.

Reaktif A: 0,2 g sodyum potasyum tartarat, 10 g Na₂CO₃, 2 g NaOH deiyonize suda çözülerek toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Reaktif B: 2 g sodyum potasyum tartarat, 1 g CuSO₄, 0,4 g NaOH deiyonize suda çözülerek toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Reaktif C: Folin-Ciocalteu fenol reaktifinden 2 mL alınarak üzerine 30 mL su eklenmiştir.

2.6. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.6.1. α -Amilaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

α -Amilaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak nişasta kullanılmıştır. Nişasta çözeltisi, çözünebilir nişastanın tampon çözelti içerisinde 10 dakika kaynatılmasıyla hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize α -amilaz 4 mL hacimli nişasta çözeltisi ile 10 dakika 100 rpm hızda farklı sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Enzim aktivitesi α -amilazın nişastayı hidrolizi sonucu oluşan indirgen şekerin derişim değışimi takip edilerek belirlenmiştir.

İndirgen şeker miktarı dinitro salisilik asit (DNS) yöntemi kullanılarak takip edilmiştir⁽⁵²⁾. Kalibrasyon grafiği için 0,4–2 mg/mL derişim aralığında bir seri maltoz çözeltisi hazırlanmıştır. Her bir çözülden deney tüplerine 0,15 mL alınarak, üzerlerine 0,6 mL DNS reaktifi eklenmiştir. Çözümler 5 dakika süre ile kaynayan su banyosunda bekletilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan kahve renkli çözüme 3 mL deiyonize su eklenerek renk seyreltilmesi yapılmıştır. Çözeltinin renk yoğunluğu 540 nm dalga boyunda spektrofotometre ile belirlenmiştir.

DNS reaktifi, 1 g Dinitro salisilik asit, 1 g NaOH, 0,05 g sodyum sülfid, 0,2 g fenol ve 20 g sodyum potasyum tartaratın deiyonize suda çözümlenerek toplam hacmin 100 mL'ye seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

1 Ünite (Enzim aktivitesi): 1 dakikada 1 mg maltoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzimin % bağıl aktivitesi aşağıdaki formüle göre her çalışmada immobilize ve serbest enzim için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

$$\text{Bağıl aktivite (\%)} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{Maksimum aktivite}} \times 100$$

2.6.2. Lipaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Lipaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak zeytinyağı kullanılmıştır. Aktivite deneyleri, zeytinyağının izooktan içerisinde çözülmesi ile hazırlanmış organik faz ile tampon çözeltinin oluşturduğu sulu fazdan oluşan iki fazlı tepkime ortamında yürütülmüştür. Serbest ve immobilize lipaz enzimleri 2 mL zeytinyağı izooktan çözeltisi ve 2 mL tampon çözeltiden oluşan iki fazlı hidroliz ortamında 150 rpm hızda ve 30 dakika süre ile farklı sıcaklıklarda inkübe edilmişlerdir. Daha sonra hidroliz ürününü içeren organik faz deney tüpüne transfer edilmiştir. Enzim aktivitesi, lipaz enziminin zeytinyağını hidroliz etmesi sonucu oluşan serbest yağ asidinin derişim değişimi takip edilerek belirlenmiştir. Açığa çıkan serbest yağ asidinin derişimi, yağ asitlerinin Cu(II) iyonları ile izooktan içerisinde oluşturdukları renkli çözeltinin optik yoğunlukları 715 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülerek belirlenmiştir⁽⁵³⁾.

Kalibrasyon grafiği için oleik asidin izooktan içerisinde, derişim aralığı 0,5–2,5 mg/mL olan, bir seri çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 2 mL alınarak deney tüplerine aktarılmıştır. Üzerlerine 0,5 mL bakır-piridin reaktif

çözeltisi eklenmiştir. Tüpler iki dakika boyunca girdaplı karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra izooktan ve su fazının ayrılması için tüpler dinlendirilmiştir. Organik fazın renk yoğunluğu spektrofotometre ile belirlenmiştir.

Bakır-piridin reaktifi şu yöntemle hazırlanmıştır. 5 g bakır(II) asetat deiyonize suda çözülerek bir gece dinlenmeye bırakılmıştır. Oluşan beyaz çökelek süzülerek ayrıldıktan sonra çözelti pH'sı piridin ile 6,1 değerine ayarlanmıştır. Daha sonra toplam hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

1 Ünite (Enzim aktivitesi): 1 dakikada 1 µmol serbest yağ asidi açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzimin % bağıl aktivitesi aşağıdaki formüle göre her çalışmada immobilize ve serbest enzim için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

$$\text{Bağıl aktivite (\%)} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{Maksimum aktivite}} \times 100$$

2.6.3. Peroksidaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak pirogallol ve hidrojen peroksit kullanılmıştır. Serbest ve immobilize peroksidaz enziminin aktivitelerinin belirlendiği çözelti ortamı şu şekilde hazırlanmıştır. Pirogallol çözeltilisinden 2 mL alınarak üzerine 1,5 mL tampon çözelti ve 0,5 mL hidrojen peroksit çözeltisi (10 mmol/L) eklenmiştir. Serbest enzim aktivitesi hidrojen peroksit eklenmesinden 1 dakika sonra, immobilize

enzim aktivitesi ise hidrojen peroksit eklendikten 5 dakika sonra ortamdan örnek alınarak belirlenmiştir. Aktivite deneyleri aynı şartlarda serbest ve immobilize peroksidazın bulunmadığı ortamda tekrar edilerek elde edilen absorbans değerleri referans değerler olarak kabul edilmiştir. Aktivite deneyleri 100 rpm hızda karıştırma yapılarak yürütülmüştür. Enzim aktivitesi, ürün olarak ortamda oluşan purpurogallin'in derişim değişimi takip edilerek belirlenmiştir^(54,55). Kalibrasyon grafiği için purpurogallin'in 0,05–0,3 µmol/mL derişim aralığında bir seri çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltilerin renk yoğunluğu 420 nm dalga boyunda spektrofotometre ile belirlenmiştir.

1 Ünite (Enzim aktivitesi) 1 dakikada 1µmol purpurogallin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzimin % bağıl aktivitesi aşağıdaki formüle göre her çalışmada immobilize ve serbest enzim için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

$$\text{Bağıl aktivite (\%)} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{Maksimum aktivite}} \times 100$$

2.7. Deneysel Çalışmalar

2.7.1. AAm-g-PET lifin modifikasyonu

AAm-g- PET lif üzerine enzim immobilizasyonunu geçekleştirmek için, lif üzerinde Hofmann dönüşüm tepkimesi kullanılarak amin grupları türetilmiştir. Uygun tepkime şartlarını belirlemek amacı ile tepkimeye NaOCl derişiminin etkisi, NaOH derişiminin etkisi ve tepkime süresinin etkisi araştırılmıştır.

NaOCl derişiminin etkisini araştırmak amacı ile 0,2 M NaOH çözeltili içinde NaOCl derişimi 1×10^{-3} - 2×10^{-2} M aralığında olan bir seri çözeltili hazırlanmıştır. AAm-g-PET lif bu çözeltilerle 100 rpm hızda 20 dakika süre ile etkileştirilmiştir. Daha sonra PET lif glutaraldehit ile aktive edilerek α -amilaz enzimi immobilize edilmiştir. Immobilize α -amilaz enziminin aktivitesi belirlenerek en yüksek maltoz miktarı Hofmann dönüşüm tepkimesi için uygun NaOCl derişimi olarak belirlenmiştir.

NaOH derişiminin etkisini araştırmak amacı ile 5×10^{-3} M NaOCl çözeltili içinde NaOH derişimi 0,1–0,4 M aralığında olan bir seri çözeltili hazırlanmıştır. AAm-g-PET lif bu çözeltilerle 100 rpm hızda 20 dakika etkileştirilmiştir. Daha sonra PET lif glutaraldehit ile aktive edilerek α -amilaz enzimi immobilize edilmiştir. Immobilize α -amilaz enziminin aktivitesi belirlenerek en yüksek maltoz miktarı Hofmann dönüşüm tepkimesi için uygun NaOH derişimi olarak belirlenmiştir.

Tepkime süresinin etkisini araştırmak amacı ile 5×10^{-3} M NaOCl ve 0,25 M NaOH içeren bir seri çözeltili hazırlanmıştır. AAm-g-PET lif bu çözeltilerle 100 rpm hızda 10–75 dakika zaman aralığında karıştırılmıştır. Yıkama işleminden sonra glutaraldehit ile aktive edilerek α -amilaz enzimi immobilize edilmiştir. Immobilize α -amilaz enziminin aktivitesi belirlenerek en yüksek maltoz miktarı Hofmann dönüşümü için uygun tepkime süresi olarak bulunmuştur.

2.7.2. Amin gruplarının analizi

PET lif üzerinde türetilen amin gruplarının oranı asit-baz titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir⁽⁵⁶⁾. Modifiye edilmiş PET lif (0,100 g) 30 mL hidroklorik asit çözeltisi (0,01 mol/L) ile 30 dakika süre ile etkileştirilmiştir. Artan hidroklorik asit sodyum hidroksit (0,01 mol/L) çözeltisi ile fenolftaleyn indikatörü eşliğinde titre edilmiştir. Referans titrasyon deneyi AAm-g-PET lif ile tekrar edilmiştir.

2.7.3. İmmobilizasyon şartlarının optimizasyonu

Enzim immobilizasyonuna çözelti pH'sının, PET lifin aşılama yüzdesinin ve protein derişiminin etkisi araştırılmıştır. Enzim immobilizasyonuna çözelti pH'sının etkisinin araştırılması amacı ile α -amilaz ve peroksidaz enzimleri için pH değerleri 4–9, lipaz enzimi için pH değerleri 3-8 aralığına ayarlanmış enzim çözeltileri ile immobilizasyon işlemi yürütülmüştür. Yıkama işleminden sonra enzim aktivitesi belirlenmiştir. Maksimum aktivitenin elde edildiği pH değerleri, immobilizasyon için uygun pH değerleri olarak belirlenmiştir.

Enzim immobilizasyonuna aşılama yüzdesinin etkisinin araştırılması amacı ile aşılama oranı %3,7–40,1 aralığında olan PET lifler kullanılmıştır. Glutaraldehit ile aktive edilmiş PET liflere enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminden sonra enzim aktivitesi belirlenmiştir. Maksimum aktivitenin elde edildiği aşılama yüzdesi immobilizasyon için uygun değer olarak belirlenmiştir.

Enzim immobilizasyonuna protein derişiminin etkisinin araştırılması amacı ile protein derişimleri 0,06–0,2 mg/mL aralığında olan bir seri enzim çözeltisi hazırlanmıştır. İmmobilizasyon işleminden sonra enzim aktivitesi belirlenmiştir.

2.7.4. Enzim aktivitesine pH'nın etkisi

α -Amilaz enziminin aktivitesine çözelti pH'sının etkisini araştırmak amacı ile derişimi 10 mg/mL, pH değeri 4–9 aralığında olan bir seri nişasta çözeltisi hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize α -amilaz'ın aktiviteleri, nişasta çözeltileri ile 100 rpm hızda 20°C'de 10 dakika inkübe edilerek belirlenmiştir.

Lipaz enziminin aktivitesine çözelti pH'sının etkisini araştırmak amacı ile derişimi 100 mg/mL olan izooktan da çözülmüş zeytinyağı çözeltisi ile pH değeri 4–9 aralığında olan tampon çözeltilerle iki fazlı sistem hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize lipaz'ın aktiviteleri iki fazlı sistem ile 150 rpm hızda 35°C'de 30 dakika inkübe edilerek belirlenmiştir.

Peroksidaz enziminin aktivitesine çözelti pH'sının etkisini araştırmak amacı ile derişimi 10 mmol/L, pH değeri 3–9 aralığında olan bir seri pirogallol çözeltisi hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize peroksidazın aktiviteleri pirogallol çözeltileri ile 100 rpm hızda 20°C'de inkübe edilerek belirlenmiştir.

2.7.5. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

α -Amilaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisini araştırmak amacı ile derişimi 10 mg/mL olan bir seri nişasta çözeltisi hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize α -amilaz'ın aktiviteleri, nişasta çözeltileri ile 100 rpm hızda 20–80°C sıcaklık aralığında 10 dakika inkübe edilerek belirlenmiştir.

Lipaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisini araştırmak amacı ile derişimi 100 mg/mL olan izooktan da çözölmüş zeytinyağı çözeltisi ile tampon çözeltiden oluşan bir seri iki fazlı sistem hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize lipaz'ın aktiviteleri iki fazlı sistem ile 150 rpm hızda 30–60°C sıcaklık aralığında 30 dakika inkübe edilerek belirlenmiştir.

Peroksidaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisini araştırmak amacı ile derişimi 10 mmol/L olan bir seri pirogallol çözeltisi hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize peroksidaz'ın aktiviteleri pirogallol çözeltileri ile 100 rpm hızda 20–60°C sıcaklık aralığında inkübe edilerek belirlenmiştir.

2.7.6. Enzim aktivitesine substrat derişiminin etkisi

α -Amilaz enziminin aktivitesine substrat derişiminin etkisini araştırmak amacı ile derişimi 5–50 mg/mL aralığında olan bir seri nişasta çözeltisi hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize α -amilaz'ın aktiviteleri, nişasta çözeltileri ile 100 rpm hızda 20°C'de 10 dakika inkübe edilerek belirlenmiştir.

Lipaz enziminin aktivitesine substrat derişiminin etkisini araştırmak amacı ile derişimi 25–300 mg/mL olan izooktan da çözölmüş zeytinyağı

çözeltisi ile tampon çözeltilerden oluşan iki fazlı sistem hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize lipaz'ın aktiviteleri iki fazlı sistem ile 150 rpm hızda 35°C'de 30 dakika inkübe edilerek belirlenmiştir.

Peroksidaz enziminin aktivitesine substrat derişiminin etkisini araştırmak amacı ile derişimi 0,25–10 mmol/L aralığında olan bir seri pirogallol çözeltisi hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize peroksidazın aktiviteleri, pirogallol çözeltisi ile 100 rpm hızda 20°C'de inkübe edilmesiyle belirlenmiştir.

2.7.7. Termal kararlılık

α -Amilaz enziminin termal kararlılığını araştırmak amacı ile immobilize ve serbest enzim tampon çözelti içerisinde 45°C sıcaklıktaki su banyosunda 300 dakika inkübe edilmiştir. Immobilize ve serbest α -amilazdan belirli zamanlarda örnekler alınarak oda sıcaklığına soğutulmuştur. Daha sonra immobilize ve serbest α -amilazın aktiviteleri 10 mg/mL derişimli nişasta çözeltisi ile 100 rpm hızda, 20°C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilerek belirlenmiştir.

Lipaz enziminin termal kararlılığını araştırmak amacı ile immobilize ve serbest enzim tampon çözelti içerisinde 50°C sıcaklıktaki su banyosunda 180 dakika inkübe edilmiştir. Immobilize ve serbest lipazdan belirli zamanlarda örnekler alınarak oda sıcaklığına soğutulmuştur. Serbest ve immobilize lipazın aktiviteleri, derişimi 100 mg/mL olan izooktan da çözülmüş zeytinyağı

özeltisi ile tampon çözeltiden oluşan iki fazlı sistem ile 150 rpm hızda 35°C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilerek belirlenmiştir.

Peroksidaz enziminin termal kararlılığını araştırmak amacı ile immobilize ve serbest enzim tampon çözelti içerisinde 50°C sıcaklıktaki su banyosunda 180 dakika inkübe edilmiştir. İmmobilize ve serbest peroksidazdan belirli zamanlarda örnekler alınarak oda sıcaklığına soğutulmuştur. Daha sonra serbest ve immobilize peroksidazın aktiviteleri, derişimi 10 mmol/L olan pirogallol çözeltisi ile 100 rpm hızda 20°C'de inkübe edilerek belirlenmiştir.

2.7.8. Depolanma kararlılığı

Serbest ve immobilize enzimler 4°C'de, tampon çözelti içerisinde 60 gün süre ile depolanmışlardır. Belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktiviteleri belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize α -amilaz enziminin aktiviteleri, 10 mg/mL derişimli nişasta çözeltisi ile 100 rpm hızda, 20°C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilerek izlenmiştir.

Serbest ve immobilize lipazın aktiviteleri, derişimi 100 mg/mL olan izooktan da çözölmüş zeytinyağı çözeltisi ile tampon çözeltiden oluşan iki fazlı sistem ile 150 rpm hızda 35°C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilerek takip edilmiştir.

Serbest ve immobilize peroksidazın aktiviteleri, derişimi 10 mmol/L olan pirogallol çözeltisi ile 100 rpm hızda 20°C'de inkübe edilerek belirlenmiştir.

2.7.9. İmmobilize enzimin tekrar kullanım kararlılığı

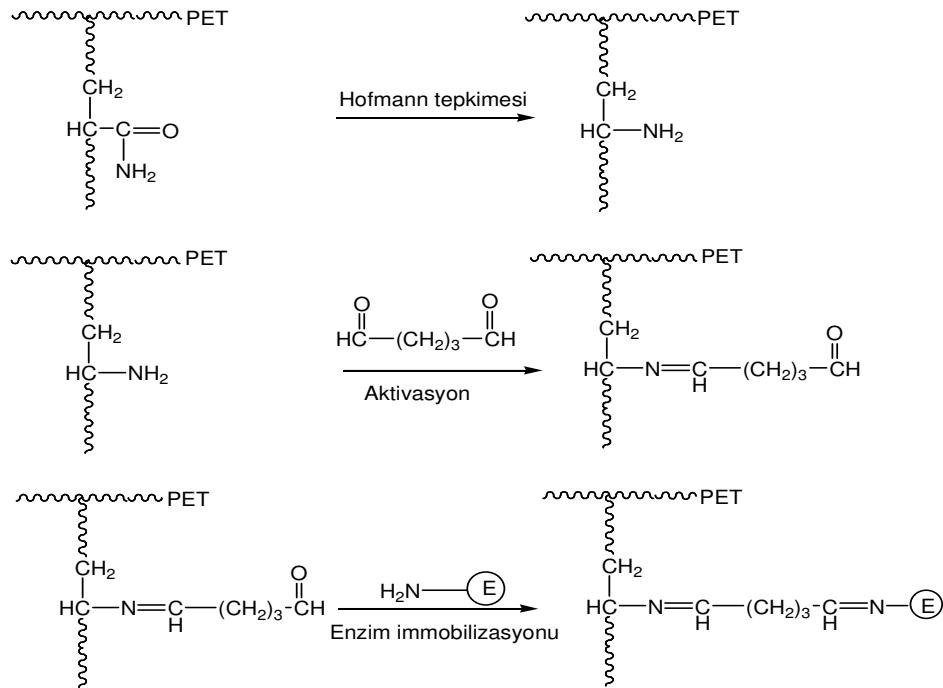
İmmobilize edilmiş α -amilaz enziminin tekrar kullanım kararlılığını belirlemek amacı ile immobilize α -amilaz enziminin aktivitesi 10 mg/mL derişimli nişasta çözeltisi ile 100 rpm hızda, 20°C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilerek takip edilmiştir. Her aktivite belirlenmesinden sonra PET lif tampon çözelti ile yıkanmıştır. Aktivite belirleme çalışması 30 defa tekrar edilmiştir.

