

T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİDROJEN PEROKSİT ELEKTRODU TASARIMINDA KULLANILMAK ÜZERE  
KATALAZIN MANYETİK KÜRELERE İMMOBİLİZASYONU

ASUMAN TOPÇU

MART 2008

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

.../.../.....

Doç. Dr. Burak BİRGÖREN

Müdür V.

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak... Biyoloji... Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU  
Ortak Danışman

Prof. Dr. M. Yakup ARICA  
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. M. Yakup ARICA

\_\_\_\_\_

Doç. Dr. Meral KARAKIŞLA ŞAHİN

\_\_\_\_\_

Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

\_\_\_\_\_

Doç. Dr. Yusuf MENEMEN

\_\_\_\_\_

## ÖZET

### HİDROJEN PEROKSİT ELEKTRODU TASARIMINDA KULLANILMAK ÜZERE KATALAZIN MANYETİK KÜRELERE İMMOBİLİZASYONU

TOPÇU, Asuman

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. M.Yakup ARICA

Ortak Danışman: Doç.Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Mart, 2008, 57 Sayfa

Manyetik poli(glisidil metakrilat- metil metakrilat), poli(GMA-MMA) mikroküreleri ile katalazın kovalent immobilizasyonu çalışıldı. Bağlanma ajanı olarak glutar dialdehit kullanıldı. İmmobilize katalazın aktivitesinin yüksek olduğu tespit edildi. İmmobilize katalaz enziminin sıcaklığa karşı dayanıklılığının serbest haline göre daha fazla olduğu gözlemlendi. Ayrıca, immobilize enzimin sıcaklık profiline göre serbest enzime göre daha geniş olduğunda görüldü. Serbest ve immobilize enziminin kinetik parametreleri belirlendi. İmmobilize enzimin substratına ilgisinin azalmasıyla tespit edilen Michaels sabitleri ( $K_m$ ) serbest enzime göre daha büyük olduğu ve diğer taraftan,  $V_{max}$  değerinin immobilize enzim için daha küçük olduğu gözlemlendi. 77 gün devam ettirilen kesikli işletimde manyetik poli(GMA-MMA) mikrokürelerine immobilize edilmiş enzimin aktivitesindeki kaybın yalnızca %14 mertebesinde olduğu görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Süspansiyon polimerizasyonu, İmmobilizasyon, Manyetik destek, Polimerik mikroküre, Katalaz, Enzim reaktörü

## ABSTRACT

### CATALASE İMMOBİLİSATION ONTO MAGNETİC BEADS FOR CONSTRUCTION HYDROGEN PEROXİDE ELECTRODE

TOPÇU, Asuman

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. M.Yakup ARICA

Asist. Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

March, 2008, 57 Pages

Covalent immobilisation of catalase onto magnetic poly(glycidyl methacrylate- methyl methacrylate), poly(GMA-MMA), microbeads was studied. Glutaric dialde was used as a coupling agent. Immobilization of catalase onto magnetic microbeads resulted an increase in the apparent activity with respect to the free enzyme. The activity yield of the immobilised catalase on the magnetic poly(GMA-MMA) microbeads was very high. Immobilised catalase preparation has resistance to temperature inactivation as compared to the free form. The temperature profile was broader for immobilised preparation than that of the free enzyme. Kinetic parameters were determined for immobilised catalase preparation as well as for the free enzyme. The values of the Michael's constants  $K_m$  for the immobilised catalase preparations were significantly larger, indicating decreased affinity by the enzyme for its substrate, whereas  $V_{max}$  values were

smaller for the immobilised catalase preparations. In a 77 days batch operation with magnetic microbeads, only 14% of immobilised catalase activity was lost.

**Keywords:** Suspension polymerisation, Immobilisation, Magnetic support,  
Polymer microbeads, Catalase, Enzyme reactor

## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanması esnasında desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve bilgileriyle yol gösteren saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. M. Yakup Arıca ve Doç Dr. Gölly Bayramoğlu' na teőekkürlerimi bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	İ
ABSTRACT.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	viii
ŞEKİLLER.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	4
1.1.1. Katalaz Enzimi.....	5
1.2. Enzim Aktivitesi Belirleme Yöntemleri.....	8
1.3. Enzimlerin Uygulama Alanları.....	8
1.4. Enzim İmmobilizasyonu.....	11
1.4.1. İmmobilizasyon İşleminde Kullanılan Matriksler.....	12
1.4.1.1 Manyetik Temelli Destek Materyalleri.....	14
1.4.2. Enzim İmmobilizasyon Metodları.....	16
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
2.1. Kullanılan Kimyasallar.....	19
2.2. Yöntem.....	19
2.2.1. Manyetik Temelli Destek Materyalinin Sentezi.....	19
2.2.2. Manyetik Temelli Mikrokürelere Katalaz Enziminin İmmobilizasyonu.....	21
2.2.2.1. Mikrokürelere Aktivasyonu.....	21
2.2.2.2. Manyetik Mikrokürelere Katalaz İmmobilizasyonu.....	22
2.2.2.2.1. İmmobilizasyon Etkinliğinin Belirlenmesi.....	22
2.2.3. Manyetik Mikrokürelere Karakterizasyonu.....	23
2.2.4. Serbest ve İmmobilize Katalazın Aktivite Tayinleri.....	23
2.2.5. Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi.....	25
2.2.6. Serbest ve İmmobilize Enzimin Isısal Kararlılığı.....	25



2.2.7. Depolama Kararlılığı.....	26
2.2.8. Manyetik Kürelerin Tekrar Kullanımları Sırasında Enzimin Kararlılığı.....	26
2.2.9 Sürekli Sistem Uygulaması.....	27
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	28
3.1. Destek Materyalinin Karakterizasyonu.....	30
3.2. Katalazın Destek Materyaline İmmobilizasyonu.....	33
3.3. Serbest ve İmmobilize Katalazın Kinetik Parametreleri.....	34
3.4. Enzimin Katalitik Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	36
3.5. Serbest ve Tutuklu Katalaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	38
3.6. Isısal Kararlılık.....	39
3.7. İmmobilize Katalazın Tekrar Kullanımı.....	40
3.8. Depolama Kararlılığı.....	41
3.9. Enzim Reaktörü Verimliliği.....	42
4. SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR.....	49

## ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Serbest ve İmmobilize Katalazın Kinetik Parametreleri.....	35
---	----

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b> Enzim İmmobilizasyonu Tekniklerinin Şematik Gösterimi.....	17
<b>Şekil 3.1.</b> (a) Poli(GMA-MMA) ve (b) Manyetik Poli(GMA-MMA) Mikrokürelerin FTIR Spektrumu.....	31
<b>Şekil 3.2.</b> Magnetik Mikrokürelerin SEM Mikrografı ( Yüzey Görüntüsü).....	32
<b>Şekil 3.3.</b> Serbest ve İmmobilize Katalaz Enzim Eşleniklerinin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	37
<b>Şekil 3.4.</b> Serbest ve İmmobilize Katalaz Enzim Eşleniklerinin pH Profilleri.....	38
<b>Şekil 3.5.</b> Serbest ve İmmobilize Katalaz Enziminin Isısal Kararlılığı.....	40
<b>Şekil 3.6.</b> İmmobilize Katalazın Tekrar Kullanımdan Sonra Kararlılığı .....	41
<b>Şekil 3.7.</b> Serbest ve İmmobilize Katalaz Eşleniklerinin Depolama Kararlılığı (4°C 'de).....	42
<b>Şekil 3.8.</b> İmmobilize Katalazın Sürekli Sistem Uygulaması.....	43

## 1. GİRİŞ

Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek canlı hücreler içerisinde meydana gelen kimyasal reaksiyonların hızlarını arttıran biyolojik katalizörlerdir ve çoğu zaman hücre dışında da aktivitelerini sürdürürler. Protein yapısında olan enzimler her ne kadar tepkime hızını artırsalar da, substrat ve denge derişimlerini etkilemezler. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, toksik ve patojenik olmaması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha kararlı ve ekonomik olmaları, yüksek ölçekte üretilebilmeleri gibi özelliklerinden dolayı, endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir <sup>(1-3)</sup>.

Son yıllarda, enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ile çok yüksek işletim maliyetleri ile üretilen ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği artmıştır. Biyoteknoloji ve genetik mühendisliğindeki çalışmalar, çeşitli proteinlerin ve enzimlerin endüstriyel ölçekli üretiminde önemli gelişmeler olduğunu göstermiştir. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak büyük ölçekte enzim üretimi mümkün olmuş ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır <sup>(4)</sup>. Enzim üretimi işlemi sürecinde saflaştırma işlemlerinin zor koşullar altında olması ve yüksek maliyet gerektirmesinin yanında sadece bir kere kullanılabilmeleri, genellikle ilaç ve gıda endüstrisinde biyokatalizör olarak veya kimyasal analizlerde çok özel olarak kullanılan enzimler için önemli dezavantajları oluşturmaktadır <sup>(5,6)</sup>.

Bazı çalışmalarda çok özel olarak kullanılan enzimlerin çalışmalardan sonra enzimin geri kazanımının mümkün olmaması, enzim saflaştırma işleminin zor olması, maliyetinin yüksek olması ve bir defaya mahsus kullanılmaları gibi bazı dezavantajlar sergilemektedirler. Bu nedenle modern biyoteknolojik yöntemlerin uygulanması ile doğal kaynaklardan izole edilen veya üretilen biyoaktif makromoleküller; yiyecek teknolojisinde, biyomedikal ve analitik alanlarda genellikle immobilizasyon işleminden sonra kullanılmaktadır <sup>(7)</sup>. Geliştirilen farklı immobilizasyon yöntemlerinin uygulanması ile; enzimler tekrar kullanılabilirliklerinin ve kararlılıkları artırılması, sürekli sistem çalışmalarına uygulanabilir olması, kısa işlem süresi, işletim maliyetinin azaltılmış olması ve ürünlerin saflık derecesi artırılabilmesi mümkün hale gelmektedir <sup>(8-10)</sup>.

Enzim immobilizasyonunda kullanılan metotlar, enzim ve destek arasındaki moleküler etkileşimlere dayanan fiziksel yöntemler ve kovalent bağ oluşumuna dayanan kimyasal yöntemler olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır <sup>(8)</sup>. Son yıllarda, çeşitli polimerizasyon teknikleri kullanılarak farklı geometrilere sahip polimerik yapılar enzim immobilizasyon destek materyali olarak kullanılmak üzere sentezlenmektedir. Enzim tutuklaması için uygun olacak bir taşıyıcı destek malzemesi reaktif grup içeriğine sahip olmalı, yüksek mekanik ve kimyasal kararlılık sunmalı ve olumlu akış özellikleri sergilemesinin yanında geniş bir yüzey alanına sahip olmalıdır.

Fazla sayıda destek materyali ve enzim tutuklama tekniklerinin varlığı, hemen hemen hiç bir biyoaktif türün uygulanabilir bir tutuklama yöntemi olmadan kalmasına izin vermemiştir. Böylece, destek materyalinin ve tutuklama yönteminin seçiminin önemi, serbest biyoaktif ajanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda doğrulanmıştır <sup>(8,9)</sup>. Akrilik kopolimerleri, bir taşıyıcı materyal ailesi

olarak, çeşitli özellikte hazırlanabildiklerinden, özellikle enzim tutuklanması için çok uygundur. Bunlar arasında, epoksi grubu taşıyan akrilik kopolimerler (poli(metilmetakrilat-ko-glisidil metakrilat) gibi), potansiyel taşıyıcı matris olarak bazı önemli avantajlar (örneğin amino, tiyol ve fenolik grupları ile, ılımlı deney koşulları altında kolay ve kararlı kovalent bağları oluşturabilmeleri ve yüksek mekanik kararlılık gibi) gösterir <sup>(10,11)</sup>. Enzim immobilizasyonu için kullanılan yöntemlerin ve destek materyallerinin, yüksek enzim aktivitesi gösterdiklerinden, işletim koşulları altında kararlılık ve dayanıklılıklarını koruduklarından emin olunmalıdır.

Bu çalışmada, katalaz enzimin immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanılmak üzere, FeCl<sub>3</sub> elektroliti varlığında glisidil metakrilat (GMA) ve metil metakrilat (MMA) komonomerlerinin polimerizasyonu, mikroküre formunda bir akrilik kopolimer hazırlandı. Polimerizasyon sonrasında gerçekleştirilen amonyak varlığında amonolizis işlemi ile kürelerin yüzeyinde amino gruplarının oluşturulması sağlandı. Yüksek aktivitede katalaz tutuklanmış kürelerin hazırlanmasında, optimum işlem şartlarını araştırmak için, hazırlanan manyetik küreleri glutaraldehit kullanılarak amino grubu üzerinden modifiye edildi. Katalaz enzimi daha sonra, glutarik dialdehit ile modifiye edilen poli(GMA-MMA) mikrokürelere kovalent bağlanma metodu ile immobilize edildi. Serbest ve tutuklanmış enzim için Michaelis-Menten kinetik sabitleri ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ), optimum pH ve sıcaklık araştırıldı. Serbest ve tutuklanmış enzimin ısısız aktivasyon kaybı, çeşitli sıcaklıklarda çalışıldı ve işlem şartları altında tutuklanmış katalazın kinetik sabitleri belirlendi. Sonuç olarak, tutuklanmış enzim sistemi, bir sürekli akış enzim reaktöründe, enzimin davranışının çalışılması için, bir enzim reaktörüne uygulandı.

## 1.1. Enzimler

Enzimlerin tümü protein yapısında olan suda çözünen ve kimyasal reaksiyonlarda büyük bir özgünlüğe sahip olan çok özel katalizörlerdir. Enzimler, diğer proteinler gibi 12.000'den 1.000.000 üzerine kadar değişen moleküler ağırlığa sahiptirler. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının bütünlüğüne bağlıdır.

Etki ettiği maddenin sonuna "az" eki getirilerek ya da katalizlediği tepkimenin çeşidine göre adlandırılırlar. Tüm enzimler genler tarafından şifrelenir. Dolayısıyla amino asit dizilimi kendine özgüdür. Pepsin ve üreaz gibi bazı enzimler yalnız proteinden oluşurken; enzimler çoğu, enzimin hangi maddeye etki edeceğini belirleyen protein kısmı (enzimin Apoenzim kısmı) ve daha küçük organik ya da inorganik moleküllerden oluşan koenzim kısmı olmak üzere iki farklı kısımdan meydana gelmiştir. Bazı enzimler ortama belirli iyonlar bulunması durumunda etkinlik göstermektedirler, örneğin bazı enzim zincirine ancak  $Mg^{2+}$  iyonu eklenince glikozu laktik aside çevirebilir veya tükürükteki amilaz nişastayı klor iyonları varlığında parçalayabilir. Bilindiği gibi, bazı durumlarda ise enzimin etkinlik gösterebilmesi için bir metal iyonuna gereksinim vardır <sup>(2)</sup>.

