

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

POLİ(VİNİL ALKOL)-KALSİYUM ALJİNAT,
POLİ(N-İZOPROPİLAKRİLAMİT)-KALSİYUM ALJİNAT
HİDROJEL KÜRELERİNE LAKKAZ İMMOBİLİZASYONU

Alper AKIN

HAZİRAN 2010

Kimya Anabilim Dalı Alper AKIN tarafından hazırlanan POLİ(VİNİL ALKOL)-KALSİYUM ALJİNAT, POLİ(N-İZOPROPİLAKRİLAMİT)-KALSİYUM ALJİNAT HİDROJEL KÜRELERİNE LAKKAZ İMMOBİLİZASYONU adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. Zeki ÖKTEM
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Yrd.Doç.Dr.Haydar ALTINOK
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Serpil AKSOY _____
Üye (Danışman) : Yrd. Doç. Dr. Haydar ALTINOK _____
Üye : Prof. Dr. Zeki ÖKTEM _____

28/06/2010

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Burak BİRGÖREN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

POLİ(VİNİL ALKOL)-KALSİYUM ALJİNAT, POLİ(N-İZOPROPİLAKRİLAMİT)-KALSİYUM ALJİNAT HİDROJEL KÜRELERİNE LAKKAZ İMMOBİLİZASYONU

AKIN, Alper

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Haydar ALTINOK

Haziran 2010, 128 Sayfa

Bu çalışmada, Lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2), poli(vinil alkol)-kalsiyum aljinat (PVA-CaAlj), poli(N-izopropilakrilamit)-kalsiyum aljinat (P(NIPA)-CaAlj) kürelerine, karbodiimit (CDI), N-hidroksisüksinimit (NHS), karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit (CDI-NHS) ile aktifleştirilerek kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edildi. Serbest enzim için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum tepkime hızı (V_{mak}) değerleri sırası ile $1,70 \times 10^{-2}$ mM, $2,08 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu. Immobilize enzimler için ise K_m değerleri $2,87 \times 10^{-2}$ mM – $5,55 \times 10^{-2}$ mM arasında değişirken V_{mak} değerleri $5,30 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ - $8,58 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ aralığında bulundu. Serbest enzim ve immobilize enzimler için optimum pH değerleri sırasıyla 5,0 ve 6,0 ve optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 40°C ve 45°C olarak bulundu. Serbest enzim 34 gün sonunda aktifliğinin %60'ını korurken immobilize enzimlerinin ise 30-32 gün sonunda aktifliklerinin yaklaşık %80-87'sini koruduğu görüldü. Immobilize enzimlerin 5 kez kullanım sonunda ve enzim aktifliklerini %86-92 aralığında koruduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: Lakkaz, poli(vinil alkol), kalsiyum-aljinat, enzim immobilizasyonu, kovalent bağlanma, N-izopropilakrilamit.

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF LACCASE ONTO POLY(VINYL ALCOHOL)- CALCIUM ALGINATE, POLY(N-ISOPROPYLACRYLAMIDE)-CALCIUM ALGINATE HYDROGELS

AKIN, Alper

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, M.Sc. Thesis

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Haydar ALTINOK

June 2010, 128 pages

In this study, Laccase (E.C 1.10.3.2) was covalently immobilized onto poly(vinylalcohol)-calcium alginate (PVA-CaAlj), poly(N-isopropylacryl amide)-calcium alginate (P(NIPA)-CaAlj) beads by activating with carbodiimide (CDI), N-hydroxysuccinimide (NHS), carbodiimide and N-hydroxysuccinimide (CDI-NHS). Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum reaction rate (V_{max}) values were found as 1.70×10^{-2} mM and 2.08×10^{-3} mM.min⁻¹ for free enzyme, respectively. K_m and V_{max} values were changed between 2.88×10^{-2} mM – 5.56×10^{-2} mM and 5.30×10^{-3} mM.min⁻¹ – 8.58×10^{-3} mM.min⁻¹ for immobilized enzymes, respectively. Optimum pH and temperature were observed as 5.0, 6.0 and 40°C, 45°C for free enzyme and immobilized enzymes, respectively. After 34 days of storage at 4°C free enzyme retained 60% of its original activity and immobilized enzymes were retained 80-87% of their original activities, after 30-32 days of storage at 4°C. Immobilized enzymes were used repeatedly 5 times, were retained 86-92% of their original activities.

Key Words: Laccase, poly (vinyl alcohol), calcium-alginate, enzyme immobilization, covalent bonding, N-isopropylacrylamide.

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca ve tez yazım aőamasında değerli yardımlarını esirgemeyen, her türlü imkânı sağlayan, zor zamanlarımda yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Sayın Yrd. Doç.Dr.Haydar ALTINOK'a

Çalıőmalarım süresince bana destek olan değerli hayat arkadaőım, eőim Hasibe AKIN'a, evimizin neőe kaynağı kızım Zeynep Leyla AKIN'a

Hayatı, fikirleri ve düőünceleriyle hayatım boyunca yanımda olan babam Sadettin AKIN'a, moral verici kardeőim Tuba Bilge AKIN'a

Desteğinden dolayı Mustafa ERDİNÇ Beye,

Sonsuz teşekkür...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLERİN DİZİNİ	xii
ÇİZELGELERİN DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler.....	2
1.1.1. Enzimlerin genel özellikleri.....	2
1.1.2. Enzimlerin çalışmasını etkileyen faktörler.....	2
1.1.3. Enzimlerin uygulama alanları.....	3
1.2. Enzimlerin İmmobilizasyonu.....	5
1.2.1. Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri.....	6
1.2.2. Kovalent bağlanmayla immobilizasyon.....	7
1.2.3. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması.	8
1.2.4. Enzim destek ateryali.....	10
1.2.5. Sodyum aljinat.....	11
1.2.6. Poli(vinil alkol) (PVA).....	12
1.2.7. Poli(N-İzopropilakrilamit) (P-NİPA).....	14
1.3. Lakkaz Enzimi.....	14
1.3.1. Lakkazın doğada bulunuşu.....	14
1.3.2. Lakkaz enzimi ve özellikleri.....	15
1.3.3. Siringaldazin.....	17
1.3.4. Lakkazın uygulama alanları.....	18
1.3.5. Lakkaz enzimiyle yapılan çalışmalar.....	18
2. MATERYAL VE METOD	26
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26

2.2. Kullanılan Cihazlar.....	29
2.3. Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
2.3.1. Sodyum hidroksit çözeltisi.....	29
2.3.2. Siringaldazin çözeltisi.....	29
2.3.3. Sitrat tamponu.....	29
2.3.4. Fosfat tamponu.....	29
2.3.5. Lakkaz çözeltisi.....	30
2.3.6. 0,3 M Kalsiyum klorür çözeltisi.....	30
2.3.7. 0,03 M Kalsiyum klorür çözeltisi.....	30
2.3.8. Sodyum aljinat çözeltisi.....	30
2.3.9. N-İzopropil akrilamit çözeltisi.....	30
2.3.10. Poli(N-İzopropil akrilamit) eldesi ve çözeltisi.....	30
2.3.11. Karbodiimit çözeltisi.....	31
2.3.12. N-Hidroksi süksinimit çözeltisi.....	31
2.3.13. Karbodiimit ve N-Hidroksi süksinimit çözeltisi.....	31
2.4. Siringaldazin Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	31
2.5. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Enzim İmmobilizasyonu.....	33
2.5.1. Karbodiimit kullanarak enzim immobilizasyonu.....	33
2.5.2. Hidroksisüksinimit kullanarak enzim immobilizasyonu.....	35
2.5.3. Karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit kullanarak enzim immobilizasyonu.....	36
2.6. Aktiflik Tayini.....	38
2.6.1. Serbest lakkaz enziminin aktiflik tayini.....	38
2.6.2. İmmobilize lakkaz enziminin aktiflik tayini.....	38
2.7. Enzim Aktifliğine pH Etkisi.....	39
2.7.1. Serbest lakkaz enziminin aktifliğine pH etkisi.....	39
2.7.2. İmmobilize edilen lakkazın aktifliğine pH etkisi.....	39
2.8. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	40
2.8.1. Serbest lakkaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	40
2.8.2. İmmobilize enzim aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	40
2.9. Enzim Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi.....	40

2.9.1.Serbest lakkaz enziminin aktifliğine substrat derişiminin Etkisi.....	40
2.9.2.İmmobilize enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	40
2.10.Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	41
2.10.1.Serbest lakkaz enzimine depolama süresinin etkisi.....	41
2.10.2.İmmobilize edilen lakkaz enzimine depolama süresinin etkisi.....	41
2.11.İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi.....	42
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	43
3.1.Serbest Enzim Aktifliğine pH'nın Etkisi.....	43
3.2.İmmobilize Enzim Aktifliğine pH'nın Etkisi.....	44
3.2.1.Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi.....	44
3.2.2.Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi.	46
3.2.3.Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi.....	48
3.2.4.Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi.....	49
3.2.5.Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)- CaAlj hidrojel kürelerine immobilize lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	51
3.2.6.Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)- CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	53
3.3.Serbest Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	55
3.4.İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	57
3.4.1.Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklık etkisi.....	57

3.4.2.Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	58
3.4.3.Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	60
3.4.4.Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	62
3.4.5.Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	63
3.4.6.Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	65
3.5.Serbest Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi.....	67
3.6.İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi.....	69
3.6.1.Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	69
3.6.2.Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	71
3.6.3.Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	72
3.6.4.Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	74
3.6.5.Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	75

3.6.6.Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	77
3.7.Serbest Enzimin Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	78
3.8.İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	80
3.8.1.Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	80
3.8.2.Hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	81
3.8.3.Karbodiimit ve hidrosisüksinimit aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	83
3.8.4.Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	84
3.8.5.Hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	86
3.8.6.Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	87
3.9.İmmobilize Enzim Aktifliğinin Tekrar Kullanım ile Değişimi.....	89
3.9.1.Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerinin tekrar kullanım ile değişimi.....	89
3.9.2.Hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerinin tekrar kullanım ile değişimi.....	91
3.9.3.Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerinin tekrar kullanım ile değişimi.....	92
3.9.4.Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerinin tekrar kullanım ile değişimi.....	94

3.9.5.Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerinin tekrar kullanım ile değişimi.....	95
3.9.6.Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerinin tekrar kullanımla değişimi.....	97
4. SONUÇLARIN DEğERLENDİRİLMESİ.....	100
KAYNAKLAR.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
1.1.	Kovalent bağlanma ile immobilizasyon.....	7
1.2.	(a) β -1,4-D-Mannuronik Asit, (b) α -1,4-L-Gluronik Asit (c) sodyum aljinat'ın kimyasal yapısı.....	12
1.3.	Trametes Versicolor türü mantarın doğadaki görüntüsü.....	15
1.4.	Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması.....	16
1.5.	Siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime.....	17
1.6.	X-ışınları kristalografisiyle görüntülenen <i>Trametes versicolor</i> 'dan elde edilen lakkaz enziminin üç boyutlu yapısı.....	17
2.1.	Siringaldazin kalibrasyon eğrisi.....	31
2.2.	Ca-aljinat kürelerinin elde edilmesi	33
2.3.	Polimerik desteğin karbodiimit ile aktifleştirilmesi ve polimerik desteğe enzim bağlanması.....	33
2.4.	Polimerik desteğin N-hidroksisüksinimit ile aktifleştirilmesi ve polimerik desteğe enzim bağlanması.....	35
2.5.	Polimerik desteğin karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit ile aktifleştirilmesi ve polimerik desteğe enzim bağlanması.....	36
3.1.	Serbest lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi.....	43
3.2.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğinin pH'nın etkisi.....	44
3.3.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi.....	46
3.4.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine pH'nın etkisi.....	47

3.5.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine pH'nın etkisi.....	49
3.6.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi.....	50
3.7.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi.....	52
3.8.	Serbest enzimin aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	54
3.9.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin sıcaklık ile değişimi....	56
3.10.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	57
3.11.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	59
3.12.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	60
3.13.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	62
3.14.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	63
3.15.	Serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği.....	66
3.16.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.....	70
3.17.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.....	72
3.18.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.....	73

3.19.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.....	75
3.20.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.....	76
3.21.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.....	78
3.22.	Serbest enzimin maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi.....	79
3.23.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresi ile değişimi.....	81
3.24.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresi ile değişimi.....	82
3.25.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin depolama süresi ile değişimi.....	84
3.26.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresi ile değişimi.....	85
3.27.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresi ile değişimi.....	87
3.28.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelere immobilize edilen lakkaz aktifliğinin depolama süresi ile değişimi.....	88
3.29.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	90
3.30.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğinin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	92

3.31.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine kullanım sayısı ile değişimi.....	93
3.32.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	95
3.33.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi	96
3.34.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1	İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması..... 9
1.2.	Enzim immobilizasyonun da kullanılan bazı destek materyalleri..... 10
2.1.	Siringaldazin derişimi ile absorbandsın değişimi..... 32
3.1.	Serbest lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi..... 43
3.2.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi..... 45
3.3.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi..... 47
3.4.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine pH'nın etkisi..... 48
3.5.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine pH'nın etkisi..... 50
3.6.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi..... 52
3.7.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi..... 54
3.8.	Serbest enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi..... 56
3.9.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi..... 57
3.10.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi..... 59

3.11.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	61
3.12.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	62
3.13.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	64
3.14.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	65
3.15.	Serbest enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	68
3.16.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	70
3.17.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	71
3.18.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	73
3.19.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	74
3.20.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	76
3.21.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	77
3.22.	Serbest enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	79
3.23.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresi ile değişimi.....	80

3.24.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	82
3.25.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	83
3.26.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	85
3.27.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	86
3.28.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini.....	88
3.29.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	90
3.30.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	91
3.31.	Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	93
3.32.	Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	94
3.33.	Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	96
3.34.	Karbodiimit ve Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	97
3.35.	Deneysel Sonuçlar.....	99

1. GİRİŞ

Günümüzde endüstriyel atıklar çevre ve insan sağlığını tehdit eder durumdadır. Örneğin polisiklik aromatik hidrokarbonlar endüstriyel alanlarda çevreyi en çok kirleten maddeler arasında yer almaktadır ve aldığımız gıdalarda birikip ciddi sağlık problemlerine ve genetik eksikliklere yol açabilmektedir. Fenol içeren bu aromatik bileşikler kömür dönüşüm endüstrisi, petrol rafinerisi, plastik, ağaç koruma, metal kaplama, kağıt, tekstil, boya, tekstil endüstrilerinin atıklarında mevcut olan maddelerdir. Endüstriyel atıkların arıtımı için yapılan fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerin içinde en uygun yöntemlerden birisi de biyoteknolojinin alanı içine giren, doğal enzimlerin kullanılmasıdır. Enzimler suda çözünen spesifik biyolojik katalizörlerdir. Endüstriyel atıklar, genelde sulu çözeltiler olması sebebiyle enzimlerle arıtmaya uygundur. Çok sayıda organik kirleticileri indirgeyen mangan peroksidaz, lignin peroksidaz, lakkaz (fenol oksidaz) gibi enzimleri sentezleyen ligniolitik mantarlar çevre kirleticilere yönelik araştırma çalışmalarında kullanılmaktadır. Polisiklik aromatik hidrokarbonları indirgeme mekanizmasının temeli aromatik zincirin yükseltgenmesidir. Beyaz çürükçül mantarlar çok sayıda organik kirleticiyi, lignin modifiye edici enzimler (Mangan Peroksidaz, Lignin Peroksidaz, Lakkaz (fenol oksidaz)) vasıtasıyla indirgerler. Mantar yetiştirmenin yerine enzim kullanımı, mantar yetiştirmede kültürün metabolik hali, pH ve atık su içeriğindeki değişim gibi fiziksel şartlara ait gereksinimleri gidermiştir. Enzimlerin kullanımını ekonomik ve kullanışlı hale getirme enzimlerle arıtmayı uygun arıtma yöntemleri arasına koyabilir. Eğer enzim sodyum veya kalsiyum aljinat, karragenan, kitosan veya selüloz türevleri gibi bir destek materyali üzerine tutturulursa, enzimin istenildiği zaman ortamdaki uzaklaştırılması ve defalarca kullanımı sağlanarak enzimle arıtma daha ekonomik hale getirilir. Ayrıca üzerine immobilize edilen destek materyalinin ekonomik olması sebebiyle polimerik yapıdan oluşması, suda çözünmemesi, gözenekli yapıda olması, biyolojik, kimyasal, fiziksel ve termal kararlılık gibi özelliklere sahip olmalıdır (1-8).

1. ENZİMLER

1.1. Enzimler

1.1.1. Enzimlerin genel özellikleri

Enzimler kimyasal tepkimelerin hızını artıran protein yapısında biyomoleküllerdir [9,10]. Hemen hemen tüm enzimler proteindir. Enzim tepkimelerinde enzimle tepkime veren moleküllere substrat denir ve enzimler substratları farklı ürünlere dönüştürürler. Enzimlerin etkinlikleri kimyasal katalizörlerden 10^6 – 10^{16} kat daha fazladır. Normal laboratuvar koşullarında yüksek sıcaklık ve fazla enerji gerektiren pek çok tepkime, enzimlerin kullanılmasıyla daha düşük sıcaklıkta ve daha düşük enerji ile gerçekleştirilebilir (11).

1.1.2. Enzimlerin çalışmasını etkileyen faktörler

Protein yapısında olan enzimlerin çalışmasını etkileyen faktörler

a) Enzim derişimi

Tepkime ortamında yeterli miktarda substrat varlığıyla tepkimenin hızı, enzim derişimi ile doğru orantılı olarak artar.

b) Substrat derişimi

Substrat derişimiyle enzimlerin aktivitesi doğru orantılıdır.

c) Sıcaklık

Sıcaklığın düşmesiyle tepkime hızı yavaşlar, sıcaklığın artmasıyla tepkime hızı artar fakat her enzime göre değişen belirli bir sıcaklıktan sonra protein yapısına sahip enzimin yapısı bozulur.

d) Ortam pH'sı

Her enzimin en iyi çalıştığı bir pH aralığı vardır. Bu aralık genellikle nötrale yakın değerler olduğu halde asidik veya bazikde olabilir.

e) Ortamdaki su miktarı

Sulu ortamda etkili olan enzimler su miktarının yaklaşık %18'in altında olduğu ortamlarda çalışmaz.

f) İnhibitörler (engelleyiciler)

Substratlara çok benzeyen, enzimlerle birleşerek enzim tepkimelerini yavaşlatan veya engelleyen maddelere inhibitörler denir. İnhibitörlerin bazıları antibiyotiklerin vücuttaki etki mekanizmasında olduğu gibi enzimlerle birleşip parçalanmasına neden olurlar. Bazıları ise zirai ilaçlar, ilaçlar, antibiyotikler, siyanür, arsenik, yılan zehiri, akrep zehiri, arı zehiri, kurşun ve civa gibi ağır metallerde bulunur ve enzimin substratını bozar.

g) Aktivatörler (aktifleştiriciler)

Enzimlerin tepkimelerini hızlandıran inorganik veya organik maddelere aktivatör denir. Aktivatörler, enzimin substrat ile birleşmesini kolaylaştırarak veya enzimin aktif yüzeyini daha da aktif hale getirerek tepkime hızını artırır.

h) Substrat yüzeyi

Substrat yüzeyi arttıkça enzimin etki hızı artar (11).

1.1.3. Enzimlerin uygulama alanları

Enzimler spesifik oluşları ve çok düşük derişimlerde bile substrat tepkimelerini katalizlemelerinden dolayı sanayide önemli kullanım alanlarına sahiptirler.

Tıp, eczacılık, çevre, gıda, kâğıt, tekstil, deterjan, tarım, hayvancılık gibi birçok alanda enzimler kullanılmaktadır. Son yıllarda biyoteknoloji alanında elde edilen gelişmelerle enzimlerin uygulama alanı artmıştır.

Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %30-35'i deterjan sanayisinde kullanılır. Örneğin, proteazlar giysilerden protein lekelerinin çıkarılması için ve enfeksiyon olmaması için lenslerdeki proteinleri çıkarmak için, amilazlar bulaşık makinası deterjanlarında, dayanıklı nişasta lekelerinin çıkarılmasında, lipazlar yağ lekelerinin çıkartılmasını kolaylaştırmak için, selülazlar çamaşır yumuşatıcılarında kullanılır.

%20-25'i nişasta ile ilgili alanlarda kullanılır. Örneğin, bebek gıdalarında tripsin, amilazlar, amiloglukosidazlar ve glukoamilazlar, nişastayı glikoza ve çeşitli şuruplara dönüştürmede kullanılır.

% 20'si süt ve süt ürünleri sanayinde kullanılmaktadır. Örneğin, rennin peynir üretimi, proteinin hidrolizi için, mikroplar tarafından üretilmiş enzim süt endüstrisinde, lipazlar mavi küflü rokfor peynirinin üretimi sırasında peynirin olgunlaşmasında, laktaz laktozu glukoz ve galaktoza parçalar.

%1-20 arasında değişen oranlarda ise bira yapımında örneğin, arpa enzimleri, amiloglukozidaz ve pullulanazlar düşük kalorili bira yapımı ve fermantasyonun ayarlanmasında, betaglukanazlar ve arabinoksilanazlar arpa bulamacını ve biranın filtrelene özelliğini iyileştirirler, proteazlar biranın saklanması sırasında oluşan bulanıklığın giderilmesi, amilaz, glukanaaz, proteazlar malttaki polisakkarit ve proteinleri parçalarlar.

Meyve suyu sanayisinde, selülazlar ve pektinazlar meyve sularının berraklaştırılmasında kullanılır.

Unlu mamüller sanayisinde, fungal alfa-amilaz enzimleri unlu mamüller yapımında kullanılır.

Biyoyakıt sanayisinde, selülazlar selülozik etanol elde etmek için, selülozu fermente edilebilir şekerlere parçalamak için kullanılır.

Kağıt sanayisinde, amilaz, ksilanaz, selülaz ve ligninazlar kullanılır.

Biyoteknolojik arıtmada, ligninazlar (MnP, LiP, Lakkaz) kullanılır.

Genetik mühendisliğinde, farmakoloji, tarım ve tıpta restriksiyon enzimleri, DNA ligaz ve polimerazlar DNA'nın manipülasyonu için kullanılır. Restriksiyon sindirimi ve polimeraz zincir tepkimeleri için esastır.

Tekstil sanayisinde bakteriyel amilaz dokumadan önce nişasta banyosuna batırılan ipliklerden nişastanın uzaklaştırılmasında kullanılır.

Deri sanayisinde, mikrobiyal tripsin deriden tüy veya kılların uzaklaştırılmasında kullanılır.

Tıp alanında, tripsin kan pıhtılarının eritilmesinde ve yaraların temizlenmesinde kullanılmaktadırlar (11,12).

1.2. Enzimlerin İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon, enzimlerin ya da mikroorganizmaların katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara tutturulması olarak tanımlanır. Enzimlerin, tepkimeleri spesifik ve yüksek bir hızla katalizlemelerinden faydalanmak amacıyla onları canlı organizma dışında kullanabilmek düşüncesi bilim adamlarını harekete geçirmiştir. İlk olarak 1916 yılında Nelson ve Grifin sakkarozu hidroliz etmek için maya invertazını mangal kömürüne adsorbe etmişlerdir. İmmobilize enzim sistemlerinin pratik olarak ilk kullanımı ise 1954 yılında Grobhofer ve Scheilth tarafından yapılmıştır. Araştırmalarında; karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz enzimlerini poliaminostiren reçinesine kovalent bağlanma ile immobilize etmişler ve bu immobilize enzim türevlerinin kinetik parametrelerini incelemişlerdir (13-15).

Özel teknikler gerektirdiğinden dolayı enzim saflaştırılması maliyeti yüksek olan serbest enzimin aktifliğini kaybetmeden istenildiği anda tepkime ortamından uzaklaştırılması güçtür. Bu durum pahalı olan enzimlerin tekrar tekrar kullanılmasına engel olur. İstenildiği anda ortamdaki uzaklaştırmayı sağlamak için immobilize enzimlerin son yıllarda kullanımı artmıştır (15).

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre avantajları;

1. Tepkime sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilmesi.
2. Uzun süre kullanılabilirliği.
3. Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı dayanıklı olması.
4. Doğal enzime göre daha kararlı olması.
5. Ürün oluşumu esnasında kontrol imkanı vermesi.
6. Ardışık tepkimeler için uygunluğu.
7. Sürekli proseslere uygulanabilirliği.
8. Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığının azalması (13,14).

1.2.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri basitçe kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir (16).

1) Kimyasal yöntemler

a) Kovalent bağlama

b) Çapraz bağlama

2) Fiziksel yöntemler

a) Adsorpsiyon ile immobilizasyon

b) Hapsetme ile immobilizasyon

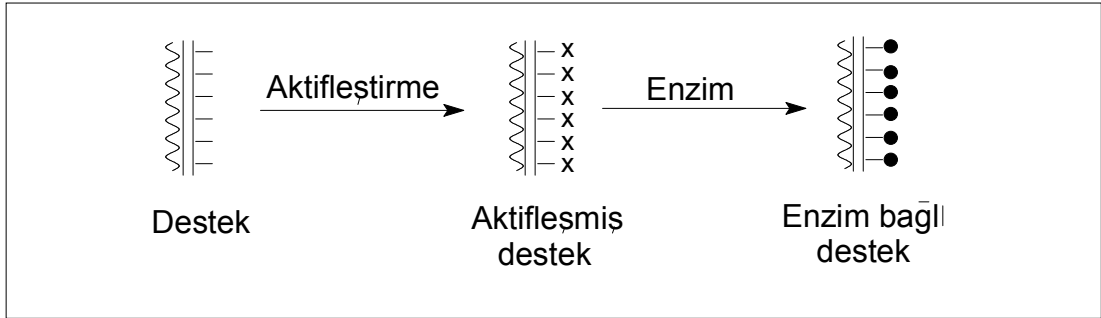
-Mikro kapsül ile hapsetme yöntemi

-Kafes tipi hapsetme yöntemi

1.2.2. Kovalent bağlanmayla immobilizasyon

Enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlayan, çözeltiliye geçmesini engelleyen kovalent bağlanma yöntemi çok sık kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır ve enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşturulur. Enzim immobilizasyonunda, enzimin özellikleri, pH, sıcaklık, aktif ucun yapısı ve organik çözücüler gibi faktörlerden dolayı sınırlı sayıda yöntem kullanılabilir (17-19).