İmmobilize edilmiş lipaz enziminin tekrar kullanım kararlılığını belirlemek amacı ile immobilize lipaz enziminin aktivitesi derişimi 100 mg/mL olan izooktan da çözülmüş zeytinyağı çözeltisi ile tampon çözeltiden oluşan iki fazlı sistem ile 150 rpm hızda 35°C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilerek izlenmiştir. Her aktivite belirlenmesinden sonra PET lif tampon çözelti ile yıkanmıştır. Aktivite belirleme çalışması 10 defa tekrar edilmiştir.

İmmobilize edilmiş peroksidaz enziminin tekrar kullanım kararlılığını belirlemek amacı ile immobilize peroksidaz enziminin aktivitesi derişimi 10 mmol/L olan pirogallol çözeltisi ile 100 rpm hızda 20°C'de inkübe edilerek belirlenmiştir. Her aktivite belirlenmesinden sonra PET lif tampon çözelti ile yıkanmıştır. Aktivite belirleme çalışması 20 defa tekrar edilmiştir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

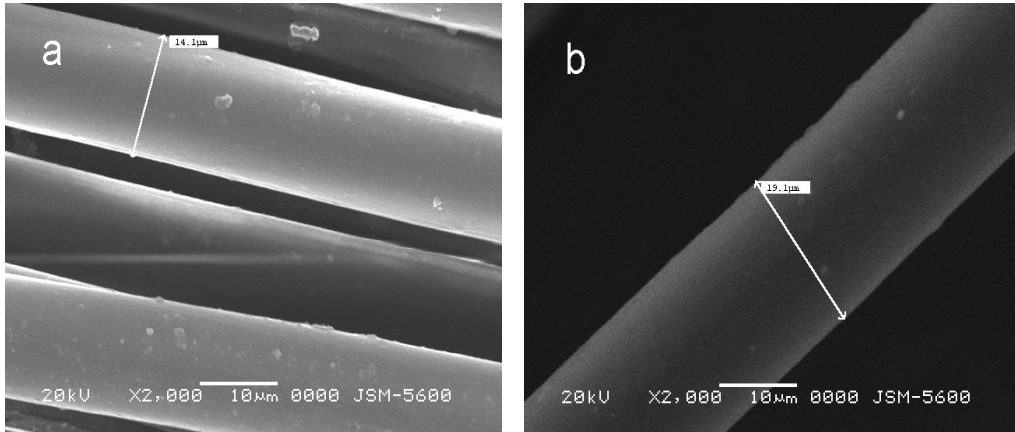
Bu çalışmada AAm-g-PET life enzim immobilizasyon şartları araştırılmıştır. Bu amaçla AAm-g-PET lif Hofmann dönüşüm tepkimesi ile modifiye edilmiştir. AAm-g-PET lifin yüzeyindeki amit gruplarının %12,4'ünün amin gruplarına dönüştüğü belirlenmiştir. Modifiye edilmiş PET lif glutaraldehit ile aktive edilmiştir. Daha sonra PET lif üzerine enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Serbest ve immobilize edilmiş enzimlerin aktiviteleri belirlenerek elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Immobilizasyonda kullanılan tepkime basamakları Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



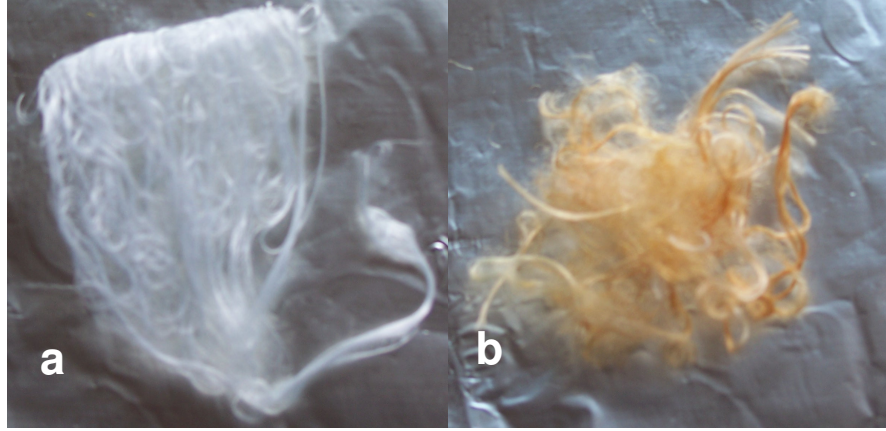
Şekil 3.1. Enzim immobilizasyon basamakları⁽⁴⁷⁾

3.1. Materyalin Karakterizasyonu

PET lif üzerine akrilamidin aşılması ve karakterizasyonu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir^(46,57). PET lifin ve akrilamid aşlanmış PET lifin SEM görüntüleri Şekil 3.2'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, PET life akrilamid aşılması sonucunda lif çapında bir artış meydana gelmiştir. Hofmann dönüşüm tepkimesinin önemli bir görüntüsü ise PET lif yüzeyinde oluşan amin gruplarının glutaraldehit ile tepkimesi sonucu oluşan imin (C=N) bağından kaynaklanan renklenme olmuştur. Şekil 3.3'de bu durumla ilgili fotoğraflar verilmiştir.



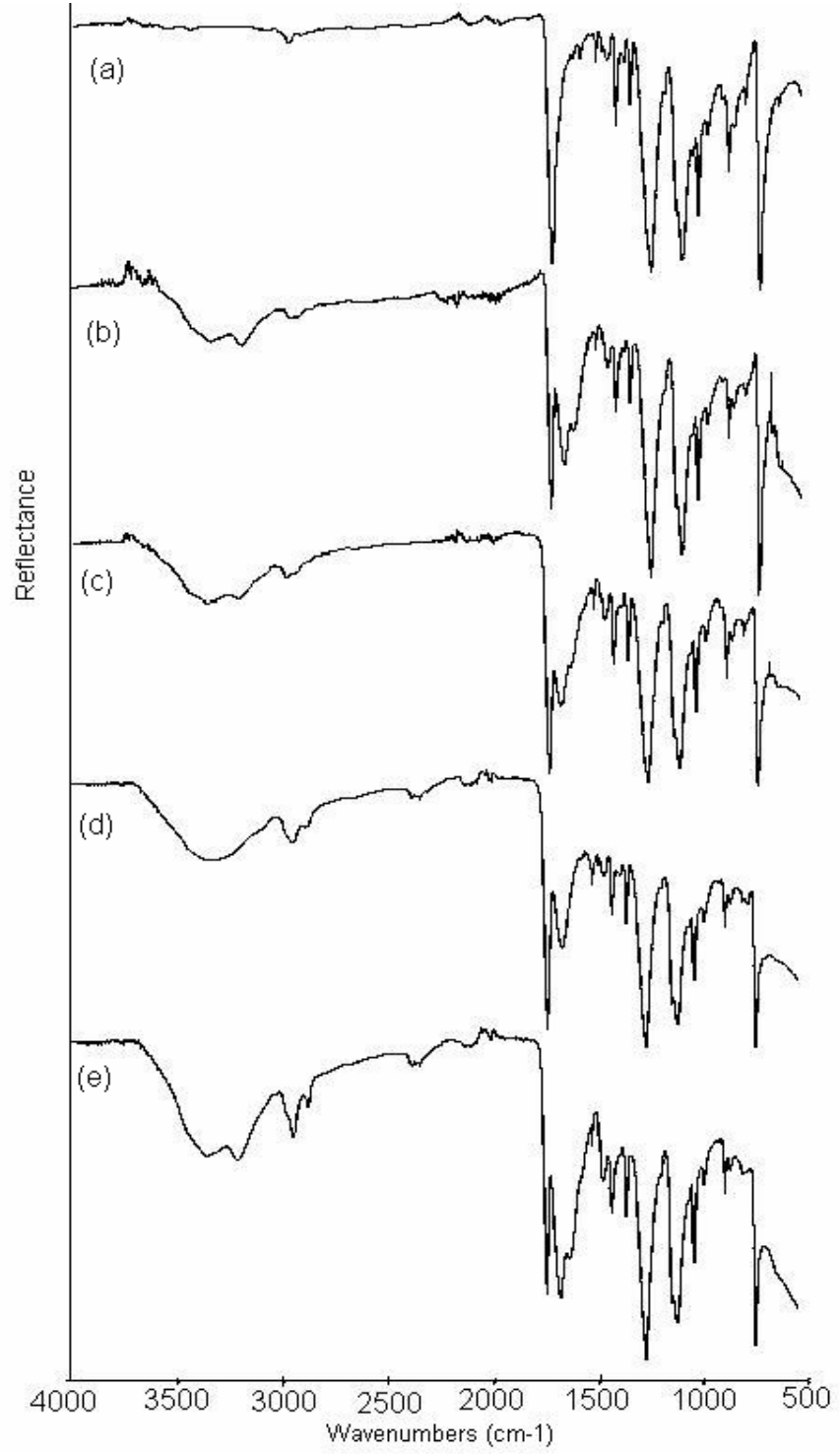
Şekil 3.2. SEM görüntüsü, PET lif (a), akrilamid aşlanmış PET lif (b)



Şekil 3.3. Üzerinde amin grupları oluşturulmuş PET lif (a), glutaraldehit bağlanmış PET lif (b)

Şekil 3.4'de PET lifin (a), akrilamid aşılansmış PET lifin (b), Hofmann dönüşüm reaksiyonu ile modifiye edilmiş PET lifin (c), glutaraldehit bağlanmış PET lifin (d) ve enzim immobilize edilmiş PET lifin (e), FTIR spektrumları verilmiştir. Spektrum a ve b karşılaştırıldığında, b spektrumunda akrilamide ait karbonil grubunun piki ($\sim 1652 \text{ cm}^{-1}$) ve N-H piki ($\sim 1606 \text{ cm}^{-1}$) görülmüştür. Bu veriler akrilamidin PET lif üzerine aşılandığını göstermiştir. Spektrum b ve c incelendiğinde ise, karbonil grubuna ait pikin ve N-H pikinin şiddetlerinde azalma olduğu görülmüştür. Bu bilgilerden akrilamidin Hofmann tepkimesi ile dönüşüme uğradığı anlaşılmıştır. Spektrum c ve d karşılaştırıldığında ise yapıya glutaraldehidin katılması ile 1646 cm^{-1} de elde edilen pikte genişleme görülmüştür. Pikteki genişleme aldehit karbonilinden ve amin ile aldehit arasında meydana gelen imin bağından (C=N) kaynaklanmaktadır. Ayrıca 2855 cm^{-1} dalga boyunda glutaraldehidin karakteristik piki (C-H gerilme titreşimi (-CHO)) elde edilmiştir.

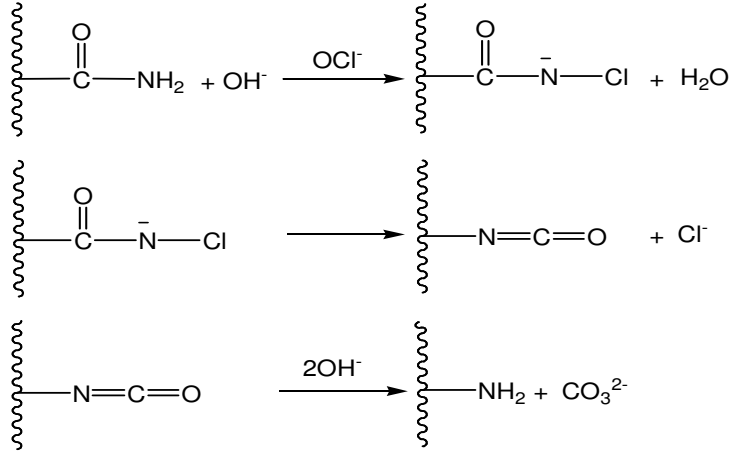
Glutaraldehydin yapıya katılması ile 2927 cm^{-1} C-H ($-\text{CH}_2-$) gerilme titreşiminden kaynaklanan pikin şiddetinde artış gözlenmiştir. Spektrum e'de görüldüğü gibi, 1610 cm^{-1} , 1653 cm^{-1} ve 3189 cm^{-1} 'de enzim molekülleri ile aldehit grupları arasında meydana gelen imin bağından (C=N), enzim yapısında bulunan başlıca amin ve karboksilik asit gruplarından dolayı pik şiddetinde artmalar meydana gelmiştir.



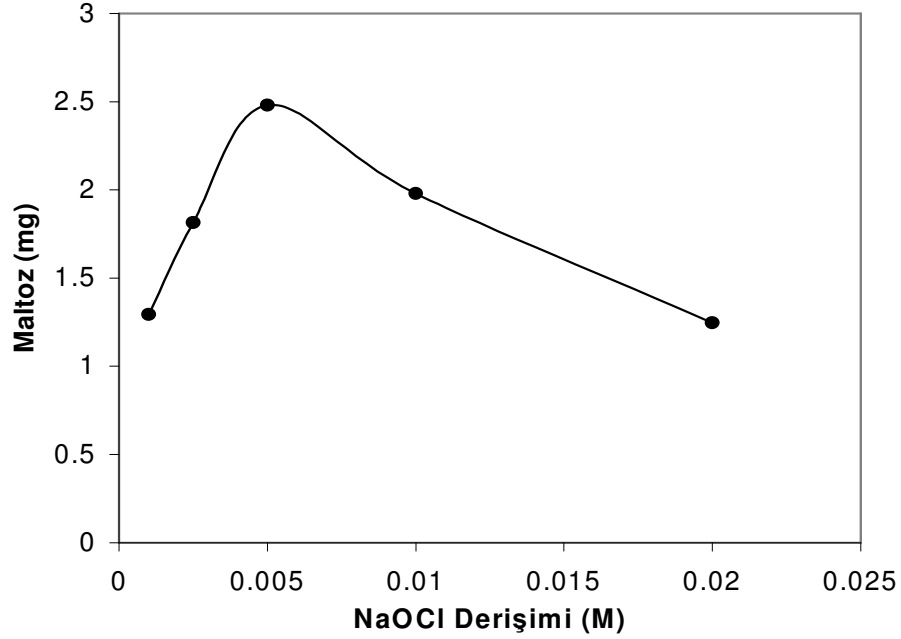
Şekil 3.4. FTIR Spektrumu, PET lif (a), AAm-g-PET lif (b), Hofmann tepkimesi sonrasındaki AAm-g-PET (c), glutaraldehit bağlanmış PET lif (d), enzim immobilize edilmiş PET lif (e).

3.2. AAm-g-PET Lifin Modifikasyonu

Hofmann dönüşüm tepkimesi ile amit gruplarının amin gruplarına dönüşümü aşağıdaki mekanizma ile gerçekleşir. Tepkimenin önemli parametreleri NaOCl derişimi, NaOH derişimi ve tepkime süresidir⁽⁴⁷⁾.



Hofmann tepkimesine NaOCl derişiminin etkisi Şekil 3.5'de verilmiştir. Hofmann dönüşüm tepkimesi için en uygun NaOCl derişiminin 5×10^{-3} M olduğu görülmüştür. Ortamda oluşan maltoz miktarı immobilize olan enzim miktarını temsil etmektedir. Immobilize olan enzim miktarı ise aşılınmış PET lif üzerinde oluşan amit gruplarının miktarına bağlıdır.

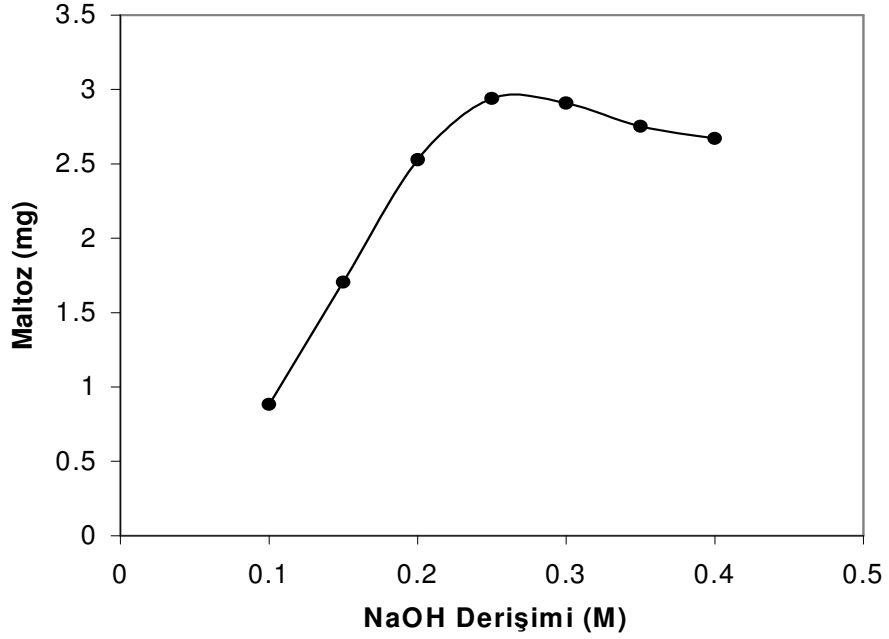


Şekil 3.5. NaOCl derişiminin Hofmann dönüşüm tepkimesi üzerine etkisi

Şekilde görüldüğü gibi, hipoklorit derişiminin belirli bir değerine kadar oluşan maltoz miktarı artmakta, daha sonra ise maltoz miktarında azalma görülmektedir. Yukarıda verilen tepkime mekanizmasına göre, dönüşüm tepkimesi amit gruplarının klorlanması ile başlamaktadır. Sano ve arkadaşları⁽⁴⁷⁾, amit gruplarının klorlanmasının düşük hipoklorit derişiminde zor olduğunu belirtmişlerdir. Hipoklorit derişiminin yüksek olduğu durumlarda ise poliakrilamidin ana zincirinde rasgele kırılmalar olduğunu bildirmişlerdir.