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler; redoks tepkimelerini katalizleyen ve dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, transhidrogenazlar ve hidroksilazlar olarak alt sınıflandırılması yapılan oksidoredüktaz enzimleri, hidrojenin dışında bir atomun veya atom grubunun (metil, karboksil, glikozil, amino, fosfat grupları) bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlayan transferaz enzimleri, su molekülü aracılığıyla moleküllerin yıkılmasını sağlayan esterazlar ve proteazlar olarak alt sınıflamaya sahip hidrolaz enzimleri, su molekülü çıkışı olmadan molekülleri yıkan liaz enzimleri, molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren izomeraz enzimleri ve enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını; örneğin amino asitlerin ve yağ asitlerinin aktifleşmesini sağlayan ligazlar olmak üzere toplam altı ayrı alt kategoride sınıflandırılırlar <sup>(2,12)</sup>.

### **1.1.1. Katalaz Enzimi.**

Katalaz (EC 1.11.1.6), protein yapısında bulunan karakteristik bir enzimdir. Reaksiyon katalizleme hız sayısı en yüksek enzimlerden biri olan katalaz dört polipeptit zincirinden oluşan bir tetramerdir. Bu enzim yaygın bir şekilde hayvan, bitki ve mikroorganizmada mevcuttur. Katalaz enzimi canlı organizmanın eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği ve çeşitli dokularında ve hayvan hücrelerinin özellikle peroksizom organellerinde de yoğun bir şekilde bulunur da bulunur <sup>(13,14)</sup>.



Sığır karaciğerden elde edilen ve prostetik grup olarak her alt birim başına bir molekül demir porfirin kompleksi içeren katalaz enzimi hidrojenperoksiti parçalayan bir enzimdir ve molekül kütlesi 220.00 ile 270.000 arasında değişmektedir. Katalaz yapısında bulunan histidin ve tirozin amino asit gruplarının, enzimin tersiyer yapısında önemli rolleri olduğu saptanmıştır. Enzimler, olağanüstü katalizörlerdir. Örneğin,  $H_2O_2$ 'in parçalanması için gerekli olan aktivasyon enerjisi 18,16 kcal/mol iken, katalizör katalaz enzimi varlığında bu değer 1,91 kcal/mol'e düşmektedir. Bazı enzimler tepkimelerde yan ürün olarak vücutta  $H_2O_2$  meydana getirdiğinden ve bu da vücut için zehirli olduğundan, katalaz enzimi onları sürekli parçalayarak hücreleri korur. Bir molekül katalaz enziminin parçaladığı  $H_2O_2$ 'i demir atomu yalnız başına ancak 300 senede parçalayabilmektedir <sup>(15)</sup>.

Katalaz toksik hidrojen peroksidi hücrelerden uzaklaştırmada da önemli bir rol oynar. İnsan yaşamının vazgeçilmezlerinden olan oksijen metabolizma sırasında meydana gelen bazı bileşiklerden dolayı zararlı olabilmektedir. Süperoksit, hidrojenperoksit, hidroksil, hipoklöröz, peroksil, perhidroksil, alkoksil, organik peroksit radikalleri bu reaktif oksijen türleri olarak adlandırılan bu bileşiklerdir <sup>(16)</sup>. Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşmakta, ancak radikal parçalayan antioksidan sistemlerle oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksite ortaya çıkmamaktadır. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkmaktadır <sup>(17)</sup>. Organizmalar oluşan serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı endojen koruyucu antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Biyolojik ve biyokimyasal sistemlerde primer antioksidan enzimler; süperoksit anyonlarının dismutasyonunu katalizleyerek hidrojen peroksit oluşturan Süperoksit Dismutaz, hidrojen peroksidi, su ve oksijene parçalanmasını sağlayan Glutasyon Peroksidaz ve Katalaz enzimleridir <sup>(18)</sup>.

Antioksidant savunma sisteminde bu enzimler radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir.

Katalaz, oksitleyici, ağartıcı veya sterilizasyon amaçlı kullanılmaktadır. Katalaz, yiyecek endüstrisinde ürünlerden soğuk pastörizasyondan sonra  $H_2O_2$ 'in uzaklaştırılması uygulamalarında kullanılmaktadır. Ayrıca analitik uygulamalarda  $H_2O_2$  ve/veya glikoz biyosensör sistemlerinin bir unsuru olarak da önemli uygulamaları bulunmaktadır <sup>(7)</sup>.

Katalaz, süt ve süt ürünleri endüstrisinde de kullanılmaktadır. Süt ve süt ürünleri endüstrisinin en temel problemi ham sütün kısa sürede dayanıklılığını yitirmesidir. Uzak mesafelerden işletme merkezlerine taşınma süresi içerisinde peynir yapımı gibi ön pastörizasyon işleminin gerekmediği durumlarda süte koruyucu maddelerin katılması tercih edilen bir yoldur ve ideal yöntem olan soğukta korumaya göre de büyük bir maliyet düşüşü sağlar. Bu amaçla en çok kullanılan koruyucu madde  $H_2O_2$ 'dir <sup>(19)</sup>. Ham süte katılan  $H_2O_2$ 'in, sütün işleme aşamasından önce parçalanması gerekir. Bu amaçla çözüner veya immobilize edilmiş katalaz enzimi yaygın olarak kullanılmaktadır <sup>(20)</sup>.

Katalaz, kontak lens hijyeninde,  $H_2O_2$  solüsyonu kullanılarak lensin dezenfekte edilmesinde kullanılmaktadır. Katalaz içeren solüsyon, kontakt lensin tekrar kullanılmadan önce ortamdaki  $H_2O_2$ 'in parçalanmasını sağlanmaktadır. Son zamanlarda katalaz, epidermisin üst tabakalarındaki hücresel oksitlenmeyi artırmak amacı ile  $H_2O_2$  ve enzimden oluşan ve yüze uygulanan değişik maske uygulamaları için de kullanılmaktadır.

## 1.2. Enzim Aktivitesi Belirleme Yöntemleri

Enzim aktivite tayininde kullanılan çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Aktivite tayinlerinde genellikle ya kaybolan substrat miktarı ve/veya meydana gelen ürün miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülür<sup>(8,10)</sup>.

En çok kullanılan enzim aktivitesi birimi, IU'dir (internasyonal Ünite). 1 IU enzim aktivitesi, optimum koşullarda, 1 dakikada 1µmol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder ki bu da 1 saniyede 16,67 nmol substratın ürüne dönüştürülmesine karşılık gelmektedir. Enzim aktivitesi, çok özel aktivite olarak da ifade edilir. Bir enzim için çok özel aktivite, 1 mg enzim proteini başına düşen enzim ünitesi (IU veya katal) sayısıdır. Aktivite tayini yapılan biyolojik örnekteki enzimin saflığı arttıkça spesifik aktivitesi de artışlar gözlenmektedir<sup>(1,9,12)</sup>.

Enzim aktivite tayininde kullanılan farklı tayin yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında bulunmasına spektrofotometrik analiz yöntemi işlem kolaylığı ve basitliği sergilemesinin yanı sıra yüksek hassasiyet ile tayin imkanı tanınması nedeni ile tercih edilen bir yöntemdir. Bu nedenle, birçok enzimin aktivite tayini bu yöntem ile yapılmaktadır. Pek çok enzim substratı, ürünü veya koenzimi, görülen ışıktaki veya ultraviyole ışıktaki bir maksimum değeri göstererek, absorbanı vermektedir. Bu takdirde ya substratın kaybolması ya da ürünün meydana gelişi gibi koenzimdeki değişiklik spektrofotometreden tayin edilebilmektedir. Bu yöntemde optik dansite değişimi, belirli miktardaki enzim ünitesini verir.

## 1.3. Enzimlerin Uygulama Alanları

Tüm enzimlerin medikal ve endüstriyel bir önemi vardır. Enzimler, yiyeceklerin, içeceklerin üretiminde, hazırlanmasında, gıysilerin temizlenmesinde, hastalıkların teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyoteknolojik yöntemler

kullanılarak, yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur. Örneğin, bu tekniklerin kullanımı ile nişastayı parçalayan alfa-amilaz enzimi çimlenmekte olan arpadan, tripsin enzimi büyük baş hayvanların pankreaslarından, lizozim enzimi yumurta akından, rennin veya proteaz enzimi süt emmekte olan buzağuların midesinden endüstriyel ölçekte üretilebilmektedir.

Üretimi, sabitlenmesi (non-reaktive), paketlenmesi ve belirli ölçeklerde dağıtımının yapılabilmesi sonucu, enzimler, raflarda duran ekzotik bir maddeden ziyade, büyük depolarda muhafaza edilebilen endüstriyel ürünler olmuştur.

Enzimler genelde endüstri, klinik, tıp ve eczacılık gibi alanlarda kullanılmaktadır. Enzimlerin kullanımının en fazla olduğu alan gıda endüstrisidir. Bu endüstri alanında özellikle proteazlar ve amilazlar yaygın olarak kullanılan enzimlerdir. Bu endüstri alanında içeceklerin bozulmasını önlemek amacı ile *Aspergillus niger*'den biyoteknolojik yöntemler ile üretilen katalaz kullanılmaktadır <sup>(21)</sup>.

Eczacılıkta alanında kullanıl anılan pek çok enzim arasından hazım kolaylaştırıcı bazı ilaçların bileşimindeki besinlerimizin temel bileşenlerinden olan proteini parçalayan proteaz, nişastayı parçalayan selüloz, yağları parçalayan lipaz ve laktozu parçalayan laktaz enzimleri örnek olarak verilebilir <sup>(22)</sup>.

Aynı şekilde enzim kullanımının en fazla olduğu endüstriyel ölçekli uygulama alanlarından bir diğeri de deterjan endüstrisidir. Deterjanlar kullanılacakları alana göre bileşimi değışen kompleks karışımlardır. Bazı deterjanlar alkali koşullarda aktivite gösteren alkali-protez (bazik) enzimlerini içerirler, bazı deterjanların yapımında da amilaz, selülaz ve lipazlar kullanılmaktadır. Bu enzimlerin etkisi ile özellikle protein, yağ ve nişastanın tesiriyle oluş an kirlilik etkisi bir şekilde temizlenir <sup>(23)</sup>.

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi, dünyada enzim kullanabilecek en büyük pazarlardan birisi olarak kabul edilmektedir. Enzimlerin, kağıt ve kağıt hamuru üretiminde kullanılabilmesi üzerine son yıllarda yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Özellikle ağartma ve mürekkep giderme işlemlerinde kullanılmak üzere birçok enzim halen yoğun bir şekilde incelenmektedir. Bu alanda sıklıkla kullanılan selüloz, ksilaz, lakkaz, lipaz, katalaz enzimleridir <sup>(24,25)</sup>.

Deri işlemede ve deri endüstrisinde de enzimler, bakteriyel proteazlar, deri dokusu dışındaki proteinlerin ve yağların temizlenmesinde, kılların uzaklaştırılması ve derinin yumuşatılması işlem basamaklarında kullanılmaktadır. Ayrıca çeşitli selülozlu atıkların karbon kaynağı olarak kullanılmasında, kalitesiz yağlardan daha kaliteli yağların elde edilmesi işlemlerinde de enzimlerden yararlanılmaktadır <sup>(14,26)</sup>. Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedirler. Bu işleme haşılama adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bu işleme de haşıl alma adı verilmektedir. Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak  $\alpha$ -amilaz enzimi kullanılmaktadır <sup>(27)</sup>.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, rekombinant-DNA teknolojisine paralel olarak, yeni ve istenilen özellikteki enzimin endüstriyel ölçekli üretiminin mümkün olduğunu göstermesi, enzimlerin kullanım alanlarının gelecekte daha da yaygınlaşacağına bir göstergesidir <sup>(4)</sup>.

İmmobilize enzimler katı faz reaktörlerinde (özellikle dolgulu kolanlarda), potansiyometrik enzim elektrotları ve optik sensörler gibi enzim sensörlerinin tasarımında filmlere bağlanarak kullanılmaktadır <sup>(28)</sup>. Ayrıca immobilize ürünler, yapay organ sistemlerinin içeriğinde ya da yapay materyal yüzeyinin biyoyumluluk özelliğinin artırılmasında da kullanıldıkları bilinmektedir <sup>(29)</sup>. Tutuklu enzimlerin

temel büyük ölçekli uygulama alanları, gıda (tutuklu glikoz isomeras kullanılarak yüksek fruktoz şurubu üretimi) ve eczacılık endüstrisidir (tutuklu penisilin amidaz kullanarak 6-aminopenisilanik asit üretimi)<sup>(5)</sup>. Tutuklu enzim bazlı biyosensörler, mayalanma endüstrileri, çevresel izleme ve klinik teşhiste analiz için geniş bir kullanım alanına sahiptir. Glikoz ve sukroz için biyosensörler, gıda ve mayalanma örneği analizi için kullanılmaktadır<sup>(30,31)</sup>. Yapay organların yapımını içeren diğer potansiyel alanda, tutuklu üreaz, ekstra bedensel detoksifikasyon için kandan ürenin uzaklaştırılmasında yapay böbrek aygıtında kullanılmaktadır<sup>(6)</sup>.

#### **1.4. Enzim İmmobilizasyonu**

Enzimlerin çözünmeyen destek görevi gören materyaller (matriksler) yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmeleri immobilizasyon olarak tanımlanabilir. Bu yolla, enzim moleküllerinin hareketinin sınırlandırıldığı, durağanlaştırıldığı ifade edilir.

İmmobilizasyon tekniğinin sunduğu avantajlar; katalitik gücünün önemli ölçüde stabilize edilerek korunmuş olması, tekrar kullanılabilirliğinin sağlanması, ürünlerin yüksek saflık derecesinde kolaylıkla elde edilebilmesi, sürekli ve büyük ölçekte üretime olanak tanınması, kısa işlem süresi ve düşük üretim maliyeti olarak sıralanabilir<sup>(32,33)</sup>.