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Bu basamaklar destek maddesinin aktifleştirilmesi ve enzimin kovalent bağlanması şeklindedir. Destek maddesi; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar taşımalı ve fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak glutaraldehit, karbodiimit, N-Hidroksisüksinimit, siyanojen bromür, epiklorhidrin, siyanürik klorür gibi değişik aktifleyici maddeler kullanılabilir.



Şekil 1.1. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon

Yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması nedeniyle her türlü ortamda kullanılması ve enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile temasının kolay olması ve ayrıca, enzim molekülü ve destek materyalinin birlikte ısı kararlılık göstermesidir. Kovalent bağlama yönteminin

dezavantajı ise destek materyali ile enzim arasında sıkı etkileşimin enzimin doğal konformasyonunu bozmasıdır (20).

1.2.3. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Her immobilizasyon yönteminin uygulama şartlarına göre avantajları ve dezavantajları vardır. Bu nedenle immobilizasyon işlemi sırasında veya sonrası aktif merkezin zarar görmeyeceği bir yöntem seçilmelidir. Seçimin uygun olabilmesi için enzimin yapısının iyi bilinmesi gerekir (21,22). Çizelge 1.1'de immobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

Karakteristik	Kovalent Bağlama	Adsorbsiyon	Çapraz Bağlama	Tutuklama
Destek Maddesi	Agaroz Selüloz PVC İyon değiştirici reçine Gözenekli cam	İyon değiştirici reçine Aktif kömür Slika jel Kil Gözenekli cam	Fonksiyonel olarak inert proteinler	Aljinat Karageenan Kolojen Poliakrilamid Jelatin Silikon kauçuk poliüretan
Bağlanmanın Doğası	Kimyasal bağlanma	Tersinir, pH'a göre değişken, iyonik şiddetin yüksek olması ile enzim ayrılabilir	Gluteraldehit Bisizosiyanat Bisdiazobenzidin ile çapraz bağlanma	Fiziksel hapsetme
Hazırlama	Zor	Kolay	Orta	Zor
Enzim Aktivitesi	Yüksek	Orta	Düşük	Düşük
Substrat Spesifikliği	Değişebilir	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
Rejenerasyon	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	Nadiren	Mümkün	İmkansız	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Yüksek	Düşük	Orta	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Orta	Düşük	Düşük	Yüksek

1.2.4. Enzim destek materyali

Enzim immobilizasyonunda destek olarak kullanılan bazı destek materyalleri Çizelge 1.2'de verilmiştir (23).

Çizelge 1.2. Enzim immobilizasyonun da kullanılan bazı destek materyalleri

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

Enzim destek materyalinde aranan nitelikler

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Mekanik ısı kararlılığı ve uygun partikül formu,
- Kimyasal ve termal ısı kararlılığı,
- Kovalent bağlamada kullanılacak destekler yumuşak koşullarda tepkime verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik.

Destek materyaline bağlanmada enzim molekülünün protein yapısından yararlanır. Enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar bağlanmada etkilidir (17).

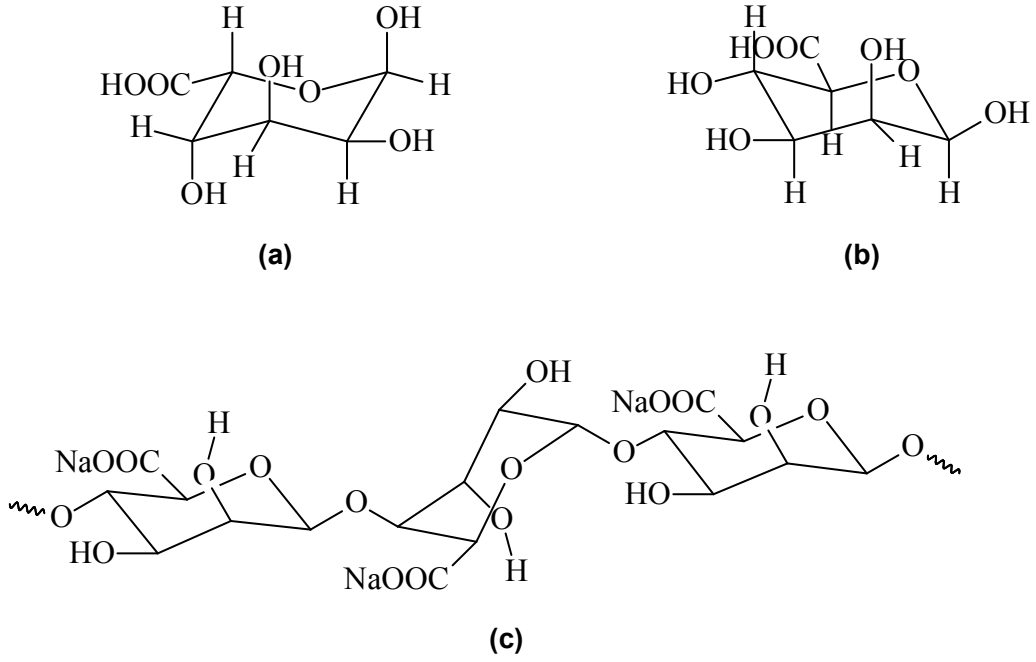
1.2.5. Sodyum aljinat

Aljinik asit 1881 yılında, Stanford tarafından kahverengi su yosunlarından (İrlanda yosunu) ekstraksiyonla elde edilmiştir (14). Kahverengi alglerin hücre duvarlarında bulunan lineer asidik bir polisakkarit olan aljinik asidin elde edildiği belli başlı algler aşağıda verilmiştir. Bu yosunlardaki aljinik asit içeriği %20-40 arasında değişmekle birlikte, hücre zarının temel bileşenini oluşturur (24).

- *Laminariales,*
- *Fucales,*
- *Eisenia bicyclis,*
- *Ecklonia,*
- *Ascophyllum,*
- *L. Digitata,*
- *L. Cloustoni,*
- *Macrocystis pyrifera,*
- *Lessonia,*

Aljinik asit, üronik asidin β -1.4-D-Mannuronik Asit (M) ve α -1.4-L-Gluronik Asit (G) in iki türünün birleşmesiyle meydana gelen heteroblok bir kopolimerdir. Bütün aljinat moleküllerinde her iki homopolimerik sıra birlikte bulunur. Mannuronik asit-gluronik asit oranı (M/G) türe, mevsime ve algin yetiştiği ortama göre değişmektedir. G bloğu oranı yüksek olan aljinatlar basınca dayanıklı ve kırılğan iken G bloğu düşük aljinatlar basınca az dayanıklı ve esnek karakterlidirler (25-27).

Genellikle sodyum, potasyum, amonyum tuzları ve propilen glikol esteri şeklinde bulunan aljinik asitin ve kalsiyum aljinatın sudaki çözünürlüğü son derece sınırlı iken, sodyum, potasyum, amonyum tuzları ile propilen glikol esteri suda kolaylıkla çözünebilirler. Sodyum aljinat, kokusuz tatsız beyaz hafif bir toz olup suda çözüldüğünde viskoz kolloidal bir çözelti oluşturur.



Şekil 1.2. (a) β -1,4-D-Mannuronik Asit

(b) α -1,4-L-Gluronik Asit

(c) Sodyum aljinat ın kimyasal yapısı

Aljinatın yüksek molekül kütlesi, suda çözünürlüğünün iyi olması ve biyoyumluluğu nedeniyle, gıda endüstrisinde stabilizatör ve koyulaştırıcı olarak kullanıldığı gibi, kozmetik, kağıt, plastik ve ilaç endüstrisinde sık sık kullanılmaktadır. Ayrıca aljinatın iki değerlikli metal çözeltileri içerisine damlatılmasıyla meydana getirilen Ca-aljinat küreleri, ağır metal içeren atık suların arıtılması çalışmalarında enzim immobilize edilerek kullanılmaktadır (27-29).

1.2.6. Poli vinil alkol (PVA)

Molekül formülü $(C_2H_4O)_n$, Molekül kütlesi 85 000-124 000 g/mol aralığında ve yoğunluğu 1,269 g/ml' dir. Poli vinil alkol çeşitli enzim ve hücrelerin immobilizasyonu için sıklıkla matriks olarak kullanılır. Poli vinil alkol

mükemmel bir film oluşturucu, emilsiyonlaştırıcı ve yapıştırıcı özelliğe sahiptir. Aynı zamanda yağa, yağlanmaya ve çözücüye karşı dirençli, kokusuz, toksik olmayan, yüksek gerilme direnci, oksijen ve aromaya karşı bariyer gibi özellikleri, yüksek nem absorblama özelliğine bağlıdır. Erime noktası 230°C'dur. PVA kullanım kolaylığı, düşük fiyat, yüzeyindeki hidrofilik karakter ve hidroksi guruplarından dolayı kimyasal tepkime yeteneğinden dolayı, çeşitli enzim ve hücrelerin immobilizasyonunda matriks olarak sıklıkla kullanılır. Kimyasal yapısı polimer zincirine ilgisinden veya benzemesinden dolayı protein kararlığına neden olur. Poli vinil alkolün en geniş kullanımını poli vinil büteral hazırlanması için Amerika'da kullanılır. Çin'de polimerleştirmede yardımcı madde olarak geniş bir pazara sahiptir. Japonya'da vinilon fiber üretiminde önemli kullanıma sahiptir.

Bazı kullanım alanları;

1. Lateks boyalarda yapışkan ve kalınlaştırıcı malzeme olarak, kağıt kaplamacılığında, astar olarak, sağ spreyi, şampuan ve tutkal olarak kullanılır.
2. Polietilen tereftalat şişelerinde karbondioksit bariyeri olarak kullanılır.
3. Yüzey aktif madde olarak polimer kapsüllü nano küreler oluşturulmasında kullanılır.
4. Kimyasallara karşı koruyucu eldiven yapımında kullanılır.
5. Paketlemede suda çözünebilir film olarak kullanışlıdır.
6. Betonda destekleme materyali olarak kullanılır.
7. İyotla karıştırılıp polarize ışığın titreşim düzlemini değiştiren madde yapımında kullanılır.
8. Epoksi gibi yapışmayan materyallerin yumuşatılmasında kullanılır.
9. Göz damlalarında ve sert kontak lenslerde yağlayıcı olarak kullanılır.
10. Medikal uygulamalarda tampon madde olarak kullanılır (30,31).

1.2.7. Poli (N-İzo propil akrilamit) (P-NİPA)

Molekül formülü [H₂C-CH-CO-NH-CH(CH₃)₂]_n. Sıcaklığa duyarlı polimer P-NİPA ilk olarak 1950 yılında sentezlenmiştir. P(NİPA) sıcaklık ve pH hassasiyetinden dolayı biyolojik olarak aktif sistemlerde (protein konjugasyonunda) katyonu aktif çözülebilir polimer olarak su ve fizyolojisine uygun ortamlarda kullanılır. P-NİPA'nın kenar zincirlerindeki hidrofilik amid gurupları ve hidrofobik izopropil guruplarından dolayı çarpaz bağlı şişmiş hidrojel oluşturur. P-NİPA hidrojel sulu çözeltide, hızlı ve dönüşebilir hidrasyon-dehidrasyon değişimini Kritik Çözelti Sıcaklığına yakın küçük sıcaklık değişimlerinde gösterir. Kritik Çözelti Sıcaklığının altında hidrojel şişerken, üzerindeki sıcaklıkta ise hidrojel büzülür ve bozulmuş suyu gitmiş hidrofobik bir hal oluşur. Bunun sebebi ise network yapıdaki hidrofilik-hidrofobik dengenin bozulmasından dolayıdır. Sıcaklığa hassas P-NİPA hidrojel immunoassay uygulamalarında, ilaç ulaştırma sistemlerinde, ayırma işlemlerinde ve enzimlerin immobilizasyonunda kullanışlı bir maddedir. Bu uygulamalarda şişme tarzı ve mekaniksel kuvvet önemlidir. Hidrojel şişme derecesi; hidrojel doğasına, şiştiği ortama ve çarpaz bağlanma yoğunluğuna bağlıdır (32-42).

1.3.Lakkaz

1.3.1. Lakkazın doğada bulunuşu

Trametes versicolor veya *Coriolus versicolor* adıyla bilinen polyporaceae grubuna ait mantarlar lakkaz enzimini üretirler. Yüzeyi ince tüylü ve bulunduğu çevreye göre farklı renkler alan bu mantar hindi kuyruğuna benzeyen yapıda olup dünyada çok yaygın olup odun çürütücüsüdür. İlkbahar ve sonbaharda ağaç kütüklerinde toplu olarak çıkar (Şekil 1.3) (43).

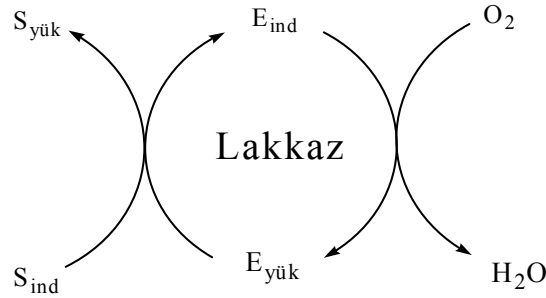


Şekil 1.3. *Trametes versicolor* türü mantarın doğadaki görüntüsü (44).

1.3.2. Lakkaz enzimi ve özellikleri

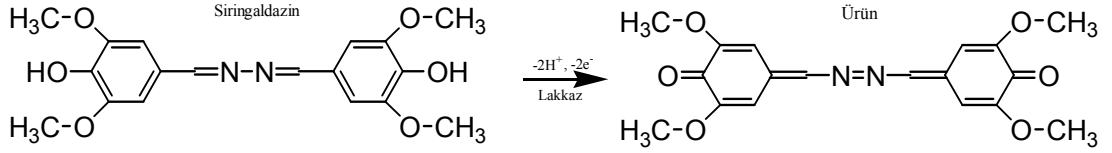
Beyaz çürükçül mantarlardan elde edilen (*Trametes versicolor* E.C.1.10.3.2.) lakkaz enzimi, her molekülü dört bakır iyonu taşıyan bir oksidoredüktazdır. Yaklaşık 500 amino asitten oluşup çoğu 55-85 kDa molekül kütlesine sahiptir. Lakkaz enzimi bilinen en eski enzimlerdendir, ilk olarak 1883 yılında Yoshida tarafından, *Rhus vernicifera*'nın öz suyundan izole edilmiştir. Optimum pH aralığı 3,0-7,5 ve optimum sıcaklık aralığı 40-80°C'dur. Lakkaz enziminin optimum pH değeri kullanılan substrata göre değişmektedir. Lakkaz redoks enzimlerinin bir alt sınıfıdır. Karbohidraz ve proteazlar gibi hidrolitik enzimlerinin substrat özgünlüğünün aksine redoks enzimlerinin substrat özgünlüğü oldukça azdır (45,46) .

Lakkaz enzimi kaynağından, molekül kütlesi, optimum pH, substrat özgünlüğü gibi özellikleri farklı olan türde elde edilebilir. Lakkaz enzimi bakteriler, böcekler, yüksek yapılı bitkiler ve mantarlardan üretilmektedir. Lakkazın elde edildiği mantar türüne *Trametes versicolor*, *Rhus vernicifera*, *Trametes hirsuta*, *Panus tigrinus*, *Flavodon flavus*, *Agaricus bisporus* örnek olarak verilebilir. Bunlardan beyaz çürükçül mantarlar daha çok kullanılmaktadır. Lakkaz enzimi, glikoprotein yapısındadır. Enzimin karbonhidrat miktarı, ağırlıkça %15-45'ini oluşturur. Enzim heksozamin, glukoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve arabinoz gibi karbonhidratları içerir (46-48). Lakkaz enzimi, aromatik substratı oksitlerken, aynı zamanda oksijen molekülünün suya indirgenmesini katalizler (Şekil 1.4.) (49). Lakkazın aktif bölgesinde hidratlanmış elektron, oksijen ve değişik tiplerde bakır atomları bulunur.

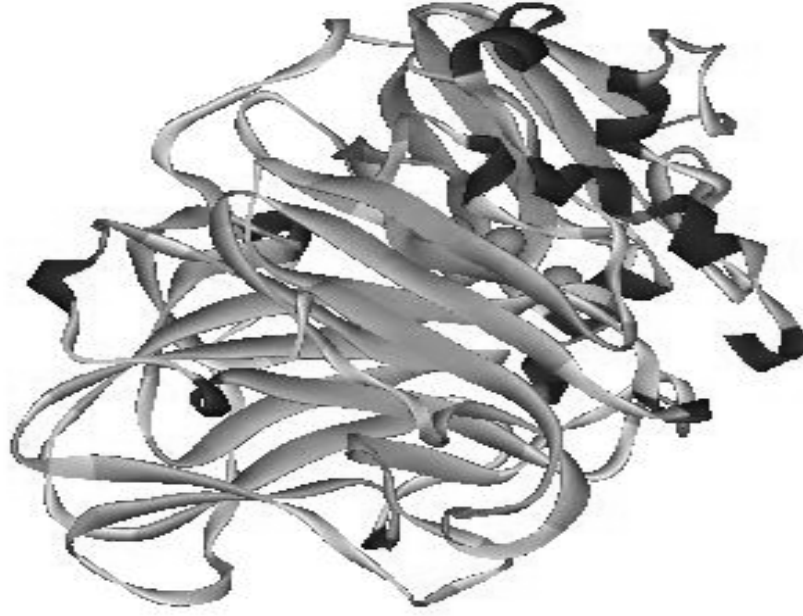


Şekil 1.4. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması

Lakkaz enzimi 4-benzendiol, siringaldazin, naftol, diklorofenol, metoksifenol, askorbat, pirogallol, kresol, syringic asit vb. türevleri gibi geniş bir aralıktaki substratlarla tepkime vermektedir (50). Genel olarak fenoller, amino fenoller ve aromatik diaminler ile benzer özellikler gösteren substratlar, lakkaz enzimi tarafından oksitlenebilir (51). Şekil 1.3'de siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime ve sonuçta oluşan ürün gösterilmektedir (52). Şekil 1.6'da X-ışınları kristalografisiyle görüntülenen *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enziminin üç boyutlu yapısı gösterilmiştir (53).



Şekil 1.5. Siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime



Şekil 1.6. X-ışınları kristalografisiyle görüntülenen *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enziminin üç boyutlu yapısı

1.3.3. Siringaldazin

$C_{18}H_{20}N_2O_6$ kapalı formülüne sahip siringaldazin (4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin) molekül kütlesi 360,3 g/mol'dür. Yapısal özelliklerinin benzerliğinden dolayı genel olarak fenoller, amino fenoller ve aromatik diaminler ile benzer özellikler gösterip lakkaz enzimi tarafından kolayca oksitlenebilir (51).

1.3.4. Lakkazın uygulama alanları

Beyaz çürükçül mantarların ve onlardan elde edilen enzimlerin kullanıldığı alanlar;

1. Fabrikalardan çıkan atık suların renginin giderilmesinde ve toksisitesinin azaltılmasında (54,55).
1. Lignin parçalanması amacıyla kağıt ve kağıt hamuru üreten endüstrilerde (56,57).
2. Biosensör olarak nanobiyoteknoloji alanında (58).
3. Ağır metallerin biyolojik adsorpsiyonunda (59).
5. Pestisid ve herbisid'lerin biyolojik yıkımında (5).
6. Enzim üretiminde (60).
7. Mikrobiyal protein kaynağı olarak (61).
8. Hormon üretiminde (62).
9. Katalizör olarak Anti-kanser ilaçlarının üretiminde (63).

1.3.5. Lakkaz enziminin immobilizasyonu ile yapılan çalışmalar

1995 yılında Rogalski vd. (64) *Phlebia radiata*'dan elde edilen lakkazı α -aminopropil-trietoksisilanla aktive edilmiş gözenekli cam üzerine kovalent bağlayarak immobilize etmişlerdir. Enzimin bağlanma kapasitesini %98 ve immobilize enzimin aktifliğini %96 olarak bulmuşlardır. Immobilize enzimin 4°C'de iki hafta depolandığında aktifliğini %100 koruduğunu belirtmişlerdir.

1997 yılında Piacquadio vd. (65) *Polyporus versicolor*'dan elde edilen lakkazı yenilenebilir Cu^{2+} kelatlarına immobilize ederek elma suyundan fenolün giderilmesi üzerine çalışmışlardır.

1998 yılında Luterek vd.(66) *Cerrena unicolor*'dan elde edilen lakkazı silanlanmış gözenekli cam küreler üzerine immobilize etmişler ve substrat olarak siringaldazin kullanıp enzimin bağlanma kapasitesini %94, immobilize enzim aktifliğini %100, immobilizasyonla optimum pH'nın 5,5 den 5,7'ye kaydığını belirtmişlerdir. Immobilize enzimin 7 ay 4°C'da saklandığında aktifliğinin %95'ini, aynı şartlardaki serbest enzimin aktifliğinin %40'ını koruduğunu tespit etmişlerdir.

1999 yılında Rogalski vd.(67). *Cerrena unicolor*'dan elde edilen lakkazı, gözenekli cam yüzeyini iki polisakkarit tabakası ile kaplayıp çapraz bağlanmış, γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES) ile aktivasyonundan sonra DEAE dekstran oluşturup bu matrikse kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Substrat olarak siringaldazin kullanmışlardır. Değişik pH ve sıcaklıktaki aktiviteleri incelemişler ve immobilize enzimin organik çözücülerde aktivitesinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

1999 yılında D'Annibale vd.(68) zeytinyağı fabrikalarından çıkan atık sulardaki fenollerin uzaklaştırılması üzerine yaptıkları çalışmada *Lentinula edodes*'ten elde edilen lakkazı glutaraldehit ile çapraz bağlanma ve adsorpsiyon yöntemini kullanarak kitosan üzerine immobilize etmişler, substrat olarak DMP (2,6-dimetoksifenol) kullanmışlardır. Optimum pH'sı serbest ve immobilize enzim için 4,0, optimum sıcaklıkları ise sırasıyla 50°C ve 60°C, K_m değerlerini 77 μ M ve 256 μ M olarak bulunmuştur.

1999 yılında Reyes vd.(69) *Coriolopsis gallica*'dan elde edilen lakkazı aktifleştirilmiş agaroz üzerine immobilize etmişler ve hidroksibenzotriazolle kullanımının, rengi giderilen tekstil boyası çeşitliliğini ve boyanın rengini giderme hızını artırması üzerinde çalışmışlardır.

2000 yılında Lante vd.(70) atık sulardaki farklı fenol türevlerini uzaklaştırma üzerine yaptıkları çalışmada adsorpsiyon yöntemi ile polietersülfon membrana *Pterotus ostreatus*'dan elde edilen lakkazı immobilize etmişlerdir. Siringaldazin substratını kullanarak serbest enzim için optimum pH 6,3

immobilize enzim için ise pH 6,6, optimum sıcaklık serbest enzim için 40°C, immobilize enzim için ise 35°C olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin bağlanma kapasitesini %40 ve 32°C'da immobilize enzimin serbest enzime göre %18 daha aktif olduğunu bulmuşlardır.

2000 yılında Krastanov(71), *Pyricularia oryzae*'den elde edilen lakkaz ve tyrosinazın mikroperl üzerine immobilize edilip karışımlardan fenol kaldırılması üzerine çalışmıştır.

2000 yılında Hublik vd.(72) fenolik kirliliklerin giderilmesi üzerine yaptıkları çalışmada eupergit üzerine *Plerotus ostreatus*'dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Substrat olarak, siringaldazin, ABTS, fenol ve DMP substratlarını kullanmışlardır. pH 5,8, 50°C'da 40mM fosfat tamponunda siringaldazin substratı ile lakkazın en yüksek oksidasyonunu gösterdiğini ve immobilize lakkazın 25°C'da 10 gün boyunca depolandığında %2 oranında aktifliğini kaybettiğini tespit etmişlerdir.

2000 yılında Ruiz vd.(73) *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazı, cam, cam tozu, silikajel ve naylon 66 membranlarına kurutma yoluyla immobilize ederek dietil eter, etil asetat ve metilen klorit gibi organik çözücülerde aktifliğini ve stabilitesini geliştirmek üzerine çalışmışlardır. Organik çözücülerde naylon-66 membranına immobilize edilen lakkazın yüksek aktifliğinin engellendiğini tespit etmişlerdir.

2001 yılında Freire vd.(49) adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile aktifleştirilmiş karbon fiber mikro elektrotlar üzerine *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazı immobilize etmişlerdir. Substrat olarak katekol kullanmış ve optimum pH'sı 5,0 olarak bulmuşlardır. 2 ay boyunca immobilize lakkazın aktifliğini koruduğunu tespit etmişlerdir.