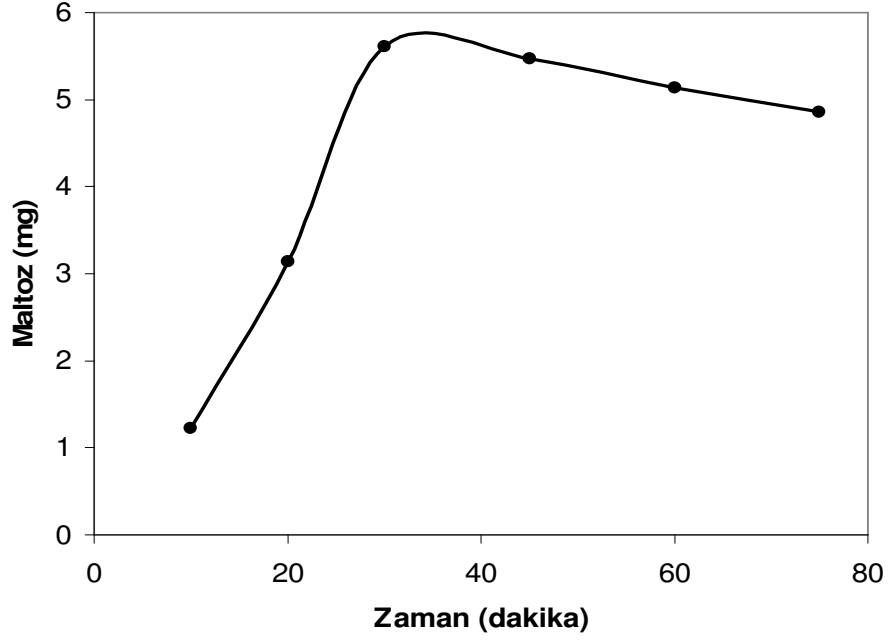
Hofmann tepkimesine NaOH derişiminin etkisi Şekil 3.6'da verilmiştir. Yukarıdaki tepkime mekanizmasında görüldüğü gibi, OH⁻ iyonları mekanizmanın son basamağında, izosiyanat gruplarının amin gruplarına hidrolizinde de rol almaktadır⁽⁴⁷⁾. Şekilde görüldüğü gibi, maltoz miktarı NaOH

derişiminin 0,25 M olduğu değere kadar artmıştır ve bu değerin üzerinde herhangi bir değişim hemen hemen gözlenmemiştir.



Şekil 3.6. NaOH derişiminin Hofmann dönüşüm tepkimesi üzerine etkisi

Hofmann tepkimesine, sürenin etkisi Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, tepkime süresi arttıkça üretilen maltoz miktarı da artmaktadır. Üretilen maltoz miktarı 30 dakikada maksimum seviyeye ulaşmıştır. Bu süreden sonra maltoz miktarında çok fazla değişiklik görülmemiştir. Belirlenen bu şartlarda enzim immobilizasyonu için destek materyaller hazırlanmıştır.

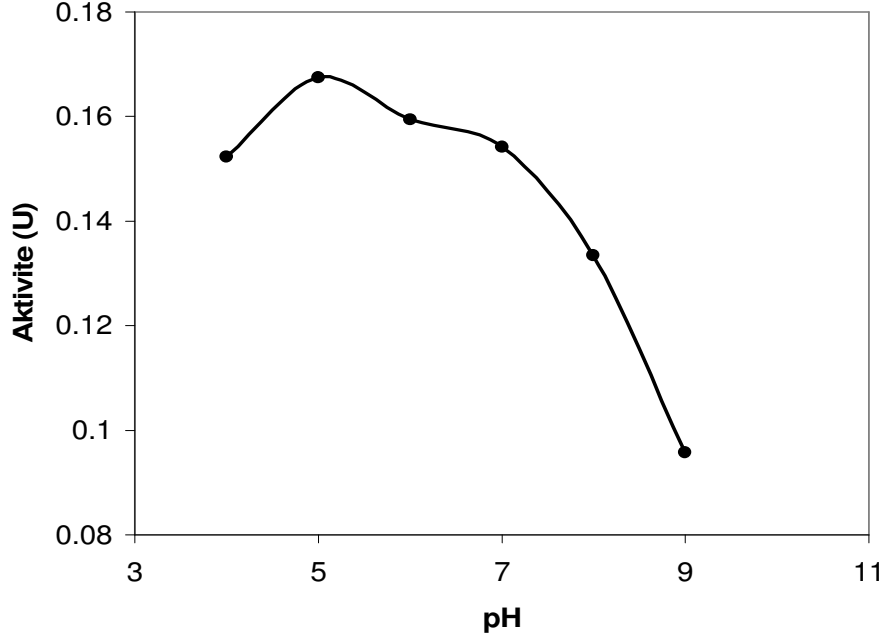


Şekil 3.7. Sürenin Hofmann dönüşüm tepkimesi üzerine etkisi

3.3. Enzim İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu

3.3.1. Enzim immobilizasyonuna pH'nın etkisi

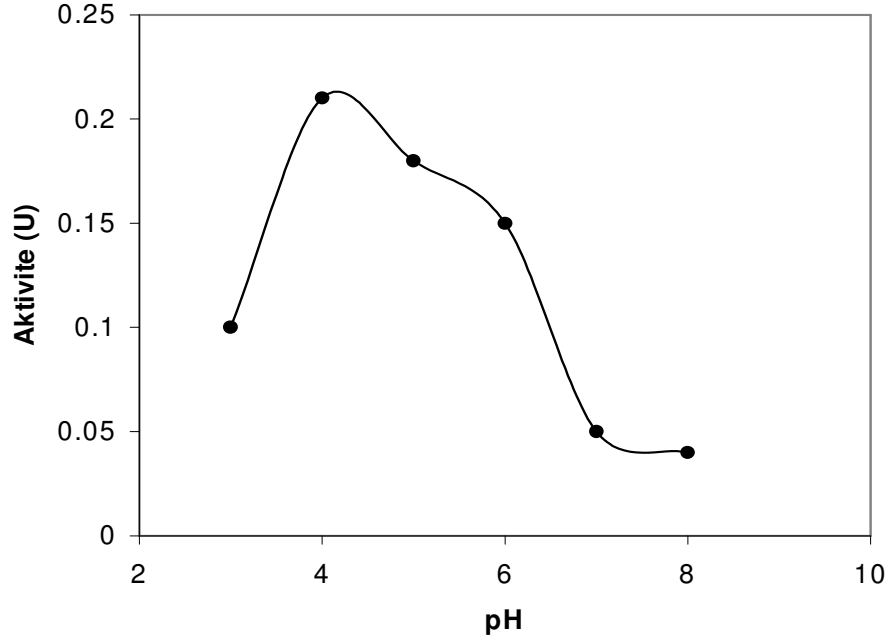
α -Amilaz enziminin immobilizasyonuna pH'nın etkisi Şekil 3.8'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, α -amilaz enziminin aktivitesi immobilizasyon ortamının pH değerine bağlı olarak değişmiştir. En yüksek aktivite pH 5 değerinde elde edilmiştir.



Şekil 3.8. α -Amilaz immobilizasyonuna pH'nın etkisi

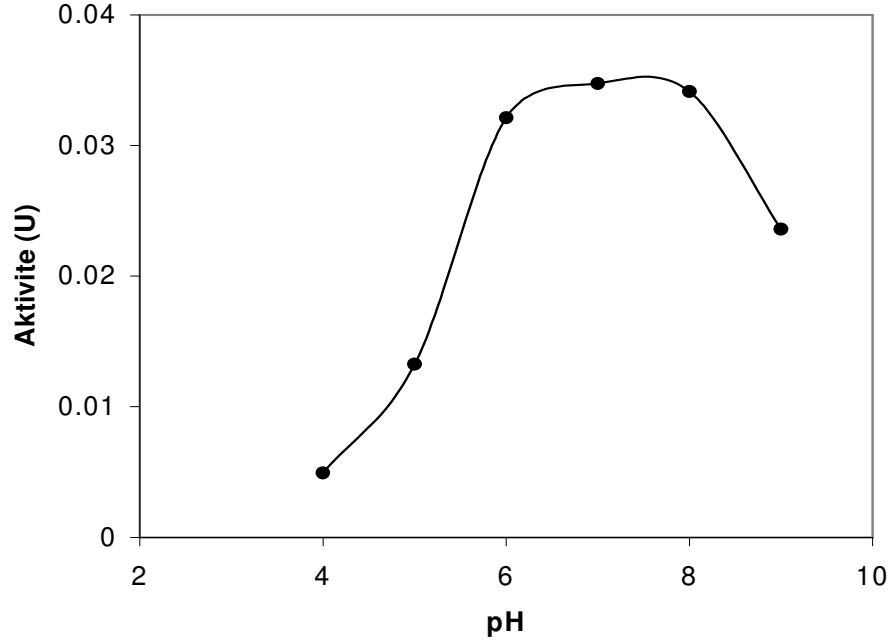
Lipaz enziminin immobilizasyonuna pH'nın etkisi Şekil 3.9'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, lipaz enziminin aktivitesi immobilizasyon ortamının pH değerine bağlı olarak değişmiştir. En yüksek aktivite pH 4 değerinde elde edilmiştir.

Peroksidaz enziminin immobilizasyonuna pH'nın etkisi Şekil 3.10'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, enzim aktivitesi immobilizasyon ortamının pH değerine bağlı olarak değişmiştir. En yüksek aktivite pH 7 değerinde elde edilmiştir.



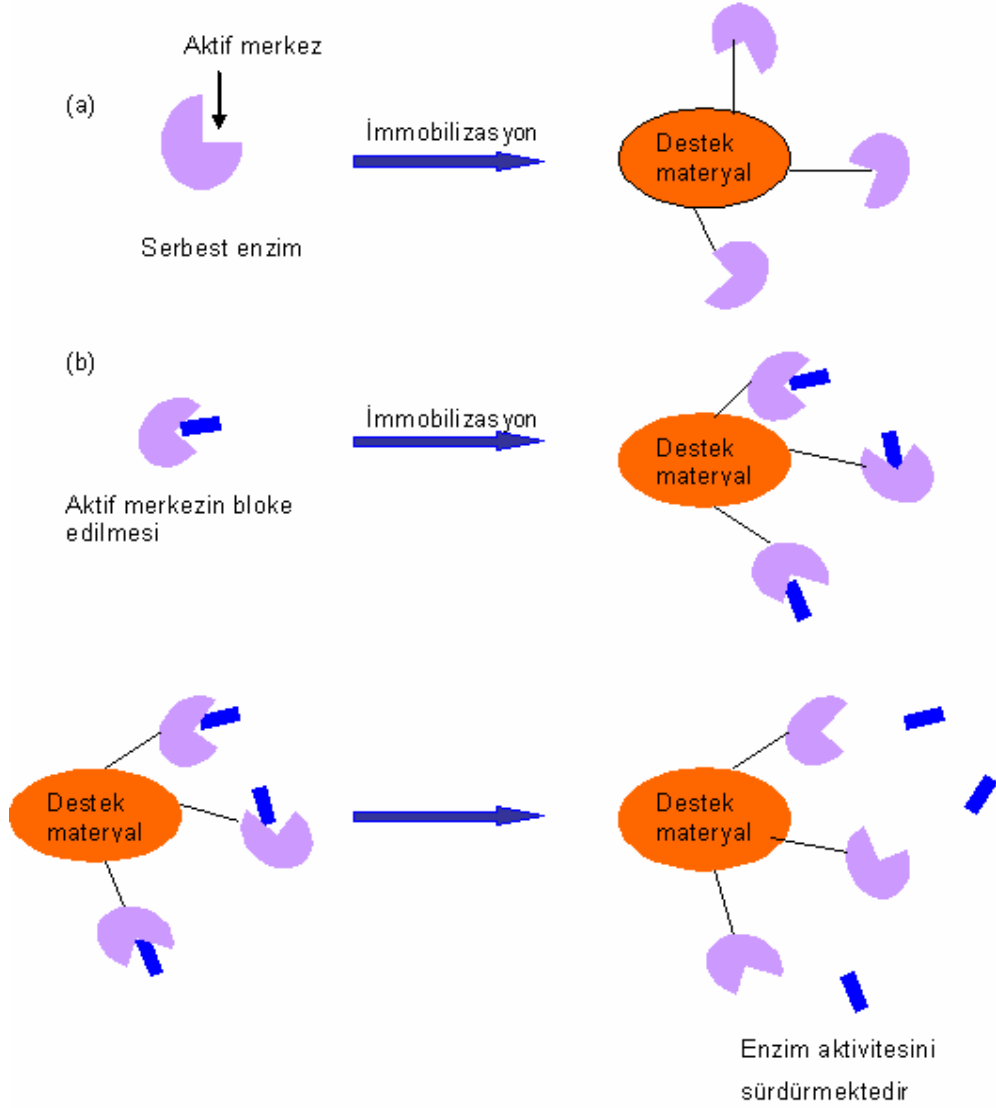
Şekil 3.9. Lipaz immobilizasyonuna pH'nın etkisi

Lee ve arkadaşları⁽⁵⁸⁾ lipaz enzimini silika jel üzerine kovalent bağlanma yolu ile immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon işleminden önce enzimi substrat ile etkileştirdiklerinde immobilize enzimin aktivitesinde artış meydana geldiğini açıklamışlardır. Enzimin aktif merkezinin substrat ile bloke edilmesi nedeni ile enzimin destek materyale bağlanma noktasının aktif merkezden uzak bölgeler üzerinden gerçekleştiğini bunun sonucu olarak aktivitede artış meydana geldiğini belirtmişlerdir.



Şekil 3.10. Peroksidaz immobilizasyonuna pH'nın etkisi

Enzim aktiviteleri immobilizasyon ortamının pH değerine bağlı olarak değişmiştir. Enzim molekülü üzerinde kovalent bağın olduğu nokta immobilizasyon çözeltisinin pH değerine bağlı olabilir. Her üç enzim için de immobilizasyon yöntemi aynı olduğu halde, maksimum enzim aktivitesi immobilizasyon ortamının farklı pH değerlerinde elde edilmiştir. Maksimum aktivitenin elde edildiği pH değerlerinde enzimin aktif merkezinin maskelendiği ve bu bölge üzerinden kovalent bağlanmanın gerçekleşmediği düşünülebilir. Yani modifiye edilmiş PET lif üzerindeki aldehit gruplarının enzimin aktif merkezinden uzak bölgelerdeki amin grupları ile tepkimeye girdiği varsayılabilir. Enzimin destek materyale bağlanma noktasını temsil eden şematik gösterim Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11. Enzim immobilizasyonunda bağlanma noktasının şematik modeli⁽⁵⁸⁾

a) Aktif merkeze yakın bölgelerdeki amin gruplarının kovalent bağlanmaya katılmasından dolayı enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir.

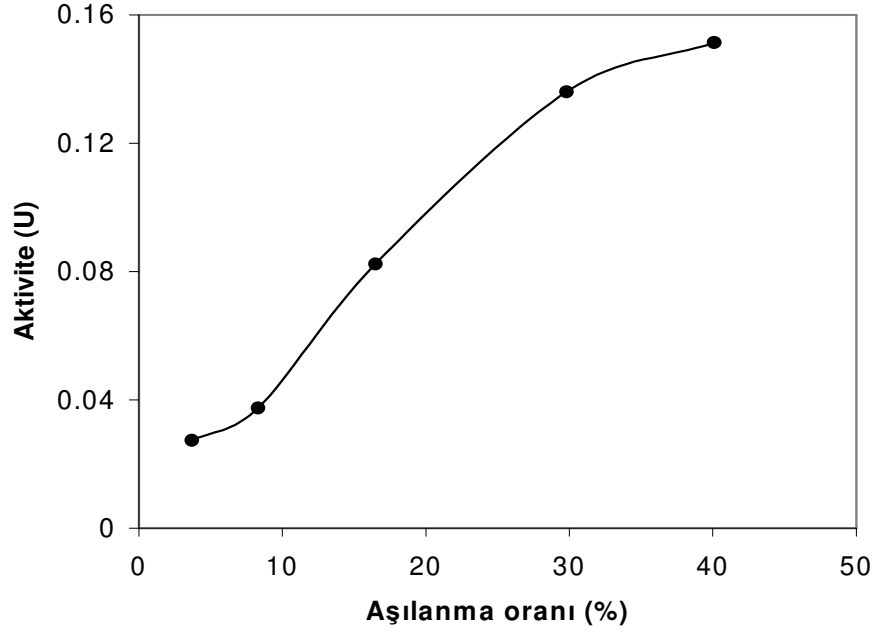
b) İmmobilizasyon çözeltisinin pH değerine bağlı olarak, enzim üzerindeki kovalent bağın oluşumu enzimin aktif merkezine uzak noktalardan gerçekleşmektedir. Dolayısı ile immobilizasyon esnasında enzim aktivitesini koruyabilmiştir.

3.3.2. Enzim immobilizasyonuna aşılama yüzdesinin etkisi

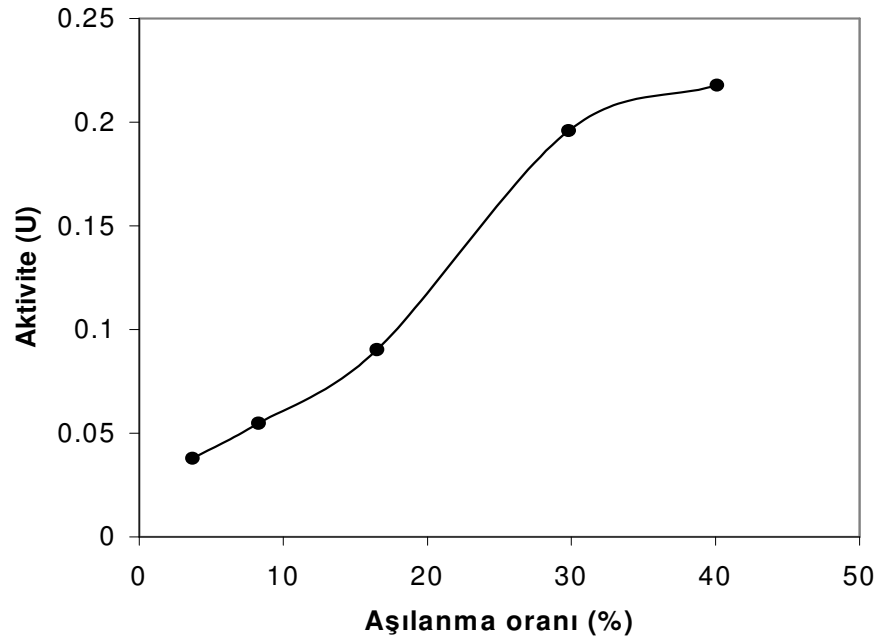
α -Amilaz, lipaz ve peroksidaz enzimlerinin aktivitelerine akrilamidin PET lif üzerine aşılama yüzdesinin etkisi sırası ile Şekil 3.12, 3.13 ve 3.14'de verilmiştir. Şekillerde görüldüğü gibi, akrilamidin PET lif üzerine aşılama yüzdesi arttıkça her üç enzimin aktivitesinin de arttığı saptanmıştır.