İmmobilize enzimin verimini ve performansını belirleyen üç temel parametre; seçilen enzimin özelliğine, taşıyıcı destek materyalinin özelliklerine ve seçilen immobilizasyon yöntemidir. Bu faktörlere bağlı olarak enzim aktivitesinde kayıplar meydana gelebilir ve tutuklu enzimin aktif bölgesi ve reaksiyon ortamı ara yüzeyinde, substrat yada ürünün taşınmasına difüzyonel dirençten dolayı

difüzyonel etkilerin ortaya çıkması söz konusu olabilir. Bu nedenle, oluşabilecek bu sınırlamalar; destek materyalinin küre yapıda hazırlanması ve parçacık boyutunu küçülterek geniş yüzey alanı sağlanması, yüksek spesifik aktiviteye sahip olan enzimlerde enzim yükleme miktarını azaltmak ve enzimi destek materyalinin dış yüzeyine bağlanması yoluyla en minimum düzeyde tutulabilmektedir <sup>(34,35)</sup>.

#### **1.4.1. İmmobizasyon İşleminde Kullanılan Matriksler**

Enzim, protein ve vb. gibi biyolojik moleküllerin immobilizasyonunda kullanılmak üzere çok sayıda destek materyali geliştirilmiştir. Bu doğrultuda, sürekli işletim koşulları altında uzun süre kararlılığını koruması amacı ile enzimlerin, farklı doğal veya sentetik katı destek materyallerine immobilizasyonu ve optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aluminyum oksit, bentonit veya silikajel gibi anorganik kökenli materyaller, kitosan, kitin, nişasta, aljinat, selüloz gibi doğal kökenli polimerler ve/veya stiren veya türevleri, naylon, akrilamid veya akrilat kökenli polimerler, çeşitli iyon değiştiriciler enzim immobilizasyonu uygulamalarında başarı ile uygulanmıştır <sup>(36-40)</sup>. Bu materyaller kontrol edilebilir boyut dağılımına ve gözenek çapına sahip olarak üretilebilmelidir.

Polimer küçük basit moleküllerin devamlı olarak birbirine kovalent bağlarla bağlanarak oluşan makro bileşiklerdir. 'Poli' Latince bir sözcük olup çok sayıda anlamına gelir. Polimerler 'monomer' denilen birimlerin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Buna basit bir örnek olarak 'Polistren' verilebilir. Polistren birçok stiren monomerinin monomerinin bir araya gelmesi ile oluşmuştur.

Bir polimer tek bir monomer biriminin tekrarlanmasından oluşuyorsa buna 'homopolimer' denir. Örnek olarak, etilenden elde edilen polietilen ve streden elde edilen polistren verilebilir. Eğer polimer molekülü iki farklı monomerin birleşmesinden oluşuyorsa buna 'kopolimer' denir. Polimerler katılma veya kondenzasyon polimerizasyonu ile sentezlenirler.

Sentetik polimerlerin üretiminde kullanılan endüstriyel teknikler, reaksiyon ortamının özelliklerine bağlı olarak yığın, çözelti, süspansiyon, emülsiyon ve dispersiyon polimerizasyon işlemleri olarak sınıflandırılmaktadır. Sunulan tez kapsamında katalaz enziminin immobilizasyonunda kullanılmak üzere yeni manyetik mikro küreleri süspansiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlanması planlanmaktadır.

Süspansiyon polimerizasyon tekniği endüstride büyük ölçekli polimer üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknik ile polimerizasyon şartlarına bağlı olarak 50-1000 mikrometre çapında, gözenekli ve/veya gözeneksiz partiküller hazırlanabilmektedir. Bu yöntemde en önemli parametre monomerin ve/veya monomerlerin, dağıtma fazındaki çözünürlüğünün çok düşük olması gerekliliğidir. Bu amaçla yapısında çözünmüş olarak başlatıcıyı içeren hidrofobik monomerler için dağıtıcı faz olarak genellikle su kullanılır.

Günümüzde farklı geometrilere üretilen polimerlerin birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Geometrik olarak küre, çubuk veya membran yapılarına sahip polimerik destek materyallerinin kullanılabildiği uygulamalarda, özellikle küre yapıdaki taşıyıcı destekler sağladığı avantajlardan dolayı tercih edilir <sup>(9)</sup>.



#### 1.4.1.1. Manyetik Temelli Destek Materyalleri

Manyetik taşıyıcılar, laboratuvar koşullarında hazırlanabilir ya da ticari olarak temin edilebilir. Ticari olarak temin edilebilen ve/veya laboratuvar koşullarında hazırlanan manyetik materyaller iki temel yapıdan oluşmaktadır. İlk yapı  $Fe_3O_4$ ,  $MnFe_2O_4$  ve  $CoFe_2O_4$  gibi inorganik manyetik nanopartiküllerden oluşan manyetik merkezdir. Manyetik materyalleri oluşturan ikinci yapı ise manyetik merkezi çevreleyen polimerik kabuktur. Manyetik merkez materyale manyetik özellik kazandırırken polimerik yapı daha çok saflaştırma ve immobilizasyon gibi amaçlara hizmet etmektedir<sup>(32)</sup>.

Son on yıl içerisinde, enzim immobilizasyon tekniği uygulamalarında manyetik özelliğe sahip destek materyallerinin kullanıldığı manyetik ayırma tekniği, enzim saflaştırılması ve immobilizasyonu uygulamalarında geleneksel yöntemlerle kıyasla sunduğu çeşitli üstünlükler nedeni ile araştırmacıların konu üzerine ilgisi artmıştır<sup>(41-43)</sup>.

Manyetik ayırma teknolojisinin hızlı ve kolay bir teknik olması, hedef molekülü çok daha az mekanik gerilime maruz bırakması konusunda önemli bir üstünlük sağlaması enzim immobilizasyon uygulamalarında hedeflenen başarının sağlanmasında temel ilkeleri oluşturmaktadır. Bu yeni kombine yöntemle pahalı saflaştırma sistemlerine, santrifüjlere, filtrelere ya da diğer ekipmanlara gerek olmaması, otomasyona ve mikro-ölçek gerektiren işlemlere daha kolay olarak adapte edilmeleri bu teknolojinin sunduğu diğer avantajları oluşturmaktadır. Manyetik destek malzemelerinin hazırlama yöntemine bağlı olarak partiküller dış manyetik alana karşılık olarak, süper paramanyetik gibi davranırlar, fakat manyetik alanın uzaklaştırılması sonucu hemen sistem içerisine yeniden süspansiyon olmaları büyük

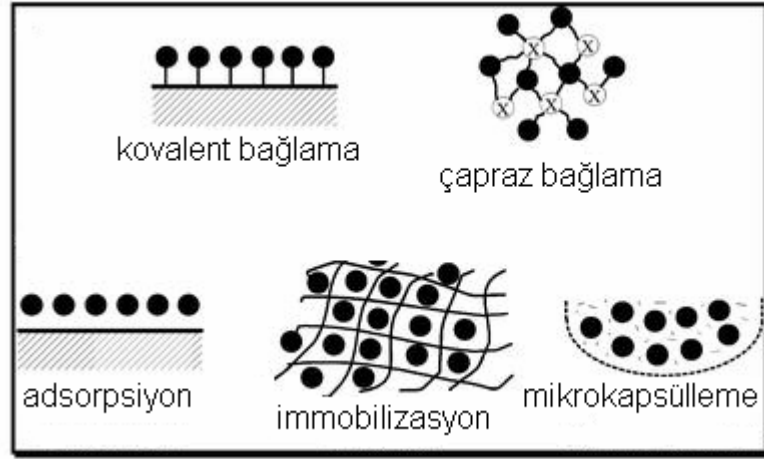
avantaj sağlamaktadır ve manyetik alan yokluğunda kendi aralarında etkileşim olmamaktadır <sup>(42,44)</sup>.

Farklı destek materyallerinin başarı ile kullanıldığı enzim teknolojisi uygulamalarında, biyokatalistin tutuklanması için manyetik partiküllerin kullanımı, işlenmiş enzim ürünlerin endüstriyel üretimi uygulamalarında artan bir ilgiye neden olmaktadır <sup>(45-47)</sup>. Çeşitli manyetik destek materyalleri, farklı fonksiyonel gruplar içeren çeşitli polimerlerden üretilmektedir. Manyetik partiküller, hücre ve enzimlerin tutuklanması <sup>(45,46)</sup>, biyoseparasyon sistemleri <sup>(47)</sup>, immunoanalizler <sup>(48)</sup>, ilaç salınımı, biyosensör<sup>(49)</sup> uygulamaların alanında yaygın bir kullanıma sahiptir. Kalıcı manyetik özellik, destek materyalinin dışarıdan uygulanan manyetik alanın uzaklaştırılmış olması durumunda bile, partiküllerin bir araya toplanmasına sebep olabilir. Bu dezavantaj, süper-paramanyetik partiküller geliştirilmesi zorunluluğunu beraberinde getirmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> süper-paramanyetik materyallerden biridir ve biyoteknolojik ve biyomedikal alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır <sup>(50,51)</sup>.

### 1.4.2. Enzim İmmobilizasyon Metodları

İmmobilize edilecek enzimin özelliklerini bilmek ve bu özelliklere uygun destek materyal tipi ve immobilizasyon yöntemi belirlemek başarılı bir immobilizasyon için gerekli şartlardan birisidir. Kullanılacak enzimin izoelektrik noktası, sıcaklık, iyonik şiddet ve pH gibi çevre koşullarına karşı toleransı ve üç boyutlu yapısı gibi özellikler immobilizasyon işlemi sonrasında da enzim aktivitesinin korunabilmesi için enzim hakkında bilinmesi gereken önemli verilerdir.

Enzimlerin katı desteklere tutuklanması işleminde kovalent bağlanmadan adsorsiyona ya da fiziksel tutuklamaya kadar birçok immobilizasyon yöntemi kullanılmaktadır (Şekil 1.1). İmmobilizasyon teknikleri arasında, adsorpsiyon, işlemin basit ve ucuz olması, yüksek katalitik aktivite sağlaması ve en önemlisi tutuklu enzimin inaktivasyonundan sonra, destek materyalinin tekrar tekrar kullanılabilmesi gibi nedenlerden dolayı diğer metotlardan daha yüksek bir ticari potansiyele sahiptir <sup>(52,53)</sup>. Literatürde, doğal veya sentetik iyonik polimerlerin aşılandığı destek materyalleri, çeşitli enzimlerin geri dönüşümlü tutuklanması ile ilgili birkaç metot rapor edilmiştir <sup>(53-55)</sup>. Agaroz, sefadeks türevleri, selüloz türevleri, metal tuzları ve mineraller de enzimlerin adsorpsiyon yolu ile immobilizasyonu işleminde kullanılmışlardır. Bununla birlikte adsorpsiyon genellikle çok güçlü değildir ve adsorbe olan enzimlerin bir kısmı yıkama ve işlem sırasında desorbe olur. Bu sebepten dolayı adsorpsiyon yoluyla geri dönüşümlü enzim tutuklanması, enzim ve destek materyali arasında çok güçlü hidrofobik ya da iyonik etkileşim gerektirir <sup>(55-60)</sup>.



**Şekil 1.1.** Enzim immobilizasyonu tekniklerinin şematik gösterimi

Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için sıkça kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiliye geçmesini engeller. Kovalent bağlanma genelde enzimin yapısının ve fonksiyonel grupların bilindiği durumlarda kullanılır. Enzimler kimyasal olarak kovalent bağlarla selüloz, sefadeks, agaroz, poliakrilamid, gözenekli seramik gibi suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanırlar. Amino, karboksil v.s. gibi fonksiyonel gruplar taşıyan destek materyali uygun aktivasyon ajanı ile yüzey modifikasyon edilerek enzim moleküllerinin yüzeye kovalent bağlanması sağlanır <sup>(22,56)</sup>.

Bir diğer immobilizasyon tekniği olan matriks içi tutuklama yöntemi polimerin yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzim tutuklanması temeline dayanır. Bu yarı geçirgen membran, enzimin dışarı çıkmasını engellerken, düşük molekül kütleye sahip olan substrat ve reaksiyon sonucu oluşan ürünün serbestçe giriş çıkışını sağlar. Çapraz bağlı poliakrilamid jeller, Ca alginat, kapa karragenan polimerleri bu uygulamalara örnek olarak verilebilir.

Çapraz bağlama yönteminin temeli; küçük moleküllü iki veya çoklu fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasına dayanır. Yöntemde, molekül içi bağların yanı sıra moleküller arası bağ türleri de söz konusudur. Enzimler glutaraldehit, alifatik diaminler gibi bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanırlar. Bu reaktifler enzim molekülleri arasında bağ oluştururlar. Glutaraldehit enzim moleküllerinin amino gruplarından, diaminler ise karboksil gruplarından çapraz bağlarlar.

Ayrıca bu yöntemlerin kombinasyonları da, tutuklama-çapraz bağlama, kapsülleme-çapraz bağlama gibi, enzim immobilizasyonunda başarı ile kullanılmaktadır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Kimyasal Maddeler

Katalaz (EC 1.11.1.6, hydrogen peroxide oxidoreductase; sığır ciğerinden) sığır serum albümin (BSA) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sigma firmasından elde edildi. Başlatıcı olarak kullanılan  $\alpha, \alpha'$  azobisisobutirilonitril (AIBN), polivinil alkol (PVA), ve toluen Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, ABD) firmasından temin edildi ve alındığı gibi kullanıldı. Glisidil metakrilat, metil metakrilat Merck AG (Darmstadt, Almanya), etilenglikoldimetakrilat ise Aldrich Kimya Şirketi'nden (USA) alındı ve monomerler hidrokinon varlığında azaltılmış basınç altında distile edildi ve kullanılmaya kadar 4°C'de saklandı. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

Çalışmamızın her aşamasında kullanılan su, Barnstead (Dubuque, IA, USA) ROpure LP marka ters ozmos, Barnstead D3804 NANOpure organik/kolloid uzaklaştırıcı yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) üniteleri ve iyon-değişimi dolgulu yatak kolonundan oluşan ultra-saf su sisteminden elde edildi.