2001 yılında Leontievsky vd.(74), *Coriolus versicolor*'dan elde edilen lakkazı Celite R-637 üzerine glutraldehit kullanarak kovalent bağlama ile immobilize ederek toksik ve çevreye zararlı kimyasallardan biri olan 2,4,6-

trichlorophenol'ü toksik olmayan maddelere dönüştürülmesi üzerine çalışmışlardır.

2002 yılında Al-Adhami vd.(75) DEAE-Granocel 500, CM-Granocel ve akrilik taşıyıcılara üç farklı beyaz çürükçül mantardan (*Trametes versicolor*, *Cerrena unicolor* ve *Heterobasidin annosun*) elde ettikleri lakkazı kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. Siringaldazin substratı kullanarak *Cerrena unicolor*'dan elde edilen lakkazın optimum pH'sı 5,2, DEAE-Granocel üzerine immobilize edilmiş lakkaz için optimum pH'sı 5,0, optimum sıcaklığı ise serbest enzim için 40°C ve immobilize enzim için 55°C olarak bulmuşlardır. İmmobilize lakkazın 4°C'da 4 ay depolandığında aktifliğinin %90'ını koruduğunu bulmuşlardır.

2002 yılında Yinghui vd.(76) N-hidroksisüksimid ile aktifleştirilmiş karboksillenmiş polivinil alkole kovalent bağlama ile *Panus conchatus*'tan elde edilen lakkazı, immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon için optimum pH'sı 3,2 ve sıcaklığı 40°C ve immobilize lakkazın 10 kez kullanımda aktifliğinin %60'ını koruduğunu tespit etmişlerdir.

2003 yılında Zille vd.(77) *Trametes villosa*'dan elde edilen lakkazı alumina üzerine immobilize ederek tekstil alanında kullanılan Reactive Black 5 boya atığının giderilmesi üzerinde çalışmışlardır

2003 yılında Zamora vd.(78) çeşitli boyar maddelerin renk giderimi üzerine yapılan çalışmada silikalı destek materyallerine *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazı kovalent bağlama ve adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir.

2004 yılında Quan vd.(51), yaptıkları çalışmada silan ile modifiye edilmiş platin elektrot üzerine *Corilus hirsutus*'dan elde edilen lakkazı kovalent bağlama yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Başka bir çalışmalarında ise lakkazı camı karbon elektrot üzerine kovalent bağlayarak immobilize etmişlerdir. Platin elektrot üzerine immobilize edilmiş lakkazın optimum

sıcaklığını 60°C olarak belirlemişlerdir. Substrat olarak ABTS, PPD (p-fenilendiamin) ve PAP (p-aminofenol) kullanıldığında optimum pH'ları sırasıyla 3,5, 6,0 ve 5,0-5,5 olarak bulmuşlardır.

2004 yılında Dodor vd.(79) polisiklik aromatik hidrokarbonlar; piren, benzopiren, benzoantrasen gibi maddelerin uzaklaştırması için yapılan çalışmalarında kaolinit üzerine *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazı immobilize etmişler, immobilize enzim için optimum pH'sı 4,5 olarak belirlemişlerdir. Asidik bileşiklerde serbest enzimin aktifliğinin %97'den fazlasını kaybettiğini, immobilize enzimin aktifliğinin ise %40'ından fazlasının korunduğunu ve serbest enziminin optimum sıcaklığının 40°C, immobilize enzimin ise 60°C olduğunu bulmuşlardır. 4°C'da 4 ay depolandığında serbest enzimin aktifliğinin %90'ını koruduğunu, immobilize enzimde ise 4°C'da 90 gün depolama sonunda aktifliğinde kayıp olmadığını bulmuşlardır. ABTS (2,2'-azinobis-3-metilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanıldığında K_m değerini serbest enzim için 0,262 mM, immobilize enzim için 0,165 mM olarak bulmuşlardır.

2004 yılında Quan vd.(80) DeniLite'den elde edilen lakkazın platin elektroda immobilize edilerek, hastalık sırasında vücut sıvısında derişimin yükselmesi değişik hastalıkların göstergesi olan katekolamin ve katekolün amperometrik olarak belirlenmesi üzerine çalışmışlardır.

2004 yılında Quan vd.(81) aktifleştirilmiş platin elektrot üzerine lakkazı kovalent bağlayıp, biyosensör olarak kullanmış ve karakterizasyonunu incelemişlerdir. Platin yüzeyine immobilize edilmiş lakkazın K_m sabitini 85µM olarak bulmuşlardır.

2004 yılında Kandelbauer vd.(82), *Trametes modesta*'dan elde edilen lakkaz enzimin alüminyum oksit topraklarının üzerine immobilize edilip tekstil boyalarının giderilmesi online olarak spektroskopik takibinin yapılması üzerine çalışmışlardır.

2005 yılında Delanoy vd.(83) *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazın farklı miktarlarda konjugasyonu ile elde edilen konjuge lakkazların aktivitelerine pH ve sıcaklığın etkisini inceleyip, kinetik parametreleri belirtmişlerdir.

2005 yılında Dominguez vd.(84) aljinat kürelerine immobilize edilen *Trametes hirsuta*'dan oluşan lakkazın boyaların rengini gidermesini incelemişlerdir.

2005 yılında Solna vd.(85) fenolik bileşikleri belirlemek için *Trametes hirsuta*'dan elde edilmiş lakkazın polimer matrislere immobilize edilerek bir amperometrik biyosensör olarak kullanımı üzerinde çalışmışlardır.

2005 yılında Aroujo vd.(86), beyaz şarapta istenilmeyen fenolik bileşiklerin giderilmesi için yaptığı bir çalışmada adsorpsiyon yöntemi ile kitosan üzerine *Pleureatus ostreatus*, *Botryosphaeria sp*'den elde edilen lakkazı ve *Aspergillus sp*'den elde edilen ticari lakkazı immobilize etmişler, ABTS ve DMP olarak iki substrat kullanarak enzim aktifliğini araştırmışlardır. 1,0 mg/ml *Botryosphaeria sp*'den elde edilen enzimatik lakkaz ve 1 g destek kullanarak en yüksek aktifliğe ulaşmışlardır.

2006 yılında Xiao vd.(87) gutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile amin sonlu nanokompozitler (Cu TPAc)-Fe₃ O₄, bakır tetraamin ftalosiyanın) üzerine iki basamaklı tepkime üzerinden *Pcynoporus sanguineus*'dan elde edilen lakkazı immobilize etmişlerdir. İlk aşamada çapraz bağlanma koşulları ikinci aşamada ise enzimin nanokompozitlere kovalent bağlanması koşulları incelenmiştir. Lakkazın 5 kez art arda kullanımıyla aktifliğinin %80'ini koruduğunu belirtmişlerdir.

2006 yılında Zawisza vd.(88) hidrofilik silika filmlerinde immobilize edilen lakkazın biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerinin serbest lakkazla aynı olduğunu buldukları çalışmada altın elektrotlar üzerine biriktirilen terametoksilan'dan oluşturulan ince hidrofilik silika jelde mikrokapsülleme yöntemi ile *Cerreana unicolor*'dan elde edilen lakkazı immobilize etmişlerdir.

İmmobilize enzimin maksimum performans gösterdiği pH aralığı 4,2 – 5,2, sıcaklığı aralığı ise 40 – 50°C olarak bulunduğunu belirtmişlerdir.

2006 yılında Yang vd.(89) glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünen kitosan, kitosan mikroküreler ve Fe⁺³ geçiş metali kelatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile *Rhus vernicifera*'dan elde edilen lakkazı immobilize etmişlerdir. Substrat olarak ABTS, hidrosibenzotriazol (HBT), 3-hidroksiantranilik asit kullanmışlar. Kitosan üzerinde %56 immobilizasyon, mikroküreler üzerinde ise %70 immobilizasyon tespit etmişlerdir. İmmobilize lakkaz için optimum pH'sı 8,0, optimum sıcaklığı ise 45°C olarak bulmuşlardır. 4°C'da 3 aylık depolama sonunda kelat üzerine immobilize edilmiş enzim ve suda çözünen kitosan üzerine immobilize edilmiş enzimin aktifliğinin %10'unu kaybettiğini, mikro küreler üzerine immobilize edilen enzimin ise aktifliğinin %15'ini kaybettiğini bulmuşlardır, ayrıca 15 kullanımdan sonra ise suda çözünebilen kitosan üzerine immobilize edilmiş enzim aktifliğinin %80'ini, kelat üzerine immobilize edilmiş enzimin aktifliğinin ise %85'ini koruduğunu bulmuşlardır.

2007 yılında Dominguez vd.(90) aljinat kürelerine immobilize edilen *Trametes versicolor* ile değişik indükleyiciler kullanarak lakkaz aktivitesini incelemişlerdir.

2007 yılında Xiaoke vd.(91) *Trametes versicolor*'dan elde edilen ve fonksiyonel kaolinite immobilize edilen lakkazın, bilinen en fazla kanserojen etkiye sahip benzopirenin biyo bozunması üzerinde çalışmışlardır.

2007 yılında Champagne vd.(92), silika kürelerine immobilize edilen *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazın bir antrakinin boyası Reactive blue 19'un renginin giderilmesi üzerinde çalışmışlardır.

2007 yılında Hu vd.(93) adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile nanopartiküller (hegzagonal mezogözenekli silika) ve kaolinit üzerine *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazı immobilize etmişlerdir. Substrat

olarak ABTS kullanmışlardır. Kaolinit üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş enzimin optimum pH'sı 5,5 optimum sıcaklığı 50°C, kaolinit ve nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen enzimin ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimin optimum pH'sını 6,0 optimum sıcaklığını ise 45°C olarak tespit etmişlerdir. Immobilize enzimin ısıl kararlılıklarının serbest enzime göre daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

2008 yılında Niladevi vd.(94) *Streptomyces psammoticus*'dan elde edilen lakkazın immobilizasyonu ve dolgulu biyoreaktör kullanarak fenol giderme uygulamaları üzerinde çalışmışlardır.

2009 yılında Fang vd.(95) manyetik kitosan nanopartikülleri hazırlayıp lakkaz enzimini glutraldehitle çarpaz bağlayıp immobilize şartları, immobilize enzimin karakterizasyonu ve biyosensör olarak kullanım üzerinde çalışmışlardır.

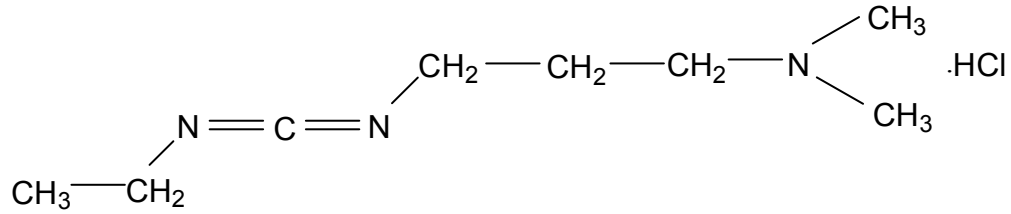
2009 yılında Vasilyeva vd.(96) *Trametes hirsuta*'dan elde edilmiş lakkazı immobilize ederek, elektrik iletkenliğine sahip polianilin sentezi kullanımını üzerinde çalışmışlardır.

2. MATERYAL VE METOD

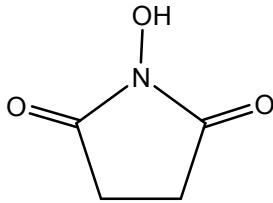
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

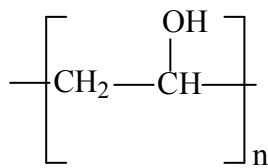
1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimit Hidroklorür :
($C_6H_{17}N_3 \cdot HCl$ MA:191,7 g/mol) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



N-Hidroksisüksinimit : ($C_4H_5NO_3$ MA:115,09 g/mol) Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.

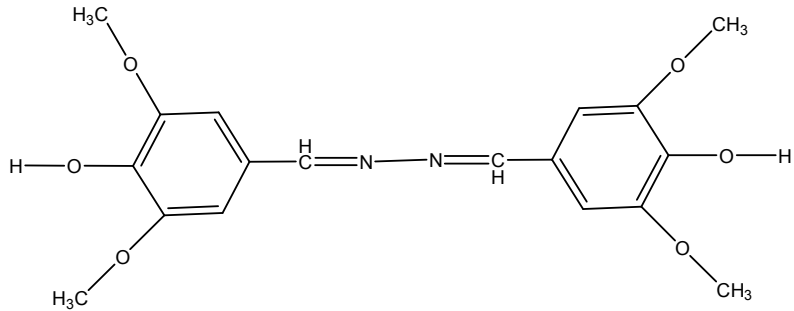


Polivinilalkol (PVA) : $-C_2H_4O-$ Merck (Almanya) firmasından temin edildi.
MA:85 000-124 000 g/mol aralığında ve $d= 1,269$ g/ml.



Kalsiyum Klorür: CaCl_2 MA:110,99 g/mol Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

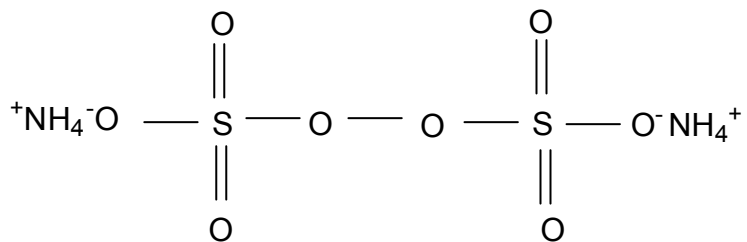
4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin (Siringaldazin) : $(\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6)$, MA:360,3 g/mol Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



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



Amonyum persülfat : $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, MA:228,19 g/mol Analar (İngiltere) firmasından temin edildi.



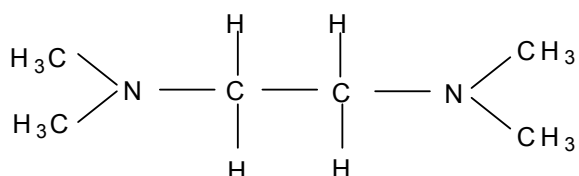
Etil alkol (Mutlak) : $(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})$, MA:46,06 g/mol Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edildi.

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

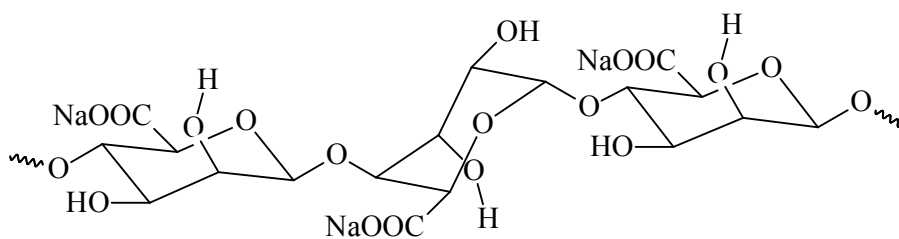
Sitrik asit : ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, MA:192,13 g/mol) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

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

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



Sodyum aljinat: Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



2.2. Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre : SHIMADZU UV / Vis-1800 Spektrofotometre

pH metre : Orion pH metre 420 A + Thermo electron corp.

Çalkalamalı su banyosu : MEMMERT marka sıcaklık kontrollü su banyosu

Terazi : Sartorius CP224S

2.3. Çözeltilerin Hazırlanması

2.3.1. Sodyum hidroksit çözeltisi

8,0 g sodyum hidroksit saf suda çözüldü, hacmi 100 mL'ye tamamlandı (2,0 M).

2.3.2. Siringaldazin çözeltisi

0,00360 g siringaldazin mutlak etil alkolde çözümlenerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı (0,1 mM).

2.3.3. Sitrat tamponu

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

2.3.4. Fosfat tamponu

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

2.3.5. Lakkaz çözeltisi

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

2.3.6. 0,3 M Kalsiyum klorür çözeltisi

11,1 g CaCl₂ bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf suyla 500 mL'ye tamamlandı.

2.3.7. 0,03 M Kalsiyum klorür çözeltisi

1,11 g CaCl₂ bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf suyla 500 mL'ye tamamlandı.

2.3.8. Sodyum aljinat çözeltisi

0,25 g sodyum aljinat 25 mL saf suda çözüldü (% 1 w/v).

2.3.9. N-İzopropil akrilamit çözeltisi

0,7 g N-İzopropil akrilamit 10 mL saf suda çözüldü.

2.3.10. Poli(N-İzopropil akrilamit) eldesi ve çözeltisi

0,7 g N-İzopropil akrilamit 10 mL saf suda çözülerek üzerine 10 mg amonyum persülfat ve 10 damla N,N,N',N'-tetraetilendiamin (TEMED) ilave edilip iyice karışması sağlandıktan sonra 10 ml sıcak saf suya yavaşca dökülerek katı çökelek oluşturuldu. Oluşan çökelek alınarak 25 ml saf suda çözüldü.

2.3.11. Karbodiimit çözeltisi

100 mg karbodiimit 100 mL saf suda çözüldü

2.3.12. N-Hidroksi süksinimit çözeltisi

100 mg N-Hidroksi süksinimit 100 mL saf suda çözüldü

2.3.13. Karbodiimit ve N-Hidroksi süksinimit çözeltisi

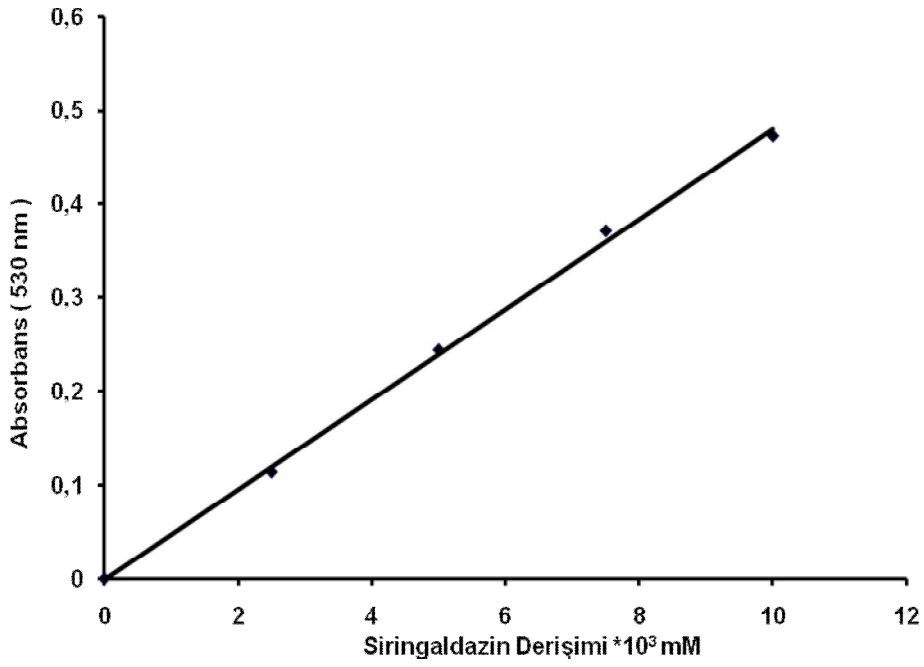
50 mg karbodiimit ve 50 mg N-Hidroksi süksinimit 100 mL saf suda çözüldü

2.4. Siringaldazin Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Siringaldazin kalibrasyon eğrisini hazırlamak için farklı derişimlerde (0,100 mM, 0,075 mM, 0,050 mM, 0,025 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanıp, tepkime balonuna 9 mL sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5,3) ve farklı derişimler de hazırlanan 1 mL siringaldazin çözeltisi eklendi. Çözeltilere 0,1 mL Lakkaz enzimi (0,01mg/mL) ilave edilip tepkime balonları 10 dakika 25°C'daki çalkalamalı su banyosunda tutulduktan sonra çıkarılıp 12. dakikada UV görünür bölge spektrofotometresi (SHIMADZU UV/Vis1800) kullanılarak 530 nm dalga boyunda absorbanları okundu. Siringaldazin derişimlerine karşılık gelen absorban değerleri grafiğe geçirilip kalibrasyon grafiği hazırlandı (Çizelge 2.1, Şekil 2.1).

Çizelge 2.1. Siringaldazin derişimi ile absorbandsın değişimi

Siringaldazin derişimi ($\times 10^{-3}$ mM)	Absorbans (A_{530})
0,0	0,000
2,5	0,114
5,0	0,244
7,5	0,371
10,0	0,472

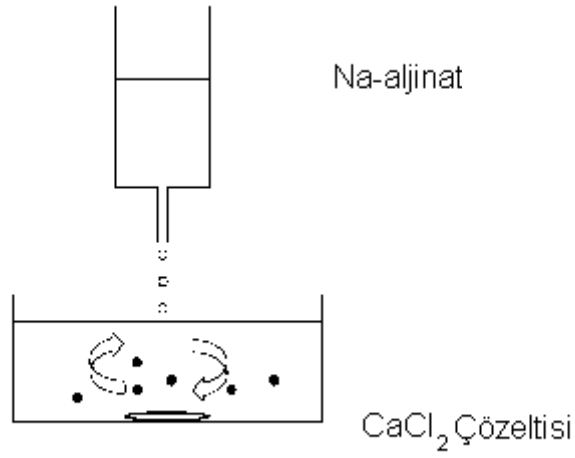


Şekil 2.1. Siringaldazin kalibrasyon eğrisi

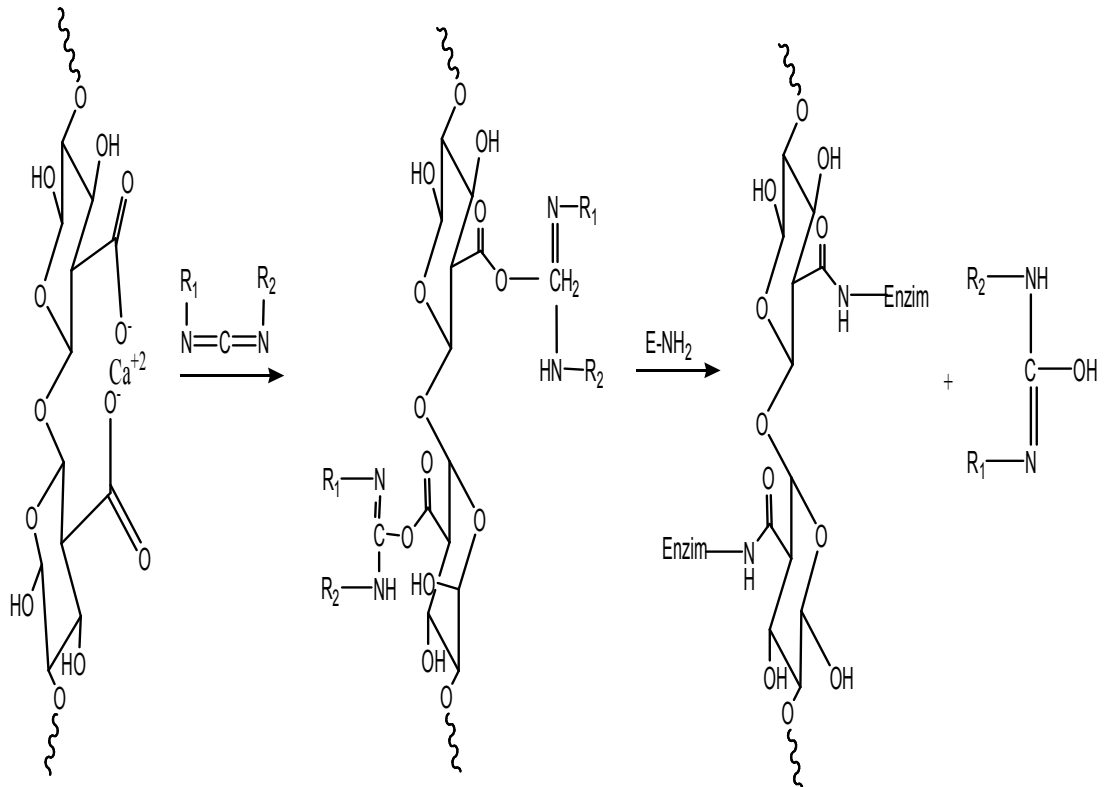
2.5. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Enzim İmmobilizasyonu

2.5.1 Karbodiimit kullanarak enzim immobilizasyonu

Sodyum aljinat (kütlece %1'lik, 0,5 g) 50 mL saf suda çözüldü ve oluşan çözeltiden 10 mL alınarak üzerine 5 mL PVA çözeltisi eklenip iyice karıştırıldı. Daha sonra 0,3 M CaCl₂ çözeltisine damla damla ilave edildi (Şekil 2.2). Na-aljinat, CaCl₂ ile temas ettiğinde sodyum-kalsiyum değişimi nedeniyle suda çözünmeyen Ca-aljinat polimerik küreleri elde edildi. Yüzey aktifleştirme işlemi karbodiimit ile şu şekilde gerçekleştirildi. Ca-aljinat polimerik küreleri karbodiimit çözeltisi (0,5 mM) içine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 4 saat süreyle karıştırılarak bir gece aktifleşme işleminin tamamlanması için bekletildi. Daha sonra karbodiimit bağlanmış küreler üzerine enzim çözeltisi (0,05 g lakkaz 20 mL (0,04 M pH=6,5) fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı) ilave edilerek dört saat süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Yüzey üzerine adsorbe olan enzimler deiyonize su ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra kullanılmak üzere 4°C'da saf su içinde bekletildi. Aynı işlemler 5 mL PVA yerine 1 mL P(NIPA) çözeltisi konularak tekrarlandı. Karboksil grubu taşıyan matrisler karbodiimit kullanılarak aktif hale getirilip enzimlerin immobilizasyonunda kullanılabilirler. Bu immobilizasyon Şekil 2.3' de gösterilmiştir.