İmmobilize olan enzim miktarı destek materyal üzerinde bulunan fonksiyonel grup sayısı ile orantılıdır. PET lif yüzeyinde amit gruplarının artışı aynı zamanda PET lif yüzeyinde Hofmann tepkimesi ile elde edilen amin gruplarının artışı anlamına gelmektedir. Bu nedenle fonksiyonel grup sayısına bağlı olarak enzim aktivitesinde artma gözlenmiştir. Enzim aktivitesindeki artış %29,8 aşılama değerine kadar yüksek oranda gerçekleşmiştir. Bu aşılama yüzdesinden sonra ise enzim aktivitesindeki artış oranı daha düşük seviyede gerçekleşmiştir.

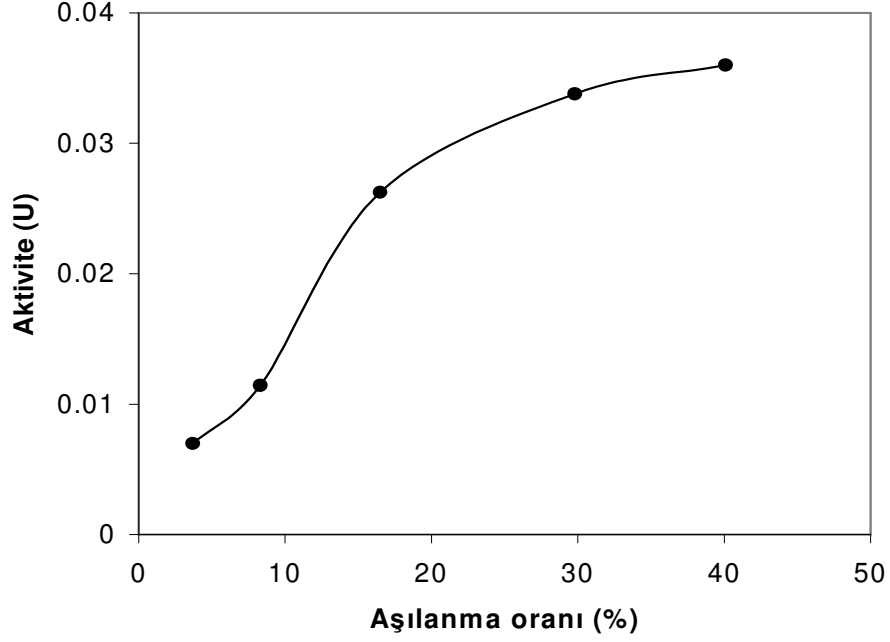
Shukla ve Devi⁽⁵⁹⁾ peroksidaz enzimini akrilamid-2-hidroksi etil metakrilat kopolimeri üzerine immobilize etmişlerdir. Enzim aktivitesinin kopolimerdeki akrilamid oranına bağlı olarak değiştiğini ve aktivitenin %50 akrilamid oranına kadar arttığını, bu değerden sonra aktivitede azalma gözlendiğini bildirmişlerdir.



Şekil 3.12. α -Amilaz immobilizasyonuna aşılama oranının etkisi



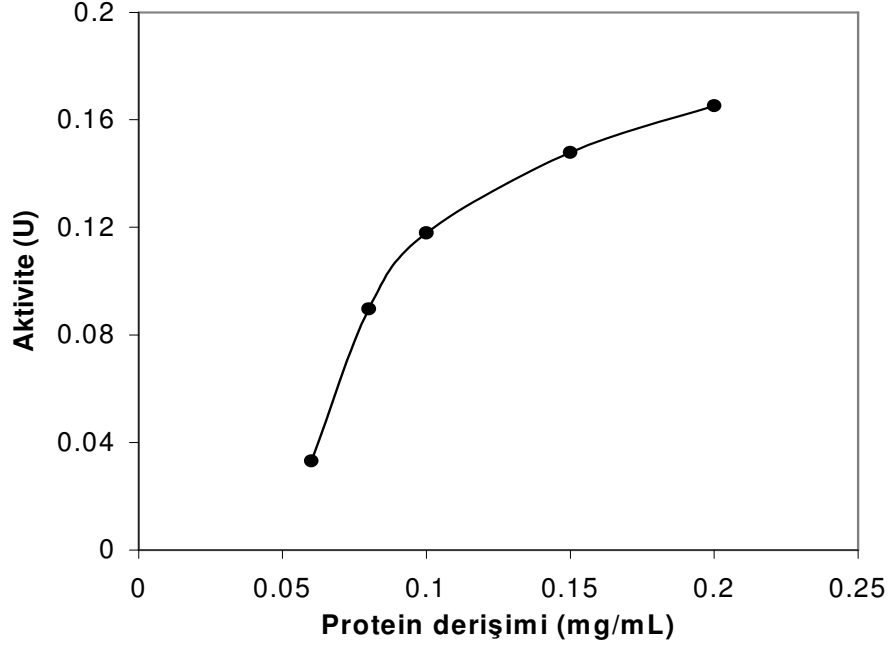
Şekil 3.13. Lipaz immobilizasyonuna aşılama oranının etkisi



Şekil 3.14. Peroksidaz immobilizasyonuna aşılama oranının etkisi

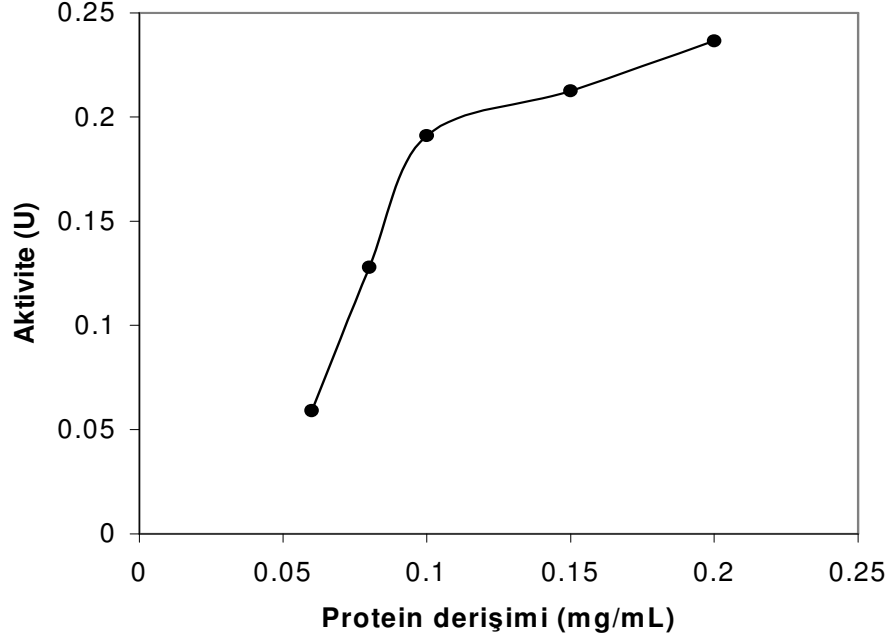
3.3.3. Enzim immobilizasyonuna protein derişiminin etkisi

α -Amilaz enziminin aktivitesine immobilizasyon ortamında bulunan protein derişiminin etkisi Şekil 3.15’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilizasyon ortamında protein derişimi arttıkça immobilize α -amilaz enziminin aktivitesi de artmaktadır. Protein derişiminin değerleri 0,06–0,1 mg/mL olduğunda, enzim aktivitesindeki artış yüksek oranda gerçekleşmiştir. Protein derişiminin 0,1 mg/mL’nin üzerinde olduğu değerlerde aktivitedeki artış oranında bir miktar azalma görülmektedir.



Şekil 3.15. α -Amilaz immobilizasyonuna protein derişiminin etkisi

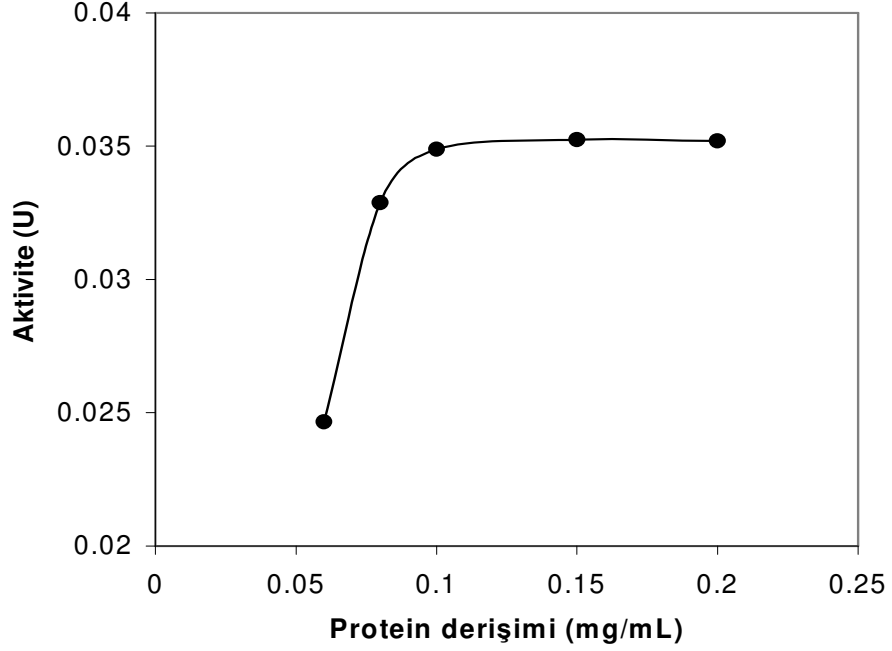
Lipaz enziminin aktivitesine immobilizasyon ortamında bulunan protein derişiminin etkisi Şekil 3.16'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilizasyon ortamında protein derişimi arttıkça immobilize lipaz enziminin aktivitesi de artmaktadır. Protein derişiminin değerleri 0,06–0,1 mg/mL olduğunda enzim aktivitesindeki artış yüksek oranda gerçekleşmiştir. Protein derişiminin 0,1 mg/mL'nin üzerinde olduğu değerlerde aktivitedeki artış oranında bir miktar azalma görülmektedir.



Şekil 3.16. Lipaz immobilizasyonuna protein derişiminin etkisi

Peroksidaz enziminin aktivitesine immobilizasyon ortamında bulunan protein derişiminin etkisi Şekil 3.17’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, enzim aktivitesi 0,1 mg/mL protein derişimine kadar artmıştır. Bu değerin üzerinde aktivitede herhangi bir değişim görülmemiştir.

Polianilin nano fiber üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu ile ilgili yapılan çalışmada, enzim aktivitesine immobilizasyon ortamındaki enzim derişiminin etkisi incelenmiştir. Enzim aktivitesinin 10 mg/mL enzim derişimine kadar arttığı ve bu değerin ötesinde aktivitede değişim gözlenmediği belirtilmiştir⁽⁶⁰⁾.



Şekil 3.17. Peroksidaz immobilizasyonuna protein derişiminin etkisi

3.4. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

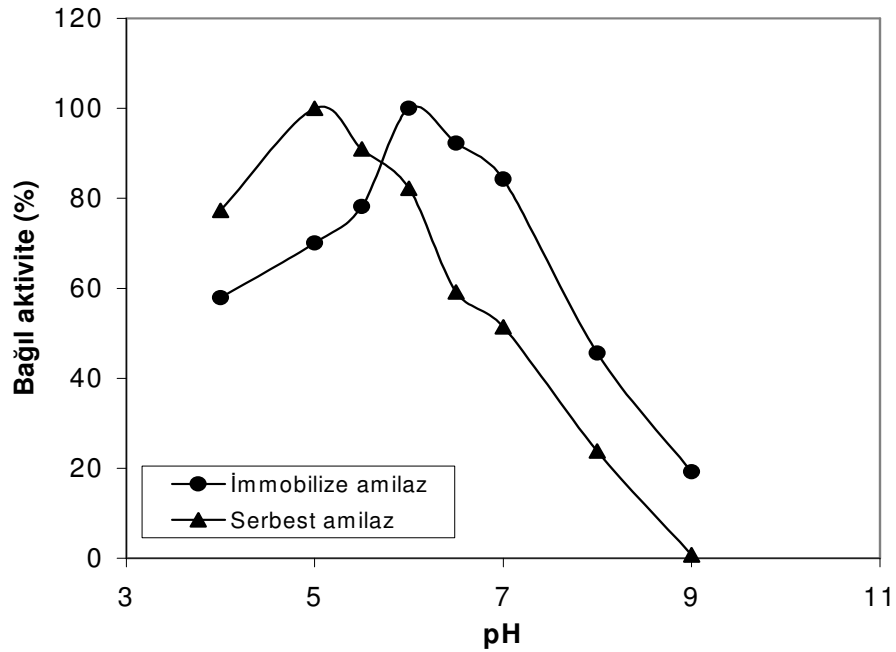
3.4.1. Enzim aktivitesine pH'nın etkisi

İmmobilize ve serbest α -amilaz enzimlerinin aktivitelerinin değişimi, çözelti pH'sına bağlı olarak incelenmiştir. İmmobilize ve serbest α -amilaz enzimlerinin bağlı aktivitesine pH'nın etkisi Şekil 3.18'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, serbest α -amilaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 5 olduğu halde immobilize α -amilaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 6 olarak belirlenmiştir. İmmobilize α -

amilaz enzimi nötral ve bazik pH değerlerinde serbest enzime göre daha yüksek bağıl aktivite sergilemiştir.

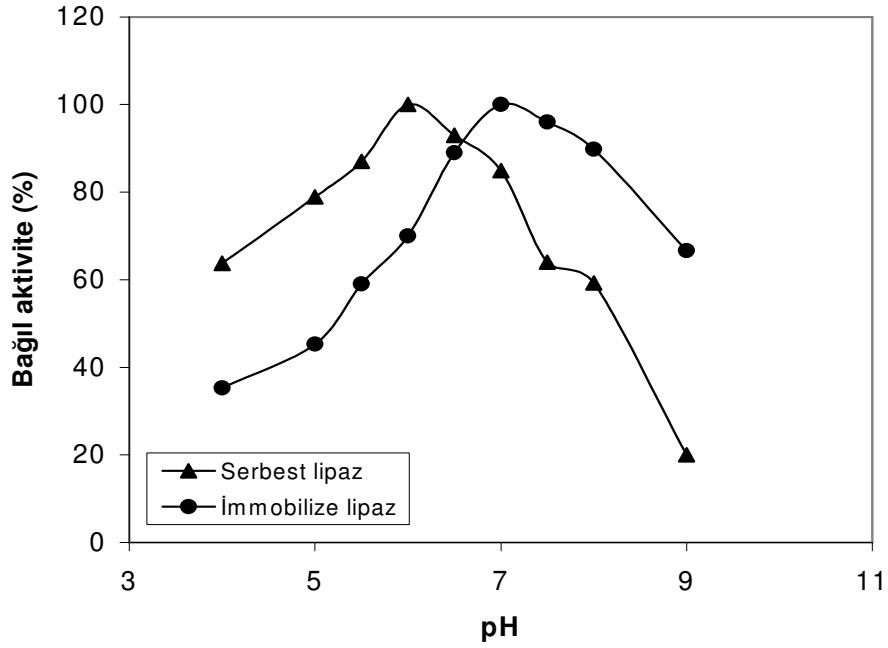
Reshmi ve arkadaşları⁽⁶²⁾, α -amilaz enzimini zirkonyum oksit üzerine immobilize etmişlerdir. Serbest enzimin pH 5 değerinde maksimum aktivite gösterdiğini buna karşılık immobilize enzimin ise pH 6 değerinde maksimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Park ve arkadaşları⁽⁶³⁾, α -amilaz enzimini modifiye edilmiş silika jel üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon işleminin enzimin pH profilinde değişim meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize edilmiş enzimin maksimum aktivite gösterdikleri pH değerlerinin sırası ile 5 ve 5,5 olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 3.18. α -Amilaz enziminin aktivitesine pH'nın etkisi

İmmobilize ve serbest lipaz enzimlerinin aktivitelerinin değişimi, çözelti pH'sına bağlı olarak incelenmiştir. İmmobilize ve serbest lipaz enzimlerinin bağlı aktivitesine pH'nın etkisi Şekil 3.19'da gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, serbest lipaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 6 olduğu halde, immobilize lipaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7 olarak belirlenmiştir. İmmobilize lipaz enzimi nötral ve bazik pH değerlerinde serbest enzime göre daha yüksek bağlı aktivite sergilemiştir.



Şekil 3.19. Lipaz enziminin aktivitesine pH'nın etkisi

Kim ve arkadaşları⁽⁶⁴⁾, silika nano partikülleri üzerine lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon ile enzimin optimum pH değerinin

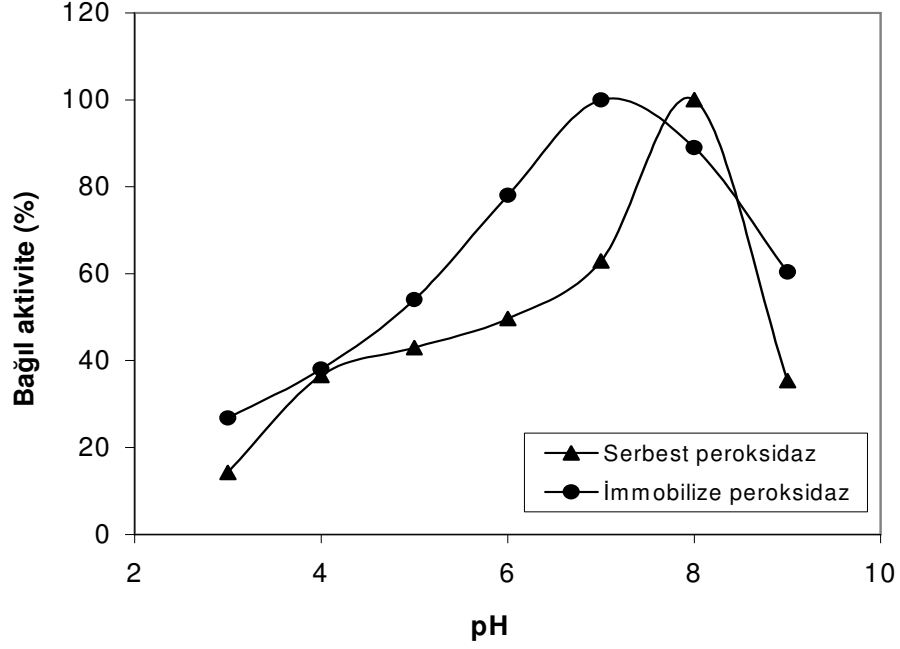
8'den 9 değerine artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca bazık bölgede immobilize enzimin serbest enzime göre daha kararlı olduğunu bulmuşlardır.