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Manyetik Temelli Destek Materyalinin Sentezi

Bu çalışmada, süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile çapraz bağlayıcı (etilenglikol dimetakriat, EGDMA) varlığında, glisidilmetakrilat (GMA) ve metilmetakrilat (MMA) komonomerleri kullanılarak katalaz enzimi

immobilizasyonunda kullanılmak üzere manyetik özellik kazandırılmış küre yapıda poli(glisidilmetakrilat-metilmetakrilat), poli(GMA-MMA), mikroküreleri manyetik özellik taşıyan yeni bir destek materyali olarak hazırlandı. Poli(GMA-MMA) mikrokürelerinin sentezi ve magnetizasyonu iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada, demir içeren poli(GMA-MMA) küreleri,  $Fe^{+3}$  iyonları varlığında süspansiyon polimerizasyonu yoluyla monomerlerinden hazırlandı. Bu amaç doğrultusunda, glisidilmetakrilat (7.5 ml) ve metilmetakrilat (7.5 ml) komonomerleri  $\alpha$ - $\alpha'$ -azobisisobutirilonitril başlatıcısı (0.2 g) varlığında çapraz bağlayıcı olarak etilenglikoldimetakrilat (7.5 ml) monomerleri, polimerizasyon işleminden önce, NaOH-NaCl çözeltisi kullanılarak ekstrakte edilerek monomer içindeki inhibitör uzaklaştırıldı ve ekstrakt içinde kalabilecek muhtemel su molekülleri ise  $CaCl_2$  kullanılarak uzaklaştırıldı. Komonomer karışımının ve stabilizatör olarak da, polivinil alkol (PVA), çözeltisinin (20 cm<sup>3</sup>, %5.0 w/v) kullanıldığı polimerizasyon sistemini içeren reaktör sıcaklığı 65 °C olan su banyosuna yerleştirildi. Dağıtıcı ortam olarak toluen (20 ml) ve su, elektrolit olarak  $FeCl_3$  (0.1 M, 400 ml) çözeltisi kullanıldı. Polimerizasyon işlemi, 250 rpm karıştırma hızında 70 °C'de 2.0 saat ve 80 °C'de 1.0 saat mekanik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak gerçekleştirildi.

İkinci aşamada ise poli(GMA-MMA) mikrokürelerin yapısında demir oksit kristali oluşumu için  $Fe^{+2}$  iyonları içeren  $NH_3 \cdot H_2O$  sulu çözeltisinde klasik termal çöktürme reaksiyonu gerçekleştirildi. Ko-presipitasyon işlemi için süzülen poli(GMA-MMA) mikrokürelerin 100 ml distile su içerisinde  $FeSO_4$  (5 g) çözeltisinin bulunduğu reaktöre aktarıldı. Mekanik karıştırıcı ile sürekli karıştırılan reaktör, azot atmosferi altında 2 saat içerisinde oda sıcaklığından 90 °C sıcaklığa kadar çıkan sistem koşullarında geri soğutucu altında damla damla  $NH_3 \cdot H_2O$  amonyak (50ml, %25 v/v)

eklenirken reflüks edilmesi sağlandı. Termal çöktürme reaksiyonu süresince, manyetik kürelerin epoksi grupları, ortamdaki amonyağın varlığından dolayı, amonolizis reaksiyonu yoluyla amino gruplarına dönüştürülmüş oldu. Ko-presipitasyon yöntemi ile magnetizasyon işleminin tamamlanması işlemi takiben, Bühner hunisi ile süzülen manyetik poli(GMA-MMA) mikroküreleri, reaksiyon ortamından ayrıldı, 3 saat etanol çözeltisi (70%; 250 ml) ile yıkandı ve daha sonra sırası ile distile su, sitrik asit, nitrik asit, NaCl çözeltisi ve su ile yıkandı. Manyetik mikrokürelere süzüldü ve 30-35°C'de vakum etüvde kurutuldu.

## **2.2.2. Manyetik Temelli Mikrokürelere Katalaz Enziminin İmmobilizasyonu**

### **2.2.2.1. Mikrokürelere Aktivasyonu**

Manyetik mikrokürelere (~5.0 g), fosfat tamponu içerisinde (50 mM, pH 7.0) dengeye getirildi ve reaktörde aynı tampon sisteminde hazırlanan glutaraldehit çözeltisi (% 0.5 v/v, 50 ml) içerisine aktarıldı ve oda sıcaklığında 12 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak inkübasyonu sağlandı. Aktivasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra mikrokürelere sırası ile distile su, asetik asit çözeltisi (100 mM, 100 ml) ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7.0) ile yıkanarak glutaraldehitin fazlası uzaklaştırıldı. Glutaraldehit çözeltisinin başlangıç ve aktivasyon sonundaki adsorbansları ölçülerek manyetik mikrokürelere bağlanan glutaraldehit miktarı tayin edildi.



### **2.2.2.2. Manyetik Mikrokürelere Katalaz İmmobilizasyonu**

Çalışmanın bu kısmında sentezlenip aktive edilen manyetik poli(GMA-MMA) mikrokürelere katalaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi. Glutaraldehit aktivasyonu yapılan manyetik mikrokürelere (~5.0 g) 2 saat fosfat tamponunda (50 mM, pH 7.0) dengeye getirildi ve katalaz enzimi (50 ml, 2.0 mg ml<sup>-1</sup>) içeren ortama transfer edildi. Manyetik mikrokürelere katalazın kovalent bağlanma yöntemi ile immobilizasyonu 4 °C ortam sıcaklığında 20 saat süresince inkübe edilerek gerçekleştirildi. Bu süre sonunda manyetik mikrokürelere, reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı ve 1.0 M NaCl ve sonra fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.0) ile yıkandı.

#### **2.2.2.2.1. İmmobilizasyon Etkinliğinin Belirlenmesi**

Katalaz immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanılan manyetik mikrokürelere üzerine tutuklanan enzim miktarı, Bradford yöntemi ile Coomassie Brilliant Blue kullanılarak, immobilizasyon ortamındaki başlangıç ve bakiye protein konsantrasyonu ölçülerek tayin edildi <sup>(57)</sup>. Bilinen albümin (BSA) konsantrasyonuyla hazırlanan ölçümleme eğrisi, enzim ve yıkama çözeltisindeki protein miktarının hesaplanmasında kullanıldı.

### 2.2.3. Manyetik Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Vakum etüvünde kurutulan manyetik mikrokürelerin boy ve boyut dağılımı belirlendi ve polimerizasyon verimi hesaplandı.

Manyetik mikrokürelerin yüzey alanı, BET (Brunauer-Emmett-Teller) metodu kullanılarak yüzey analizi cihazı ile ölçüldü.

Manyetik poli(GMA-MMA) mikrokürelerin ko-presipitasyon işlemi amin grubuna dönüşmeden kalan erişilebilir epoksi grubu içeriği literatürde verilen piridin-HCl yöntemi ile tayin edildi <sup>(58)</sup>. Bu amaçla, 0.5 g mikroküre piridin-HCl çözeltisi (50 ml) ile 20 dakika geri soğutucu altında etkileştirildi. Reaksiyon sonunda örnek ayarlı NaOH çözeltisi (0.1 M) ile titre edildi.

Mikrokürelerinin şişme oranı, distile su içerisinde gravimetrik yöntem kullanılarak tayin edildi.

Mikrokürelerin yoğunluğu Gay Lussac piknometresi yardımıyla, mikroküreler için çözücü olmayan bir sıvı (n-Dekan) kullanılarak belirlendi.

75-150 µm boyut dağılımına sahip manyetik mikroküreleri, azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı ve kürelerin elektron mikrografları JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

Manyetik poli(GMA-MMA) mikrokürelerine ait FTIR spektrumu, FTIR spektrometre (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde edildi. 0.1 g kuru küre ve 0.1 g KBr karıştırılarak tablet haline getirildikten sonra spektrumu alındı.

### 2.2.4. Serbest ve İmmobilize Katalazın Aktivite Tayinleri

Serbest ve immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri, birim zaman başına enzimin katalizlediği reaksiyonu sonucu ortamda kalan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun

240 nm dalga boyunda, nm'de UV/Vis Spektrofotometre (Shidmadzu, Model 1601, Tokyo, Japonya) ile, spektrofotometrik olarak doğrudan ölçülmesiyle tayin edildi. Hidrojen peroksit çözeltileri (2-20 mM) serbest ve immobilize enzim aktivitelerini belirlemek için kullanıldı (61,62). 4.0 mL reaksiyon karışımı 10 dakika 25 °C'de inkübe edildi ve 50 µL katalaz çözeltisi eklenerek reaksiyon başlatıldı. Ve sürekli karıştırılarak 30 saniye süre aralıklar ile 5 dakika inkübasyon süresi boyunca ölçüm alındı 240 nm'de absorbansındaki azalma kayıt edildi. Absorbansındaki değişim hızı, 240 nm'de farklı konsantrasyonlardaki (2-20 mM) hidrojen peroksit çözeltisinin absorbanslarının ölçülerek elde edilen ölçümleme eğrisinden yararlanarak eğrinin doğrusal bölgesinden hesaplandı.

Katalaz aktivitesinin bir ünitesi, 25°C sıcaklıkta, pH 7.0'da, 1 dakikada 1.0 µmol hidrojen preoksiti ayrıştıran enzim miktarı olarak tanımlandı. Manyetik kürelere immobilize katalaz aktivitesinin belirlenmesi için, enzim immobilize küre (10 mg) hidrojen peroksit çözeltisine aktararak inkübasyon başlatıldı ve substratın ayrıştırılması yukarıda tanımlandığı gibi izlendi. 4 dakika sonra, enzim tutuklu manyetik mikrokürelere reaksiyon karışımından uzaklaştırılması ile reaksiyon sonlandırıldı. Reaksiyon karışımının absorbansı belirlendi ve immobilize katalazın aktivitesinin hesaplamada kullanıldı. Serbest ve immobilize enzimin pH ve sıcaklık profilinin belirlemek amacı ile, serbest ve immobilize enzim aktivite ölçümleri pH 4.0-8.0 aralığında ve ortam sıcaklığı da 15-55 °C aralığında değiştirilerek belirlendi. Substrat konsantrasyonunun etkisi 2-20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyon aralığında çalışılarak belirlendi. pH ve sıcaklığa bağlı sonuçlar, her bir setin en yüksek değeri tayin edilerek %100 aktivite değerine normalize edilmiş olarak gösterildi.

### 2.2.5. Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi

Hiperbolik eğrinin denklemi olan Michaelis-Menten denkleminin türetilen Lineweaver-Burk denklemi aşağıdaki gibi gösterilmektedir;

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

Burada  $K_m$ , Michaelis sabitini;  $V_{max}$ , maksimum reaksiyon hızını;  $[S]$ , substrat konsantrasyonunu ve  $V$ , başlangıç hızını göstermektedir. Bu doğru denklemi kullanarak  $1/V$ 'ye karşı  $1/S$  Lineweaver-Burk doğrusu çizilirse, eğim ve kayma değerlerinden  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplanabilir.

Serbest enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri 25 °C'de hidrojen peroksit (2-20 mM) içeren fosfat tamponunda (50mM, pH= 7.0), reaksiyonun başlangıç hızı ölçülerek tayin edildi. Kesikli sistemde, 5 dakikalık inkübasyon periyodundan sonra elde edilen veriler kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı.

### 2.2.6. Serbest ve İmmobilize Enzimin Isısal Kararlılığı

Serbest ve tutuklu enzimin ısısal kararlılığı, 2 saat fosfat tamponunda (50 mM, pH= 7.0) iki farklı sıcaklığa (60 °C ve 70 °C) maruz bırakılan enzimin kalan aktivitesi ölçülerek belirlendi. Belirli zaman aralıklarında, 10 mg enzim immobilize küreleri uzaklaştırıldı ve yukarıda tanımlandığı gibi 180 dakika süresi boyunca enzimatik aktivite tayini gerçekleştirildi.

Sonuçlar, bağıl aktiviteye dönüştürüldü (Bu seride elde edilen maksimum aktivitenin yüzde oranı). Kalan aktivite, aynı miktardaki serbest enzime göre,

manyetik mikrokürelere üzerine kovalent bağlanmadan sonra, toplam hidrolitik aktivitenin bir kesri olarak belirlendi.

### **2.2.7. Depolama Kararlılığı**

Bu deney, fosfat tamponunda (50 mM, pH= 7.0) 4 °C'de 77 gün depolama süresinden sonra serbest ve immobilize katalazın kararlılığını tespit etmek için gerçekleştirildi. Kalan aktiviteler yukarıda verilen deneysel koşullar altında bir kesikli sistem işlem modunda belirlendi ve serbest ve immobilize enzimin aktivitesi, başlangıç aktivitesine göre kalan aktivitesinin bir yüzdesi olarak ifade edildi. Manyetik kürelere katalazın tutuklanmasından sonra kalan aktivite, aynı miktardaki serbest enzime kıyasla, geri kazanılan toplam aktivitenin bir fraksiyonu olarak tanımlandı.

### **2.2.8. Manyetik Kürelerin Tekrar Kullanımları Sırasında Enzimin**

#### **Kararlılığı**

İmmobilize katalazın aktivitesi kalan aktivitesi yukarıda tanımlanan aktivite ölçüm yöntemi çerçevesinde belirlendi. Her bir reaksiyon periyodunun ardından enzim immobilize küreler reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı ve 25 °C'da 15 dakika, fosfat tamponu ile (50 mM, pH 7.0) kürelerde substrat kalmayınca kadar yıkandı. Aynı küreler tekrar 10 mM hidrojen peroksit içeren taze reaksiyon ortamına aktarıldı.

### 2.2.9. Sürekli Sistem Uygulaması

Sürekli sistem uygulamasında pyrex camdan yapılmış reaktör (uzunluk 8.0 cm, çap 1.0 cm, toplam hacim 25 ml) kullanıldı. Enzim immobilize mikroküreler (3.0 g), fosfat tamponunda (50 mM, pH 7.0), 4°C'de, 1.0 saat süresi boyunca bekletilerek dengeye getirildi ve yaklaşık 6.0 ml'lik boş bir hacim vererek reaktöre yüklendi. Sürekli sistem çalışması için fosfat tamponunda (50 mM, pH 7.0) hazırlanmış hidrojen peroksit çözeltisi (10 mM), bir peristaltik pompa ile 20 ml saat<sup>-1</sup>'lik bir akış hızında, alttaki giriş kısmından, reaktöre verildi. Bu işlem, 25°C'de 64 saat süresi boyunca devam ettirildi ve reaktörden çıkan ve toplama kabında biriktirilen çözelti daha önce tanımlandığı gibi katalaz aktivitesi belirlendi.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

İmmobilizasyon işleminde kullanılacak destek materyallerin, biyolojik moleküllerin rahatça girebileceği geniş gözenekler içerecek şekilde ve uygun boyut dağılımına sahip olarak düşük işlem maliyeti ile büyük ölçekte üretilebilmesi gerekmektedir. Destek materyali, kimyasal ve biyolojik olarak inert olmalı, yüksek mekanik dayanımı olmalı, yüzeyinde aktivasyona ve/veya enzimin bağlanmasına olanak sağlayacak fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Bunun yanında, hidrofilik ve nötral yapı sergilemesi, sıcaklığa karşı dayanıklılık göstermesi, kimyasal ve biyolojik reaksiyonlarla karşı dirençli olması, aktivasyona veya ligand bağlamak için türevlendirilmeye olanak sağlaması ve rejenerasyon esnasında elüentlere karşı dayanıklı olmalısı beklenmektedir. Ayrıca, destek materyali yüzeyindeki yüklü veya hidrofobik gruplar ile enzim arasında meydana gelebilecek non-spesifik ilişkilerin mümkün olduğunca düşük olması da beklenmektedir.