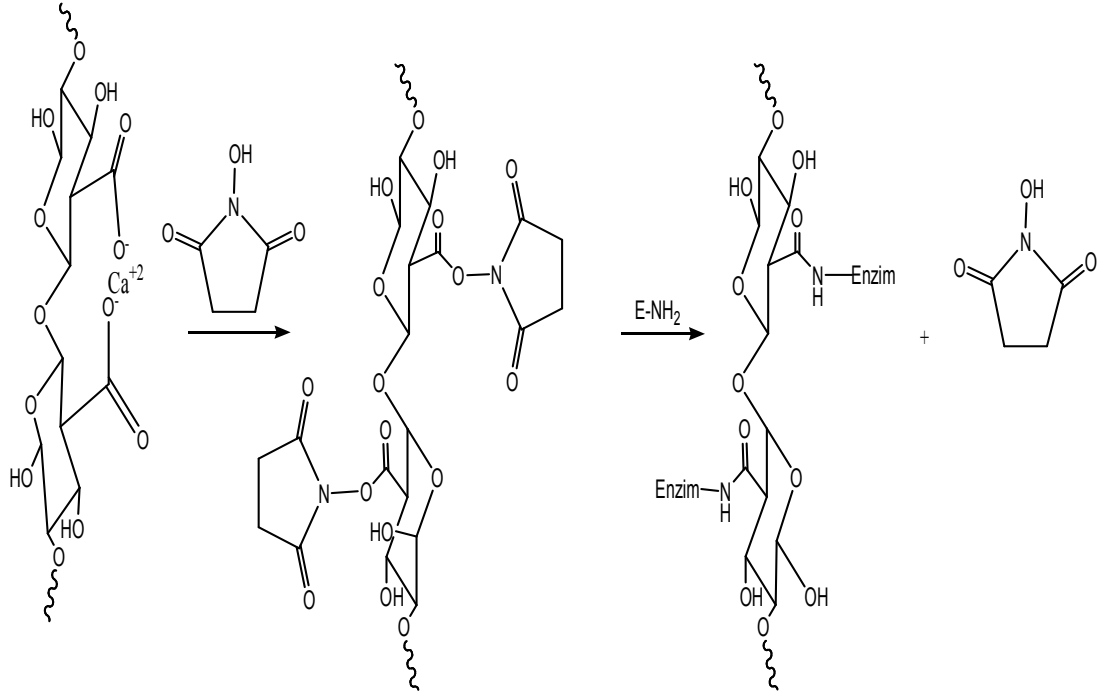
Şekil 2.2. Ca-aljinat kürelerinin elde edilmesi



Şekil 2.3. Polimerik desteğin karbodiimit ile aktifleştirilmesi ve polimerik desteğe enzim bağlanması

2.5.2 Hidroksisüksinimit kullanarak enzim immobilizasyonu

Sodyum aljinat (kütleye %1'lik, 0,5 g) 50 mg saf suda çözüldü ve oluşan çözülden 10 mL alınarak üzerine 5 mL PVA çözeltisi eklenip iyice karıştırıldı. Daha sonra 0,3 M CaCl_2 çözeltisine damlatılarak ilave edildi (Şekil 2.2). Na-aljinat, CaCl_2 ile temas ettiğinde sodyum-kalsiyum değişimi nedeniyle suda çözünmeyen Ca-aljinat polimerik küreleri elde edildi. Yüzey aktifleştirme işlemi N-hidroksisüksinimit ile şu şekilde gerçekleştirildi. Ca-aljinat polimerik küreleri N-hidroksisüksinimit çözeltisi içine ilave edildi ve oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 4 saat süreyle karıştırılarak bir gece aktifleştirme işleminin tamamlanması için bekletildi. Daha sonra hidroksisüksinimit bağlanmış küreler üzerine enzim çözeltisi (0,05 g lakkaz 20 mL (0,04 M pH=6,5) fosfat tamponunda çözümlenerek hazırlandı) fosfat tamponunda çözümlenerek hazırlandı) ilave edildikten sonra 4 saat süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Yüzey üzerine adsorbe olan enzimler deiyonize su ile yıkanarak ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra kullanılmak üzere 4°C 'da saf su içinde bekletildi. Aynı işlemler 5 ml PVA yerine 1 mL P(NIPA) çözeltisi konularak tekrarlandı. Bu immobilizasyon Şekil 2.4'de gösterilmiştir.

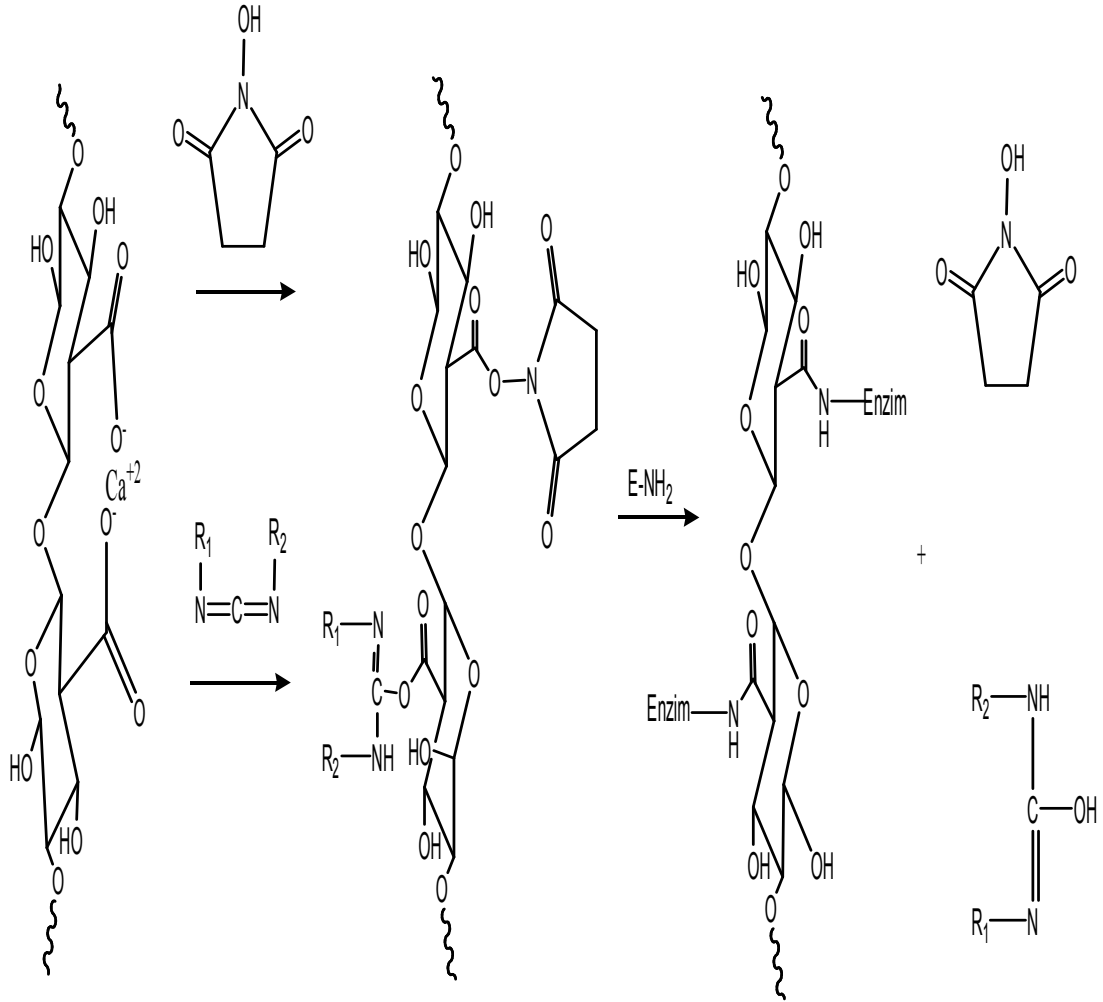


Şekil 2.4. Polimerik desteğin N-hidroksisüksinimit ile aktifleştirilmesi ve polimerik desteğe enzim bağlanması

2.5.3. Karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit kullanarak enzim immobilizasyonu

Sodyum aljinat (kütlece %1'lik, 0,5 g) 50 mg saf suda çözüldü ve oluşan çözültiden 10 mL alınarak üzerine 5 mL PVA çözültisi eklenip iyice karıştırıldı. Daha sonra 0,3 M CaCl₂ çözültisine damlatılarak ilave edildi (Şekil 2.2). Na-aljinat, CaCl₂ ile temas ettiğinde sodyum-kalsiyum değişimi nedeniyle suda çözünmeyen Ca-aljinat polimerik küreleri elde edildi. Yüzey aktifleştirme işlemi karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit ile şu şekilde gerçekleştirildi. Ca-aljinat polimerik küreleri karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit (1:1 oranında) çözültisi içine ilave edildi ve oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 4 saat süreyle karıştırılarak bir gece aktifleştirme işleminin tamamlanması için bekletildi. Daha sonra karbodiimit ve hidroksisüksinimit bağlanmış küreler

üzerine enzim çözeltisi (0,05 g lakkaz 20 ml (0,04 M pH=6,5) fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı) ilave edildikten sonra dört saat süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Yüzey üzerine adsorbe olan enzimler deiyonize su ile yıkanarak ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra kullanılmak üzere 4°C'da saf su içinde bekletildi. Aynı işlemler 5 mL PVA yerine 1 mL P(NIPA) çözeltisi konularak tekrarlandı. Bu immobilizasyon Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Polimerik desteğin karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit ile aktifleştirilmesi ve enzim bağlanması

2.6. Aktiflik Tayini

2.6.1. Serbest enzimin aktiflik tayini

Serbest lakkazın aktiflik tayini Leonowicz ve Grzywnowicz tarafından verilen yöntemle yapıldı [97]. Aktiflik tayininde 9 mL sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5,3) üzerine 1 mL siringaldazin çözeltisi (0,1 mM) ve 0,1 mL lakkaz çözeltisi (0,01 mg/mL) eklenerek tepkime başlatıldı. Çözelti çalkalamalı su banyosunda 25°C'da 10 dakika çalkalandı ve 12. dakikada 530 nm de absorbanstaki değeri ölçüldü. Tepkime hızı, ölçülen absorbanstaki değerleri ve kalibrasyon eğrisinin eğiminden ($\Delta A_{530}/\Delta C$) faydalanarak aşağıdaki bağıntıya göre hesaplandı.

$$\text{Hız (V)} = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{530}}{\Delta t} \times \frac{\Delta C}{\Delta A_{530}}$$
$$\frac{\Delta C}{\Delta A_{530}} = \frac{1}{\text{eğim}}$$

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

2.6.2. İmmobilize enzimin aktiflik tayini

İmmobilize lakkazın aktiflik tayini için karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, karbodiimit

ve hidrokisisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj polimer küreciklerinin üzerine immobilize edilmiş lakkaz enzimi hazırlanarak üzerine 9 mL sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5,3), 1 mL siringaldazin çözeltisi (0,1 mM) eklendi. Karışım çalkalamalı su banyosunda 25°C'da 10 dakika çalkalandı ve 12. dakikada absorban değerleri ölçüldü. Ölçülen absorban değerlerinden aktiflikler Bölüm 2.6.1' de anlatıldığı gibi hesaplandı.

2.7. Enzim Aktifliğine pH Etkisi

2.7.1. Serbest enzim aktifliğine pH etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine pH'nın etkisini belirleyebilmek amacıyla farklı pH' larda (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) fosfat tamponları hazırlandı. Her bir pH'da aktiflik Bölüm 2.6.1' de anlatılan yöntemle göre tayin edildi. Tepkime süresince, sıcaklık (25°C) ve siringaldazin başlangıç derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

2.7.2. İmmobilize enzim aktifliğine pH etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacı ile karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, hidrokisisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimit ve hidrokisisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, hidrokisisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, karbodiimit ve hidrokisisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj polimer kürecikleri üzerine immobilize edilmiş lakkaz enzimi ve farklı pH'larda (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) fosfat tamponları hazırlanarak, her bir pH'da aktiflik tayini Bölüm 2.6.2'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince, sıcaklık (25°C) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

2.8. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

2.8.1. Serbest enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C) araştırıldı. Her bir sıcaklık için aktiflik tayini Bölüm 2.6.1' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

2.8.2. İmmobilize enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj polimer kürecikleri üzerlerine immobilize edilmiş lakkaz enzimi hazırlanarak farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C) aktiflik tayini Bölüm 2.6.2'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. □Tepkime süresince, pH (5,3) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

2.9. Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

2.9.1. Serbest enzimin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 4 farklı derişimde (0,025 mM, 0,050 mM, 0,075 mM, ve 0,100 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 2.6.1.'de anlatılan yöntemle

göre yapıldı. Tepkime süresince pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu.

2.9.2. İmmobilize enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj polimer küreciklerinin üzerine immobilize edilmiş lakkaz enzimi ve 4 farklı derişimde (0,025 mM, 0,050 mM, 0,075 mM, 0,100 mM) siringaldazin çözeltisi hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 2.6.2' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu.

2.10. Enzim Aktifliğine Depolanma Süresinin Etkisi

2.10.1. Serbest enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için 0,04 M, pH 6,5 fosfat tamponunda, 0,01 mg/mL derişiminde enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti buzdolabında 4°C'da saklandı ve bu çözeltiden belirli aralıklarla 0,1 mL örnek alınarak Bölüm 2.6.1.'de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu.

2.10.2. İmmobilize enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla hazırlanan karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj,

hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj polimer küreciklerinin üzerine immobilize edilmiş lakkaz enzimi buzdolabında 4°C'da saklandı. Bu hidrojellerden belirli aralıklarla örnek alınarak Bölüm 2.6.2.'de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu.

2.11. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

İmmobilize lakkazın tekrar kullanılabilirliğini incelemek için 1 günde 5 kez tekrar kullanıldı. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj polimer küreciklerinin üzerine immobilize edilmiş lakkazın Bölüm 2.6.2'de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu.

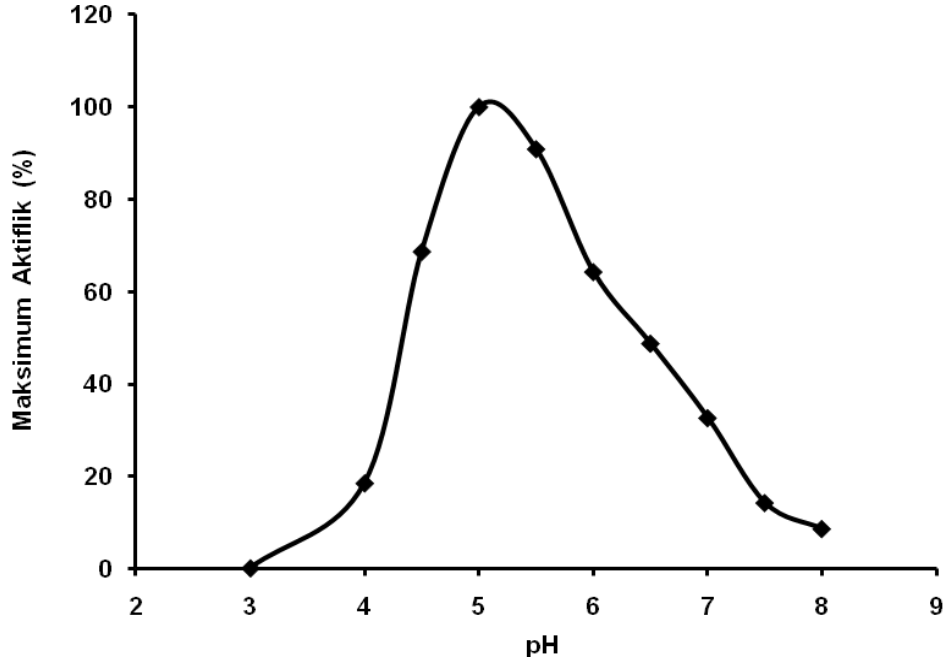
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Serbest Enzim Aktifliğine pH'nın Etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla çeşitli pH'larda Bölüm 2.7.1'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.1'de verildi. Serbest lakkaz enzimi için optimum pH 5,0 olarak bulundu ve maksimum aktifliğin pH ile değişimi Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Serbest lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi

pH	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
3,0	0,001	0,02	0,15
4,0	0,122	2,12	18,54
4,5	0,452	7,84	68,69
5,0	0,658	11,41	100,00
5,5	0,598	10,37	90,88
6,0	0,423	7,34	64,29
6,5	0,381	6,61	57,90
7,0	0,215	3,73	32,67
7,5	0,094	1,63	14,29
8,0	0,057	0,98	8,66



Şekil 3.1. Serbest lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

Literatürde siringaldazin substratı kullanarak *Trametes versicolor* için optimum pH 5, *Cerrena unicolor*'dan elde edilen lakkaz için optimum pH 5,2 olarak bulunmuştur (75,84).

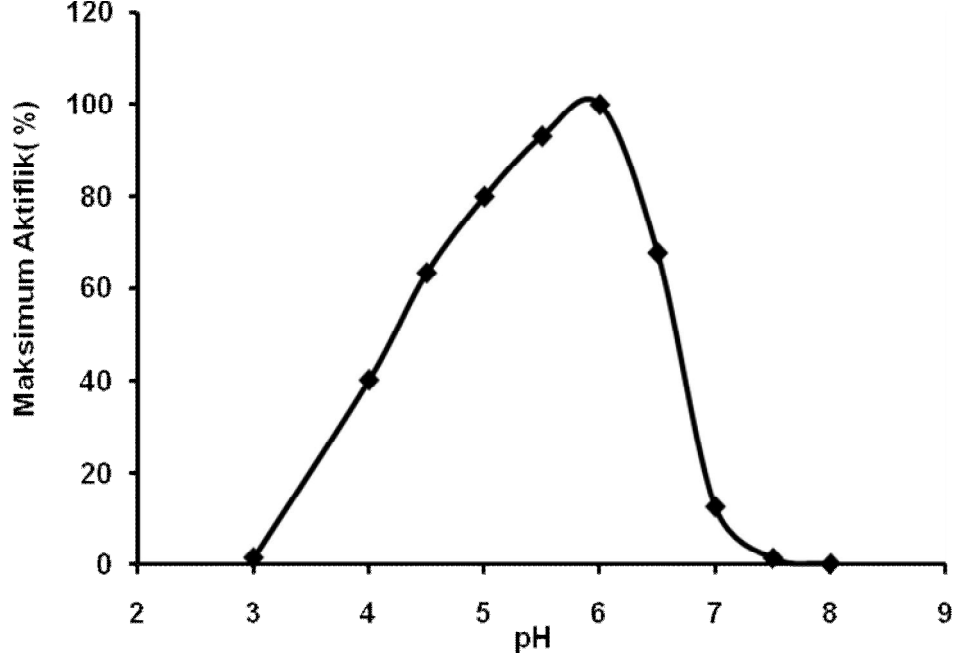
3.2. İmmobilize Enzim Aktifliğine pH'nın Etkisi

3.2.1. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi

Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enziminin aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 2.7.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.2'de verildi. Karbodiimitle aktifleştirilmiş (PVA-CaAlj) hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 6,0 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 3.2'de gösterildi.

Çizelge 3.2. Karbodiimitle aktiveştirilmiş (PVA-CaAlj) hidrojel kürelerde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi

pH	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
3,0	0,015	0,26	1,71
4,0	0,353	6,12	40,34
4,5	0,655	9,63	63,42
5,0	0,800	12,14	79,99
5,5	0,835	14,14	93,13
6,0	0,875	15,18	100,00
6,5	0,593	10,28	67,76
7,0	0,062	1,94	12,80
7,5	0,014	0,24	1,60
8,0	0,003	0,05	0,34



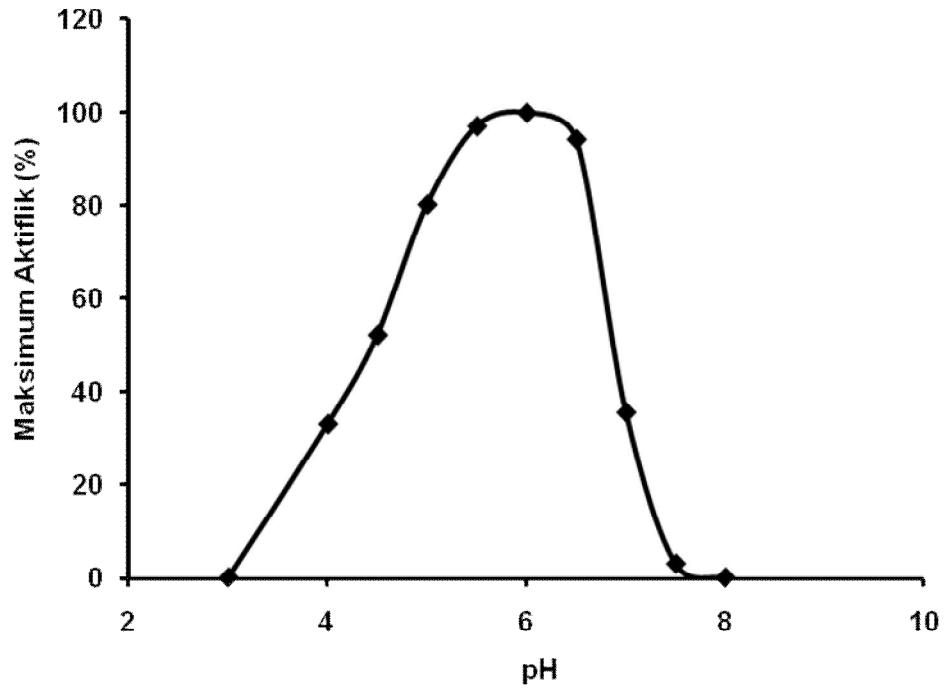
Şekil 3.2. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

3.2.2. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi

Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş (PVA-CaAlj) hidrojeline immobilize lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 2.7.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.3'de verildi. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 6 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 3.3'de gösterildi.

Çizelge 3.3. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi

pH	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	Maksimum Aktiflik (%)
3,0	0,001	0,02	0,10
4,0	0,330	5,72	33,07
4,5	0,445	9,05	52,31
5,0	0,822	13,91	80,37
5,5	0,969	16,81	97,11
6,0	0,997	17,31	100,00
6,5	0,971	16,32	94,30
7,0	0,355	6,16	35,58
7,5	0,031	0,54	3,11
8,0	0,001	0,02	0,10



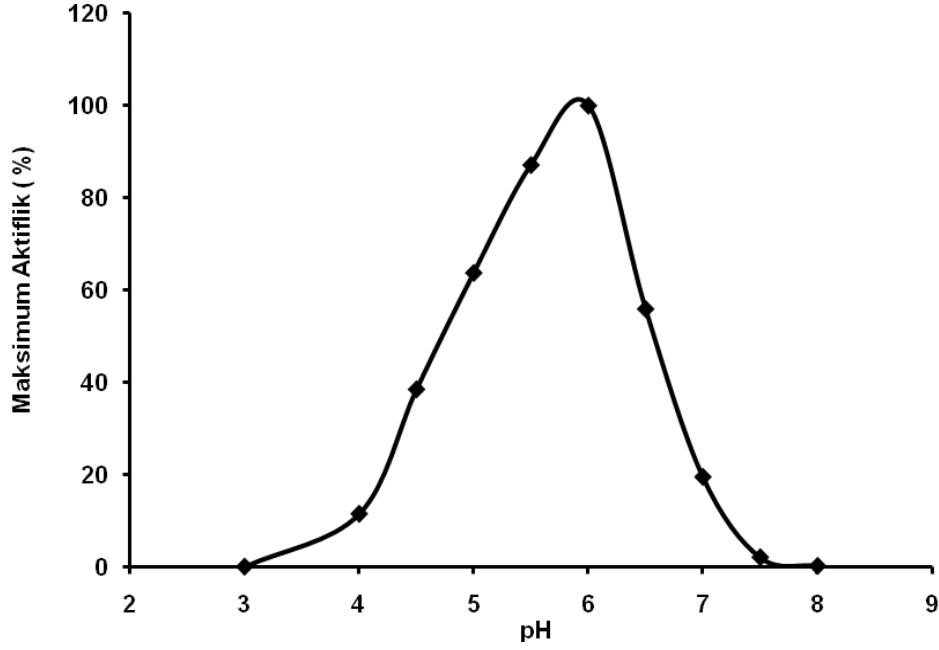
Şekil 3.3. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

3.2.3. Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi

Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 2.7.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.4'de verildi. Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 6 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 3.4'de gösterildi.