Lipaz enziminin manyetik mikro kürelere immobilize edildiği çalışmada, immobilizasyonun enzimin pH profilinde değişim meydana getirdiği belirtilmiştir. Serbest enzim pH 6,7 değerinde maksimum aktivite gösterirken, immobilize enzimin pH 7,7 değerinde maksimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir⁽⁶⁵⁾.

İmmobilize ve serbest peroksidaz enzimlerinin aktivitelerinin değişimi, ozelti pH'sına bağlı olarak incelenmiştir. İmmobilize ve serbest peroksidaz enzimlerinin bağlı aktivitesine pH'nın etkisi şekil 3.20'de verilmiştir. şekilde görüldüğü gibi, serbest peroksidaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 8 olduğu halde, immobilize peroksidaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7 olarak belirlenmiştir. İmmobilize peroksidaz enzimi geniş bir pH aralığında serbest peroksidaz enzimine göre daha yüksek bağlı aktivite sergilemiştir.

Shukla ve Devi⁽⁵⁹⁾, peroksidaz enzimini akrilamit-2-hidroksi etil metakrilat kopolimeri üzerine immobilize etmişlerdir. Serbest enzimin pH 8 değerinde maksimum aktivite gösterdiğini, immobilize enzimin ise maksimum aktivite gösterdiği pH değerinin 7 olduğunu belirtmişlerdir.

Peroksidaz enziminin polianilin üzerine immobilize edildiği çalışmada, serbest ve immobilize sistemlerin maksimum aktivtelerinin farklı pH değerlerinde elde edildiği belirtilmiştir. İmmobilize enzim pH 6 değerinde maksimum aktivite gösterirken serbest enzim pH 8 değerinde maksimum aktivite göstermiştir⁽⁶⁶⁾.



Şekil 3.20. Peroksidaz enziminin aktivitesine pH'nın etkisi

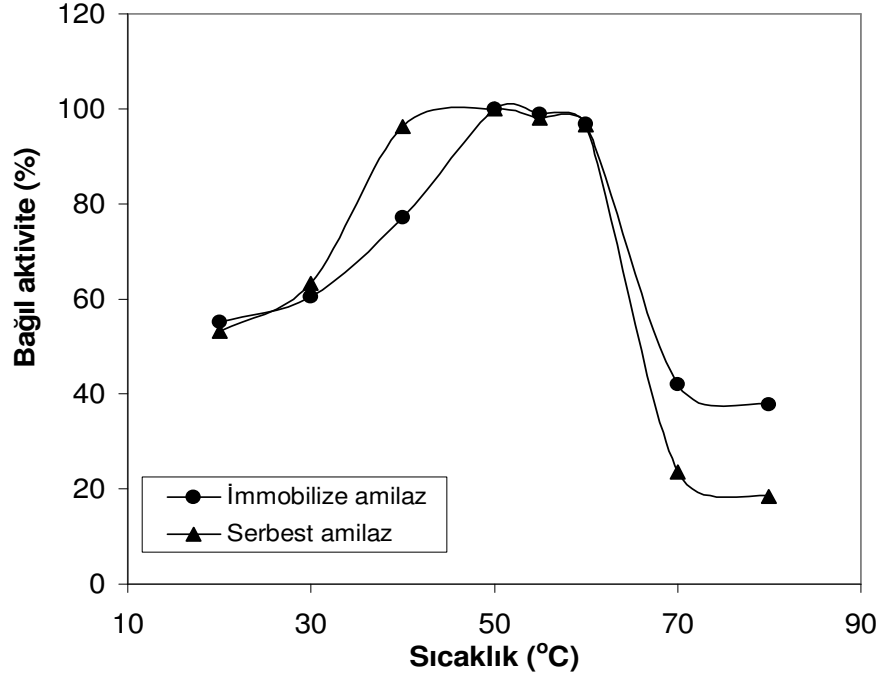
Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyale bağlı olarak, immobilize enzimlerin optimum pH değerlerinde serbest enzimlere göre değişim meydana gelmektedir. Çünkü enzim aktivitesi çevresel şartlardan önemli ölçüde etkilenmektedir⁽⁶⁷⁾. AAm-g-PET lif üzerine immobilize edilen α -amilaz, lipaz ve peroksidaz enzimlerinin pH davranışlarında değişim meydana gelmiştir. İmmobilize ve serbest enzimlerin maksimum aktivitelerinin farklı pH değerlerinde gözlenmesi, immobilize sistemlerde hidrojen iyonlarının destek materyalin mikro çevresi ile çözelti içerisindeki dağılımlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır⁽⁶⁸⁾.

3.4.2. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

İmmobilize ve serbest α -amilaz enzimlerinin aktiviteleri sıcaklığa bağılı olarak incelenmiştir. İmmobilize ve serbest α -amilaz enzimlerinin bağılı aktivitelerinin sıcaklığa bağılı olarak değişimi Şekil 3.21'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilize ve serbest α -amilaz enzimlerinin bağılı aktiviteleri 50°C'ye kadar artmıştır. Maksimum enzim aktivitesi immobilize ve serbest sistem için bu sıcaklıkta elde edilmiştir. Bu sıcaklıktan sonra her iki sistemin bağılı aktivitelerinde termal inaktivasyondan dolayı azalma gözlenmiştir. İmmobilize α -amilaz 70°C ve 80°C sıcaklıklarda serbest α -amilaz enzime göre daha yüksek bağılı aktivite sergilemiştir. İmmobilize α -amilaz enzimi 80°C'de maksimum aktivitenin %38'ini korurken, serbest α -amilaz bu sıcaklık değerinde maksimum aktivitenin %18'ini korumuştur.

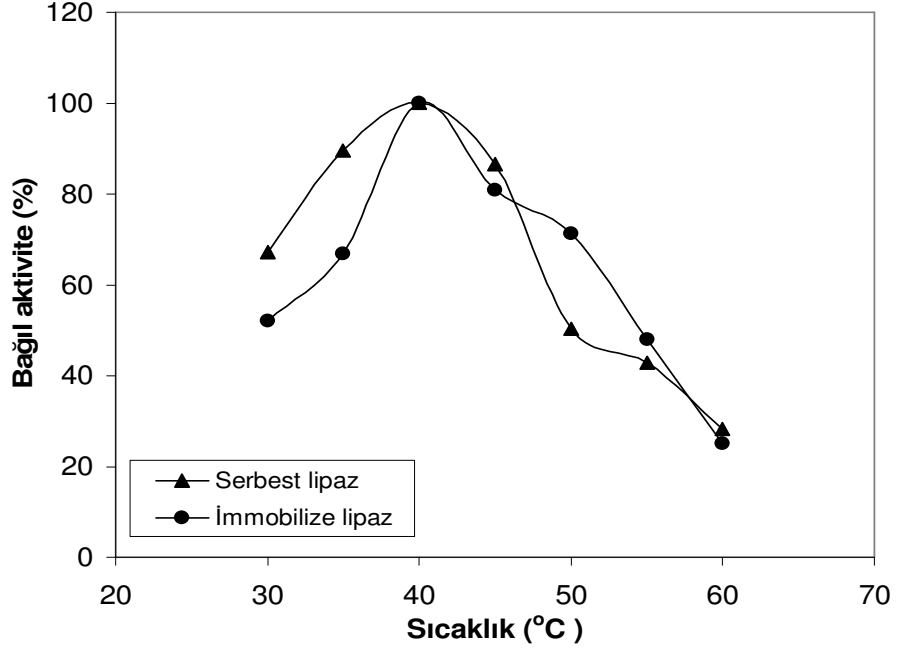
Qiu ve arkadaşları⁽⁶⁸⁾, amilaz enzimini Fe₃O₄/Poli(stiren-co-maleik anhidrit) destek üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın, serbest enzime göre 30°C artış göstererek 80°C'ye yükseldiğini belirtmişlerdir.

α -amilaz enziminin Amberlite MB 150 destek üzerine immobilize edildiği çalışmada, immobilize enzimin 75°C'de maksimum aktivite gösterdiği bunun yanında serbest enzimin ise 65°C'de maksimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir⁽⁶⁹⁾.



Şekil 3.21. α -Amilaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi

İmmobilize ve serbest lipaz enzimlerinin aktiviteleri sıcaklığa bağlı olarak incelenmiştir. İmmobilize ve serbest lipaz enzimlerinin aktivitelerinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi Şekil 3.22’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilize ve serbest lipaz enzimlerinin aktiviteleri 40°C’ye kadar artmıştır. Bu sıcaklıktan sonraki değerlerde immobilize ve serbest enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Maksimum enzim aktivitesi immobilize ve serbest sistem için 40°C’de elde edilmiştir.



Şekil 3.22. Lipaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi

Harun ve arkadaşları⁽⁷⁰⁾, lipaz enzimini poli(N-vinil-2-pirolidon-co-stiren) hidrojeline immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin 40°C'de maksimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Lipaz enziminin nano boyutlu magnetit partiküller üzerine immobilize edildiği çalışmada, serbest ve immobilize lipaz enziminin aktivitelerinin 40°C'ye kadar arttığı ve daha yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir⁽⁶⁵⁾.

Yi ve arkadaşları⁽⁷¹⁾, aminoasit ile modifiye edilmiş kitosan küreler üzerine lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. Enzimin her iki formunda 50°C'de maksimum aktivite gösterdiğini ayrıca immobilize enzimin daha

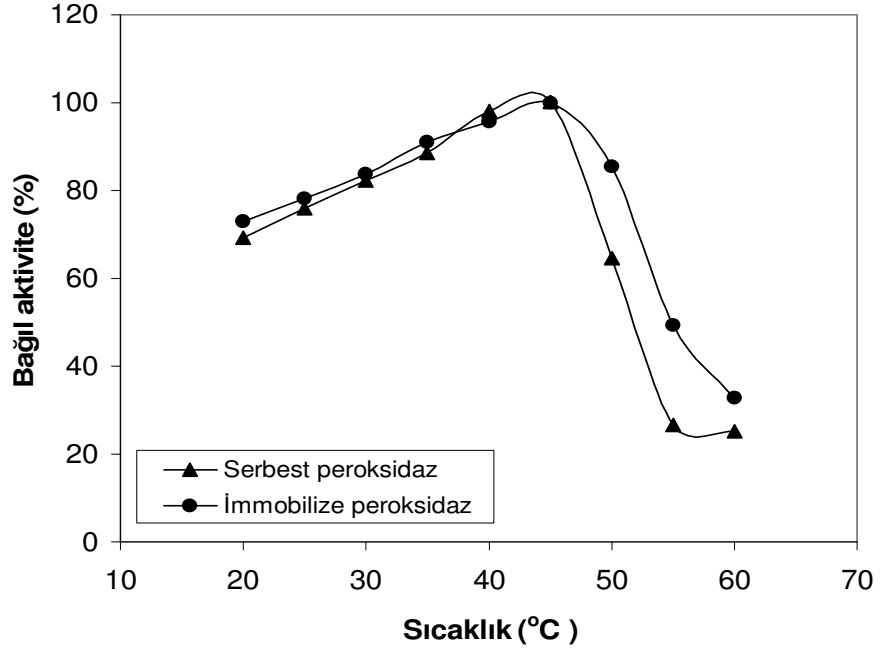
yüksek sıcaklıklarda serbest enzime göre daha kararlı olduğunu belirtmişlerdir.

İmmobilize ve serbest peroksidaz enzimlerinin aktiviteleri sıcaklığa bağlı olarak incelenmiştir. İmmobilize ve serbest peroksidaz enzimlerinin aktivitelerinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi Şekil 3.23'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilize ve serbest peroksidaz enzimlerinin aktiviteleri 45°C sıcaklığa kadar artmıştır. Maksimum enzim aktivitesi immobilize ve serbest sistem için 45°C sıcaklıkta elde edilmiştir. İmmobilize ve serbest peroksidaz enzimlerinin 45°C'ye kadar olan bağlı aktiviteleri için benzer bir görüntü elde edilmiştir. Daha yüksek sıcaklık değerlerinde ise immobilize peroksidaz enziminin bağlı aktivitesinin serbest enzime göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Caramori ve Fernandes⁽⁷²⁾, peroksidaz enzimini poli(etilen tereftalat)-poli(anilin) kompozit üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinde serbest enzime göre azalma olduğunu belirtmişlerdir.

Enzimlerin katalitik aktiviteleri konformasyonları ile ilgilidir. Genel olarak kimyasal katalizörlerde olduğu gibi enzim aktivitesi sıcaklık artışı ile artar. Serbest enzimler yüksek sıcaklıklarda kararsızdırlar, çünkü sıcaklık artışı ile birlikte enzimlerin katalitik aktivitesinin bağlı olduğu konformasyonlarda bozulmalar meydana gelir. Enzim molekülleri için, immobilizasyon daha sert bir yapı sağlar böylece yüksek sıcaklıkların enzimin konformasyonunun bozulmasına olan etkisi azalır. Bu konformasyon

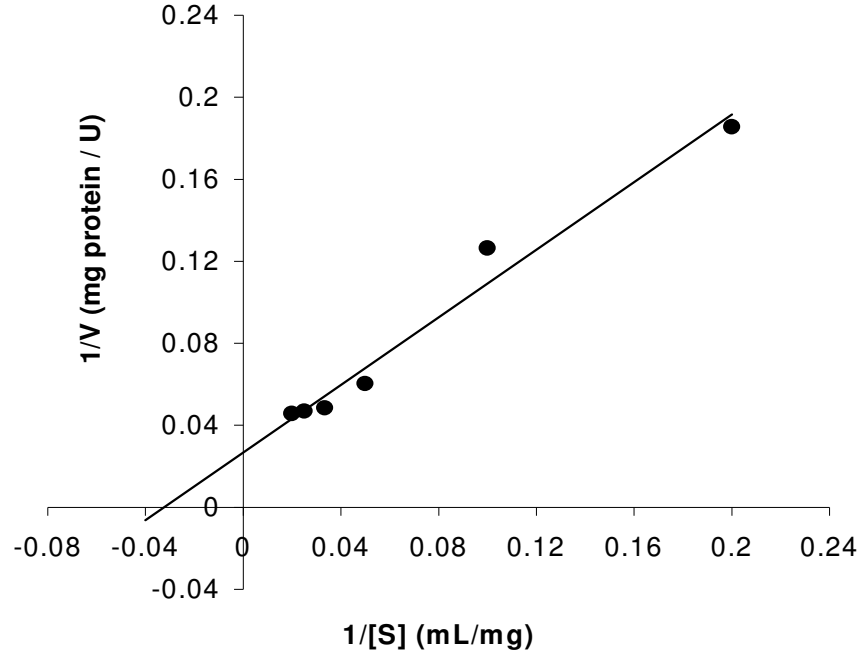
kararlılığı bazen immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre daha yüksek sıcaklıklarda maksimum aktivite göstermelerini sağlayabilir⁽⁷³⁾.



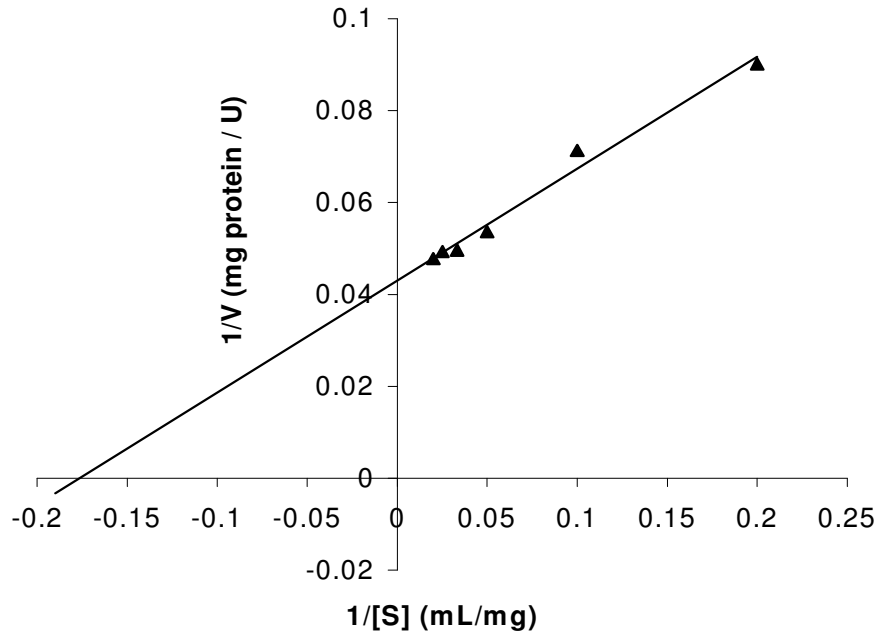
Şekil 3.23. Peroksidaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi

3.4.3. Enzim aktivitesine substrat derişiminin etkisi

α -Amilaz enziminin aktivitesi farklı derişime sahip nişasta çözeltileri ile belirlenmiştir. İmmobilize ve serbest α -amilaz enzimlerinin Lineweaver-Burk grafikleri sırası ile Şekil 3.24 ve Şekil 3.25'de verilmiştir. Grafikten faydalanarak immobilize ve serbest α -amilaz enzimlerine ait kinetik parametreler hesaplanmıştır. İmmobilize ve serbest α -amilaz enzimlerine ait K_m ve V_{mak} değerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.24. İmmobilize α -amilaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.25. Serbest α -amilaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.1. α -Amilaz enziminin kinetik parametreleri

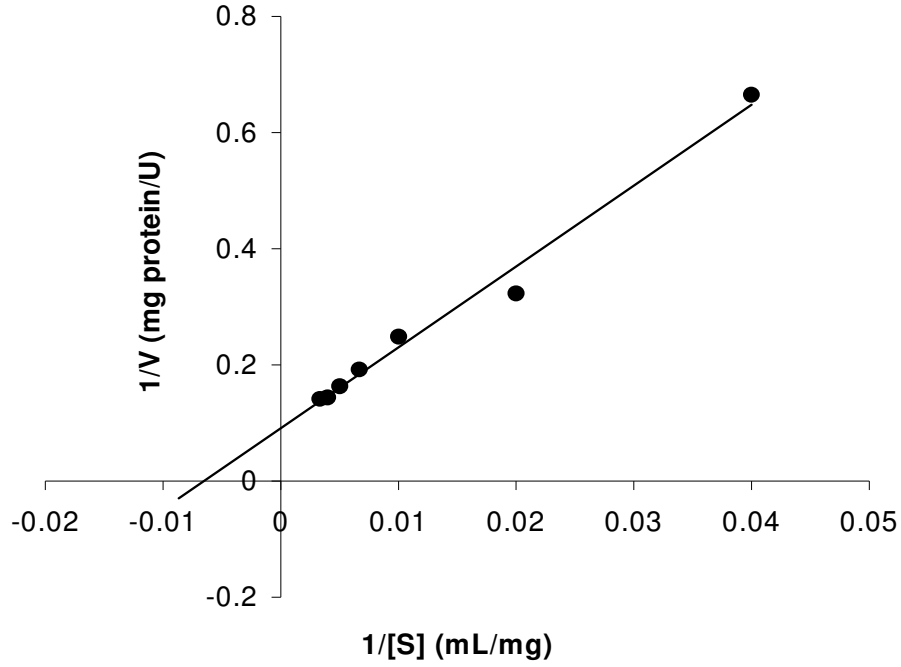
	V_{mak} (U/mg protein)	K_m (mg/mL)	R^2
Serbest α -amilaz	23,3	5,6	0,984
İmmobilize α -amilaz	37,3	30,7	0,974

Chang ve Juang⁽⁷⁴⁾, α -amilaz enzimini kitosan-kil kompozit üzerine immobilize etmişlerdir. Serbest enzim ile immobilize enzimin V_{mak} değerlerinde yüksek oranda bir değişim olmadığını immobilize enzimin K_m değerinin serbest enzime göre yaklaşık iki kat arttığını belirtmişlerdir.

