

**POLİ(AKRİLAMİT-AKRİLİK ASİT)/ALJİNAT,
POLİ(AKRİLAMİT-İTAKONİK ASİT)/ALJİNAT,
POLİ(AKRİLAMİT-AKRİLİK ASİT)/K-KARRAGENAN,
POLİ(AKRİLAMİT-İTAKONİK ASİT)/K-KARRAGENAN
HİDROJELLERİNDE LAKKAZ İMMOBİLİZASYONU**

YELDEM GİZEM MAKAS

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2008

ANKARA

Yeldem Gizem Makas tarafından hazırlanan POLİ(AKRİLAMİT-AKRİLİK ASİT)/ALJİNAT, POLİ(AKRİLAMİT-İTAKONİK ASİT)/ALJİNAT, POLİ(AKRİLAMİT-AKRİLİK ASİT)/K-KARRAGENAN, POLİ(AKRİLAMİT-İTAKONİK ASİT)/K-KARRAGENAN HİDROJELLERİNDE LAKKAZ İMMOBİLİZASYONU adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof.Dr.Serpil AKSOY
Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Mehmet SAÇAK
(Kimya, Ankara Üniversitesi)

Prof.Dr.Serpil AKSOY
(Kimya, Gazi Üniversitesi)

Prof. Dr. Mehlika PULAT
(Kimya, Gazi Üniversitesi)

Tarih:/...../.....

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nermin ERTAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Yeldem Gizem MAKAS

**POLİ(AKRİLAMİT-AKRİLİK ASİT)/ALJİNAT,
POLİ(AKRİLAMİT-İTAKONİK ASİT)/ALJİNAT,
POLİ(AKRİLAMİT-AKRİLİK ASİT)/K-KARRAGENAN,
POLİ(AKRİLAMİT-İTAKONİK ASİT)/K-KARRAGENAN
HİDROJELLERİNDE LAKKAZ İMMOBİLİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

Yeldem Gizem Makas

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2008**

ÖZET

Bu çalışmada, lakkaz enzimi, poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat, P(AAm-AA)/Alj, poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat, P(AAm-IA)/Alj, poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan, P(AAm-AA)/K-kar, poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan, P(AAm-IA)/K-kar yarı iç içe geçmiş ağ yapılı polimerlerinde (semi-IPN'ler), hapsetme yöntemi ile immobilize edildi. Serbest lakkaz ve immobilize lakkazlar için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulundu. Serbest lakkaz ve immobilize lakkazlar için optimum pH değerlerinin 5,0-6,0 aralığında değiştiği gözlemlendi. Serbest lakkaz ve P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazlar 4 °C' da 42 gün depolandıklarında, başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %55 ve %83, %94, %94, %83' ünü korudukları gözlemlendi. P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazların 10 kez kullanımları sonucunda başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %80, %50, %62 ve %62' sini korudukları bulundu.

Serbest lakkaz, P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazlar için K_m değerleri sırasıyla 0,0073 mM, 0,0196 mM, 0,0116 mM, 0,0252 mM, 0,0108 mM, V_{mak} değerleri sırasıyla $1,04 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $3,29 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $5,22 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $6,80 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $4,40 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu. İnaktivasyon hız sabitlerinin (k_i), P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazlar için 30 °C ve 50 °C' da 0,0006 dak⁻¹- 0,0014 dak⁻¹ ve 0,0012 dak⁻¹-0,0031 dak⁻¹ aralığında olduğu bulundu. Metil oranjın renginin giderilmesinde, serbest lakkaz ve P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazlar için renk giderme yüzdeleri sırasıyla %63 ve %43, %46, %36, %35 olduğu bulundu. Mediyatör kullanıldığında ise serbest lakkaz ve P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazlar için renk giderme yüzdeleri sırasıyla %73 ve %70, %72, %69, %71 olduğu bulundu.

Bilim Kodu : 405.1.117

Anahtar Kelimeler : Hapsetme, enzim immobilizasyonu, aljinat, K-Karragenan, lakkaz

Sayfa Adedi : 142

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Serpil AKSOY

**IMMOBILIZATION OF LACCASE IN
POLY(ACRYLAMIDE-ACRYLIC ACID)/ALGINATE,
POLY(ACRYLAMIDE-ITACONIC ACID)/ALGINATE,
POLY(ACRYLAMIDE-ACRYLIC ACID)/K-CARRAGEENAN,
POLY(ACRYLAMIDE-ITACONIC ACID)/K-CARRAGEENAN,
HYDROGELS
(M.Sc. Thesis)**