Çizelge 3.4. Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine pH'nın etkisi

pH	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
3,0	0,001	0,02	0,16
4,0	0,074	1,28	11,60
4,5	0,286	4,27	38,55
5,0	0,507	7,06	63,78
5,5	0, 556	9,64	87,12
6,0	0, 638	11,07	100,00
6,5	0,357	6,19	55,94
7,0	0,125	2,17	19,59
7,5	0,014	0,24	2,19
8,0	0,002	0,03	0,31



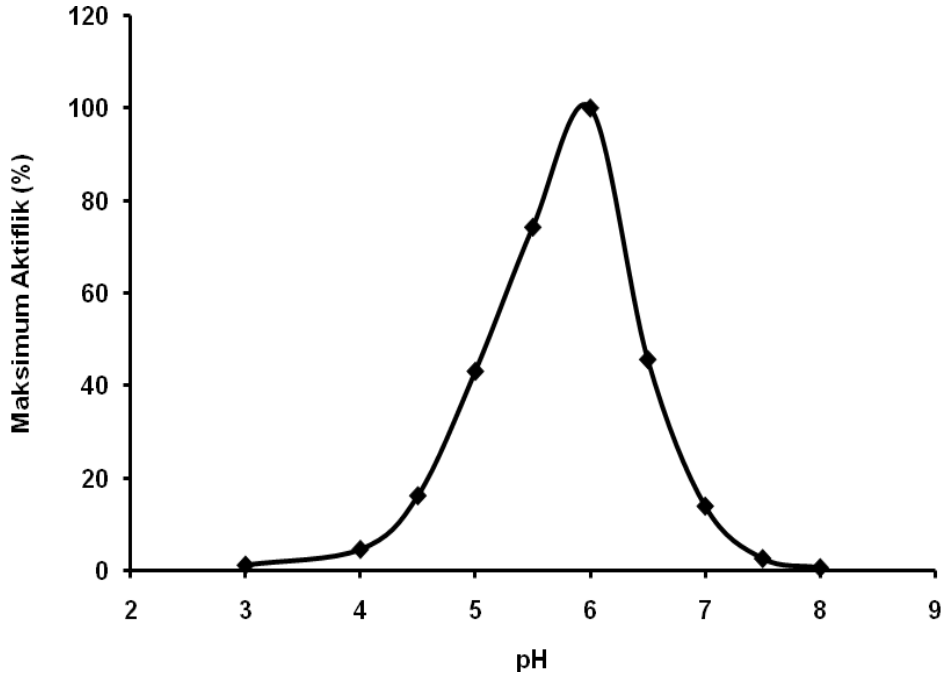
Şekil 3.4. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

3.2.4. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PNİPA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi

Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 2.7.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.5'de verildi. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 6 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 3.5'de gösterildi.

Çizelge 3.5. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine pH'nın etkisi

pH	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
3,0	0,004	0,07	1,13
4,0	0,016	0,28	4,53
4,5	0,057	0,99	16,16
5,0	0,242	2,64	43,08
5,5	0,262	4,54	74,26
6,0	0,353	6,12	100,00
6,5	0,131	2,79	45,63
7,0	0,049	0,85	13,89
7,5	0,009	0,16	2,55
8,0	0,002	0,03	0,57



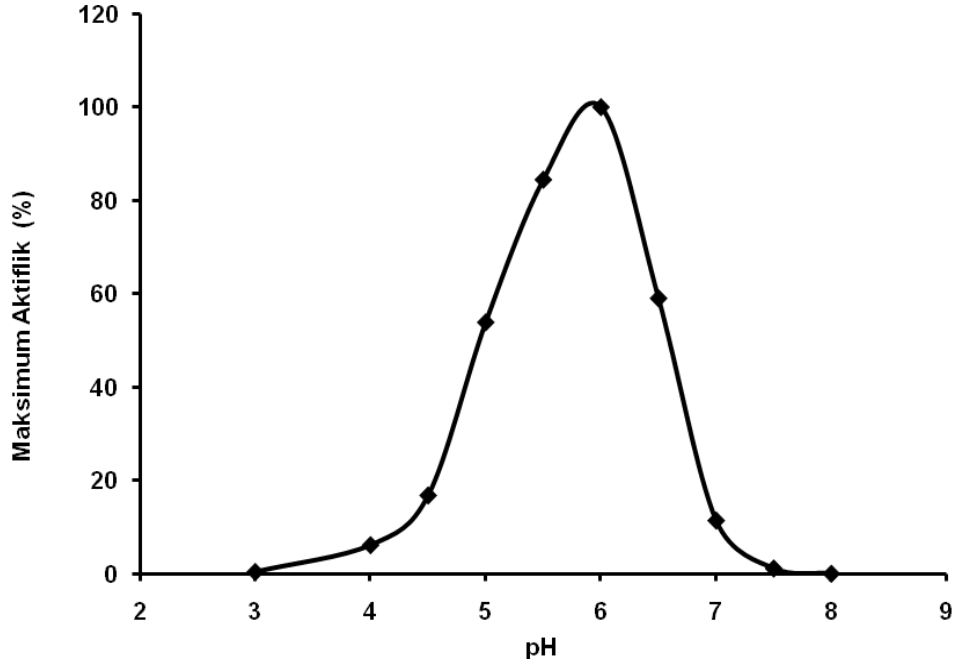
Şekil 3.5. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

3.2.5. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi.

Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 2.7.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.6'da verildi. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 6 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 3.6'da gösterildi.

Çizelge 3.6. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

pH	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
3,0	0,004	0,07	0,50
4,0	0,050	0,87	6,26
4,5	0,135	2,34	16,89
5,0	0,582	7,48	53,94
5,5	0,675	11,71	84,48
6,0	0,799	13,86	100,00
6,5	0,472	8,19	59,07
7,0	0,024	1,60	11,51
7,5	0,010	0,17	1,25
8,0	0,001	0,02	0,12



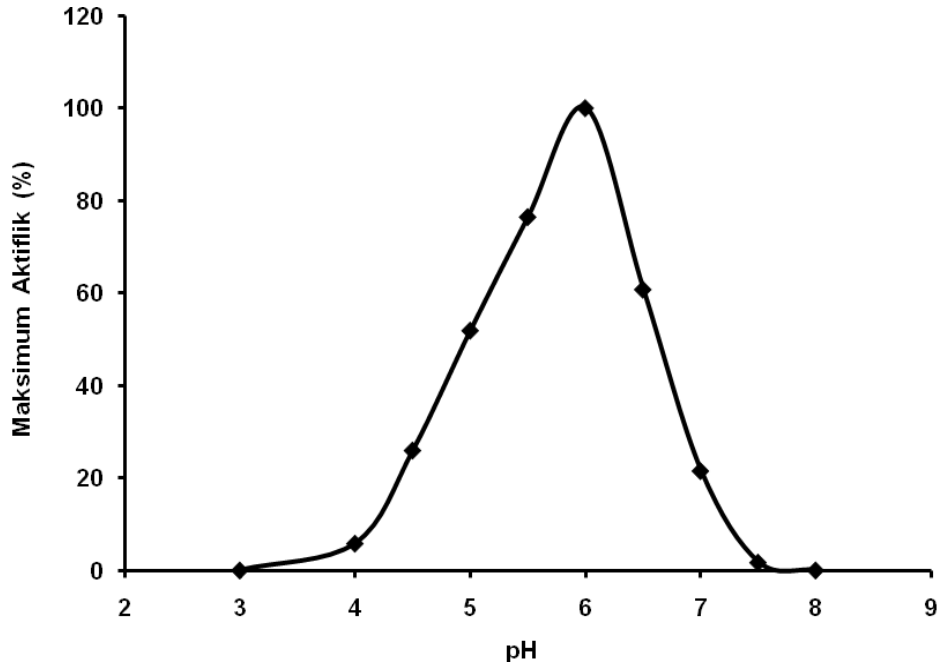
Şekil 3.6. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

3.2.6 Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH'nın etkisi.

Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 2.7.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.7'de verildi. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 6 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 3.7'de gösterildi.

Çizelge 3.7. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NiPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

pH	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	Maksimum Aktiflik (%)
3,0	0,001	0,02	0,17
4,0	0,035	0,06	5,96
4,5	0,212	2,65	26,07
5,0	0,434	5,29	51,97
5,5	0,449	7,79	76,51
6,0	0,587	10,18	100,00
6,5	0,234	6,19	60,83
7,0	0,127	2,2	21,64
7,5	0,011	0,19	1,87
8,0	0,001	0,02	0,17



Şekil 3.7. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NiPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

Literatürde, Adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile karbon fiber mikro elektrotlar üzerine immobilize edilen lakkazın optimum pH'sı 5,0 olarak verilmiştir [49]. Gözenekli cam boncuklar üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilen lakkaz için optimum pH'sı 5,7 olduğu bulunmuştur (66). Polimer matrislere immobilize edilen *Trametes hirsuta*'dan elde edilmiş Lakkaz için optimum pH 6 olarak bulunmuştur (85). Adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile nanopartiküller (hegzagonal mezogözenekli silika) ve kaolinit üzerine *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazı immobilize etmişlerdir. Substrat olarak ABTS'nin kullanıldığı çalışmada, Kaolinit üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş enzimin optimum pH'sı 5,5 kaolinit ve nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen enzimin ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimin optimum pH'nın 6,0 olarak bildirmişlerdir (93). Dopamin için hazırlanan McIlvaine tamponunda platin elektroda immobilize edilen lakkaz için optimum pH'nın 6,0 olduğu belirlenmiştir (80). Çalışmamızda bulunan sonuçlar ile literatürdeki sonuçlar uyumludur.

3.3. Serbest Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

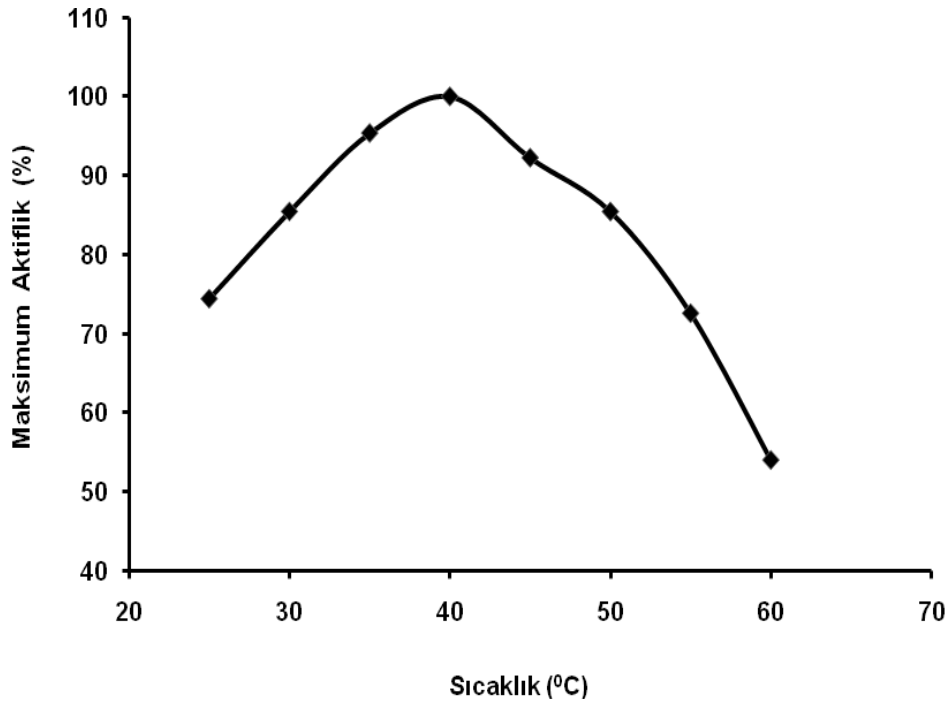
Serbest enzimin aktifliğinin üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 2.8.1'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.8'de verildi ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 3.8'de gösterildi.

Serbest enzim için optimum sıcaklık 40°C bulundu. 40°C'un altındaki ve üstündeki sıcaklıklarda enzim aktifliğinde azalmalar gözlemlendi. Enzimatik tepkimelerde de tepkime hızı sıcaklıkla artar. Ancak yüksek sıcaklıklarda enzim yapısında meydana gelen denatürasyon nedeni ile enzim aktifliği

düŖer (98). Sıcaklık arttıkça önce enzim molekülünün tersiyer yapısı, sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapısı) bozulur ve enzimin aktif merkezi etkilenerek enzim aktifliğini yitirir (99).

Çizelge 3.8. Serbest enzim aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,405	7,03	74,42
30	0,465	8,07	85,44
35	0,519	9	95,36
40	0,544	9,44	100,00
45	0,502	8,71	92,24
50	0,465	8,07	85,44
55	0,395	6,85	72,58
60	0,294	5,1	54,02



Şekil 3.8. Serbest enzimin maksimum aktifliğinin sıcaklık ile deđiŖimi

Literatürde *Cerena unicolor*'dan elde edilen lakkazın optimum sıcaklığı 40°C bulunmuştur (75). *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazın optimum sıcaklığı 40°C bulunmuştur (79)

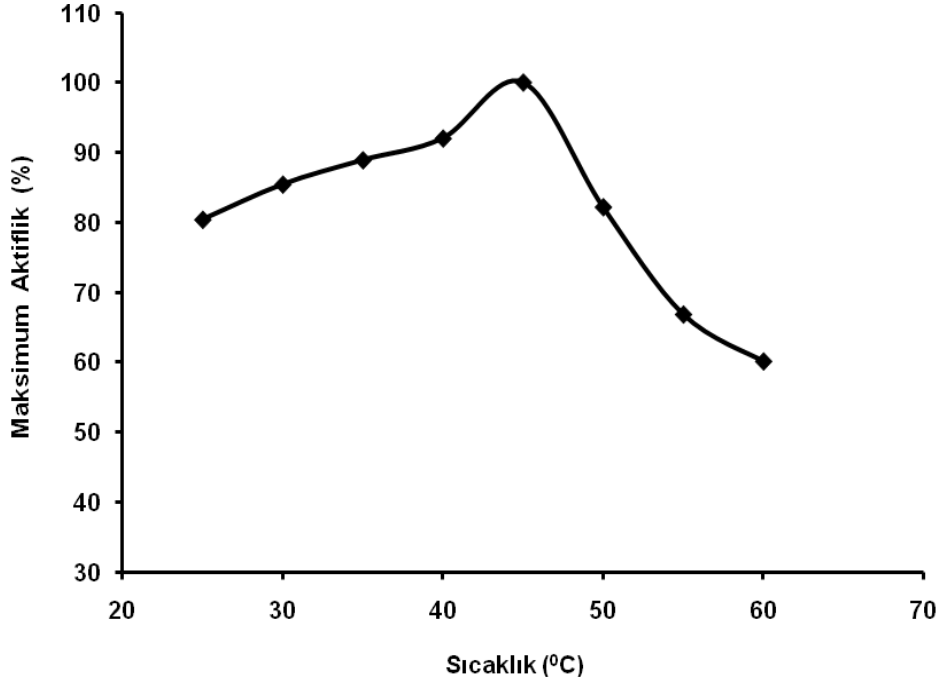
3.4. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

3.4.1. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 2.8.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.9'da verildi. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 45°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 3.9'da gösterildi.

Çizelge 3.9. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,671	11,64	80,38
30	0,713	12,37	85,41
35	0,742	12,87	88,88
40	0,768	13,32	92,00
45	0,835	14,48	100,00
50	0,686	11,9	82,18
55	0,558	9,68	66,84
60	0,502	8,71	60,13



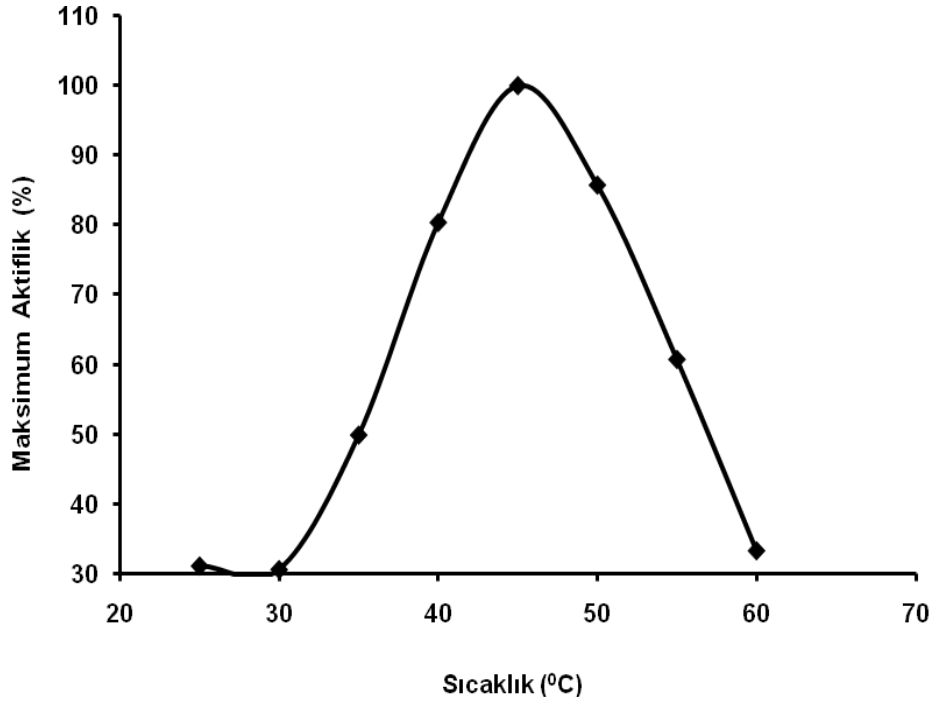
Şekil 3.9. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel Kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

3.4.2. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 2.8.2’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.10’da verildi. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 45°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 3.10’da gösterildi.

Çizelge 3.10. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,256	4,44	31,18
30	0,363	6,29	44,21
35	0,410	7,11	49,93
40	0,660	11,45	80,39
45	0,821	14,24	100,00
50	0,704	12,21	85,75
55	0,499	8,65	60,78
60	0,274	4,75	33,37



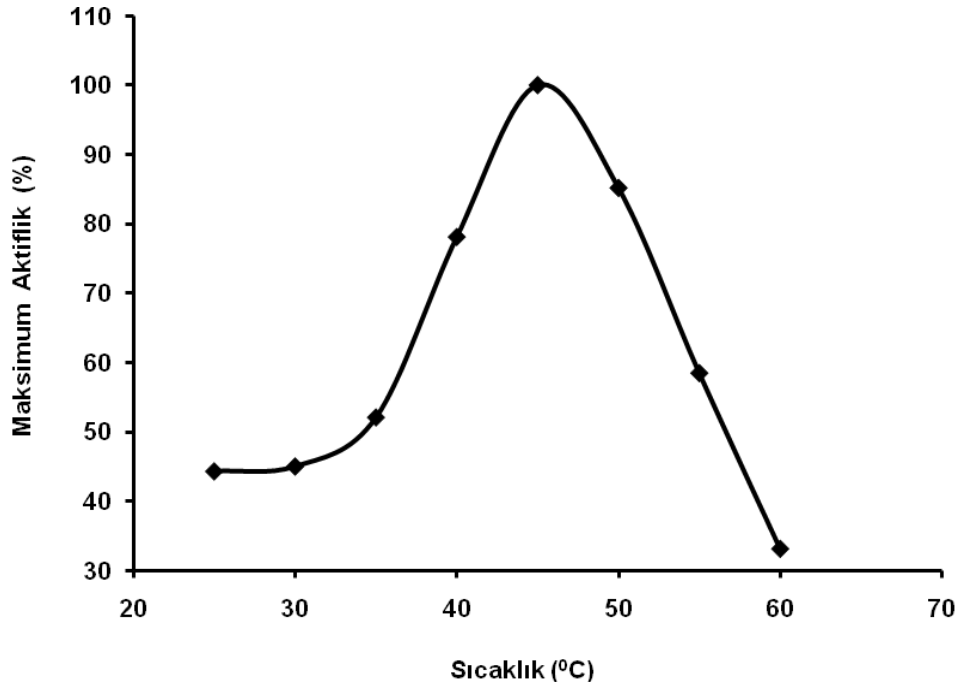
Şekil 3.10. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

3.4.3. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 2.8.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.11'de verildi. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 45°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 3.11'de gösterildi.

Çizelge 3.11. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktiveştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,227	3,94	44,34
30	0,395	6,85	45,05
35	0,457	7,93	52,12
40	0,685	11,88	78,12
45	0,877	15,21	100,00
50	0,747	12,96	85,19
55	0,513	8,90	58,51
60	0,291	5,05	33,19



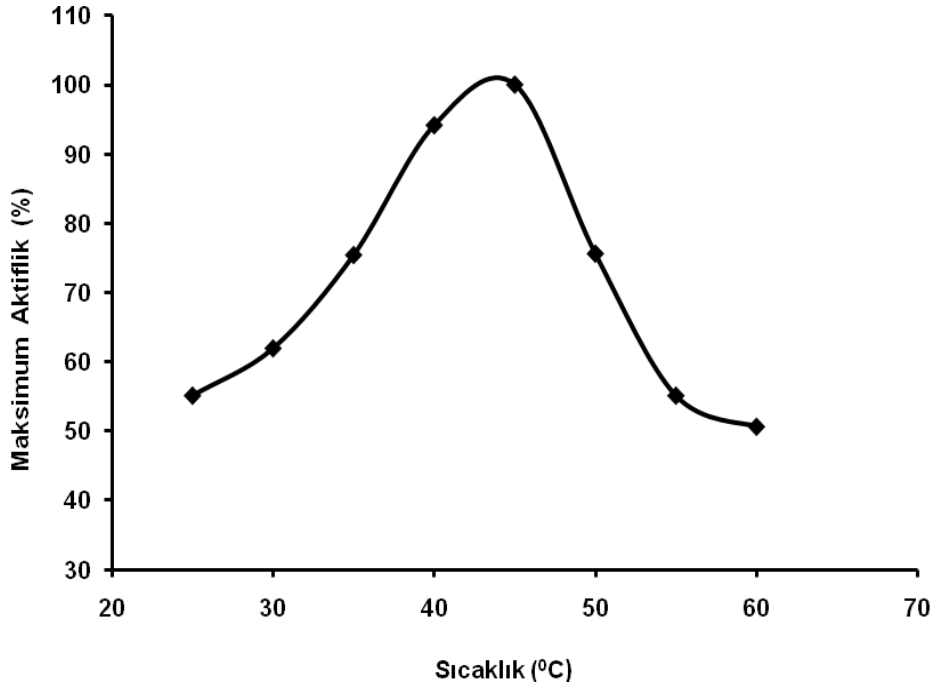
Şekil 3.11. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktiveştirilmiş (PVA-CaAlj) hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

3.4.4. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 2.8.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.12'de verildi. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 45°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 3.12'de gösterildi.

Çizelge 3.12. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,282	4,89	55,09
30	0,317	5,50	61,92
35	0,386	6,70	75,40
40	0,482	8,36	94,15
45	0,512	8,88	100,00
50	0,387	6,71	75,59
55	0,322	4,89	55,08
60	0,259	4,49	50,59



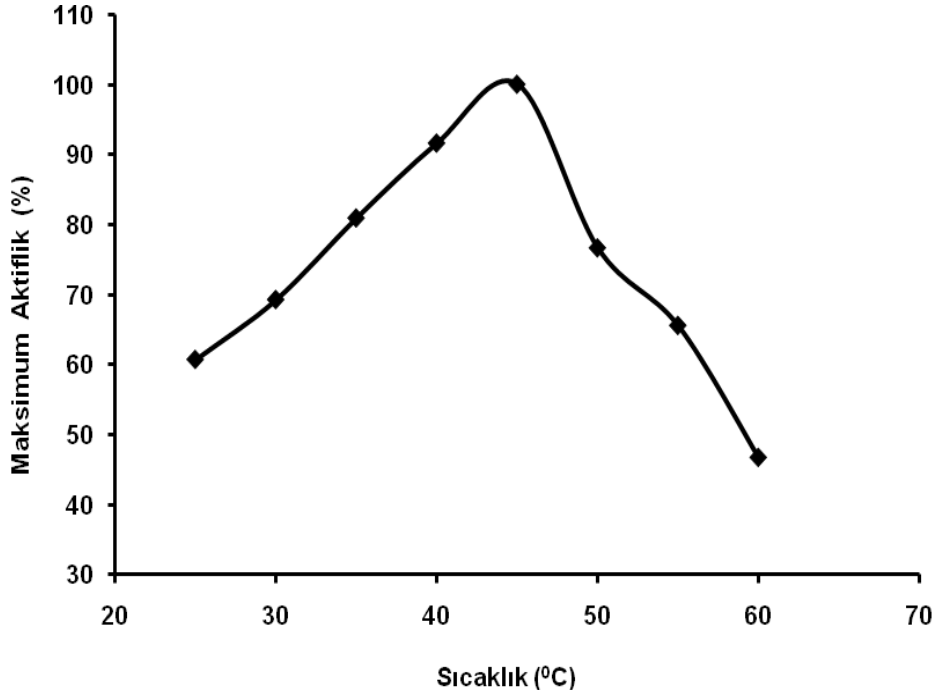
Şekil 3.12. Karbodiimitle aktive edilmiş P(NiPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

3.4.5. Hidroksisüksinimitle aktive edilmiş P(NiPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Hidroksisüksinimitle aktive edilmiş P(NiPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 2.8.2’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorban değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.13’de verildi. Hidroksisüksinimitle aktive edilmiş P(NiPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 45°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 3.13’de gösterildi.