α -amilaz enziminin çapraz bağlı selüloz destek üzerine immobilize edildiği çalışmada, immobilize enzimin V_{mak} değerinde serbest enzime göre azalma gözlenmiştir. Immobilize enzimin K_m değerinin ise serbest enzime göre 4,5 kat arttığı bildirilmiştir⁽⁷⁵⁾.

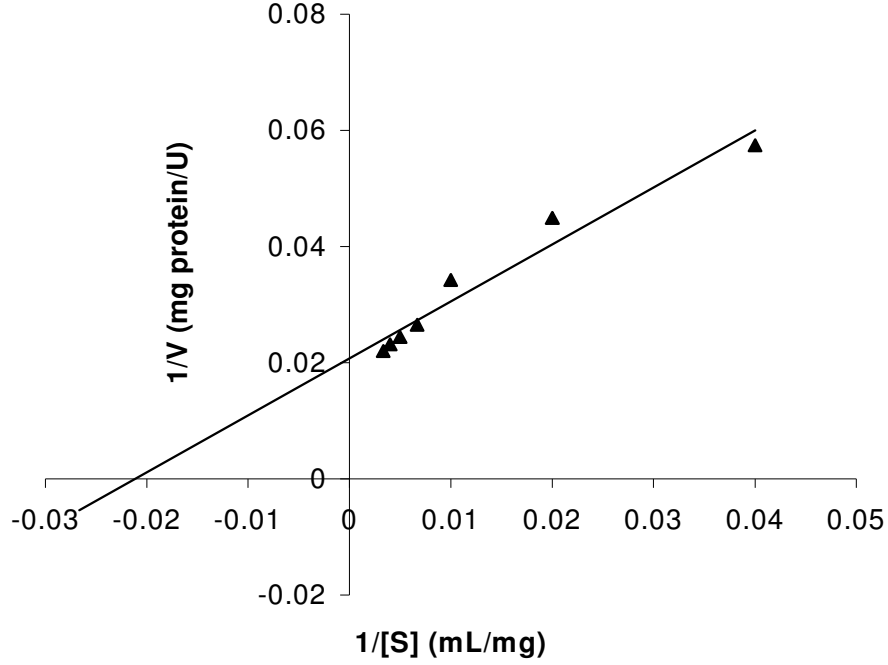
Lipaz enziminin aktivitesi farklı derişime sahip zeytinyağı çözeltileri ile belirlenmiştir. Immobilize ve serbest lipaz enzimlerinin Lineweaver-Burk grafikleri sırası ile Şekil 3.26 ve Şekil 3.27'de verilmiştir. Grafikten faydalanılarak immobilize ve serbest lipaz enzimlerine ait kinetik parametreler hesaplanmıştır. Immobilize ve serbest lipaz enzimlerine ait K_m ve V_{mak} değerleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Immobilize edilmiş lipaz enziminin V_{mak} değerinde azalma gözlenmiştir. Immobilizasyon enzimin K_m değerinin artmasına neden olmuştur. K_m değerindeki artış, konformasyonel değişim sonucu enzim-substrat kompleksinin oluşma ihtimalinin azalmasından ya da

substratın immobilize enzimin aktif merkezine taşınmasının sınırlanmasından kaynaklanmıştır⁽⁷⁶⁾.



Şekil 3.26. Immobilize lipaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

Ye ve arkadaşları⁽⁷⁶⁾, poli(akrilonitril-co-maleik asit) membran üzerine lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin V_{mak} değerinde serbest enzime göre azalma olduğunu belirtmişlerdir. Serbest enzimin V_{mak} değerinin 46,4 U/mg olarak elde edildiğini buna karşı immobilize enzimim V_{mak} değerinin 23,3 U/mg olduğunu bildirmişlerdir. Serbest enzimin K_m değeri 0,45 mM iken immobilize enzimin K_m değerinin 1,05 mM olarak hesaplandığını belirtmişlerdir.



Şekil 3.27. Serbest lipaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.2. Lipaz enziminin kinetik parametreleri

	V_{mak} (U/mg protein)	K_m (mg/mL)	R^2
Serbest lipaz	48,1	47,2	0,954
İmmobilize lipaz	10,9	151,6	0,986

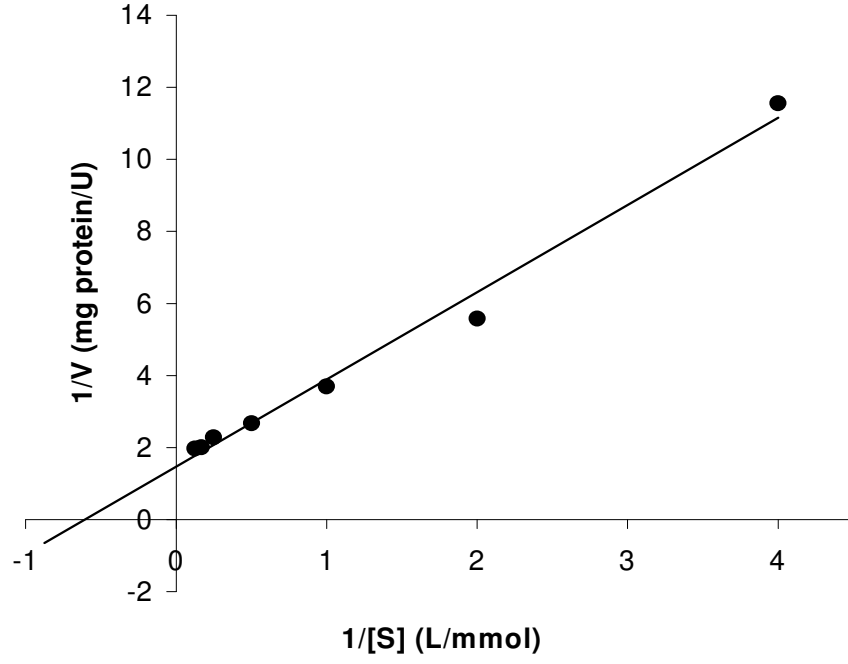
Lipaz enziminin palygorskite destek üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiği çalışmada, enzim immobilizasyonunun kinetik parametrelerde değişme meydana getirdiği belirtilmiştir. Serbest lipaz enziminin K_m değerinin 0,0053 mg/mL, immobilize lipaz enziminin K_m değerinin 0,0117 mg/mL, serbest enzimin V_{mak} değerinin 7,6 $\mu\text{mol}/(\text{mg dak})$,

immobilize enzimin V_{mak} değerinin 4,51 $\mu\text{mol}/(\text{mg dak})$ olarak hesaplandığı bildirilmiştir⁽⁷⁷⁾.

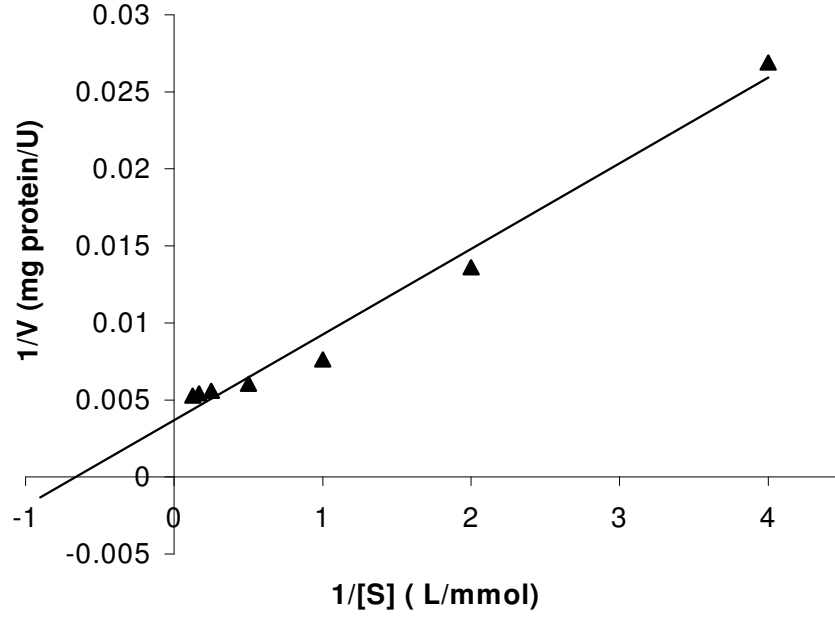
Chiou ve Wu⁽⁷⁸⁾, lipaz enzimini ıslak ve kuru kitosan küreler üzerine immobilize etmişlerdir. Serbest enzimin, ıslak ve kuru kürelere immobilize edilmiş enzimin V_{mak} değerlerinin sırasıyla 3,98 U, 117,23 U ve 1,79 U olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin immobilize edilmesi ile K_m değerlerinde artış gözlemişlerdir.

Peroksidaz enziminin aktivitesi farklı derişime sahip pirogallol czelteleri ile belirlenmiştir. İmmobilize ve serbest peroksidaz enzimlerinin Lineweaver-Burk grafikleri sırası ile Şekil 3.28 ve Şekil 3.29'da verilmiştir. Grafikten faydalanılarak immobilize ve serbest peroksidaz enzimlerine ait kinetik parametreler hesaplanmıştır. İmmobilize ve serbest peroksidaz enzimlerine ait K_m ve V_{mak} değerleri Çizelge 3.3'de verilmiştir. İmmobilize peroksidaz enziminin K_m değerinde serbest peroksidaz enziminin K_m değerine göre cok az bir artış gözlenmiştir. Bu sonuç göstermektedir ki, immobilizasyon yöntemi ve destek materyal herhangi bir Şekilde enzimin substrat olarak pirogallole olan özgüllüğünü etkilememiştir. Serbest enzimin V_{mak} değeri immobilize enzimin V_{mak} değerine göre oldukça yüksek bir değerde elde edilmiştir. Aynı substrat derişiminde ürünün elde edilme hızı serbest ve immobilize peroksidaz enzimleri için farklı olmuştur. Bu fark oluşan ürünün aşılanmış PET lif yüzeyine adsorplanmasından kaynaklanmıştır. Ürünün destek materyal yüzeyinde tutulması czelti ortamına transfer olmasını gcleştirmiş ve oluşan ürünün gerçek miktarının belirlenmesinde sorun oluşturmuştur. Ürünün lif yüzeyine adsorplanmasını gösteren fotoğraflar Şekil 3.30'da

verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, ürünün lif yüzeyine adsorplanmasına bağlı olarak lif üzerindeki renk yoğunluğunda artma meydana gelmiştir. Bu gözlem peroksidaz enzimini immobilize eden diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir^(66,72,79).



Şekil 3.28. İmmobilize peroksidaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.29. Serbest peroksidaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.3. Peroksidaz enziminin kinetik parametreleri

	V_{mak} (U/mg protein)	K_m (mmol/L)	R^2
Serbest peroksidaz	270,2	1,5	0,981
İmmobilize peroksidaz	0,7	1,7	0,986

Enzimin immobilize edilmesi ile kinetik parametreler de meydana gelen değişim immobilizasyon yöntemi, protein konformasyonundaki değişim, destek materyal ve substrat arasındaki elektrostatik etkileşim, sterik engel ve difüzyon sınırlaması gibi başlıca etkenlerle ilişkilidir. K_m değerindeki artış enzimin kimyasal bağlanma esnasındaki aktivite kaybından

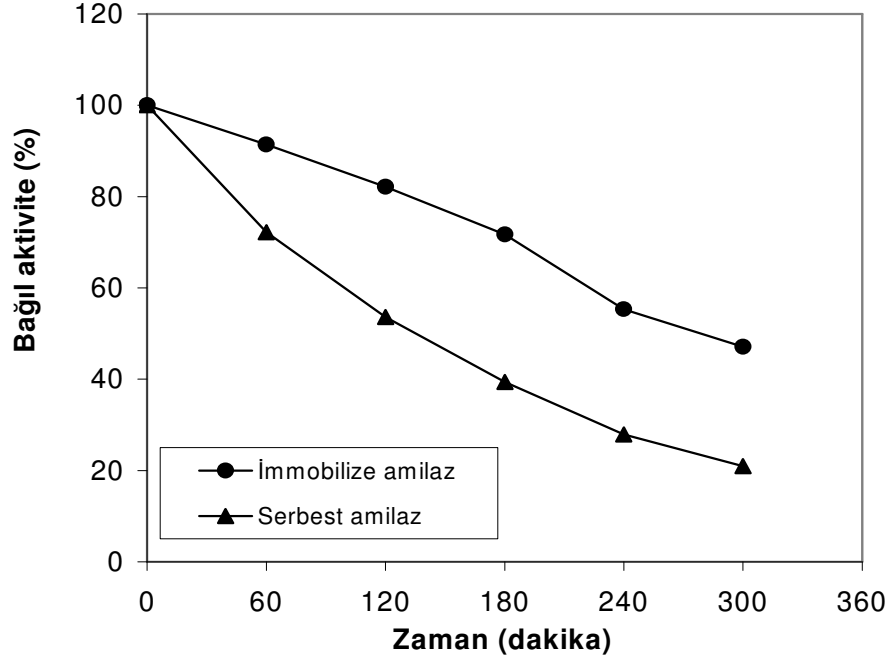
kaynaklanmaktadır. Aktivitedeki bu azalmaya substratın enzimin aktif merkezine ulaşmasındaki sterik engel neden olmaktadır^(67,74).



Şekil 3.30. Peroksidaz immobilize edilmiş PET lif (a), bir kez kullanılmış PET lif (b), yirmi kez kullanılmış PET lif (c)

3.4.4. Termal kararlılık

α -Amilaz enziminin termal kararlılığını incelemek amacı ile immobilize ve serbest α -amilaz 45°C sabit sıcaklıktaki su banyosunda 300 dakika inkübe edilmiştir. Immobilize ve serbest α -amilaz'dan belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak enzim aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.31'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilize α -amilaz enzimi serbest α -amilaz enzimine göre daha iyi termal kararlılık özelliği göstermiştir. Immobilize α -amilaz 300 dakikanın sonunda, başlangıç aktivitesini %47 oranında korurken serbest enzim ancak %21 oranında korumuştur.

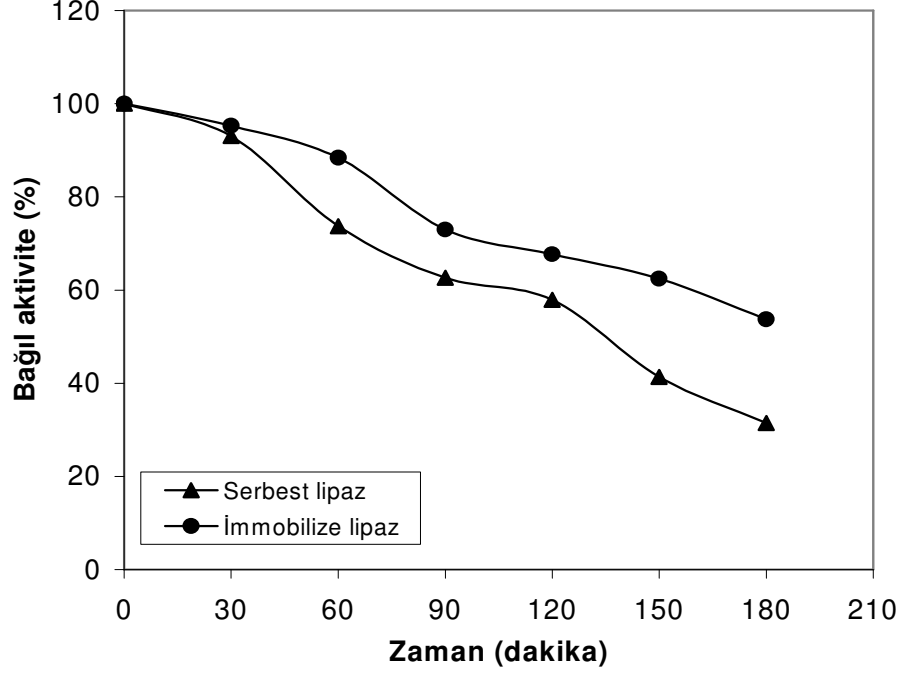


Şekil 3.31. α -Amilaz enziminin termal kararlılığı

Atia ve arkadaşları⁽⁶⁷⁾, β -amilaz enzimini poli(akrilamit-akrilik asit) destek üzerine immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığını 60°C sıcaklıkta incelemişlerdir. Serbest enzimin 40 dakika sonunda aktivite göstermediğini immobilize enzimin ise başlangıç aktivitesini %40 oranında koruduğunu belirtmişlerdir.

Lipaz enziminin termal kararlılığını incelemek amacı ile immobilize ve serbest lipaz 50°C sabit sıcaklıktaki su banyosunda tampon çözelti içerisinde 180 dakika inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak enzim aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.32'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilize lipaz enzimi serbest lipaz enzimine göre

daha iyi termal kararlılık özelliği göstermiştir. İmmobilize lipaz 180 dakikanın sonunda, başlangıç aktivitesini %54 oranında korurken serbest enzim ancak %30 oranında korumuştur.



Şekil 3.32. Lipaz enziminin termal kararlılığı

Santos ve arkadaşları⁽⁸⁰⁾, lipaz enzimini poli(N-metakrilamit) üzerine immobilize etmişlerdir. Serbest enzimin 50°C'de bir saatlik inkübasyonu sonucunda başlangıç aktivitesinin %15'ini koruduğunu, bunun yanında immobilize enzimin aynı sıcaklıkta başlangıç aktivitesini %70 oranında koruduğunu bildirmişlerdir.