İmmobilizasyon sisteminde kullanılacak polimerik destek materyalleri, çeşitli kompozisyonlarda kolayca üretilebilirler ve yapıya istenilen fonksiyonel gruplar dahil edilerek biyomoleküllerin immobilizasyonu için modifiye edilebilirler. Akrilat ve akrilik asit kökenli polimerler uzun ömürlü sentetik polimerlerdir. Çalışmamızda kullandığımız bu grupta yer alan metilmetakrilat monomerinden sentezlenen poli(metilmetakrilat), p(MMA), biyouyumlu sentetik bir polimer olmasından dolayı biyomedikal ve biyoteknolojik alanda çok sayıda uygulama alanı bulmaktadır. Ayrıca, akrilik ve metakrilik kökenli polimerler yapay damar, kontak lens, ilaç salınım sistemleri gibi uygulama alanlarına sahiptir. Bu tür materyallerin uzun süreli biyolojik uyumluluğu ve fonksiyonelliği canlı dokulardaki in vivo etkileşimleri ile kontrol

edilmektedir. Bu materyal mekanik olarak güçlü olmasından dolayı, enzim immobilizasyonu ve protein saflaştırılmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Metakrilik asit iyonize olabilen bir monomer olarak bilinir ve bu nedenden dolayı polimeri pH'a karşı duyarlıdır. Çalışmamızda kullandığımız diğer epoksi grubu taşıyan glisidil metakrilatın (GMA) komonomerinin kullanıldığı akrilat kopolimerler, enzim immobilizasyonunda, taşıyıcı materyaller ailesi olarak, özellikle çok yönlüdür, çok çeşitli özelliklerde hazırlanabilir. Epoksi grubu taşıyan destek materyalleri, enzim ve proteinlerin laboratuvar ve endüstriyel ölçekte immobilizasyonu için elverişlidir. Aktivasyon işlemine olanak tanıyan bu materyaller, depolama esnasında ve çözelti ortamında kararlıdır ve farklı protein grupları ile (amino, tiyol, fenolik türler) kararlı O-C ve N-C kovalent bağları oluştururlar. Bu özelliklerinden dolayı, küre formunda hazırlanan epoksi grubu taşıyan destek materyalleri yüksek mekanik kararlılığa sahip olmaları nedeni ile 1.0-12.0 gibi geniş pH aralığında biyomedikal ve biyoteknoloji alanındaki çeşitli uygulamalarda etkili ve güvenli olarak kullanılmaktadır <sup>(61,62)</sup>. Bu doğrultuda tez kapsamındaki çalışmalarımızda, akrilik kopolimer metil metakrilat, (MMA), ve glisidil metakrilat, (GMA), komonomerlerinden sentezlenerek ve manyetik özellik kazandırılarak katalaz enziminin immobilizasyonunda kullanılmak üzere immobilizasyon destek materyali olarak hazırlandı.

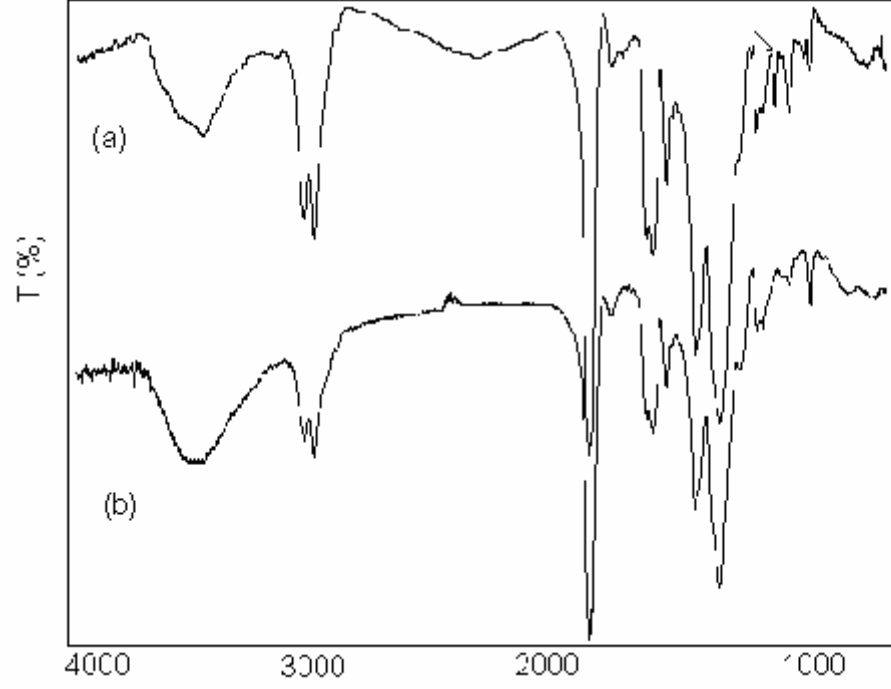


### 3.1. Destek Materyalinin Karakterizasyonu

Vakum etüvünde kurutulan manyetik poli(GMA-MMA) destek materyalinin boy ve boyut dağılımı belirlendi. 53-300 µm arasında farklı fraksiyonlarda polimerizasyon verimi % 87 olarak hesaplandı. 75-150 µm boy ve boyut dağılımına sahip fraksiyon enzim immobilizasyonu çalışmalarında kullanıldı. Manyetik mikrokürelerinin spesifik yüzey alanı 22.83 m<sup>2</sup>/g küre olarak bulundu. Manyetik kürelerin erişilebilir epoksi grubu içeriği 1.06 mmol/g olarak belirlendi. Bu değer, epoksi gruplarının bir kısmının manyetik kürelerin iç tarafında kalması nedeni ile analitik tayinler için ulaşılabilir olamaması sonucunda, teorik olarak hesaplanan değerden daha düşük olduğu belirlendi (2.59 mmol/g). Titrayon yöntemi ile belirlenen amino grubu içeriği 1.84 mmol/g küre olarak belirlendi. Protein ve enzim ayrıştırılması ve/veya saflaştırılması çalışmalarında, afinite materyalin dolgulu kolon sistemlerinde kullanımı düşünüldüğünde denge su içeriği oldukça önemlidir. Manyetik kürelerinin denge şişme oranı 1.27, yoğunluğu ise 1.41 g/cm<sup>3</sup> olarak belirlendi. Biyoteknolojik uygulamalarda önemli olan bu şişme oranı değerinin, kullandığımız destek materyalinin de farklı enzim uygulamaları için uygun ve yeterli olduğu görüldü.

Manyetik poli(GMA-MMA)'nın FTIR spektrumunda, ~1730 cm<sup>-1</sup>'deki titreşim her iki monomerin ester konfigürasyonunu ifade etmektedir (Şekil 3.1) sunar. Polimerizasyonun ilk aşamasında elde edilen poli(GMA-MMA) kürelerine ait 908 cm<sup>-1</sup>'de (epoksi halkası titreşimleri) gözlenen bant epoksi grubundan ileri gelmektedir (Şekil 3.1.(a)). Poli(GMA-MMA) kürelerinin amonolysis reaksiyonu sonucunda elde edilen manyetik kürelerin FTIR spektrumunda epoksi grubundan kaynaklanan 908 cm<sup>-1</sup>'deki bu pikin amin gruplarına dönüşmesi sonucunda kaybolduğu görüldü (Şekil

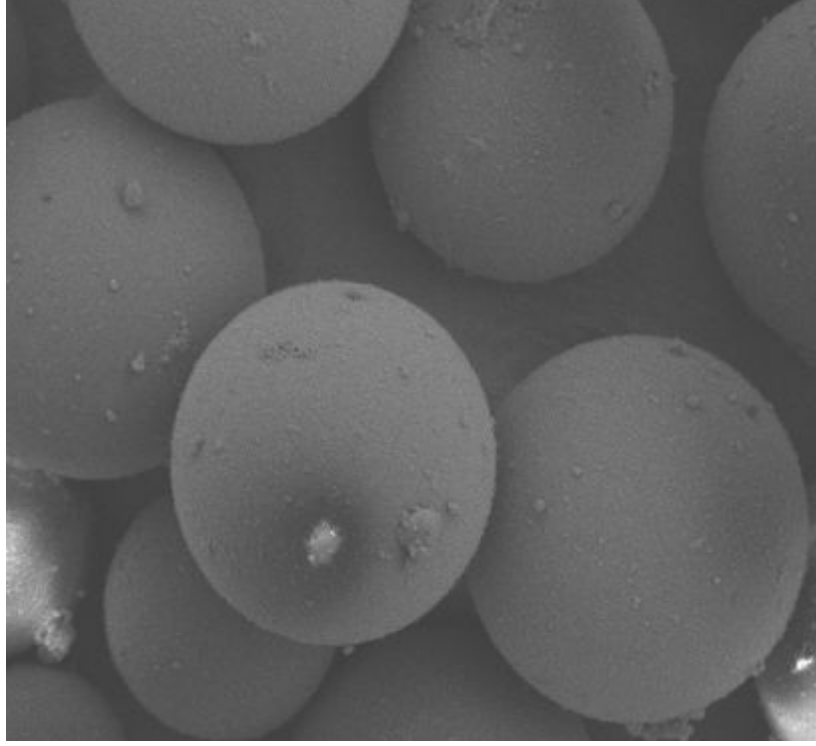
3.1.(b)).  $\sim 2952 \text{ cm}^{-1}$ 'de metilen titreşimi glisidilmetakrilat ve metilmetakrilatın her ikisinin karakteristik titreşimleri arasında yer alır.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $600 \text{ cm}^{-1}$ 'de karakteristik banda sahiptir ve bu poli(GMA-MMA) kürelerinin yapısı içinde  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  moleküllerinin başarılı bir şekilde oluştuğunu göstermektedir<sup>(64)</sup>.



**Şekil 3.1.** (a) poli(GMA-MMA) ve (b) manyetik poli(GMA-MMA) mikrokürelerin FTIR spektrumu

Poli(GMA-MMA) kürelerinin SEM mikrografı Şekil 3.2'de verildi. Polimerizasyon işlemi sonunda düzgün bir yüzey yapısına sahip mikrokürelerin oluştuğu görüldü. Sentezlenen mikrokürelerin gözenekli yapısından dolayı geniş iç yüzey alanı sağladığı görüldü. Destek materyalinin sunduğu bu yüzey özellikleri, destek üzerinde düşük difüzyonel kütle transfer direnci ile geniş iç yüzey alanından

dolayı yüksek kütle transfer hızı da sağlayacağını ve katalaz immobilizasyonu için geniş bir yüzey alanı sağlayacağını düşündürdü.



**şekil 3.2.** Manyetik mikrokürelerin SEM mikrografı ( yüzey görüntüsü)

### 3.2. Katalazın Destek Materyaline İmmobilizasyonu

Çalışmamızda sunulan yöntem, manyetik mikrokürelerin magnetizasyonu aşamasında yüzeyinde erişilebilir epoksi gruplarının amin gruplarına dönüştürülmesini ve aktivasyon ajanı olarak gultarikdialdehitin kullanılarak modifiye edilmesi ve dolayısı ile katalaz enziminin yüzeye kovalent olarak bağlanmasını içeren etkili bir tekniktir. Kürelerin yüzeyinde modifikasyon sonucunda oluşturulan aldehit gruplarının enzim yüzeyindeki lizin amino asit kalıntıları ile Schiff's bazı oluşumu reaksiyonu sonucunda enzim molekülleri küre yüzeyine kovalant olarak immobilize edildi <sup>(53,63,64)</sup>. Enzim immobilizasyon kapasitesine ve verimine reaksiyon süresinin etkisi olduğu bilinmektedir. Manyetik kürelere katalazın kovalent immobilizasyonu işleminde 12 saat inkübasyon süreci sonunda bağlanan enzim miktarı 2.76 mg/g küre olarak belirlendi. Yıkama işlem aşamalarında herhangi bir enzim sızması gözlenmemesi kullanılan deney şartlar altında uygulanan enzim bağlanma işleminin tersinmez olduğunu gösterdi.

Manyetik küreler manyetik anizotropik özellikten dolayı rotasyonel ve vibrasyonel hareket sergilemektedirler. Manyetik kürelerle çalışılan sistemlerde bu hareketler sonucunda enzim-küre sistemi çevresinde dış difüzyon kısıtlamasına neden olan ürün tabakasının oluşumu önlenmektedir. Sistemde manyetik alanda yapılan değişimler ile enzim tutuklanmış manyetik küreler vibrasyonel hareket ile çözelti de hareket etmektedir. Bu yolla, oluşan ürün tabakası ve substrat tabakası yer değiştirmektedir. Böylece enzim tutuklanmış manyetik küreler ile substrat etkileşimi kolaylaşmaktadır. Enzim immobilizasyonu işleminde kullanılan taşıyıcı manyetik küreler, manyetik özelliği nedeni ile dışarıdan manyetik alan yaratılarak kolayca

magnetize edilebilmekte ve ayrıştırma için gerekli süre sonunda yeniden süspansiyon edilmektedirler.

### 3.3. Serbest ve İmmobilize Katalazın Kinetik Parametreleri

Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat ilave edildikçe hız giderek daha az artar ve belirli bir  $V_{max}$  düzeyinde sabit kalır.

Biyokatalistin tutuklu olduğu durumda,  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik parametreleri serbest eşleniklerine göre, substrat için afinite değişimini açığa vuran, değişikliklere maruz kalır. Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri, farklı substrat konsantrasyonunda, sabit sıcaklık ve pH değerinde  $K_m$  ve  $V_{max}$  Lineweaver-Burk doğrusu çizilerek hesaplandı ve Çizelge 3.1’de verildi. Bir enzim için  $K_m$  (Michaelis-Menten sabiti), enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimlerini karakterize eden bir parametredir <sup>(2,8,22)</sup>.