Çizelge 3.13. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,312	5,41	60,67
30	0,356	6,18	69,23
35	0,416	7,22	80,89
40	0,471	8,17	91,59
45	0,514	8,92	100,00
50	0,394	6,83	76,62
55	0,337	5,85	65,54
60	0,240	4,16	46,67



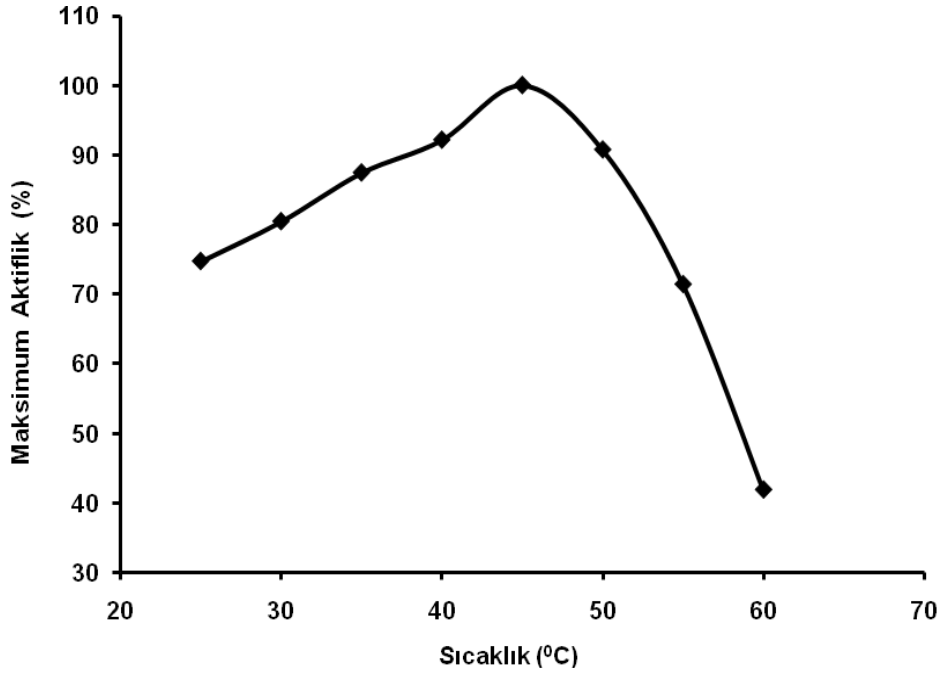
Şekil 3.13. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

3.4.6. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 2.8.2’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.14’de verildi. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 45°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 3.14’de gösterildi.

Çizelge 3.14. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,587	10,18	74,71
30	0,632	10,96	80,43
35	0,687	11,92	87,43
40	0,724	12,56	92,14
45	0,786	13,63	100,00
50	0,713	12,37	90,74
55	0,561	9,73	71,39
60	0,329	5,71	41,87



Şekil 3.14. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktive edilmiş P(NiPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

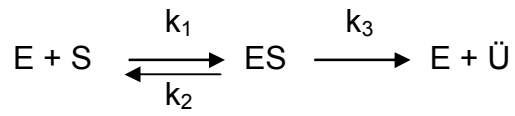
Literatürde, Magnetik kitosan nano partiküller üzerine glutaraldehit ile çapraz bağlanan lakkazın (yapılan çalışmada) optimum sıcaklığı ise 45°C olarak belirlenmiştir [95]. Hidrofilik silika filmlerinde immobilize edilen *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkazın maksimum performans gösterdiği sıcaklığı aralığı ise 40 – 50°C (88). Lakkazın glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünebilir kitosan, kitosan mikroküreler ve Fe⁺³ geçiş metali klatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmiş ve optimum sıcaklığı ise 45°C olarak tespit edilmiştir (89).

Trametes versicolor'dan elde edilen lakkazın ve nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen enzimin ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı 45°C, kaolinit üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen lakkazın optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir (93). Eupergit üzerine

kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen lakkazın optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur (72).

3.5. Serbest Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

Enzim – substrat tepkimesi aşağıda verildiği gibi gösterilir



Bu eşitlikte; E enzimi, S substratı, ES enzim – substrat kompleksini, Ü ürünü belirtir. Enzim tepkime hızı Michaelis – Menten Eşitliği ile verilir.

$$V_O = \frac{V_{\text{mak}} \times S}{K_m + S}$$

Bu mekanizmaya göre Michaelis-Menten sabiti aşağıda verilmiştir.

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

V_O : Başlangıç hızı

V_{mak} : Maksimum hız

K_m : Michaelis-Menten sabiti

S: Substrat derişimi

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

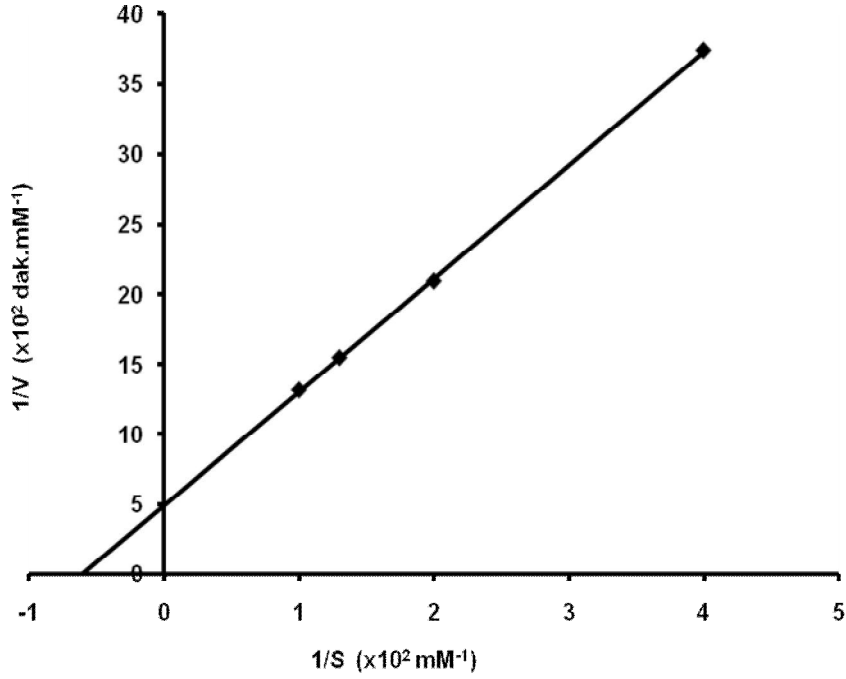
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{mak}}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{mak}}}$$

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

Serbest lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 4 farklı derişimde (0,100-0,025 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 2.6.1'de anlatılan yöntemle yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 3.15'de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.15). Serbest enzimin K_m değeri 16,98x10⁻³ mM ve V_{mak} değeri 2,085 x10⁻³ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 3.15. Serbest enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S (x10 ⁻³ mM)	1/S (x10 ² mM ⁻¹)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (V) (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	1/V (x10 ³ dak.mM ⁻¹)
10	1,0	0,438	7,60	1,316
7,5	1,3	0,372	6,45	1,549
5	2,0	0,275	4,77	2,096
2,5	4,0	0,154	2,67	3,743



Şekil 3.15. Serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği

Lentinula edodes'ten elde edilmiş serbest lakkazın K_m değeri 70 μM ve *Cerrena unicolor*'dan elde edilen lakkaz için K_m 77 μM olarak bulunmuştur (67,68). *Panus conchatus*'tan elde edilen lakkazın K_m ve V_{mak} değerleri sırası ile 37 μM ve 5,9 mM.dak^{-1} olarak bulunmuştur (76).

3.6. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi

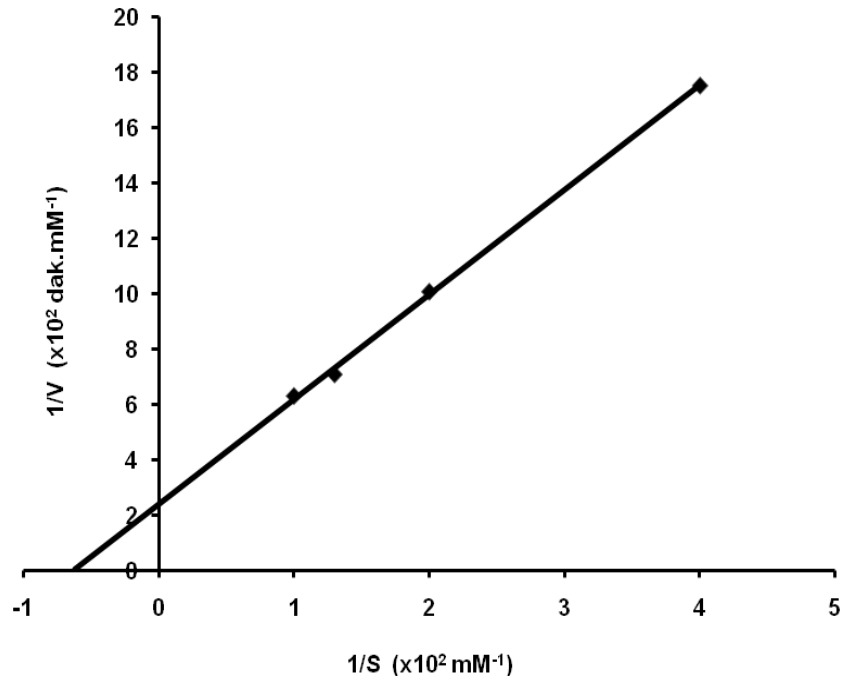
3.6.1. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat değişiminin etkisi

Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat değişiminin etkisini incelemek için Bölüm 2.9.1'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz

derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 3.16'da verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.16). Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz enzimi için K_m değeri $2,88 \times 10^{-2}$ mM ve V_{mak} değeri 6.00×10^{-3} mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 3.16. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM ⁻¹)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM ⁻¹)
10,0	1,0	0,915	15,87	6,30
7,5	1,3	0,714	12,39	8,07
5,0	2,0	0,512	8,88	11,26
2,5	4,0	0,279	4,84	20,66



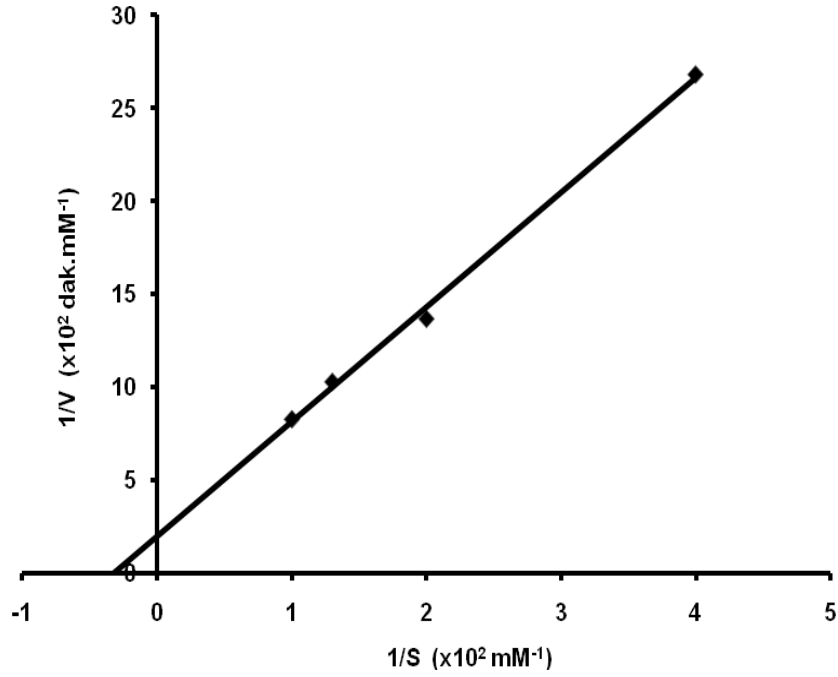
Şekil 3.16. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

3.6.2. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 2.9.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 3.17'de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.17). PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için, K_m değeri $32,7 \times 10^{-3}$ mM ve V_{mak} değeri $5,3 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 3.17. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM ⁻¹)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM ⁻¹)
10,0	1,0	0,694	12,04	8,30
7,5	1,3	0,559	9,70	10,31
5,0	2,0	0,500	8,67	11,53
2,5	4,0	0,215	3,73	26,81



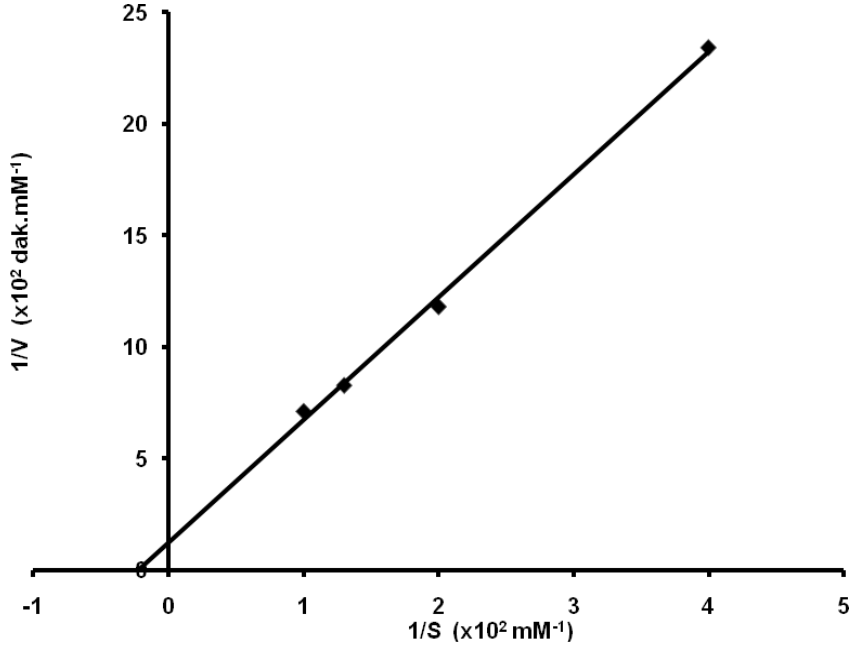
Şekil 3.17. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

3.6.3. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 2.9.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 3.18'de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.18). Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz için, K_m değeri 0,04835 mM ve V_{mak} değeri $8,07 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 3.18. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM $^{-1}$)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM $^{-1}$)
10,0	1,0	0,778	13,50	7,41
7,5	1,3	0,605	10,49	9,53
5,0	2,0	0,458	7,94	12,59
2,5	4,0	0,327	5,67	17,63



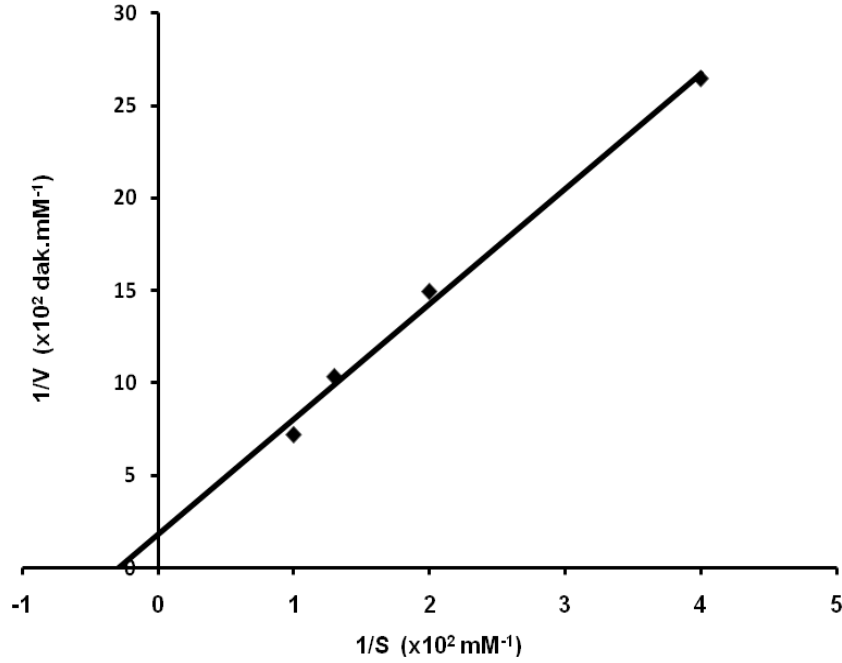
şekil 3.18. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

3.6.4. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 2.9.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 3.19'da verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.19). Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz için, K_m değeri 37×10^{-3} mM ve V_{\max} değeri $5,9 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 3.19. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM ⁻¹)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM ⁻¹)
10,0	1,0	0,821	14,24	7,02
7,5	1,3	0,558	9,68	10,33
5,0	2,0	0,366	6,35	15,75
2,5	4,0	0,218	3,78	26,44



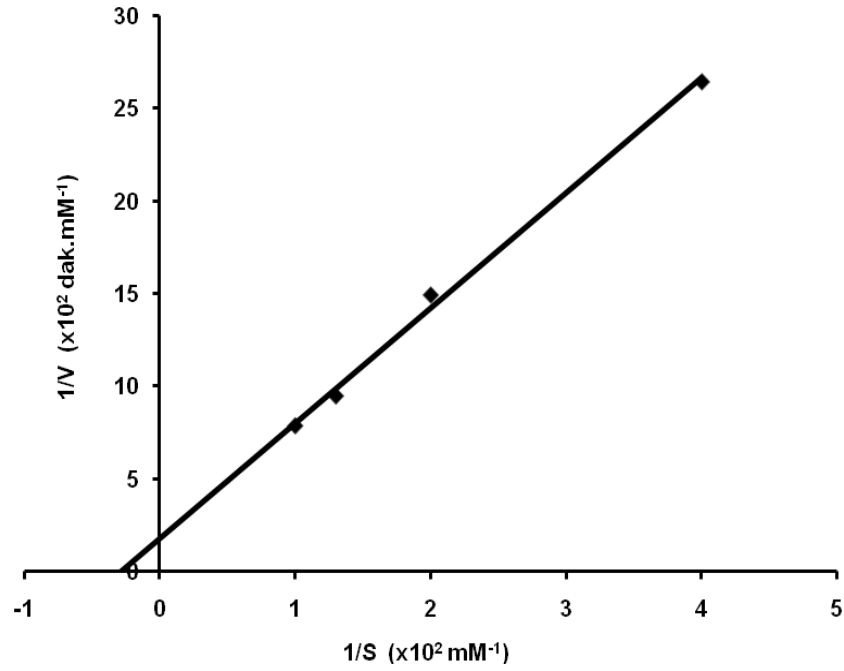
Şekil 3.19. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

3.6.5. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 2.9.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 3.20'de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.20). Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz için, K_m değeri $55,5 \times 10^{-3}$ mM ve V_{mak} değeri $8,58 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 3.20. Hidroksisüksinimitle aktiveştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifiğine substrat derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM $^{-1}$)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM $^{-1}$)
10,0	1,0	0,732	12,7	7,87
7,5	1,3	0,608	10,55	9,48
5,0	2,0	0,407	7,06	14,16
2,5	4,0	0,213	3,69	27,06



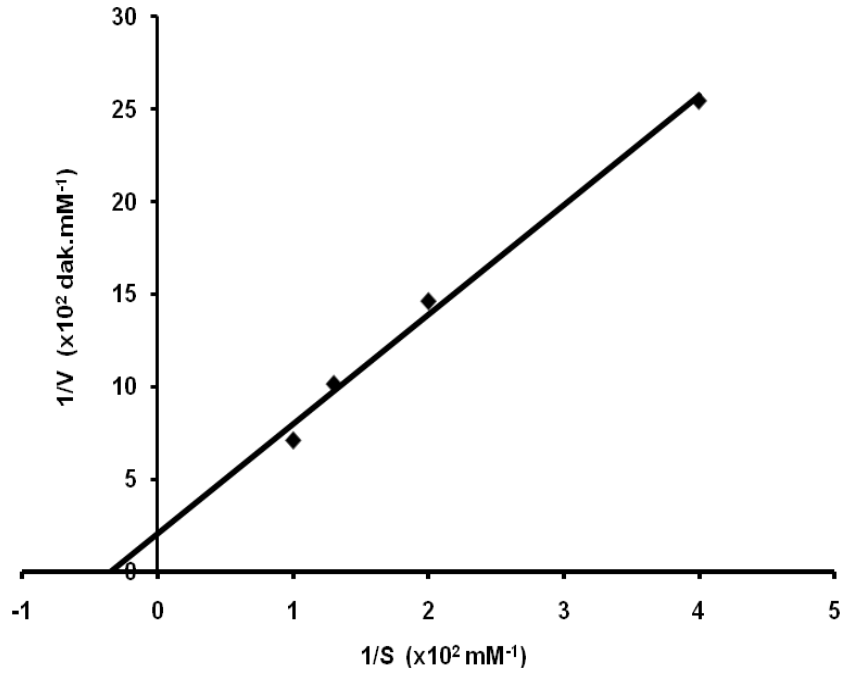
Şekil 3.20. Hidroksisüksinimitle aktiveştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiğı

3.6.6. Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 2.9.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 3.21'de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.21). Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz için, K_m değeri $30,8 \times 10^{-3}$ mM ve V_{mak} değeri $5,19 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 3.21. Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM ⁻¹)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM ⁻¹)
10,0	1,0	0,812	14,09	7,10
7,5	1,3	0,569	9,87	10,13
5,0	2,0	0,375	6,85	14,59
2,5	4,0	0,227	3,94	25,40



Şekil 3.21. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAl₃ hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

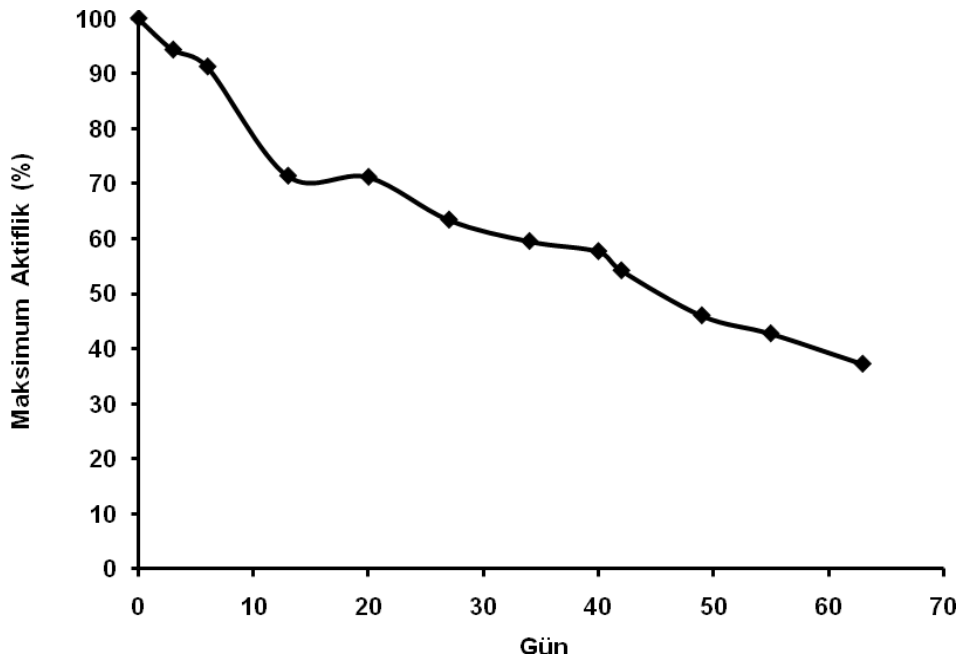
Deney sonuçlarına göre enzimin immobilize edilmesiyle K_m değerinin arttığı, yani enzimin substrata olan ilgisinin düştüğü görülmektedir. Literatürde Magnetik Kitosan nano partikülleri üzerine immobilize edilen lakkaz için K_m değerini 31,1 μM olarak bulmuşlardır (95). Eupergite immobilize edildiğinde K_m 'nin 0,150 mM ve V_{mak} değerinin $7,6 \times 10^{-3} \text{ mM.dak}^{-1}$ olduğunu tespit etmişlerdir (100).

3.7. Serbest Enzimin Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest enzimin aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla, 4°C'da saklanan lakkaz çözeltilerinin 63 gün boyunca Bölüm 2.10.1'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Serbest enzimin maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 3.22 ve Şekil 3.22'de gösterildi.

Çizelge 3.22. Serbest enzimin aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,489	8,48	100,00
3	0,461	8,00	94,30
6	0,446	7,74	91,23
13	0,349	6,05	71,39
20	0,348	6,04	71,18
27	0,310	5,38	63,41
34	0,291	5,05	59,53
40	0,313	4,89	57,68
42	0,265	4,60	54,21
49	0,225	3,90	46,02
55	0,209	3,63	42,75
63	0,182	3,16	37,23



Şekil 3.22. Serbest enzimin maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Serbest enzimin 4°C'da depolamada 63. günde başlangıç aktifliğinin sadece %37,2'sini koruduğu gözlemlendi. Literatürde *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazın 4°C'da 4 ay depolanması sonucunda serbest enzimin aktifliğinin %90'ını koruduğunu bulmuşlardır (79).