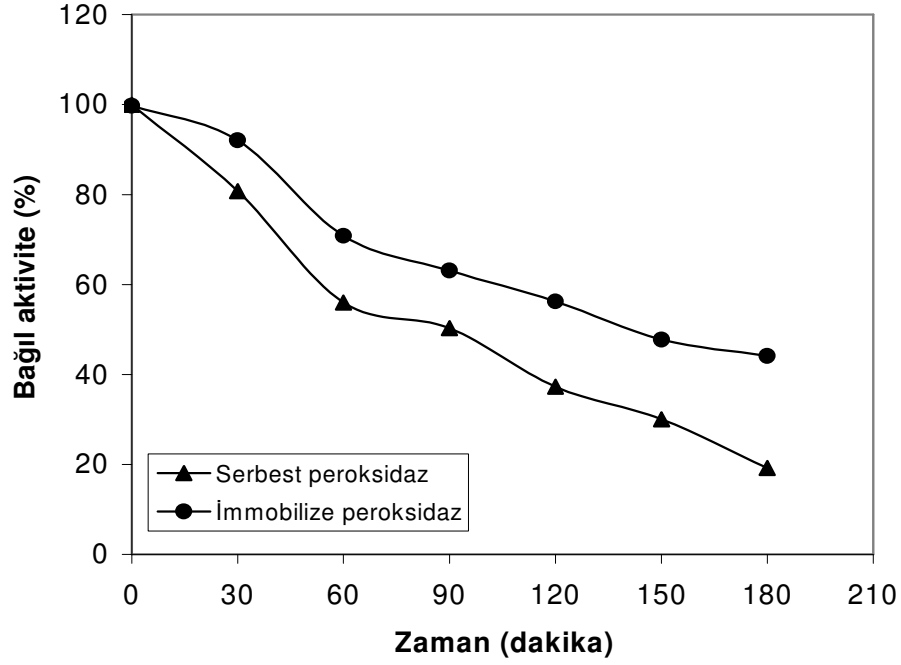
Lipaz enziminin polisiloksan-polivinil alkol destek üzerine immobilize edildiği çalışmada, serbest ve immobilize enzim bir saat süre ile 55°C'de inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda serbest enzimin aktivite göstermediği, immobilize enzimin ise başlangıç aktivitesinin %30'unu koruduğu belirtilmiştir⁽⁷³⁾.

Peroksidaz enziminin termal kararlılığını incelemek amacı ile immobilize ve serbest peroksidaz 50°C sabit sıcaklıktaki su banyosunda tampon zelti içerisinde 180 dakika inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak enzim aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 3.33'de verilmiştir. şekilde görüldüğü gibi, immobilize peroksidaz enzimi serbest peroksidaz enzimine göre daha iyi termal kararlılık özelliği göstermiştir. İmmobilize peroksidaz 180 dakikanın sonunda, başlangıç aktivitesini %44 oranında korurken serbest enzim ancak %19 oranında korumuştur.

Fernandes ve arkadaşları⁽⁶⁶⁾, peroksidaz enzimini polianilin üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyonun enzimin termal kararlılığını artırdığını belirtmişlerdir. İmmobilize ve serbest enzimleri 2 saat süre ile 55°C sıcaklıkta inkübe etmişlerdir. Bu süre sonunda immobilize enzim başlangıç aktivitesini %80 oranında korurken serbest enzimin %40 oranında koruduğu belirtilmiştir.

Peroksidaz enziminin polisakkarit destek kullanarak immobilize edildiği çalışmada, serbest ve immobilize enzim 35°C, 45°C ve 55°C sıcaklıklarda 120 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İmmobilize enzimin  koşulda da serbest enzime göre termal kararlılığının daha iyi olduğu bildirilmiştir⁽⁸¹⁾.

Bu sonuçlar immobilizasyonun enzimin konformasyon kararlılığını artırdığını göstermiştir. İmmobilize edilmiş enzimlerde konformasyon esnekliğinin azalmasından dolayı termal kararlılık artmaktadır^(74,80).

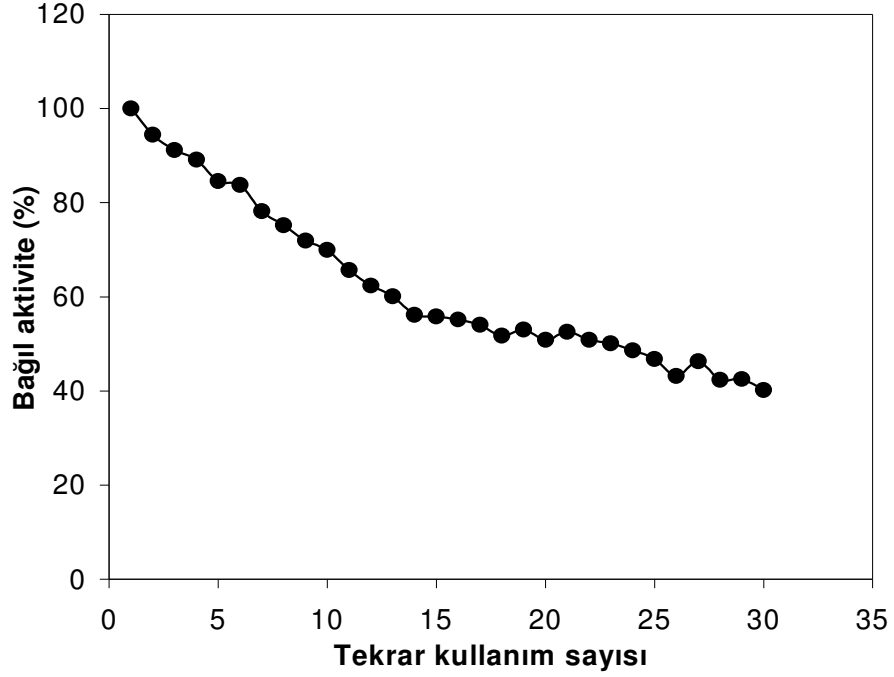


Şekil 3.33. Peroksidaz enziminin termal kararlılığı

3.4.5. Tekrar kullanım kararlılığı

İmmobilize α -amilaz enziminin tekrar kullanım kararlılığını değerlendirmek amacı ile standart aktivite ortamında her seferinde substrat olarak derişimi 10 mg/mL olan nişasta çözeltisi kullanılmıştır. İmmobilize α -amilaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı Şekil 3.34'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilize enzimin bağlı aktivitesi kullanım sayısına bağlı

olarak azalmaktadır. İmmobilize enzim 30 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesini %40 oranında korumuştur.

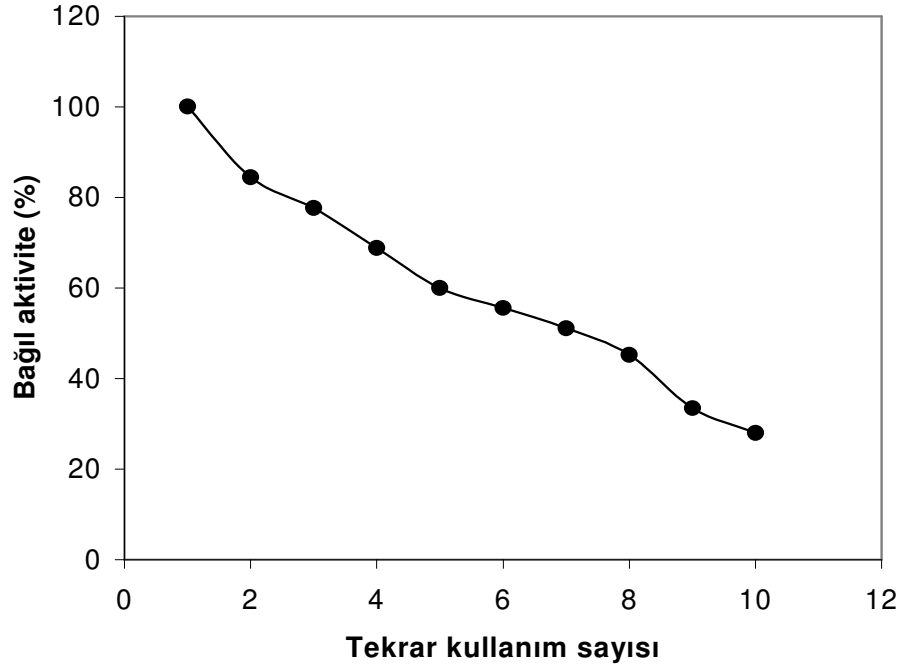


Şekil 3.34. İmmobilize α -amilaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı

Konsoula ve arkadaşları⁽²⁰⁾, α -amilaz enzimini aljinat kapsüle immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin 20 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesini %60 değerinde koruduğunu belirtmişlerdir.

α -amilaz enziminin kitosan-kil kompozit üzerine immobilize edildiği çalışmada, immobilize enzimin, 50 kez tekrar kullanımının sonunda başlangıç aktivitesinde önemli bir değişme olmadığı gözlenmiştir⁽⁷⁴⁾.

İmmobilize lipaz enziminin tekrar kullanım kararlılığını değerlendirmek amacı ile standart aktivite ortamında her seferinde substrat olarak derişimi 100 mg/mL olan izooktanda hazırlanmış zeytinyağı çözeltisi kullanılmıştır. İmmobilize lipaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı Şekil 3.35'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilize enzimin bağıl aktivitesi kullanım sayısına bağılı olarak azalmaktadır. İmmobilize enzim 10 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesini %28 oranında korumuştur.



Şekil 3.35. İmmobilize lipaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı

Oliveira ve arkadaşları⁽⁸²⁾, lipaz enzimini stiren-divinil benzen kopolimeri üzerine immobilize etmişlerdir. Lipaz immobilizasyonunu sulu ortamda ve heptan ortamında gerçekleştirmişlerdir. Sulu ortamda immobilize edilen lipaz

enziminin üçüncü kullanımda aktivite göstermediğini, heptan ortamında immobilize edilen enzimin ise altıncı kullanımın sonunda bağıl aktivitesini %80 oranında koruduğunu bildirmişlerdir.

Kitosan kürelere lipaz enziminin immobilize edildiği çalışmada, 10 tekrar kullanım sonunda immobilize lipaz enziminin %80 aktivite gösterdiği belirtilmiştir⁽⁷⁸⁾.

Pahujani ve arkadaşları⁽⁸³⁾, lipaz enzimini naylon-6 üzerine immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin onuncu kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %71'ini koruduğunu, 13 kullanım sonunda ise aktivite değerinin %20'ye düştüğünü gözlemişlerdir.

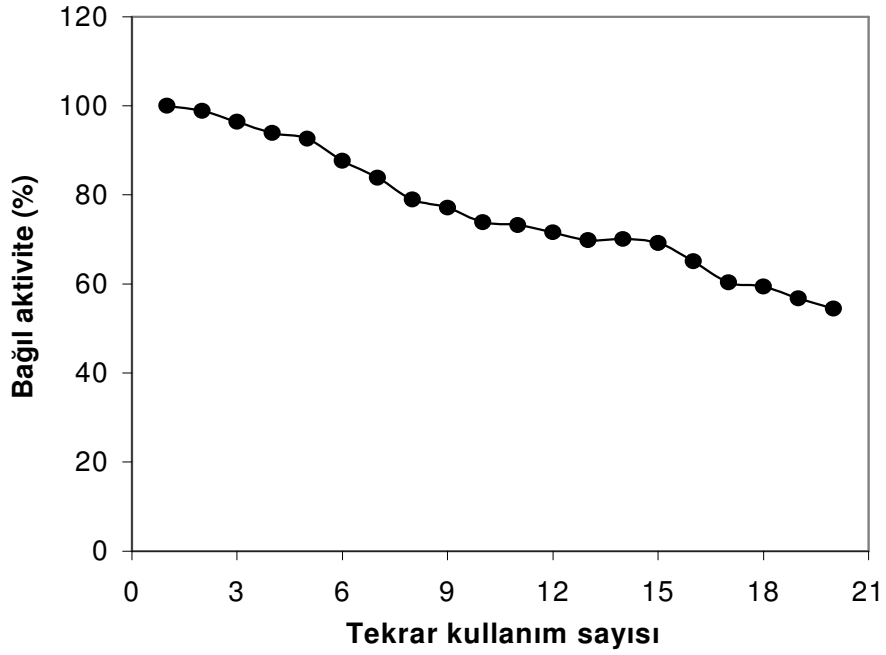
Huang ve arkadaşları⁽⁸⁴⁾, poli(akrilonitril-co-2-hidroksietil metakrilat) membran üzerine lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin 10 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %30'unu koruduğunu saptamışlardır.

İmmobilize peroksidaz enziminin tekrar kullanım kararlılığını değerlendirmek amacı ile standart aktivite ortamında her seferinde substrat olarak derişimi 10 mmol/L olan pirogallol çözeltisi kullanılmıştır. İmmobilize peroksidaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı Şekil 3.36'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilize enzimin bağıl aktivitesi kullanım sayısına bağılı olarak azalmaktadır. İmmobilize enzim 20 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesini %54 oranında korumuştur.

Peroksidaz enziminin modifiye edilmiş Sephadex G-100 destek üzerine immobilize edildiği çalışmada, immobilize enzim kullanılarak atık sulardan p-

klorofenol uzaklaştırılması incelenmiştir. İmmobilize enzimin 10 kez kullanımı sonunda p-klorofenol uzaklaştırılmasında %40 azalma olduğu belirtilmiştir⁽⁸⁵⁾.

Oliveira ve arkadaşları⁽⁸⁶⁾, peroksidaz enzimini anodik alüminyum oksit polianilin kompozit üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimi 5 kez tekrar kullanmışlar ve başlangıç aktivitesini %74 oranında koruduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 3.36. İmmobilize peroksidaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı

Pahalı bir katalizör olan enzimlerin immobilizasyonunun en önemli avantajlarından biri onların tekrar kullanımına imkân sağlamasıdır. İmmobilize enzimlerin tepkime ortamından geri kazanılması ve tekrar

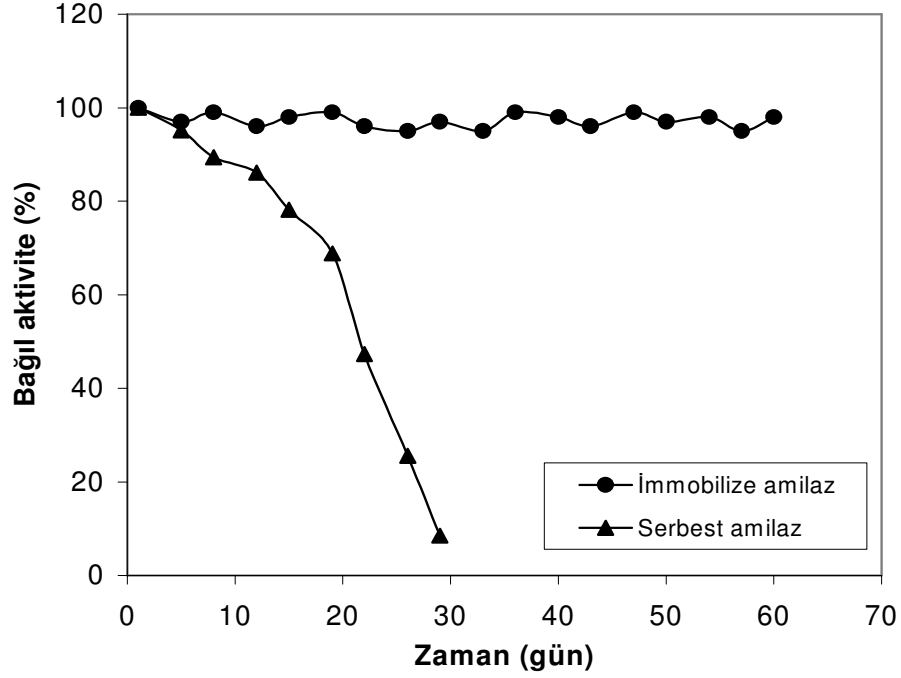
kullanılması, enzimleri endüstriyel uygulamalar için ekonomik duruma getirir. İmmobilize enzimler tepkime ortamından kolayca ayrılabilir ve tekrar kullanılabilirler⁽⁶⁰⁾.

3.4.6. Depolanma kararlılığı

İmmobilize ve serbest α -amilaz enzimleri tampon çözelti (pH=7) içerisinde 4°C'de depolanmışlardır. Belirli periyotlarda örnekler alınarak aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.37'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilize α -amilaz enzimi serbest α -amilaz enzimine göre üstün bir performans sergilemiştir. İmmobilize α -amilaz 60 gün boyunca başlangıç aktivitesini korumuştur. Serbest α -amilaz ise 30 günün sonunda başlangıç aktivitesinin büyük bir kısmını kaybetmiştir.

Bryjak⁽⁸⁷⁾, %40 oranında çapraz bağlanmış poli bütül akrilat üzerine α -amilaz enzimini immobilize etmiştir. İmmobilize enzimin 4°C'de 30 gün boyunca depolandığında başlangıç aktivitesini %76 oranında koruduğunu belirtmiştir.

Atia ve arkadaşları⁽⁶⁷⁾, β -amilaz enzimini poli (akrilamit-akrilik asit) destek üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilize ve serbest enzimi 4°C'de 30 gün süre ile depolamışlardır. Serbest enzimin başlangıç aktivitesini %47 oranında koruduğunu, immobilize enzimin ise başlangıç aktivitesini %92 oranında koruduğunu saptamışlardır.



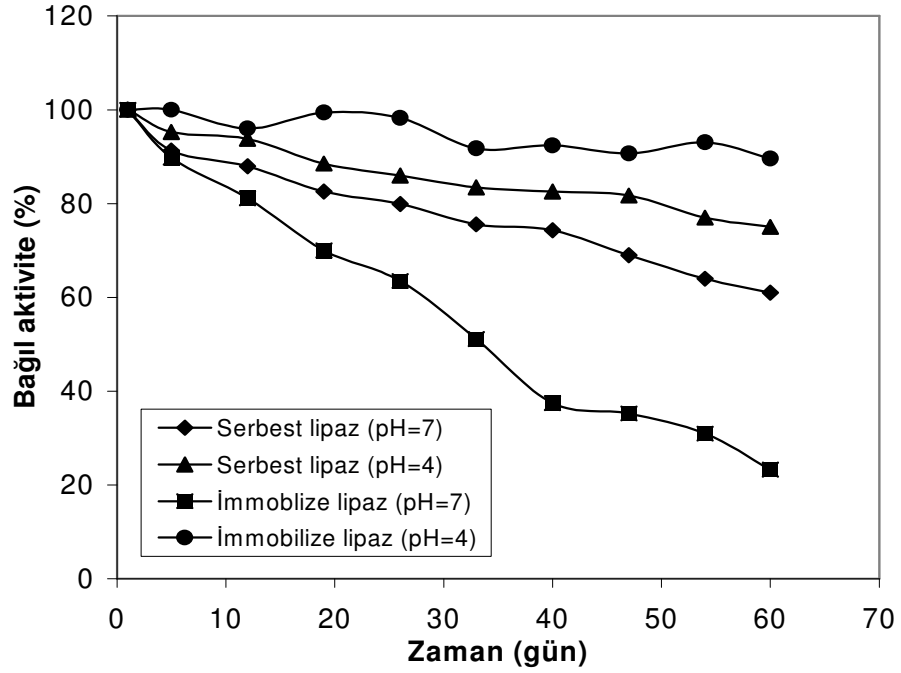
Şekil 3.37. α -Amilaz enziminin depolanma kararlılığı

İmmobilize ve serbest lipaz enzimleri tampon çözelti içerisinde 4°C’de depolanmışlardır. Belirli periyotlarda örnekler alınarak aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.38’de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilize lipaz enzimi pH 4 tamponu içerisinde 60 gün depolandığında başlangıç aktivitesini %90 oranında korumuştur. Serbest lipaz ise 60 gün depolanma sonunda başlangıç aktivitesinin %75’ini korumuştur. İmmobilize lipaz pH 7 tampon çözeltisinde oldukça düşük depolanma kararlılığı göstermiştir.