Serbest ve immobilize enzim sistemlerinde,  $K_m$  sabitleri sırası ile 16.5 ve 19.9 mM olarak bulundu. Bu değer serbest enzim için belirlenen değerden daha yüksektir. Maksimum hız,  $V_{max}$ , ise katalazın immobilizasyonu ile azalmıştır. Serbest katalazın  $V_{max}$  değeri,  $236 \times 10^3 \text{ U mg}^{-1}$  olarak bulunurken, immobilize enzim eşleniği için bu değer  $43.8 \times 10^3 \text{ U mg}^{-1}$  olarak belirlendi. Beklenildiği gibi,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, poli(GMA-MMA) mikrokürelere katalaz enziminin kovalent olarak bağlanmasında oldukça etkin olduğunu göstermiştir. Genel olarak, immobilize enzimin  $K_m$  değeri; difüzyonel sınırlamalar, sterik etkiler ve iyonik güçten dolayı serbest enzimden oldukça farklıdır. Enzimin substratına olan

afinitesindeki değişim, immobilizasyon işlemleri ile enzimin yapısındaki değişimden ve immobilize enzimin aktif bölgelerine substratın daha düşük erişiminden kaynaklandığı düşünölmektedir <sup>(9)</sup>.

Enzimin mikro çevresindeki değişim reaksiyon hızını artırırken enzimin substratına afinitesinin düşmesine neden olduğu bilinmektedir. Yüksek  $K_m$  değeri kısa yarılanma süresine sahip enzim-substrat kompleksinin oluşumu kapsayan düşük afiniteyi göstermektedir. Bu koşullarda, reaksiyon ürün oluşum tarafına veya enzim ve substrat kompleks oluşum yönüne doğru ilerler. Birinci koşulda, yüksek ürün verimi yüksek  $V_{max}$  değerini verecektir. İkinci durumda ise düşük  $V_{max}$  değeri elde edilecektir. Serbest ve immobilize katalazın kinetik analizi yapıldığında, reaksiyon hızının 5.4 kat azaldığı görölmüştür. Immobilizasyon işleminde destek üzerine enzimin bağlanması sırasında moleküllerin doğru yönlendirilmeleri gibi bir durum söz konusu olamadığından enzim moleküllerinin inaktif yapıları sonucunda kovalent olmayan etkileşimlerin kinetik parametreleri etkilediğı düşünöldü <sup>(64)</sup>.

**Çizelge 3.1.** Serbest ve Immobilize Katalazın Kinetik Parametreleri

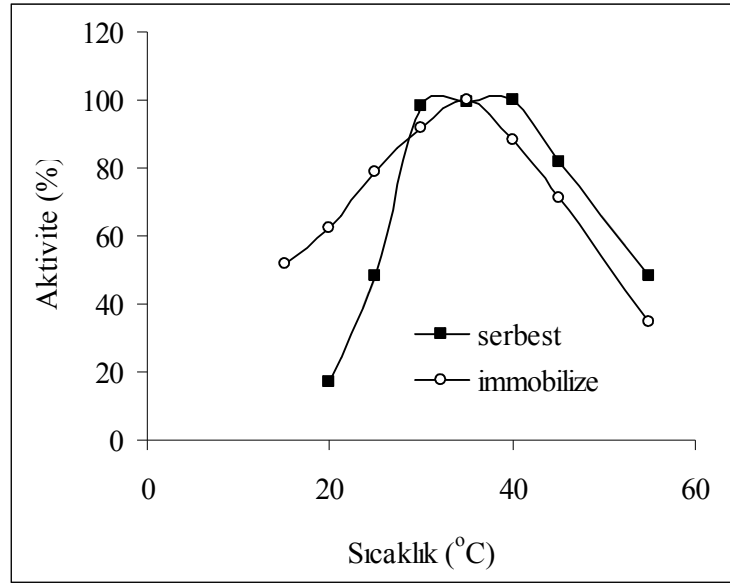
Enzim	$V_{max} \times 10^3$ (U/mg enzim)	$K_m$ (mM)	Yüklenen enzim mg enzim/ g küre
Serbest	236	16.5	-
İmmobilize	43.8	19.9	2.76

### 3.4. Enzimi Katalitik Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

İmmobilizasyondan sonra enzimin aktivitesi, optimum pH ve sıcaklığı, substrata olan ilgisi ve stabilitesi değişmektedir. Enzimatik reaksiyonun hızının maksimum olduğu sıcaklık derecesine optimum sıcaklık denir. Çoğu enzimler için optimal sıcaklık, ilgili enzimin bulunduğu hücre ortamının sıcaklığında veya onun biraz üzerinde olmak üzere 40-60<sup>o</sup> C arasındadır. Enzimatik reaksiyonların hızı, sıcaklık değişmelerinden önemli derecede etkilenir. Sıcaklık artışıyla enzimatik reaksiyonun hızındaki artış, sıcaklık belli bir değere yükselinceye kadar devam eder; daha yüksek sıcaklıklarda enzim denatüre olarak aktivitesini kaybeder ve reaksiyon hızı azalır. Genellikle enzimin aktivitesi ve substrata ilgisi immobilizasyondan olumsuz etkilenirken, uygun değer sıcaklığın ve enzimin kararlılığını olumlu etkilediği çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir <sup>(11,36,63)</sup>.

Serbest ve immobilize katalazın aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 3.3'de gösterildi. 15-55 °C sıcaklık aralığında elde edilen aktiviteler, maksimum aktivitenin bir yüzdesi olarak ifade edildi. Serbest enzimin aktivitesi 30-40°C aralığında artarken daha yüksek sıcaklıklarda aktifliği azaldığı için daha hızlı düştüğü çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Tutuklu katalaz için maksimum aktivite 35 °C'de elde edildi. İmmobilize enzimin optimum sıcaklığındaki artış, artan termal kararlılığının bir sonucu olarak değerlendirildi. Enzimlerin immobilize edilmelerindeki temel hedeflerden biri, bu işlem süreci sonunda, moleküllerin sınırlı konformasyonel hareketliliğinden dolayı, çeşitli deaktive edici kuvvetlere karşı kararlılığında beklenen artıştır. Tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz sonuç bu hedefi büyük ölçüde karşılamaktadır. Optimum sıcaklıktaki artışa, enzimin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi

neden olduğu düşünöldü. İmmobilize katalazı amino grupları vasıtasıyla kovalent bağ oluşturması sonucu enzimin konformasyonel esnekliğini azaldığı ve enzim molekülün substratına bağlanmak için uygun konformasyonuna sahip olma olasılığının azalması sonucu, daha yüksek bir aktivasyon enerjisi gereksinimi ile sonuçlandığı düşünöldü. Enzim tutuklanmasının ana nedenlerinde bir diğeri de, tutuklamayı takiben, enzim moleküllerin sınırlı konformasyonel hareketliliğinden dolayı, çeşitli deaktive edici kuvvetlere karşı kararlılığında oluşmasına beklenen artışlardır<sup>(56)</sup>.

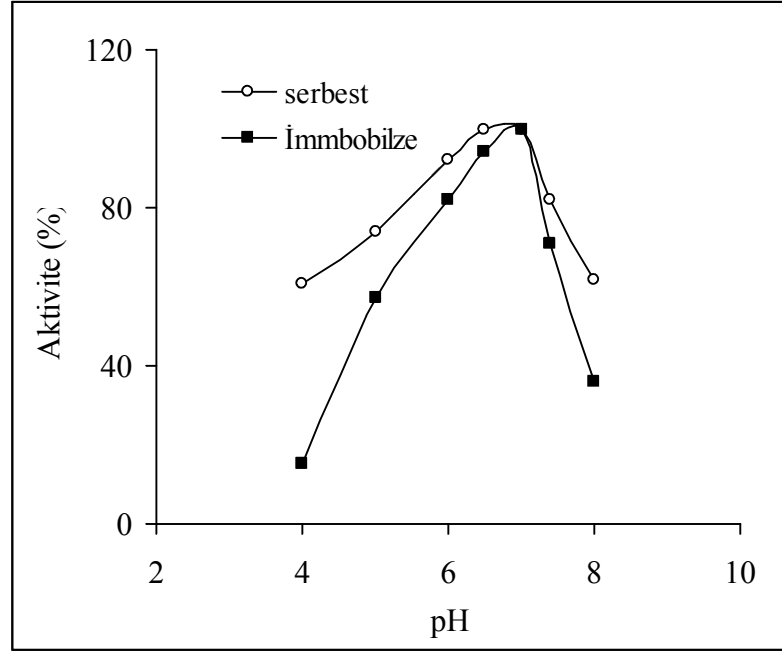


**Şekil 3.3.** Serbest ve immobilize katalaz enzim eşleniklerinin aktivitesine sıcaklığın etkisi



### 3.5. Serbest ve Tutuklu Katalaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Sıcaklık, pH ya da iyonik ortamdaki bir değişiklik proteinlerin denatürasyona neden olmaktadır. pH değişimine karşı oldukça duyarlı olan enzimler, genellikle çok fazla asidik ve alkalik ortamda etkisizdirler. Serbest ve immobilize katalaz aktiviteleri üzerine orta pH'nın etkisi araştırıldı ve Şekil 3.4'de verildi.



Şekil 3.4. Serbest ve immobilize katalaz enzim eşleniklerinin pH profilleri

Serbest ve immobilize enzimin en yüksek aktivite değerinin gözleendiği optimum pH değeri sırası ile 6.5 ve 7.0 olarak belirlendi. Serbest enzime için pH'a bağımlı aktivite profilinin immobilize katalaz enzimi ile kıyasla daha geniş olduğu görüldü. Bu sonuç bize kovalent bağlanma ile katalaz enziminin immobilizasyon sonucu enzimin ortam pH'ına karşı kararlılığının artığının bir göstergesi olduğunu

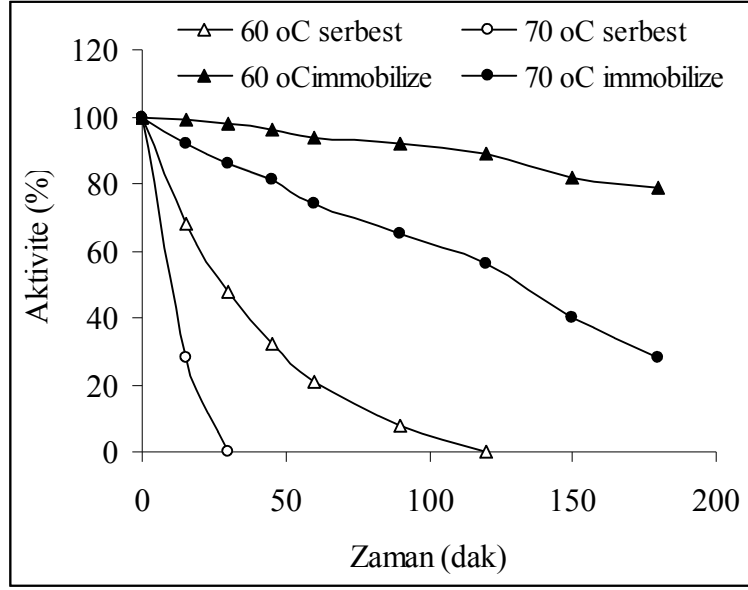
düşündürdü. Yapılan çalışmalarda, pH profilinde genişlemenin enzim ve polimerik destek materyali arasındaki ikincil etkileşimlerden (iyonik ve polar etkileşimler, hidrojen bağı) kaynaklanma ihtimali olduğu rapor edilmiştir <sup>(42,64,9)</sup>.

### **3.6. Isısal Kararlılık**

İmmobilize bir enzimin ısısal kararlılığı, onun uygulanmasının en önemli kriterlerinden biridir. Genelde, immobilize enzimin aktivitesi özellikle kovalent bağlı bir sistemde sıcaklığa ve denatüre edici ajanlara karşı, çözüner haldeki eşleniğinden daha dirençlidir.

Isısal kararlılık deneyleri, çeşitli sıcaklıklarda inkübe edilen serbest ve immobilize enzim ile gerçekleştirildi. Şekil 3.5’de serbest ve immobilize katalaz için 60 ve 70 °C sıcaklıklarındaki ısı inaktivasyon grafikleri gösterildi. İmmobilize katalaz 60°C’de başlangıç aktivitesinin neredeyse tamamını korurken serbest enzim 90 dakika inkübasyon periyodundan sonra başlangıç aktivitesinin %8’ini koruduğu belirlendi. Serbest enzimin 70°C’de sırasıyla 30 dakika işleminden sonra başlangıç aktivitesini kaybettiği belirlendi. Serbest ve immobilize enzim örneklerinin 70 °C işlem sıcaklığında, 180 dakika inkübasyon periyodundan sonra başlangıç aktivitelerinin sırası ile %79 ve %28’ini koruduğu belirlendi.

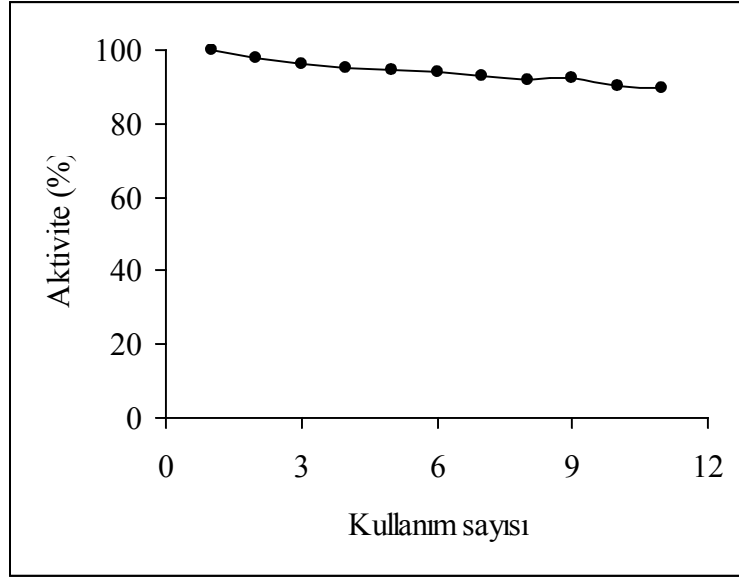
Serbest enzim 70 °C’de 15 dakika içinde hızla denatüre olurken, immobilize enzimde gözlenen serbest enzime kıyasla daha yavaş denatürasyonun, katalazın manyetik kürelere çok noktadan bağlandığını ve immobilize enzimin konformasyonel yapının kararlı kaldığının bir göstergesi olarak değerlendirildi <sup>(65)</sup>.



**Şekil 3.5.** Serbest ve immobilize katalaz enziminin ısısıl kararlılığı

### 3.7. İmmobilize Katalazın Tekrar Kullanımı

Destek materyallere tutuklanmış enzim sisteminin işlemsel kararlılığı önemlidir ve artan kararlılıkta immobilize enzimler serbest eşleniklerine göre üstün avantajlara sahiptir. Destek materyaline immobilize katalazın işlemsel kararlılığı, 11 kez tekrarlanan kesikli sistemde incelendi ve aktivitesinde önemli bir kayıp olmaksızın kararlılığını sürdürdüğü görüldü (Şekil 3.6). Yüksek işlemsel kararlılık uygulamada işletim maliyetinin önemli ölçüde azalmasına neden olacağından önemli bir parametre olduğu göz ardı edilmemelidir.