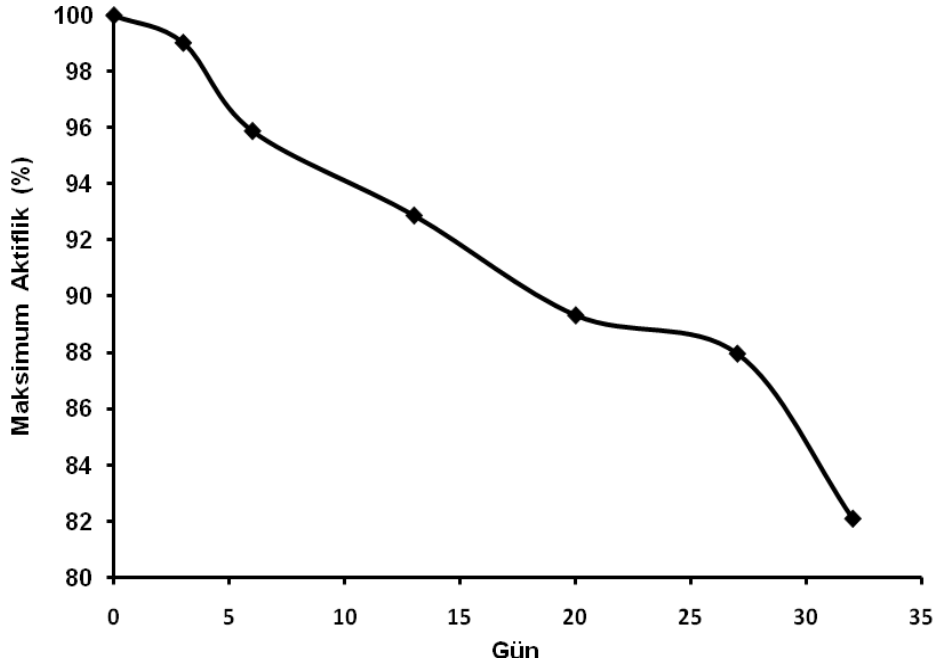
3.8. İmmobilize Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

3.8.1. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4°C'da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 32 gün boyunca Bölüm 2.10.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresiyle değişimi Çizelge 3.23 ve Şekil 3.23'de gösterildi.

Çizelge 3.23. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,732	12,70	100,00
3	0,725	12,58	99,03
6	0,702	12,18	95,88
13	0,680	11,80	92,88
20	0,654	11,34	89,33
27	0,644	11,17	87,96
32	0,601	10,43	82,09



Şekil 3.23. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresi ile değişimi

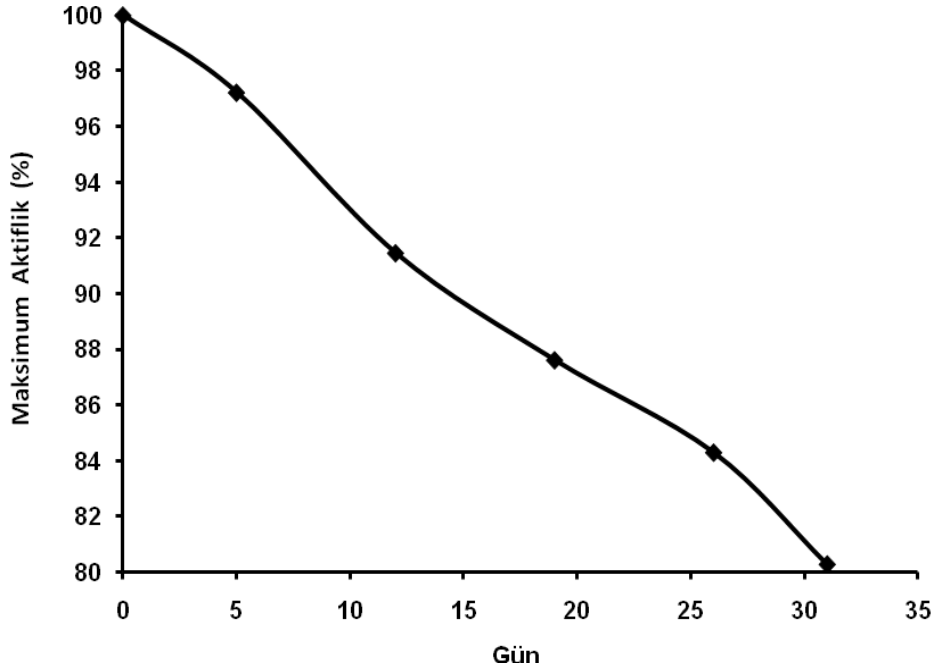
İmmobilize enzimin 4°C'da depolamada 32. günde başlangıç aktifliğinin % 82'sini koruduğu gözlemlendi.

3.8.2. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4°C'da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 30 gün boyunca Bölüm 3.10.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresiyle değişimi Çizelge 3.24 ve Şekil 3.24' de gösterildi.

Çizelge 3.24. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,572	9,92	100,00
5	0,556	9,64	97,22
12	0,523	9,07	91,45
19	0,501	8,69	87,61
26	0,482	8,36	84,28
31	0,459	7,96	80,26



Şekil 3.24. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresi ile değişimi

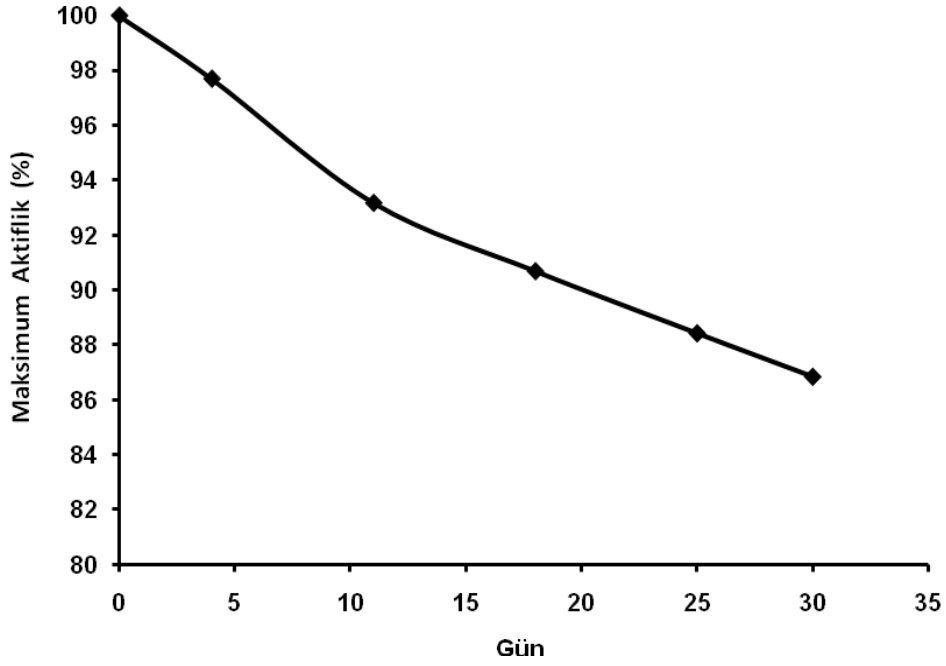
İmmobilize enzimin 4°C'da depolamada 31. günde başlangıç aktifliğinin %80'ini koruduğu gözlemlendi.

3.8.3. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4°C'da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 31 gün boyunca Bölüm 2.10.2'de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 3.25 ve Şekil 3.25'de gösterildi.

Çizelge 3.25. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,442	7,67	100,00
4	0,432	7,49	97,70
11	0,412	7,15	93,18
18	0,401	6,96	90,69
25	0,391	6,78	88,43
30	0,384	6,66	86,85



Şekil 3.25. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

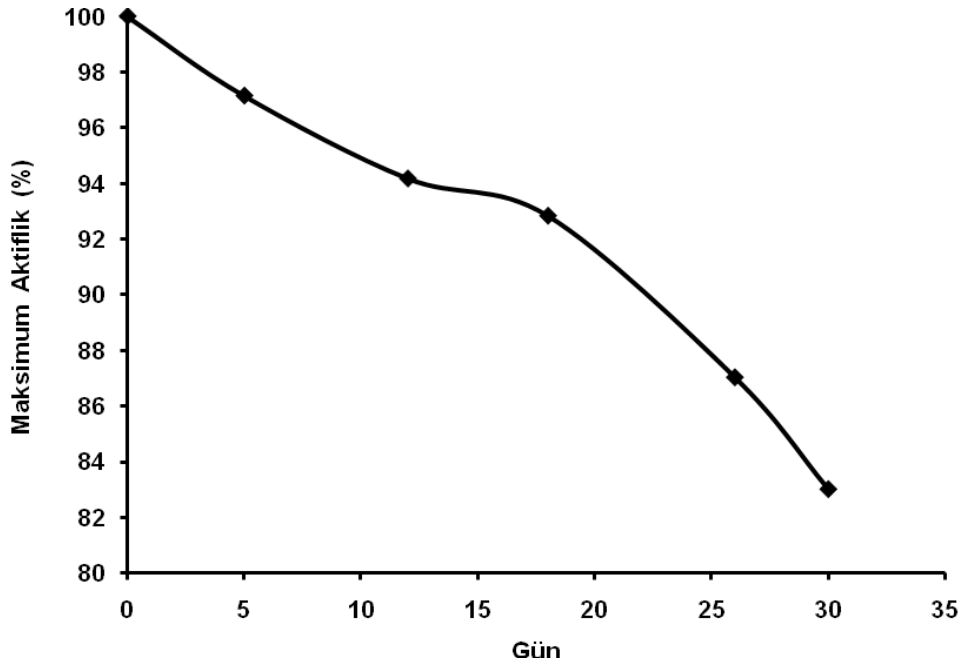
İmmobilize enzimin 4°C'da depolamada 30. günde başlangıç aktifliğinin yaklaşık %87'sini koruduğu gözlemlendi.

3.8.4. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelere immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4°C'da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 30 gün boyunca Bölüm 2.10.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelere immobilize edilen lakkazın aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 3.26 ve Şekil 3.26'da gösterildi.

Çizelge 3.26. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini

Zaman (gün)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,672	11,66	100,00
5	0,653	11,33	97,15
12	0,633	10,98	94,17
18	0,624	10,82	92,83
26	0,585	10,15	87,03
30	0,558	9,68	83,01



Şekil 3.26. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresi ile değişimi

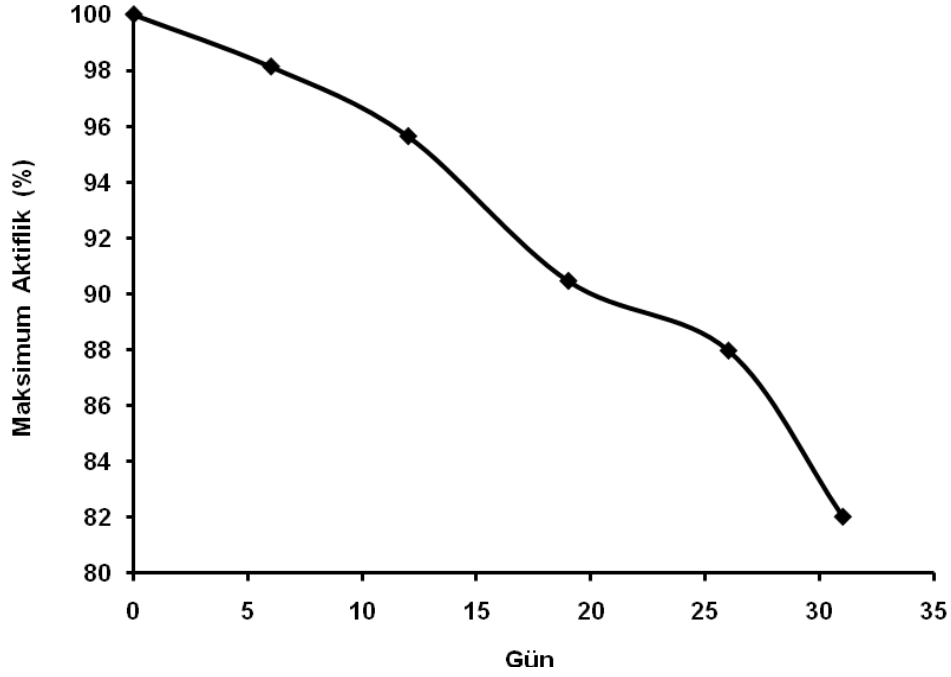
İmmobilize enzimin 4°C'da depolamada 30. günde başlangıç aktifliğinin %83'ünü koruduğu gözlemlendi.

3.8.5. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelere immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4°C'da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 31 gün boyunca Bölüm 2.10.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelere immobilize edilen lakkazın aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 3.27 ve Şekil 3.27'de gösterildi.

Çizelge 3.27. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,522	9,05	100,00
6	0,512	8,88	98,14
12	0,499	8,66	95,64
19	0,472	8,19	90,47
26	0,459	7,96	87,98
31	0,428	7,42	82,04



Şekil 3.27. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresi ile değişimi

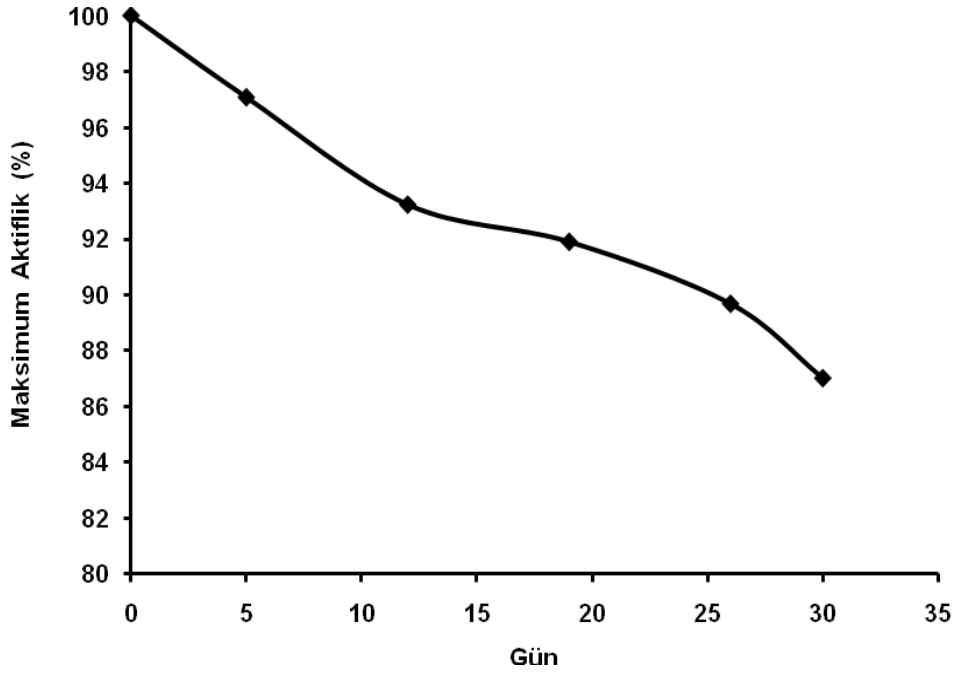
İmmobilize enzimin 4°C'da depolamada 31. günde başlangıç aktifliğinin % 82'sini koruduğu gözlemlendi.

3.8.6. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelere immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4°C'da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 30 gün boyunca Bölüm 2.10.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelere immobilize edilen lakkazın aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 3.28 ve Şekil 3.28'de gösterildi.

Çizelge 3.28. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresi ile değişimi

Zaman (gün)	Absorbans (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,677	11,74	100,00
5	0,657	11,40	97,08
12	0,631	10,95	93,23
19	0,622	10,79	91,90
26	0,607	10,53	89,69
30	0,589	10,22	87,03



Şekil 3.28. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelere immobilize edilen lakkaz aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

İmmobilize enzimin 4°C'da depolamada 30. günde aktifliğinin %87'sini koruduğu gözlemlendi.

Literatürde, magnetik kitosan nano partiküller üzerine glutaraldehit ile çarpaz bağlanan lakkazın 30 gün sonunda aktivitesinin %85'ini koruduğu belirtilmiştir (95). Lakkaz DEAE-Granocel 500, CM-Granocel ve akrilik taşıyıcılara kovalent bağlanma ile immobilize edildiğinde, 4°C'da 4 ay depolandığında immobilize lakkazın aktivitesinin %90'nını koruduğu belirtilmiştir (75). Lakkazı glutaraldehit çarpaz bağlayıcı ile kitosan mikroküreler ve Fe⁺³ geçiş metali kelatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde, 4°C'da 3 ay sonunda kelat üzerine immobilize edilmiş enzim ve suda çözünebilir kitosan üzerine immobilize edilmiş enzimin aktifliğinin %90'nını koruduğu, mikro küreler üzerine immobilize edilmiş enzimin ise aktifliğinin %85'ini koruduğu belirtilmiştir (89). Sonuçlarımız literatürdeki sonuçlarla uyum göstermektedir.

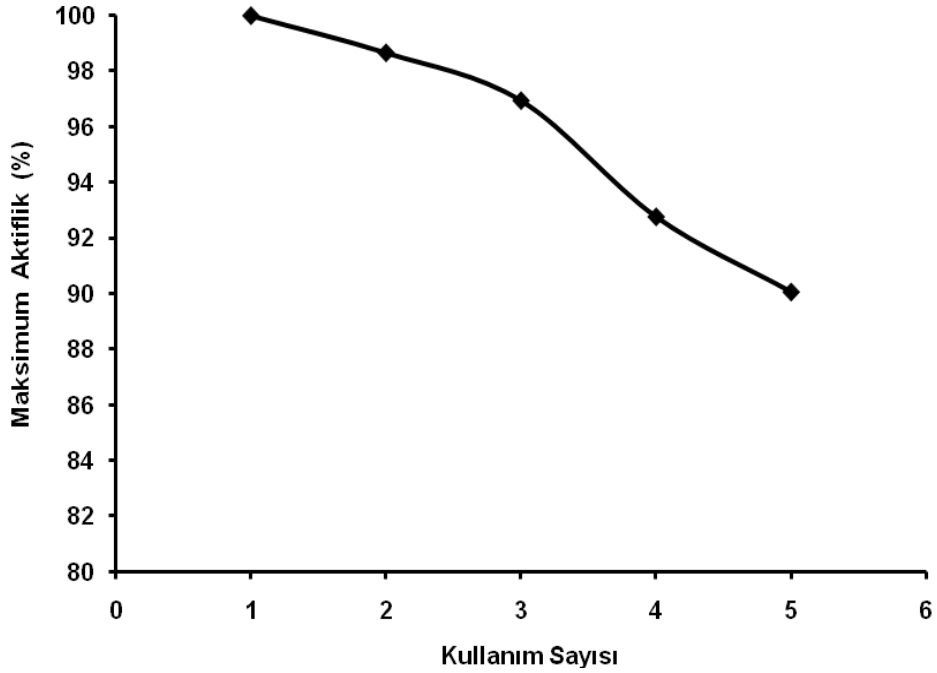
3.9. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

3.9.1. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz 1 gün içinde 5 kez arasında kullanılarak Bölüm 2.11'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 3.29 ve Şekil 3.29'da gösterildi.

Çizelge 3.29. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifiğinin kullanım sayısı ile değışimi

Kullanım sayısı	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,813	14,10	100,00
2	0,802	13,91	98,67
3	0,788	13,67	96,94
4	0,754	13,08	92,76
5	0,732	12,7	90,05



Şekil 3.29. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifiğinin kullanım sayısı ile değışimi

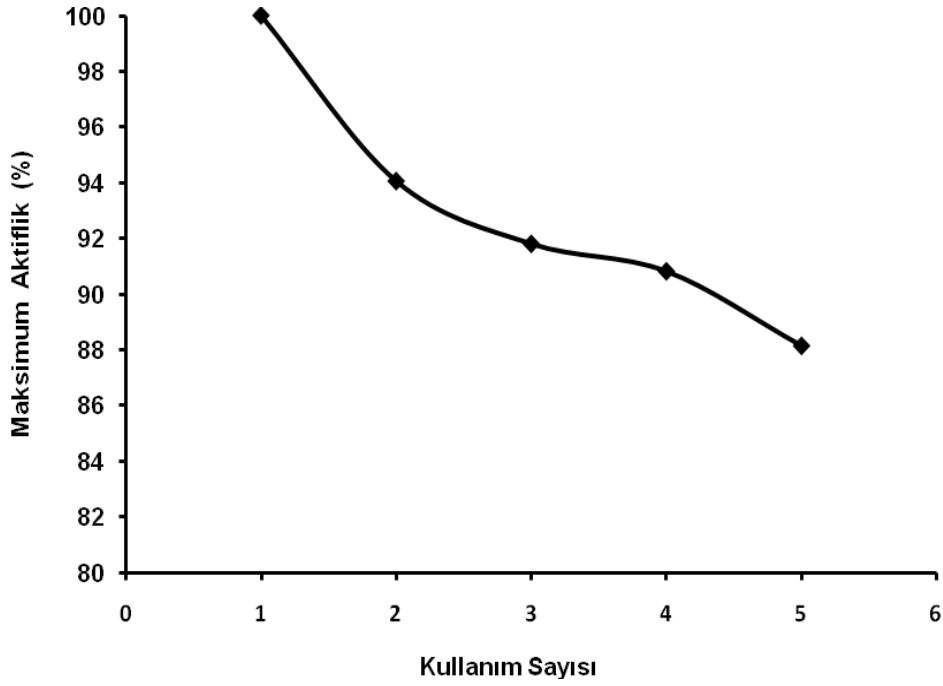
İmmobilize edilmiş enzimin 5 kez kullanılmasıyla başlangıç aktifliğinin %90'nını korunduğu gözlemlendi.

3.9.2. Hidroksisüksinimitle aktiveleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Hidroksisüksinimitle aktiveleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine lakkaz 1 gün boyunca 5 kez kullanılarak Bölüm 2.11'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 3.30 ve Şekil 3.30'da gösterildi.

Çizelge 3.30. Hidroksisüksinimitle aktiveleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,710	12,32	100,00
2	0,668	11,59	94,05
3	0,652	11,31	91,80
4	0,645	11,19	90,82
5	0,626	10,86	88,14



Şekil 3.30. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkaz aktifliğinin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

İmmobilize edilmiş enzimin 5 defa kullanılmasıyla başlangıç aktifliğinin %88'inin korunduğu gözlemlendi.

3.9.3. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 5 defa kullanılarak Bölüm 2.11'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 3.31 ve Şekil 3.31'de gösterildi.

Çizelge 3.31. Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,742	12,87	100,00
2	0,731	12,68	98,53
3	0,703	12,19	94,75
4	0,678	11,76	91,38
5	0,641	11,12	86,40



Şekil 3.31. Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine kullanım sayısı ile değişimi

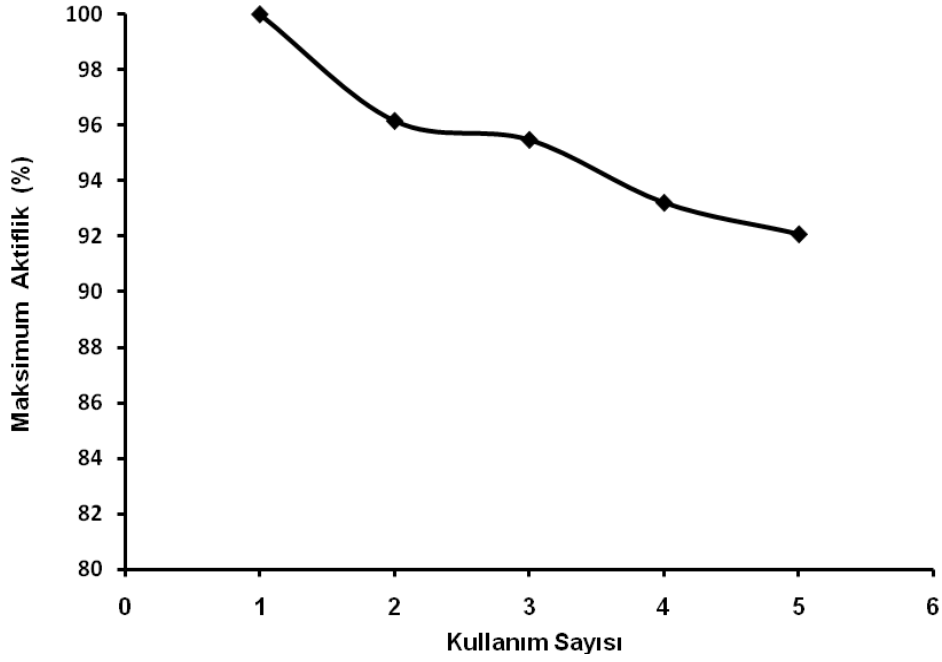
İmmobilize edilmiş enzimin 5 defa kullanılmasıyla başlangıç aktifliğinin %86' sının korunduğu gözlemlendi.

3.9.4. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 5 defa kullanılarak Bölüm 2.11'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 3.32 ve Şekil 3.32' de gösterildi.

Çizelge 3.32. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,881	15,28	100,00
2	0,847	14,69	96,16
3	0,841	14,59	95,47
4	0,821	14,24	93,20
5	0,811	14,07	92,07



Şekil 3.32. Karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NiPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

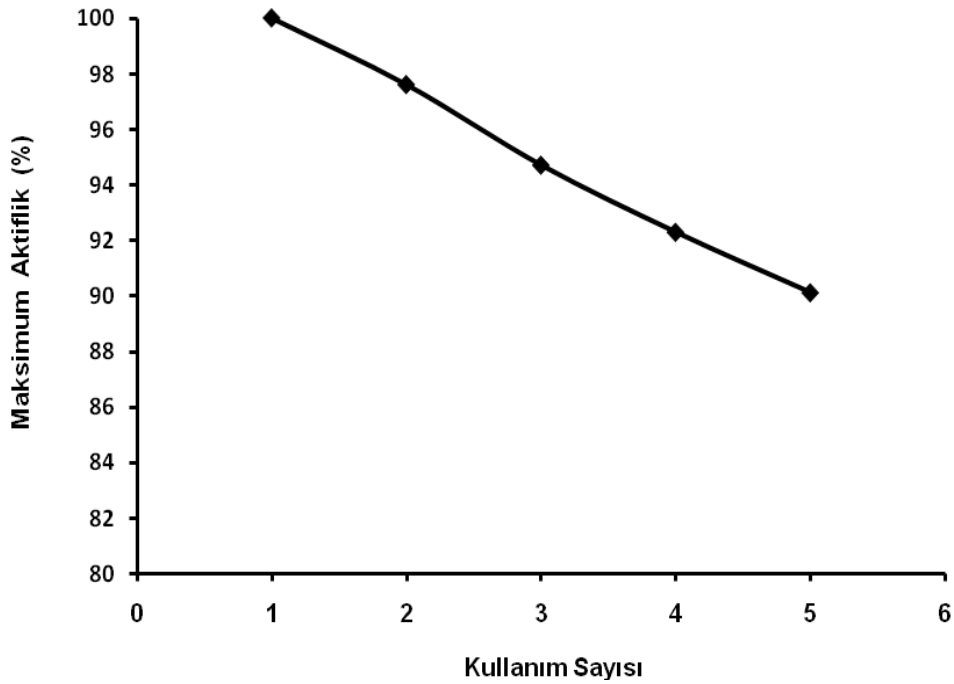
İmmobilize edilmiş enzimin 5 defa kullanılmasıyla başlangıç aktifliğinin %92' sinin korunduğu gözlemlendi.