Huang ve arkadaşları⁽⁷⁷⁾, palygorskite üzerine lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin depolanma kararlılığını on hafta süre ile takip etmişlerdir. Serbest enzimin dördüncü haftada aktivitesini

yitirmesine rağmen immobilize enzimin kararlılığını on hafta boyunca sürdürdüğünü belirtmişlerdir.

Chiou ve Wu⁽⁷⁸⁾, kitosan küreler üzerine lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin depolanma kararlılığını 25°C'de 30 gün süre ile incelemişlerdir. Serbest enzimin 30 gün sonunda aktivitesini kaybettiğini, immobilize enzimin ise bu sürede aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir.



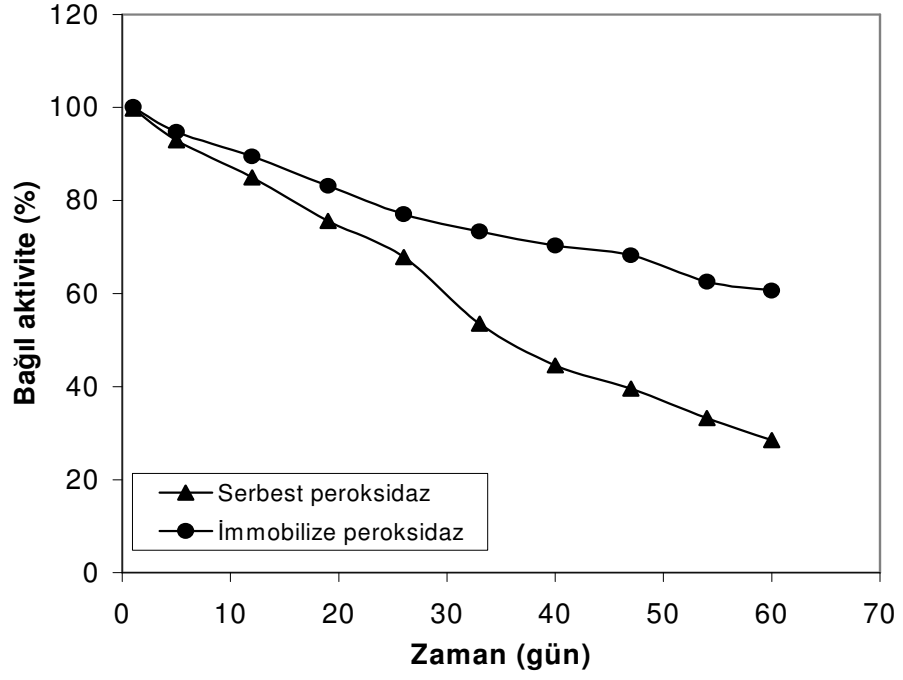
Şekil 3.38. Lipaz enziminin depolanma kararlılığı

Vaidya ve arkadaşları⁽⁸⁸⁾, lipaz enzimini poli(alil glisidil eter-co-etilen glikol dimetakrilat) kopolimeri üzerine immobilize etmişlerdir. Immobilize ve

serbest enzimin 30 gün süre ile depolanma kararlılığını incelemişlerdir. Serbest enzimin onuncu günde başlangıç aktivitesinin %14'ünü koruyabildiğini buna karşı immobilize enzimin ise otuzuncu günde başlangıç aktivitesinin %80'ini koruduğunu gözlemişlerdir.

İmmobilize ve serbest peroksidaz enzimleri tampon çözelti (pH=7) içerisinde 4°C'de depolanmışlardır. Belirli periyotlarda örnekler alınarak aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.39'da gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, immobilize peroksidaz enzimi tampon çözelti içerisinde 60 gün depolandığında başlangıç aktivitesini %61 oranında korumuştur. Serbest peroksidaz ise 60 gün depolanma sonunda başlangıç aktivitesinin %28'ini korumuştur.

Shukla ve arkadaşları⁽⁸¹⁾, peroksidaz enzimini polisakkarit destek kullanarak immobilize etmişlerdir. Serbest enzimin bir hafta depolanma sonunda aktivitesinin %50'sini kaybettiğini, immobilize enzimin ise bir ay depolanma sonunda aktivitesinin %50'sini koruduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 3.39 Peroksidaz enziminin depolanma kararlılığı

4. SONUÇ

Bu çalışmada α -amilaz, lipaz ve peroksidaz enzimleri destek materyal olarak kullanılan AAm-g-PET lif üzerine immobilize edilmiştir. Destek materyal üzerinde uygun fonksiyonel grup oluşturmak için, aşılınmış lif Hofmann dönüşüm tepkimesi ile modifiye edilmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen genel sonuçlar şunlardır.

1. AAm-g-PET üzerine uygulanan Hofmann tepkimesi için optimum değerler, sodyum hipoklorit derişiminin 5×10^{-3} M, sodyum hidroksit derişiminin 0,25 M ve tepkime süresinin 30 dakika olduğu tespit edilmiştir.
2. İmmobilize enzimlerin aktivitesini, immobilizasyon ortamının pH değerinin etkilediği saptanmıştır.
3. İmmobilize enzimlerin aktivitesinin, immobilizasyon çözeltisindeki protein derişimi ile arttığı görülmüştür.
4. İmmobilize enzimlerin aktivitesinin PET lifin aşılınma oranına bağlı olduğu belirlenmiştir.
5. İmmobilizasyon, enzimlerin pH davranışlarını etkilemiştir. İmmobilizasyon ile optimum pH değerleri α -amilaz enzimi için 5'den 6 değerine, lipaz enzimi için 6'dan 7 değerine, peroksidaz enzimi için 8'den 7 değerine değişim göstermiştir.
6. İmmobilizasyon enzimlerin optimum sıcaklık değerlerini etkilememiştir.

7. İmmobilizasyon ile enzimlerin termal kararlılıklarında artış meydana gelmiştir.
8. İmmobilizasyon, α -amilaz ve lipaz enzimlerinin K_m değerlerinde artma meydana getirirken, peroksidaz enziminin K_m değerini etkilememiştir.
9. İmmobilizasyon enzimlerin depolanma kararlılığını artırmıştır.
10. İmmobilizasyon enzimlerin tekrar kullanılmalarına olanak sağlamıştır.
11. Model olarak seçilen bu üç enzimin aktivite ve kararlılık sonuçları değerlendirildiğinde, AAm-g-PET lifin diğer endüstriyel enzimlerin immobilizasyonunda destek materyal olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. H. R. Horton, L. A. Moran and R. S. Ochs, Principles of Biochemistry, Prentice-Hall International, Inc., New Jersey, 1996.
2. L. Betancor and H. R. Luckarift, Trends Biotechnol., **26**, 566(2008).
3. B. Krajewska, Enzyme Microb. Technol., **35**, 126(2004).
4. W. Aehle, Enzymes in Industry, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, 2004.
5. E. T. Çetin, Endüstriyel Mikrobiyoloji, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, İstanbul, 1983.
6. P. V. Iyer and L. Ananthanarayan, Process Biochem., **43**, 1019(2008).
7. A. L. Lehninger, D. L. Nelson and M. M. Cox, Principles of Biochemistry, Worth Publishers, New York, 1993.
8. N. S. Pujari, B. K. Vaidya, S. Bagalkote, S. Ponrathnam and S. Nene, J. Membr. Sci., **285**, 395(2006).
9. S. Li, J. Hu, and B. Liu, BioSystems, **77**, 25(2004).
10. R. A. Sheldon, Adv. Synth. Catal., **349**, 1289(2007).
11. J. E. Bailey and D. F. Ollis, Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill, Inc., Singapore, 1987.
12. Y. Bai, Y. Li and M. Wang, Enzyme Microb. Technol., **39**, 540(2006).
13. J. Bryjak, K. Bachmann, B. Pawlow, I. Maliszewska, A. Trochimczuk and B. N. Kolarz, Biochem. Eng. J., **65**, 249(1997).
14. P. Pandya, R. V. Jasra, B. L. Newalkar and P. N. Bhatt, Micropor. Mesopor. Mat., **77**, 67(2005).
15. Y. Chen, E. T. Kang, K. G. Neoh and K. L. Tan, Eur. Polym. J., **36**, 2095(2000).
16. Y. X. Bai, Y. F. Li and M. T. Wang, Enzyme Microb. Technol., **39**, 540(2006).

17. J. Woodward, Immobilised Cells and Enzymes, IRL Press, England, 1985.
18. C. Mateo, O. Abian, R. F. Lafuente and J. M. Guisan, Enzyme Microb. Technol., **26**, 509(2000).
19. C. Mateo, J. M. Palomo, G. F. Lorente, J. M. Guisan and R. F. Lafuente., Enzyme Microb. Technol., **10**, 1451(2007).
20. Z. Konsoula and M. L. Kyriakides, Process Biochem., **41**, 343(2006).
21. J. Chen, D. Chu and Y. Sun, J. Chem. Technol. Biotechnol., **69**, 421(1997).
22. C. J. Tien and B. H. Chiang, Process Biochem., **35**, 377(1999).
23. L. H. Lim, D. G. Macdonald and G. A. Hill, Biochem. Eng. J., **13**, 53(2003).
24. G. Hills, Eur. J. Lipid. Sci. Technol., **105**, 601(2003).
25. V. Dandavate and D. Madamwar, Enzyme Microb. Technol., **41**, 265(2007).
26. M. M. Soumanou and U. T. Bornscheuer, Enzyme Microb. Technol., **33**, 97(2003).
27. S. V. Ranganathan, S. L. Narasimhan and K. Muthukumar, Bioresource Technol., **99**, 3975(2008).
28. F. M. Bautista, M. C. Bravo, J. M. Campelo, A. Garcia, D. Luna, J. M. Marinas and A. A. Romero, J. Chem. Technol. Biotechnol., **72**, 249(1998).
29. G. S. Chauhan, S. Mahajan, K. M. Sddiqui and R. Gupta, J. Appl. Polym. Sci., **92**, 3135(2004).
30. P. Ye, Z. Xu, A. Che, J. Wu and P. Seta, Biomaterials, **26**, 6394(2003).
31. V. Vojinovic, R. H. Carvalho, F. Lemos, J. M. S. Cabral L. P. Fonseca and B. S. Ferreira, Biochem. Eng. J., **35**, 126(2007).
32. A. Bodalo, J. Bastida, M. F. Maximo, M. C. Montiel, M. Gomez and M. D. Murcia, Bioprocess Biosyst. Eng., **31**, 587(2008).
33. I. Levy, G. Ward, Y. Hadar, O. Shoseyov and C. G. Dosoretz, Biotechnol. Bioeng., **82**, 223(2003).

34. F. Melgarejo, J. N. Lopez, F. Canovas and P. A. Ruiz, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **79**, 1148(2004).
35. J. L. Gomez, A. Bodalo, E. Gomez, J. Bastida, A. M. Hidalgo and M. Gomez, *Enzyme Microb. Technol.*, **39**, 1016(2006).
36. M. Arslan, M. Yiğitoğlu, O. Şanlı and H. İ. Ünal, *Polym. Bull.*, **51**, 237(2003).
37. M. Yiğitoğlu and M. Arslan, *Polym. Bull.*, **58**, 785(2007).
38. A. G. Karamani, V. I. Triantafyllou, K. Demertzi and P. Demertzis, *Eur. Food Res. Technol.*, **219**, 438(2004).
39. M. Yiğitoğlu and M. Arslan, *Polym. Bull.*, **55**, 259(2005).
40. H. Bağ, A. R. Türker, R. Coşkun, M. Saçak and M. Yiğitoğlu, *Spectrochim. Acta Part. B*, **55**, 1101(2000).
41. R. Coşkun, M. Yiğitoğlu and M. Saçak, *J. Appl. Polym. Sci.*, **75**, 766(2000).
42. M. Yiğitoğlu, M. Ersöz, R. Coşkun, O. Şanlı and H. İ. Ünal, *J. Appl. Polym. Sci.*, **68**, 1935(1998).
43. M. Yiğitoğlu and M. Arslan, *e-Polymers*, 055, (2007).
44. M. Arslan and M. Yiğitoğlu, *J. Appl. Polym. Sci.*, **107**, 2846 (2008).
45. M. Arslan and M. Yiğitoğlu, *e-Polymers*, 016, (2008).
46. R. Coşkun and C. Soykan, *J. Polym. Res.*, **13**, 1(2006).
47. S. Sano, K. Kato and Y. Ikada, *Biomaterials*, **14**, 817(1993).
48. G. S. Chauhan, S. Chauhan, K. Chauhan and U. Sen, *J. Appl. Polym. Sci.*, **99**, 3040(2006).
49. L. Betancor, F. Lopez-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisan, *Enzyme Microb. Technol.*, **39**, 877(2006).
50. S. S. Caramori and K. F. Fernandes, *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.*, **28**, 1159(2008).
51. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
52. G. N. Miller, *Anal. Chem.*, **81**, 426(1959).

53. D. Y. Kwon and J. S. Rhee, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **63**, 89(1986).
54. B. Halpin, R. Pressey, J. Jen and N. Mony, *J. Food Sci.*, **54**, 644(1989).
55. K. F. Fernandes, C. S. Lima, H. Pinho, and C. H. Collins, *Process Biochem.*, **38**, 1379(2003).
56. X. Hou, D. Huang, X. Chen, Z. Zhang and K. Yao, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, **46**, 1674(2008).
57. M. Saçak and E. Pulat, *J. Appl. Polym. Sci.*, **38**, 539(1988).
58. D. H. Lee, J. M. Kim, S. W. Kang, J. W. Lee and S. W. Kim, *Biotechnol. Lett.*, **28**, 1965(2006).
59. S. P. Shukla and S. Devi, *Process Biochem.*, **40**, 147(2005).
60. G. Lee, J. Kim and J. Lee, *Enzyme Microb. Technol.*, **42**, 466(2008).
61. L. V. Bindhu and E. T. Abraham, *J. Appl. Polym. Sci.*, **88**, 1406(2003).
62. R. Reshmi, G. Sanjay and S. Sugunan, *Catal. Commun.*, **8**, 393(2007).
63. D. Park, S. Haam, K. Jang, I-S. Ahn and W. S. Kim, *Process Biochem.*, **40**, 53(2005).
64. M. Kim, H. O. Ham, S. D. Oh, H. G. Park, H. N. Chang and S. H. Choi, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **39**, 62(2006).
65. D. G. Lee, K. M. Ponvel, M. Kim, S. Hwang, I. Ahn and C. Lee, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, In press (2008).
66. K. F. Fernandes, C. S. Lima, F. M. Lima, F. M. Lopes and C. H. Collins, *Process Biochem.*, **39**, 957(2004).
67. K. S. Atia, S. A. Ismail and A. M. Dessouki, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78**, 891(2003).
68. G. M. Qui, B. K. Zhu and Y. Y. Xu, *J. Appl. Polym. Sci.*, **95**, 328(2005).
69. P. Tripathi, A. Kumari, P. Rath and A. M. Kayastha, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **49**, 69(2007).
70. A. Harun, M. Basri, M. B. Ahmad and A. B. Salleh, *J. Appl. Polym. Sci.*, **92**, 3381(2004).
71. S. Yi, J. Noh and Y. Lee, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, In press (2008).

72. S. S. Caramori and K. F. Fernandes, *Process Biochem.*, **39**, 883(2004).
73. A. V. Paula, D. Urioste, J. C. Santos and H. F. Castro, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **82**, 281(2007).
74. M. Chang and R. Juang, *Enzyme Microb. Technol.*, **36**,75(2005).
75. S. D. Shewale and A. B. Pandit, *Carbohydr. Res.*, **342**, 997(2007).
76. P. Ye, Z. Xua, A. Che, J. Wu, C, Innocent and P. Seta, *Biomaterials*, **27**, 4169(2006).
77. J. Huang, Y. Liu and X. Wang, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **55**, 49(2008).
78. S. H. Chiou and W. T. Wu, *Biomaterials* **25**, 197(2004).
79. L. R. Silva, Y. Gushikem and L. T. Kubota, *Colloid Surface. B.*, **6**, 309(1996).
80. J. C. Santos, G. F. Nunes, A. B. Moreira, V. H. Perez and H. F. Castro, *Chem. Eng. Technol.*, **30**, 1255(2007).
81. S. P. Shukla, K. Modi, P. K. Ghosh and S. Devi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **91**, 2063(2004).
82. P. C. Oliveira, G. M. Alves and H. F. Castro, *Biochem. Eng. J.*, **5**, 63(2000).
83. S. Pahujani, S. S. Kanwar, G. Chauhan and R. Gupta, *Bioresource Technol.*, **99**, 2566(2008).
84. X. Huang, A. Yu and Z. Xu, *Bioresource Technol.*, **99**, 5459(2008).
85. S. Dalal and M. N. Gupta, *Chemosphere*, **67**, 741(2007).
86. G. B. Oliveira, J. L. Filho, M. E. C. Chaves, W. M. Azevedo and L. B. Carvalho Jr, *React. Funct. Polym.*, **68**, 27(2008).
87. J. Bryjak, *Biochem. Eng. J.*, **16**, 347(2003).
88. B. K. Vaidya, G. C. Ingavle, S. Ponrathnam, B. D. Kulkarni and S. N. Nene, *Bioresource Technol.*, **99**, 3623(2008).

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Yozgat'ın Köseyusuflu Köyünde doğdu. 1985 yılında ilkokulu, 1988 yılında ortaokulu ve 1992 yılında liseyi bitirdi. 1997 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. Aynı yıl Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Yüksek Lisans eğitimine başladı. 31.12.1997 Tarihinde Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne araştırma görevlisi olarak atandı. Yüksek Lisans eğitimini 2000 yılında tamamladı. Doktora eğitimine 2005 yılında Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde başladı. Halen Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.