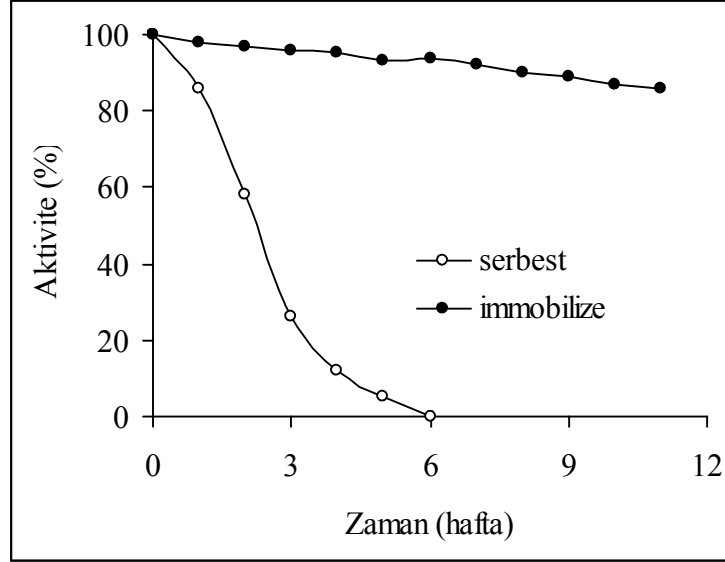


**Şekil 3.6.** İmmobilize katalazın tekrar kullanımdan sonra kararlılığı

### 3.8. Depolama Kararlılığı

Enzim immobilizasyonunda, dikkate alınması gereken bir diğer önemli parametrelere depolama kararlılığıdır. Serbest ve immobilize katalazın kararlılığı 77 gün bir süre için 4°C’de fosfat tamponunda(50 mM, pH 7.0) depolandıktan sonra belirlendi. Aynı depolama şartları altında, immobilize katalazın göstermiş olduğu aktivitenin, serbest katalaza göre daha yavaş azaldığı belirlendi (Şekil 3.7). Serbest katalaz 3 hafta içinde aktivitesinin tamamını kaybetti. İmmobilize enzim ise yaklaşık olarak üç aylık depolama periyodu sırasında başlangıç aktivitesinin yaklaşık koruduğu belirlendi. Kovalent immobilizasyon tekniği ile katalazın manyetik kürelere immobilizasyonu işlemi, serbest eşleniğine kıyasla, kararlı konumda kalmasına neden olmuştur. Hidrofobik grup taşıyan hidrofilik destek, stabilizasyon etkisine katkı sağlayacağı da söylenebilir<sup>(66)</sup>. Ayrıca, yapılan araştırmalarda, immobilizasyon işleminin sulu ortamdan etkilenen immobilize

enzimin aktif bölgesinin muhtemel distorsiyon etkisini minimize edeceği de ifade edilmektedir <sup>(67,68)</sup>.



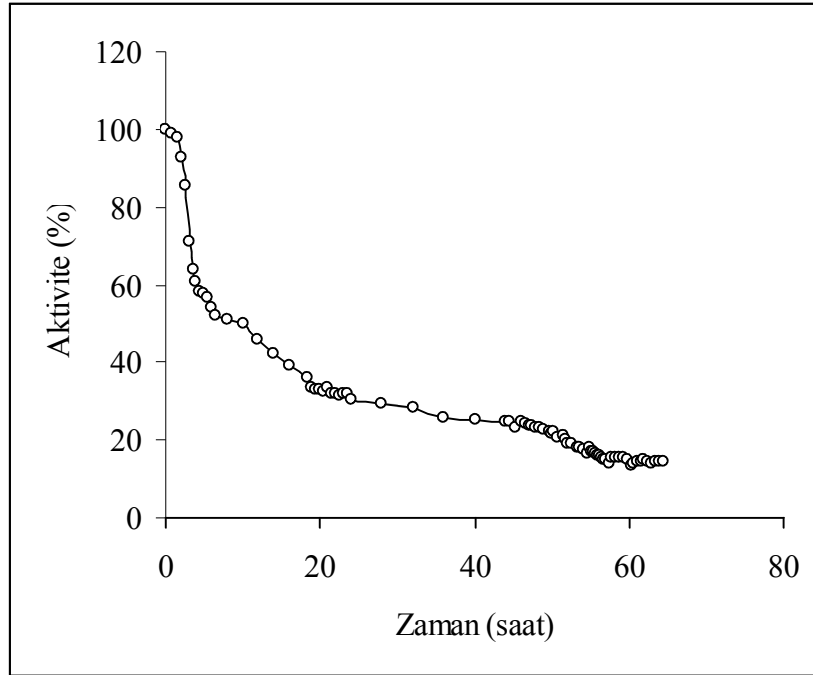
**Şekil 3.7.** Serbest ve immobilize katalaz enzim eşleniklerinin depolama kararlılığı (4°C'de)

### 3.9. Enzim Reaktörü Verimliliği

Bir enzimin ekonomik kullanımı, istenen ürünün toptan üretimi anlamında, enzim reaksiyonunun sürekli olması durumunda önemlidir. Sürekli enzim reaksiyonlarındaki problemlerden biri, desteğe tutuklanan enzimin işlemsel kararlılığıdır. Poli(GMA-MMA) manyetik kürelerine kovalent bağlanma tekniği ile immobilize edilen katalazın işlemsel kararlılığı, sürekli sistemde 64 saat süresi boyunca izlendi. Başlangıçtaki 64 saatlik sürekli işlem sırasında, tutuklu katalaz, başlangıçtaki aktivitesinin tamamını korudu. Bu süreden sonra, zamanla, enzim

aktivitesinde küçük bir azalma gözlemlendi. 120 saat sonra, tutuklu enzim, başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 7.5'ini kaybetti.

Şekil 3.8, immobilize katalaz tarafından, hidrojen peroksitin su ve oksijen molekülüne parçalanması reaksiyon temas süresinin etkisini göstermektedir. Temas süresi artması ile  $H_2O_2$  bozulmasının verimliliğinin de arttığı görüldü. Bu reaksiyon hızı, doğrusal değildir ve temas süresinin artması ile daha yüksek derecede  $H_2O_2$  bozulmasının ile sonuçlanmaz. Bu ya reaksiyon ortamındaki substratın tüketilmesinden ya da mikrokürelerin gözenekli yüzeyden difüzyon sınırlanmasıyla en düşük substrat konsantrasyonunda, enzim aktivitesiyle muhtemel karışımdan kaynaklanabilir.



Şekil 3.8. İmmobilize katalazın sürekli sistem uygulaması

#### 4. SONUÇ

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, günümüzde daha çok hız kazanmış durumdadır. Hangi tür kaynaktan olursa olsun enzimlerin biyolojik ortamdan saflaştırılması oldukça zaman alıcı ve yüksek maliyetlidir. Katalizör olarak kullanılan bu enzimlerin reaksiyon ortamındaki ürünlerden ayrılmasının zorluğu, saflaştırma işleminin masraflı olması bu enzimlere dezavantaj kazandırmaktadır. Enzim saflaştırılması aşamasında kullanılan kimyasalların enzim üzerinde inhibitör etkisi göstermesi ve buna bağlı olarak enzim yapısının bozulması durumunun oluşturduğu dezavantaj farklı teknikler uygulanarak çözümlenmeye çalışılmıştır. Bu teknikler arasında enzim immobilizasyonu başarı ile uygulanabilmiş bir yöntemdir. Bu nedenle, endüstriyel öneme sahip birçok enzim immobilizasyon işlemi ile işlemsel olarak avantajlı hale dönüştürülerek çeşitli endüstriyel uygulamalarda başarı ile kullanılabilmiştir.

Araştırmacıların dikkatini enzim immobilizasyonu üzerinde yoğun çalışmalara yönlendiren bir diğer etken endüstriyel uygulamaların çoğunun sulu çözeltilerde gerçekleştirilmesinden dolayı, katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılmasının olanak dışı olması olmuştur. Bu doğrultuda, farklı geometrilere sahip olan doğal ve/veya sentetik kökenli destek materyalleri enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmak üzere tasarlanmış ve hazırlanmıştır<sup>(8,11,36,38)</sup>.

Katalaz enzimi, gıda endüstrisinde soğuk pastörizasyon sonrası besin ürünlerinden hidrojen peroksit uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca analitiksel işlemlerde hidrojen peroksit yada glikoz biyosensör sistemlerinin bir bileşenidir. Hem grubu içeren katalaz hidrojen peroksidi yıkarak diğer bütün makromolekülleri peroksitlerin yıkıcı etkisinden korumaktadır. Dört alt üniteye sahip olan katalaz, her bir üniteye prostetik grup olarak ferriporphyrin içerir. Bir protein yüzeyindeki elektron verici grupların sıklığı ve lokalizasyonu, ligand olarak kullanılan metalin afinitesini belirlemektedir. Katalaz yüzeyinde bulunan histidin aminoasit grupları metal iyonları ile etkileşimde en büyük role sahiptir<sup>(4,5)</sup>.

Reaktif epoksi grubu içeren taşıyıcı destekleri, laboratuvar ve endüstriyel ölçekteki enzimlerin, kolayca kovalent tutuklanmaları için, ideal kabul edilebilir. Bu modifiye edilebilen destek materyalleri, depolama sırasında ve nötral sulu ortamda süspansiyon edildiğinde oldukça kararlıdır ve çok kararlı kovalent bağlar oluşturabilirler<sup>(9,69)</sup>.

Destegın fiziksel yapısı ve kimyasal kompozisyonu, tutuklanan enzimlerin mikroçevrelerini ve bunun sonucunda da biyolojik özelliklerini etkileyebilir<sup>(70)</sup>. Büyük substrat moleküllerinin enzimatik degradasyonunda kullanılması için, enzimler, polimerik destekler üzerine kovalent olarak tutuklanmaları tercih edilir. Mikroküre yüzeylere enzimlerin tutuklanması ve sürekli sistemlerde kullanılması hedef moleküllerle yüksek aktivite sergilemesinin yanında, yüksek işlemsel kararlılık sağlar ve işlem zamanını da önemli ölçüde kısaltmış olur<sup>(59,60)</sup>.

Santrifüjleme, çöktürme, karıştırma veya yüksek basınç uygulamaları biyokimyasal işlemlerde özellikle immobilizasyon sistemlerinde ve ayrıştırma ve/veya saflaştırma işlemlerinde sıklıkla kullanılan ve genellikle kimyasal işlem sırasında yer



alan biyomoleküllerin yapılarının bozulmasına veya aktivitelerinin kaybolmasına neden olan başlıca etmenler olarak sayılabilirler. Son yıllarda üzerinde yoğun araştırmalar yapılan manyetik taşıyıcı teknolojisi bu olumsuzlukların aşılması için önemli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada, reaktif poli(GMA-MMA) mikroküreleri süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile hazırlandı. Destek materyalinin hazırlanması; literatürde yer alan kürelere manyetik özellik kazandırma amacı ile manyetik demiroksit partiküllerin polimerizasyon sırasında monomer karışımını içeren ortama eklenmesi yerine, öncelikli olarak demir içeren poli(GMA-MMA) küreleri,  $Fe^{+3}$  iyonları varlığında sentezlenerek bir sonraki aşamada demir oksit kristali oluşumu için  $Fe^{+2}$  iyonları içeren  $NH_3 \cdot H_2O$  sulu çözeltisinde klasik termal çöktürme reaksiyonunu kapsamaktadır. Hazırlanan manyetik mikroküreler glutaraldehit ile aktive edilerek katalaz enziminin tutuklanması için destek materyali olarak kullanıldı.

Serbest ve immobilize katalazın aktivite tayini, enzim aktivitesi sonucu hidrojen peroksidin parçalanmasını doğrudan ölçülerek gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize enzimin en yüksek aktivite değerinin gözlemlendiği optimum pH değerleri 6.5 ve 7.0 olarak ve optimum sıcaklık değerleri ise  $30-40^{\circ}C$  ve  $35^{\circ}C$  olarak belirlendi.

İmmobilize enzim işlem sırasında aktivitesini yitirmeden kararlılığını korumalıdır. Bir enzim denatüre edilir veya alt ünitelerine ayrıştırılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur; bir enzim amino asit komponentlerine yıkılırsa katalitik aktivitesi daima harap olur. Enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları, katalitik aktiviteleri için esastır.

Enzim reaktörleri ve biyosensörlerin yapımında, tutuklamanın bir sonucu gibi görünen, izlenebilen kinetik parametrelerdeki değişiklikler çok önemlidir. Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanan serbest katalaz için görünen Michaelis sabitleri  $K_m$  ve  $V_{max}$ , sırasıyla 16.5 mM ve  $236 \times 10^3 \text{ U mg}^{-1}$  enzim olarak bulundu ve immobilize enzimin kinetik sabitleri kesikli sistemde tayin edildi. Manyetik küreler üzerine kovalent olarak bağlanan katalaz için görülebilir  $K_m$  değeri 19.9 mM olarak bulundu. İmmobilize enzimin  $V_{max}$  değeri ise  $43.8 \times 10^3 \text{ U mg}^{-1}$  enzim olarak değerlendirildi. Beklenildiği gibi, glutaraldehit ile aktive edilen küreler üzerine enzim immobilizasyonu işleminden sonra  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri önemli oranda değişiklik gösterdi.

İmmobilize katalaz, serbest eşleniğinden daha yüksek derecede sıcaklığa karşı kararlılık gösterdiği belirlendi. İmmobilize enzim, enzim reaktöründe, 120 saatlik sürekli işlem sırasında, %7.5'lük başlangıç aktivitesinin kaybı ile, hidrojen peroksitin enzim aktivitesi sonucu su ve oksijene parçalanması için kullanıldı.