3.9.5. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NiPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NiPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 5 defa kullanılarak Bölüm 2.11'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 3.33 ve Şekil 3.33'de gösterildi.

Çizelge 3.33. Hidroksisüksinimitle aktiveştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,414	7,18	100,00
2	0,404	7,01	97,60
3	0,392	6,80	94,70
4	0,382	6,63	92,29
5	0,373	6,47	90,11



Şekil 3.33. Hidroksisüksinimitle aktiveştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

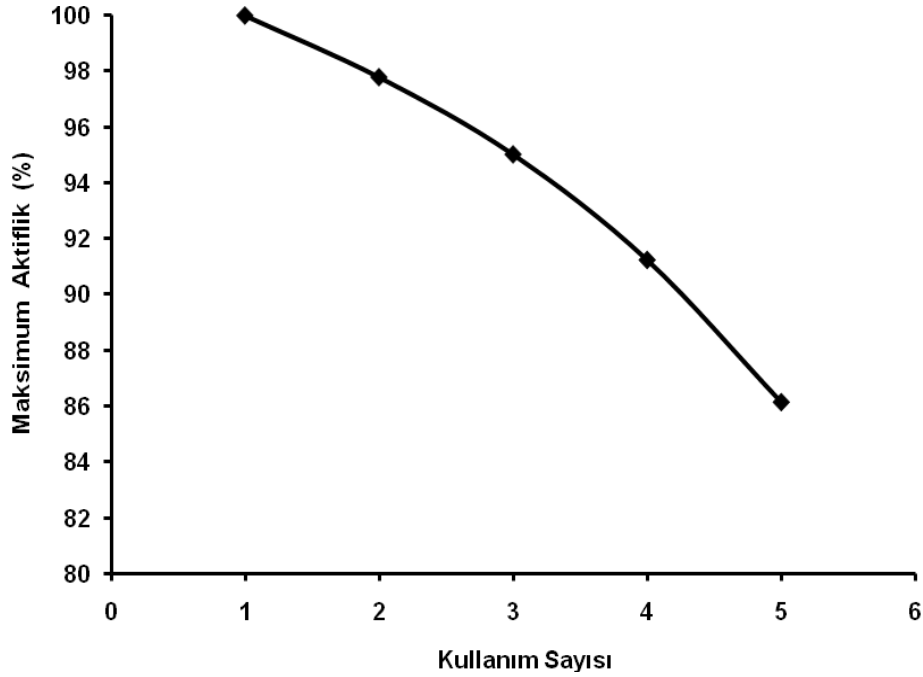
İmmobilize edilmiş enzimin 5 defa kullanılmasıyla başlangıç aktifliğinin %90'nının korunduğu gözlemlendi.

3.9.6. Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojeline immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 5 defa kullanılarak Bölüm 2.11'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 3.34 ve Şekil 3.34'de gösterildi.

Çizelge 3.34. Karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın aktifliğine aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,687	11,92	100,00
2	0,672	11,66	97,79
3	0,653	11,33	95,03
4	0,627	10,88	91,24
5	0,592	10,27	86,15



Şekil 3.34. Karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NiPA)-NaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

İmmobilize edilmiş enzimin 5 defa kullanılmasıyla başlangıç aktifliğinin % 86'sını koruduğu gözlemlendi.

Literatürde, Magnetik kitosan nano partiküller üzerine glutaraldehitte çarpraz bağlanan lakkazın 10 kullanımından sonra aktivitesinin yaklaşık %85'ini koruduğu tespit edilmiştir (95). Lakkaz gulutaraldehit çarpraz bağlayıcısı ile amin sonlu nanokompozitler (Cu TPAC)-Fe₃ O₄ (bakır tetraamin ftalosiyenin) üzerine immobilize edilmiş ve 5 kez kullanımdan sonra aktivitesinin %80'inini koruduğu tespit edilmiştir (87). Aktive edilmiş PVA üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz enziminin 10 kullanımdan sonra aktifliğinin %60'ını koruduğu tespit edilmiştir (78).

Enzimin Bağlandığı Küre Türü	Optimum pH	Optimum Sıcaklık	Tekrar kullanım	Depolama	Km (mM)	Vm(mM.dak ⁻¹)
Serbest	5	40	---	60%	16,98x10 ⁻³	2,09 x10 ⁻³
Ca alj.+ pva + karb.	6	45	90	82%	28,8x10 ⁻³	6.00x10 ⁻³
Ca alj. + pva + hidr.	6	45	88	80%	32,7x10 ⁻³	5,30x10 ⁻³
Caalj.+ pva+ karb. + hidr.	6	45	86	86%	48,35x10 ⁻³	8,07x10 ⁻³
Caalj.+p-nipa+ karb.	6	45	92	83%	37x10 ⁻³	5,90x10 ⁻³
Caalj.+ p-nipa + hidr.	6	45	90	82%	55,5x10 ⁻³	8,58x10 ⁻³
Ca-alj.+ p-nipa+ karb. + hidr.	6	45	86	87%	30,8 x 10 ⁻³	5,19x10 ⁻³

Çizelge 3.35. Deneysel Sonuçlar

4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu tez çalışmasında serbest ve immobilize lakkaz enziminin aktivitesine etki eden çeşitli parametreler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Serbest lakkaz için optimum pH değeri 5,0 olarak bulundu. Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize lakkaz enzimleri için optimum pH değeri 6 bulundu.
2. Serbest lakkaz için optimum sıcaklık 40°C olarak bulundu. Kovalent bağlanma yöntemleriyle immobilize lakkaz enzimleri için optimum sıcaklık değeri 45°C'a yükselmiştir.
3. Serbest lakkaz için K_m değeri $16,98 \times 10^{-3}$ mM olarak bulundu. Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize lakkaz enzimleri için K_m değerleri $28,77 \times 10^{-3}$ mM - $55,5 \times 10^{-3}$ mM arasında değiştiği görülmüştür.
4. Serbest lakkaz için V_{mak} değeri $0,002085$ mM.dak⁻¹, kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize lakkaz enzimleri için ise V_{mak} değerleri $5,3 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ - $8,58 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ arasında değiştiği görüldü.
5. Serbest lakkazın, 4°C'da depolamada 34. günde başlangıç aktivliğinin yaklaşık %60'ını koruduğu gözlemlendi. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAlj, karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj, karbodiimit ve hidrosisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAlj hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enziminin,

4°C'da depolamada başlangıç aktifliğinin sırasıyla 32. günde %82'sini, 30. günde %80'ini, 31. günde %86'sını, 30. günde %83'ünü, 31. günde %82'sini, 30. günde %87'sini koruduğu gözlemlendi.

6. Karbodiimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAl₂, hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAl₂, karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş PVA-CaAl₂, karbodiimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAl₂, hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAl₂, karbodiimit ve hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAl₂ hidrojellerine immobilize edilen lakkaz 5 kez kullanımı sonunda başlangıç aktifliğinin sırasıyla %90'ını, %88'ini, %86'sını, %92'sini, %90'ını, %86'sını koruduğu bulundu.

Karbodiimit, hidroksisüksinimit ve herikisiyle aktifleştirilmiş kalsiyum aljinat kürelerine immobilize edilen lakkaz enzimi, endüstriyel atıkların zehirsizleştirilmesi ve renk giderilmesinde, tekrar kullanımıyla ekonomik ve alternatif bir arıtma yöntemi olarak kullanılabilir. Hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş P(NİPA)-CaAl₂ kürelerin tekrar kullanım açısından daha dayanıklı olduğundan endüstriyel açıdan kullanımları daha uygundur.

KAYNAKLAR

- (1). Nicell, J.A., Al-Kassim, L., Bewtra, JK., Taylor, KE., " Wastewater treatment by enzyme catalysed polymerization and precipitation". *Biodeterior Abstr* 7: 1–8, 1993.
- (2). Bamforth, S.M., Singleton, I., "Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions". *J Chem Technol Biotechnol* 80: 723–736, 2005.
- (3). Jolivalt, C., Brenon, S., Caminade, E., Mougin, C., Pontié, M., "Immobilization of Laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater". *J Membrane Sci* 180:103–113, 2000.
- (4). Kurniawati, S., Nicell, JA., "Variable stoichiometry during the Laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol". *Biotechnol Prog* 23: 389–397, 2007.
- (5). Duran, N., Esposito, E., "Potential applications of oxidation enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatments: a review". *Appl Catalysis B Environ* 28: 83–99, 2000.
- (6). Duran, N., Rossa, M., D'Annibale, A., Gianfreda L., "Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review". *Enzyme Microb Technol* 31: 907–931, 2002.
- (7). Livernoche, D., Jurasek, L., Desrochers, M., Dorica, J. "Removal of color from kraft mill waste waters with cultures of white rot fungi and immobilized mycelium of *Coriolus versicolor*". *Biotechnology and Bioengineering* 25: 2055–2065, 1983.
- (8). Arica, M.Y., Kacar, Y., Genc, O., "Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution". *Bioresource Technology* 80: 121–129, 2001.
- (9). Smith, A.D., "Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology" Oxford University Press, 1997.
- (10). Garrett, R.H., Grisham, C.M., "Biochemistry", Second Edition Saunders College Publishing. 426-427, 1999.
- (11). Telefoncu, A., "Enzimoloji", Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 1-305, 1977.

- (12). Hult K., Berglund, P., "Engineered enzymes for improved organic synthesis". *Curr Opin Biotechnol.* 14 (4): 395–400, 2003.
- (13). Aksoy, C., "Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 26-28, 2003.
- (14). Zaborsky, O., "Adsorption Immobilized Enzyme", Ed. by Weast, R.C., CRC Press, Ohio, 1973.
- (15). Bickerstaff, G.F., "Immobilization of enzymes and cells", Humana press, Totowa, New Jersey, 1997.
- (16). Woodward, J., "Methods of immobilization of microbial cells", *J. Microb. Methods*, 8:91-102, 1988.
- (17). Carr, P.W., Bowers, L.D., "Support considerations in chemical analysis", *Enzymes*, Academic Press, New York, 56: 167-170, 1980.
- (18). Glick, D., "Methods of Biochemical Analysis", *Enzyme Immobilization*, Academic Press, New York, 25: 135-201, 1979.
- (19). Srere, P.A., Uyeda, K., "Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices", *Methods in Enzymology*, (Edited by Mosbach, K.), Academic Press, Inc., New York, 44: 11-19, 1976.
- (20). Scouten, W.H., Mosbach, K., "Methods in Enzymology", Academic Press, Orlando, 135: 30-65, 1987.
- (21). Kahn, K., "Theoretical Study of Intermediates in the Urate Oxidase Reaction", *Bioorganic Chemistry*, 27: 351-362 (1999).
- (22). Zaborsky, O., "Adsorption Immobilized Enzyme", Ed. by Weast, R.C., CRC Press, Ohio, 1973.
- (23). Kaetsu, I., Kamura, M., Yoshida, M., "Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low temperature", *Biotechnol. Bioeng.*, 21: 847-849, 1979.
- (24). Bailey, J.E., Gillis, F.D., "Biochemical Engineering Fundamentals", McGraw Hill, New York, 984-985, 1986.
- (25). Salamone, J.C., "Polymeric Materials Encyclopedia", CRC Press, New York, 1: 149-154, (1996).

- (26). Kierstan, M.P.J., Bucke, C., "The Immobilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles and Enzymes in Calcium Alginate", *Biotechnology and Bioengineering*, 19: 87-397, 1977.
- (27). G. Görennek, "Aljinat Kürecikler İçinde Katalaz İmmobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 21-24, 1999.
- (28). Chen, H., Tendeyong, F., Yiacoumi, S., "Equilibrium and Studies of Copper Ion Uptake by Calcium Alginate", *Environmental Science Technology*, 31: 1433-1439, 1997.
- (29). Chen, D., Lewondowski, Z., Roe, F., Surapaneni, P., "Diffusivity of Cu²⁺ in Calcium Alginate Gel Beads", *Biotechnology and Bioengineering*, 41: 755-760, 1993.
- (30). SRI Consulting CEH Report Polyvinyl Alcohol, published March 2007, abstract retrieved July 30, 2008.
- (31). Hirokawa, Y., Tanaka, T., *J Chem Phys*, 81: 6379, 1984.
- (32). Monji, N., Hoffman A.S., *Appl Biochem Biotechnol* 1987;14: 107.
- (33). Hoffman, A.S., Afrassiabi, A., Dong, L.C., *J Control Release* 1986;4: 213.
- (34). Bae, H.Y., Okano, T., Hsu, R., Kim, S.W., *Macromol Chem Rapid Commun*, 8: 481, 1987.
- (35). Freitas, R.F.S., Cussler, E.L., *Chem Eng Sci* 42 (1): 97, 1987
- (36). Champ, S., Xue, W., Huglin M.B., *Polymer* 42: 6439, 2001.
- (37). Dong L.C, Hoffman AS. *J Control Release*, 4: 223, 1986.
- (38). Chee, C.K., Rimmer, S., Soutar, I., Swanson, L., Time-Resolved fluorescence anisotropy studies of the temperature-induced intramolecular conformational transition of poly(N-isopropylacrylamide). *Polymer*, 38, 483–486, 1997.
- (39). Chen, G., Hoffman, A. S., A new temperature- and pH responsive copolymer for possible use in protein conjugation. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 196, 1251–1259, 1995.
- (40). Chen, J.-P., Hsu, M.-Sh., Preparation and properties of temperature-sensitive poly (N-isopropylacrylamide) chymotrypsin conjugates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2, 233–241, 1997.

- (41). Ringsdorf, H., Venzmer, J., Vinnik, F.M., Use of Nonradioactive energy-transfer to explore interpolymer and polymer solute interaction in aqueous solutions of poly (thermal- isopropyl-acrylamide). *Macromolecules*, 24, 1678–1686, 1991.
- (42). Schild, H.G., “Poly (N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application” *Progress in Polymer Science*, 17 (2): 163–249. 1992.
- (43). Stamets, P., 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms 3RD ED.*, TenSpeed Pres, Berkely, C.A., 382-386.
- (44). chem.ox.ac.uk
- (45). Taylor, P.B., Ashman, S., Baddeley, M.S., Bartram, L.S., “Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases”, *J Biomol Screen*. 7: 537-543, 2002.
- (46). E. Birhanlı, Mikroorganizmaların lakkaz üretimine çeşitli faktörlerin etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 37-44, 2003.
- (47). Delanoy, G., Li, Q.X., Yu, J., “Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan.”, *Int J Biol Macromol.*, 35: 89-95, 2005.
- (48). M. Bayralı, Resorsinol’ün enzimatik polimerizasyon kinetiğinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 37-44, 2003.
- (49). Freire, R.S., Durán, N., Kubota, L.T., “Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol”, *Talanta*, 54: 681-686, 2001.
- (50). Durán, N., Rosa, M.A., D’Annibale, A., Gianfreda, L., “Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports a review”, *Enzyme Microb Tech*, 31: 907-931, 2002.
- (51). Quan, D., Shin, W., “Modification of electrode surface for covalent immobilization of laccase”, *Mat. Sci. Eng. C-Bios*, 24: 113-115, 2004.
- (52). Cuadrado, M.U., Perez-Juan, P.M., Luque de Castro, D., Gomez-Nieto, M.A., “A fully automated method for in real time determination of laccase activity in wines”, *Anal. Chim. Acta*, 553: 99-104, 2005.
- (53). Piontek, K., Biol, J., “Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers”, *J.Biol.Chem*, 277: 37663-37669 (2002).

- (54). Couto, S.R., Herrera, J.L.T., Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24: 500–513, 2006.
- (55). Pointing, S.B., Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 20–33, 2001.
- (56). Call, H.P., Mücke, I., History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase mediator systems. *J Biotechnol* 53: 163–202, 1997.
- (57). Kuhad, R.C., Singh, A., Eriksson, K., Microorganisms And Enzymes Involved in The Degradation of Plant Fiber Cell Wall. In: Eriksson K.E.L., Editor. *Biotechnology in The Pulp and Paper Industry. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Berlin: Springer Verlag: 1997.
- (58). Haghghi, B., Gorton, L., Ruzgas, T., Jonsson, L.J., Characterization of Graphite Electrodes Modified With Laccase From *Trametes versicolor* and Their Use For Bioelectrochemical Monitoring of Phenolic Compounds in Flow Injection Analysis. *Anal. Chim. Acta*, 487: 3-14, 2003.
- (59). Dhawale, S.S., Lane, A.C., Dhawale, S.W., Effects of Mercury on White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 56: 825-832, 1996.
- (60). Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., Hatakka, A., Production of Laccase Lignin Peroxidase by Various Strains of *Trametes versicolor* Depending on Culture Condition. *Acta Microbiologica Polonica*, 40: 221-234, 1991.
- (61). Cardoso, M.B. and Nicoli, J.R., Single Cell Protein From The Thermotolerant Fungus *Phanerochaete chrysosporium* Grown in Vinasse. *Nutrition Reports International*, 24(2): 249-255, 1981.
- (62). Yeşilada, Ö., Topçuoğlu, F.Ş., Ünyayar, A., Ünyayar, S., Fışkın, K. Bozcuk, S., Şlempe İçeren İnkübasyon Ortamında Bazı Beyaz Çürükçül Funguslarda Absisik Asit(ABA) Üretimi. 5. Ulusal Biyoloji Kongresi, Erzurum, 1990.
- (63). Couto, S.R., Herrera, J.L.T., Industrial and Biotechnological Applications of Laccase: A Review. *Biotechnology Advances*, 24: 500-513, 2006.
- (64). Rogalski, J., Dawidowicz, A.L., Jozwik, E., Leonowicz, A., “Immobilization of Laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass”, *J. Mol. Catal. B Enzym*. 6: 29-39, 1999.

- (65). Piacquadio, P., De Stefano, G., Sammartino, G., Sciancalepore, V., "Phenols removal from apple juice by laccase immobilized on Cu²⁺ - chelate regenerable carrier", *Biotechnology Techniques*, 11 (7): 515–517, 1997.
- (66). Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N., Rogalski, J., Jaszek, M., Malarczyk, E., Staszczak, M., Fink Boots, M., Leonowicz, A., "Activity of free and immobilized extracellular *Cerrena unicolor* Laccase in water miscible organic solvents", *Cat. Inist*, 52: 589-595, 1998.
- (67). Rogalski, J., Dawidowicz, A.L., Jozwik, E., Leonowicz, A., "Immobilization of Laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass", *J. Mol. Catal. B Enzym.* 6: 29-39, 1999.
- (68). D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E., Sermanni, G.G., "Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment", *Process Biochem*, 34: 697-706, 1999.
- (69). Reyes, P., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R., "Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized Laccase", *Biotechnology Letters* 21: 875– 880, 1999.
- (70). Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A., Spettoli, P., "Biodegradation of phenols by Laccase immobilised in a membrane reactor", *Process Biochem*, 36: 51-58, 2000.
- (71). Krastanov, A., "Removal of phenols from mixtures by co- immobilized Laccase tyrosinase and Polyclar adsorbtion", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 24: 383-388, 2000.
- (72). Hublik, G. and Schinner, F., "Characterization and immobilization of the Laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of fenolic pollutants", *Enzyme Microb Tech*, 27: 330-336, 2000.
- (73). Ruiz, A.I., Malav'e, A.J., Felby, C., Griebenow, K., "Improved activity and stability of an immobilized recombinant Laccase in organic solvents", *Biotechnology Letters* 22: 229–233, 2000.
- (74). Leontievsky, A.A., Myasoedova, N.M., Baskunov, B.P., Golovleva, L.A., Bucke, C., Evans, C.S., "Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal Laccase", *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 85–91, 2001.

- (75). Al-Adhami, A.J.H., Bryjak, J., Markiewicz, B.G., Chozch, W.P., "Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers", *Process Biochem*, 37: 1387-1394, 2002.
- (76). Yinghui, D., Qiuling, W., Shiyu, F., "Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier", *Lett. Appl. Microbiol*, 35: 451-456, 2002.
- (77). Zille, A., Tzanov, T., Gübitz, G.M., Artur, C.-P., "Immobilized Laccase for decolourization of reactive black 5 dyeing effluent", *Biotechnology Letters* 25: 1473-1477, 2003.
- (78). Zamora, P.P., Pereira, M.C., Tiburtius, R.L., Rosa, M.A., Minussi, C.R., Duran, N., "Decolorization of reactive dyes by immobilized Laccase", *Appl Catal B-Environ*, 42: 131-144, 2003.
- (79). Dodor, D.E., Hwang, H., Ekunwe, S.I.N., "Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by immobilized Laccase from *Trametes versicolor*", *Enzyme Microb Tech*, 35: 210-217, 2004.
- (80). Quan, D., Shin, W., "Amperometric detection of Catechol and Catecholamines by immobilized Laccase from *DeniLite*", *Electroanalysis*, 16 (19), 2004
- (81). Quan, D., Kim, Y., Shin, W., "Sensing characteristics of tyrosinase immobilized and tyrosinase, Laccase co-immobilized platinum electrodes", *Bull. Korean Chem. Soc.* 25 (8): 1195-1201, 2004.
- (82). Kandelbauer, A., Maute, O., Kessler, R.W., Erlacher, A., Gübitz, G.M., "Study of dye decolorization in an immobilized Laccase enzyme-reactor using online spectroscopy" Published online 26 July 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.20162
- (83). Delanoy, G., Li, Q., Yu, J., *Int. J. of Biol. Macromol.*, 35, 89, 2005
- (84). Dominguez, A., Rodriguez, S., Sanroman, C. and MA. "Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into Alginate beads", *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: 405-409, 2005.
- (85). Solna', R., Petr, S., "Amperometric flow-Injection determination of phenolic compounds using a biosensor with immobilized Laccase, Peroxidase and Tyrosinase", *Electroanalysis* 17 (23): 2137-2146, 2005
- (86). Araujo, J.H., Uemura, V., Moraes, F., Barbosa, A., Zanin, G., "A comparative study on fungal Laccases immobilized on Chitosan", *Biology and Technology*, 48: 1-6, 2005.

- (87). Xiao, H., Huang, J., Liu, C., Jiang, D., "Immobilization of Laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutaraldehyde crosslinking method", *T Nonferr Metal Soc*, 16: 414-418, 2006.
- (88). Zawisza, I., Rogalsky, J., Opallo, M., "Electrocatalytic reduction of dioxygen by redox mediator and laccase immobilized in silicate thin film", *J Electroanal Chem*, 588: 244-252, 2006.
- (89). Yang, W.Y., Min, D.Y., Xiao, S.W., Jin, L., Rong, L., Tetsuo, M., Bo, C., "Immobilization and characterization of laccase from Chinese *Rhus vernicifera* on modified chitosan", *Process Biochem*, 41: 1378-1382, 2006.
- (90). Dominguez, A., Gomez, J., Lorenzo, M., Sanroman, A., "Enhanced production of laccase activity by *Trametes versicolor* immobilized into alginate beads by the addition of different inducers", *World J Microbiol Biotechnol* 23: 367–373, 2007.
- (91). Xiaoke, H., Yi, Z., Xueheng, Z., Huey-Min, H., "Biodegradation of benzo[a]pyrene with immobilized Laccase: genotoxicity of the products in HaCaT and A3 cells", *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48: 106-113, 2007.
- (92). Champagne, P.P., Ramsay, J.A., "Reactive blue 19 decolouration by Laccase immobilized on silica beads", *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 819–823, 2007.
- (93). Hu, X., Zhau, X. and Hwang, H., "Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nonparticles and kaolinite", *Chemosphere*, 66: 1618-1626, 2007.
- (94). Niladevi, K.N., Prema, p., "Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor", *World J Microbiol Biotechnol* 24: 1215–1222, 2008.
- (95). Fang, H., Huang, J., Ding, L., Li, M., Chen, Z., "Preparation of magnetic Chitosan nanoparticles and immobilization of Laccase", *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* Feb. 24 (1), 2009.
- (96). Vasil'eva, I.S., Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Yaropolov A.I., "Synthesis of electroconductive polyaniline using immobilized Laccase", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45 (1): 27–30, 2009.
- (97). Leonowicz, A., Grzywnowicz, K., "Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate", *Enzyme Microb Tech*, 3: 55-58, 1981.

- (98). Tekman, Ş., Öner, N., "Genel Biyokimya", İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul, 47-49 (1994).
- (99). Mosbach, K., "Methods in enzymology", Enzymology, Academic Press, New York, 44-49 (1976).
- (100). D'Annibale, A., Stazi, A., Vinciguerra, S.R. and Giovannozzi, V.G., "Oxirane-immobilized Lentinula edodes laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater", Biotechnol, 77: 265-273 (2000).