Bu uygulama sonucunda elde edilen verilerden; (1) Hazırlanan destek materyalinin istenen özelliklere sahip olduğu ve biyoaktif makromolekül tutuklanmasında kullanılabileceği görülmüştür; (2) Polimerizasyon protokolü sırasında erişilebilir epoksi gruplarının amonyak varlığında birlikte ısıl çökelim reaksiyonu sonucunda amin gruplarına dönüşmesi nedeni ile doğrudan glutaraldehit ile modifiye edilebilmesi aktivasyon öncesi bir adıma olan gereksinimi engellemiştir; (3) destek materyalinin mikroküre geometrisine sahip olarak hazırlanması sonucunda elde edilen geniş yüzey alanı immobilizasyon verimini arttırmıştır; (4) İmmobilize katalaz ile yüksek bir işlemsel kararlılık elde edilmiştir; (5) literatürde immobilize katalaz için belirlenen değerlerden daha yüksek aktivite değeri gözlenmiştir; (6) Enzimlerin manyetik temelli desteklere tutuklanması, diğer geleneksel metotlara kıyasla, enzim molekülünü işletim koşulları altında daha az bir mekanik gerilime maruz bırakma konusunda bir üstünlük sağlamıştır; (7) Enzimlerin manyetik temelli desteklere tutuklanması işletim kolaylığı sağlamıştır ve (8) enzim elektrodu ya da enzim reaktörünün bir kısmı gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için iyi bir mekanik kararlılığa sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, katalaz manyetik desteğe immobilize edilerek kullanıldığında reaksiyon süresi, reaktör hacmi ve sayısı azalacak ve enzim defalarca kullanılabilirdiğinden üretim harcamaları minimuma inecektir. Katalazın manyetik temelli kürelere immobilize edilmesi kolay ve ekonomik olmasıdır. Ayrıca, manyetik alan kullanarak reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılabilmeleri ve akışkan yataklı reaktörlerde stabilize edilerek kullanılabilir olmaları nedeni ile de biyoproseslerde hazırladığımız manyetik partiküllerin kullanması önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bu yolla hazırlamış olduğumuz katalaz immobilize manyetik kürelerden oluşan biyoseparatör ile sürekli sistem işletimi başarıyla uygulanabilmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. A. Wiseman, Handbook of Enzymes Biotechnology, Second Edition, Chapter 3, The Application of Enzymes in Industry , 274-373, (1987).
2. Tom Bohager, Enzymes: What the Experts Know, One World Pres (ISBN-13: 9781424307951), (2006).
3. A.L. Demain, and N.A. Solomon, In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering, Scientific American, Freeman &Comp., San Francisco, 3-14, (1981).
4. A. Gessesse, Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Appl. Environ. Microbiol., 3533-3535 (1998).
5. T. Sheper, Advances in Biochem. Eng./Biotech., Springer-Verlag, Berlin, Germany

6. E. Hearn, R. J. Neufeld, Poly(methylene co-guanidine) coated alginate as an encapsulation matrix for urease, *Process Biochem.*, **35**, 1253-1260(2000).
7. M.Y. Arıca, Adil Denizli, Bekir Salih, Erhan Pişkin, Vasif Hasırcı, *Jour. of Memb. Sci.*,**129**(1), **12**, 65-76(1997)
8. M.Y. Arıca. Immobilization of polyphenoloxidase on carboxymethylcellulose hydrogel beads: preparation and characterisation. *Polym. Int.*,**49**,775-81(2000)
9. M.Y. Arıca, G. Bayramoğlu and N. Bıçak, Characterization of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads, *Process Biochem.*, **39**, 2007-2017(2004).
10. G. Bayramoğlu, B. Kaya and M.Y.Arıca., Immobilisation of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached (GMA-HEMA-EGDMA) microspheres, *Food Chem.*, **92**, 261-268(2005).
11. M.Y. Arıca , G. Bayramoğlu, Reversible immobilization of tyrosinase onto polyethyleneimine-grafted and Cu(II) chelated poly(HEMA-co-GMA) reactive membranes, *Jour. of Molec. Catal. B: Enzymatic*, **27**, 255-265(2004).
12. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Portland Pres,1995.
13. C. Duve, Microbodies in the living cells. *Sci. Am.*,**248**,42-52(1983).
14. R.S. Holmes and C.J. Masters, Species specific feature of the distribution and multiplicity of mammalian liver catalases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**,217-233(1972).
15. G.R. Schonbaum and B. Change, In ‘The Enzymes.’(Bayer,P.D.,ed.) 3<sup>nd</sup> Vol.13, , Academic Press, New York, 368-408, (1976)

16. C. Schoneich, Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. *Exp Gerontol* Jan; **34**,19(1999).
17. G. C. Yen and J. Y. Wu, Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem.*, **65**, 375-379(1999).
18. M.E. Percy, Catalase an old enzyme with a new role, *Can.J.Biochem.Cell Biol.*, **62**,1006-1014(1984).
19. M.H. Chen Liao, Preparation and characterisation of YADH-bound magnetic nanoparticles. *J. Mol. Catal. B: Enzyme* ,**16**,283-91(2002).
20. R. Diekmann, D. C. Hempel, Immobilization techniques, bioreactors and improvements in downstream processing, *Ann. of the Sci.*, **10**, 245-255(1990)
21. A. Gromada, Dr. hab. J. Fiedurek, Optimization of catalase biosynthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* mutant, *Jour. of Basic Microbiol.*,**37**,2,85-91(2007).
22. Martin Chaplin and Christopher Bucke, *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, (1990).
23. A. Brant, A. Hole, J. Cannon, J. Helm, C. Swales, J. Welch, A Newman Taylor, P. Cullinan, Occupational asthma caused by cellulase and lipase in the detergent industry, *Occup. Environ. Med.*, **61**,793-795(2004)
24. J.L. Fuentes and M. Roberts, European Patent, 262040,1988.
25. L. Viikari, A. Kantelinen, J. Sundguist, ve M. Linko, *FEMS Microbiology Reviews*, **13**, 335(1994).
26. M. Manuela Lageiro, M. João Mouraa, Alberto Reisa and M. José Costa-Ferreira, Microbial proteases application in leather industry, *Jour.of Biotechnol.*, 131 ( 2) S239-S240, (2007).

27. Y. Tarakçıoğlu, 1979., An Amylase Producing Maltotiose from *Bacillus subtilis*. Agric. Biol. Chem. **49** (4), (1901-1907).
28. P. J. Worsfold, Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes (Technical reports) Pure and Appl. Chem., **67**, 597-600(1995).
29. D. Emerson, S.F. Peteu, R.M. Worden, A catalase microbiosensor for detecting hydrogen peroxide, Biosen. Bioelectron, **10**, 673-678(1996).
30. F. Scheller, C. Karsten, A combination of invertase reactor and glucose oxidase electrode for the successive determination of glucose and sucrose, Anal. Chim. Acta., **155**, 29-36(1983).
31. S. Ahmad, A. Anwar, M. Saleemuddin, Immobilization and stabilization of invertase on Cajanas cajan lectin support, Biores. Technol., **79**, 121-12(2001).
32. D. Gouda, M.S. Thakur, N. G. Karanth, Optimization of the multienzyme system for sucrose biosensor by response surface methodology, Electroanal., **17**,18-849(2001).
33. S. Ahmad, A. Anwar, M. Saleemuddin, Immobilization and stabilization of invertase on Cajanas cajan lectin support, Biores. Technol., **79**, 121-127(2001).
34. W. Tischer, V. Kasche, "Immobilized Enzymes: Crystals or Carriers, TIBTECH, **17**(1999).
35. B. Schulz, A. Riedel, P.U. Abel, Influence of polymerization parameters and entrapment in poly (hydroxyethyl methacrylate) on activity and stability of GOD, Jour. of Molec. Catal. B: Enzymatic, **7**, 85-91(1999).
36. S. Akgöl, Y. Yalcınkaya, G. Bayramoglu, A. Denizli, M.Y. Arıca. Reversible immobilisation of urease onto Procion Brown MX-5BR-Ni(II)

- attached polyamide hollow-fibre membranes, *Process Biochem.*, **8**:675-83(2002).
37. C. Mateo, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, Increase in conformational stability of enzymes immobilised on epoxy-activated supports by favouring additional multipoint covalent attachment, *Enzyme Microb. Technol.*, **26**, 509-15(2000).
38. G. Bayramoğlu, M. Yılmaz and M.Y. Arica, Immobilizations of a thermostable  $\alpha$ amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis, *Food Chem.* **84**, 591-599(2004).
39. G. Bayramoğlu, E. Yalcin and M.Y. Arica, Immobilization of urease via adsorption onto L-histidine-Ni(II) complexed poly(HEMA-MAH) microspheres: preparation and characterization, *Process Biochemistry*, **40**, 3505-3513(2005).
40. M.Y. Arica, and G. Bayramoğlu, Invertase reversibly immobilized onto polyethyleneimine-grafted poly(GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis, *Jour. of Molec. Catal. B:Enzymatic*, **38**, 131-138(2006).
41. J. Krizova, A. Spanova, B. Rittich, D. Horak, Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation, *Jour. of Chromatog. A*, **1064**, 247-253(2005).
42. G. Bayramoğlu, E. Loğoğlu, M.Y. Arica, Cytochrome c adsorption on glutamic acid ligand immobilized magnetic poly(methylmethacrylate-co-glycidylmethacrylate) beads, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. and Eng. Aspect*, Article in pres.



43. G. Bayramoğlu, Y. Tunalı, M.Y. Arıca ., Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto magnetic poly (GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor, Catal. Commun., Article in press.
44. G. Bayramoğlu, M.Y. Arıca ., Kinetics of mercury ions removal from synthetic aqueous solutions using by novel magnetic p(GMA-MMA-EGDMA), Jour. Hazard. Material., **144**:449-457(2007).
45. E. Horozova, N. Dimcheva, Kinetic study of catalase adsorption on disperse carbonaceous matrices, Cent. Eur. J. Chem.,**2**, 627-637(2004).
46. S. Phadtare, S. Vyas, D.V. Palaskar, A. Lachke, P.G. Shukla, S. Sivaram, M. Sastry, Enhancing the reusability of endoglucanase-gold nanoparticle bioconjugates by tethering to polyurethane microspheres, Biotechnol Progress, **20**, 1840-1846(2004).
47. S. Phadtare, V. D'Britto, A. Pundle, A. Prabhune, M. Sastry, B-galactosidase-lipid biocomposite films: Preparation, characterization, and enzymatic activity, Biotechnol Progress ,**20**, 156-161(2004).
48. K. Yamada, T. Nakasone, R. Nagano, M. Hirata, Retention and reusability of trypsin activity by covalent immobilization onto coated polyethylene plates, J. Appl. Polym. Sci. **89**, 3574-3581(2003).
49. Q.Z.K. Zhou, X.D. Chen, L. Xuemeli, Kinetics of lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on cotton fabric, Biotechnol Bioeng., **81**, 127-133(2003).
50. K. Yamada, T. Nakasone, R. Nagano, M. Hirata, Retention and reusability of trypsin activity by covalent immobilization onto coated polyethylene plates. J. Appl. Polym. Sci., **89**, 3574-3581(2003).

51. J. R. Retama, M.S.P. Lopez, J. P. H. Perez, G. F. abanillas, E. Lopez-Cabarcos, B. Lopez-Ruiz, *Biosens Bioelectron* , **20**, 2268(2005).
52. G.Bayramoglu, E. Yalcin, M.Y.Arica, Immobilisation of urease via adsorption onto L-histidine –Ni(II) complexed poly(HEMA-MAH) microspheres: Preparation and characterization, *Process Biochem.*, **40**,3505(2005).
53. M.Y. Arica., G. Bayramoğlu, Polyethyleneimine coated poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) membranes for glucose oxidase immobilization, *Biochem.Eng. J.*, **20** -73-77(2004).
54. N. Pekel, B. Salih, O.J. Guven, *Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 16, 253(2005).
55. C.S. Rha, D.H. Lee, S.G. Kim, W.K. Min, S.G. Byun, D.H. Kweon, N. S. Han, J.H. Seo, *J. Mol. Characterization of Thermoanaerobacter cyclomaltodextrin glucanotransferase immobilized on glyoxyl-agarose*, *Catal. B :Enzymatic*, **34**,39(2005).
56. Z.G. Wang, J.Q. Wang, Z.K.J. Xu, *Mol. Catal. B: Enzymatic*, **42**, 45(2006).
57. H.T. Deng, Z. K. Xu, Z. M. Liu, J. Wu, P. Ye, *Enzyme Microb. Technol.*, 35, 437(2004).
58. G.Bayramoglu, G. Celik, M.Y. Arica, Chitosan-grafted poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) membranes for reversible enzyme immobilization, *Colloids Surf. A*, **287**,75(2006).
59. M.Y. Arica ., A. Denizli, B. Salih, E. Piskin and V.J. Hasirci, New metal chelate sorbent for albumin adsorption: Cibacron Blue F3GA-Zn (II) attached microporous poly (HEMA) membranes, *Membr. Sci.***129**,65(1997).

60. M.Y. Arıca, H.A Oktem, Z. Oktem, S.A Tuncel, Immobilization of catalase in poly(isopropylacrylamide-co- hydroxyethylmethacrylate) thermally reversible hydrogels, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **15** , 197–206(2001)
61. P.J. Worsfold, Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes (Technical reports) *Pure and Appl. Chem.*, **67**, 597-600(1995).
62. G. Bayramoğlu, S. Akgöl, A. Bulut, A. Denizli, M.Y. Arıca ., Covalent immobilization of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: Properties and application in a continuous flow system, *Biochem. Eng. Jour.*, **14**, 117-126(2003).
63. M.Y.Arıca, H. Yavuz, S. Patır, A. Denizli, Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flowreactor, *J. Mol. Catal. B* ,**11**, 127–138(2000).
64. G. Bayramoğlu, S. Kiralp, M. Yılmaz, L. Toppare, M.Y. Arıca., Covalent immobilization of chloroperoxidase onto magnetic beads: catalytic properties and stability, *Biochemical Engineering Journal*, **38**(2) ,180-188(2008).
65. S. Kiralp, A.Topcu G. Bayramoğlu, M.Y. Arıca., L. Toppare, Alcohol determination via covalent enzyme immobilization on magnetic beads, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **128**(1), 521-528(2008).
66. S.H. Choi, W.T. Wu, Immobilization of *Candida rugosa* invertase on Chitosan with activation of the hydroxyl groups, *Biomaterials*, **25**, 197-204(2004).

67. S. Canofeni, Di Sario S, S. Mela x, R. Pilloton, Comparison of immobilisation procedures for development of an electrochemical PPO-based biosensor for on line monitoring of a depuration process., *Anal Lett* ,**27**,1659-69(1994).
68. H. Jia, G. Zhu, B. Vugrinovich, W. Kataphinan, D.H. Reneker, P. Wang, Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts, *Biotechnol. Prog* .,**18**:1027-32(2002).
69. C. Mateo, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favouring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microb. Technol.*, **26**, 509-515(2000).
70. Y. Chen , E.T. Kang, K.G. Neoh, K.L. Tan, Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified polyaniline from graft copolymerisation with acrylic acid. *European Polym. J.*, **36**, 2095-2103(2000).