Yeldem Gizem MAKAS

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Temmuz 2008**

ABSTRACT

In this study, laccase enzyme was immobilized using entrapment method in poly(acrylamide-acrylic acid)/Alginate, P(AAm-AA)/Alj, poly(acrylamide-itaconic acid)/Alginate, P(AAm-IA)/Alj, poly(acrylamide-acrylic acid)/K-carrageenan, P(AAm-AA)/K-kar, poly(acrylamide-itaconic acid)/K-carrageenan, P(AAm-IA)/K-kar semi-interpenetrating network (semi-IPNs). Optimum temperature was determined as 40 °C for free laccase and immobilized laccases. Optimum pH was determined between 5,0-6,0 for free laccase and immobilized laccases. After 42 days of storage at 4 °C, free laccase and P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar immobilized enzymes retained %55 and % 83, % 94, % 94, % 83 of their original activities, respectively. P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar immobilized enzymes used repeatedly 10 times in a day and they were retained %80, % 50 % 62, %52 of their original activities, respectively. K_m and V_{max} were calculated for free laccase as K_m value is 0,0073 mM, V_{max} value is $1,04 \times 10^{-3}$ mM.min⁻¹ and for P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj,

P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar immobilized laccases K_m values are 0,0196 mM, 0,0116 mM, 0,0252 mM and 0,0108 mM and V_{max} values are $3,29 \times 10^{-3}$ mM.min⁻¹, $5,22 \times 10^{-3}$ mM.min⁻¹, $6,80 \times 10^{-3}$ mM.min⁻¹ and $4,40 \times 10^{-3}$ mM.min⁻¹, respectively. Inactivation rate constants (k_i) of immobilized laccases at 30 °C and 50 °C were found between 0,0006 min⁻¹-0,0014 min⁻¹ and 0,0012 min⁻¹- 0,0031 min⁻¹. Percent decolorization of methyl orange by free enzyme and enzymes immobilized in P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar were found as %63 and %43, %46, %36, %35. Percent decolorization of methyl orange in the presence of mediator by free enzyme and enzymes immobilized in P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar were found as %73 and %70, %72, %69, %71.

Science Code : 405.1.117
Key Words : Entrapment, enzyme immobilization, K-Carrageenan, alginate, laccase
Page Number : 142
Adviser : Prof. Dr. Serpil AKSOY

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam Prof. Dr. Serpil AKSOY'a, teőekkürlerimi bir borç bilirim.

Kıymetli tecrübelerinden faydalandığım hocam Yrd. Doç. Dr. Haydar ALTINOK 'a,

Çalıőmalarımda önemli katkıları bulunan manevi destekleriyle ve yardımlarıyla beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli laboratuvar arkadaşlarım Volkan BABACAN, Selva Zeynep KÖKLÜKAYA ve Nüzhet Ayça KALKAN'a,

Manevi desteğiyle her zaman yanımda olan, beni hep sevgi ve sabırla destekleyen değerli arkadaşım Erdem KABTAN' a,

Tüm yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak, bana olan güven ve inançlarını sonsuz hissettiren, varlıklarıyla her zaman güç veren annem Nursen MAKAS' a, babam İbrahim MAKAS' a ve sevgili kardeőim Giray Berkay MAKAS' a,

Sonsuz sevgi ve teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xviii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hidrojeller.....	3
2.1.1. Hidrojellerin sınıflandırılması.....	3
2.2. Enzimler.....	6
2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri.....	6
2.2.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması.....	7
2.2.3. Enzimlerin aktifliğini etkileyen faktörler.....	8
2.2.4. Enzimlerin etkisi.....	11
2.2.5. Enzimlerin kullanım alanları.....	13
2.3. Enzim İmmobilizasyonu ve İmmobilizasyon Yöntemleri.....	13
2.3.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri.....	21
2.3.2. Çapraz bağlama yöntemleri.....	24

	Sayfa
2.3.3. Hapsetme yöntemleri.....	25
2.4. İmmobilizasyon Yöntemi ve Taşıyıcı Seçimi.....	28
2.5. Çalışmada Kullanılan Enzim, Substrat ve Destek Materyalinin Özellikleri	29
2.5.1. Lakkaz.....	29
2.5.2. Siringaldazin.....	33
2.5.3. Sodyum aljinat.....	33
2.5.4. Karragenan.....	34
2.5.5. Destek materyali.....	36
2.5.6. Azo boyları.....	39
2.5.7. ABTS.....	40
2.6. Enzimatik Renk Giderme.....	41
2.7. Lakkazın İmmobilizasyonu ve Renk Giderme İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	45
3. DENEYSEL KISIM.....	55
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler.....	55
3.2. Çözeltilerin Hazırlanması.....	59
3.2.1. Sitrata tamponu.....	59
3.2.2. Sodyum hidroksit.....	59
3.2.3. Fosfat tamponu	59
3.2.4. Siringaldazin çözeltisi.....	59
3.2.5. Lakkaz çözeltisi.....	59
3.2.6. Akrilik asit çözeltisi.....	60

	Sayfa
3.2.7. TEMED çözeltisi.....	60
3.2.8. Sodyum asetat tamponu.....	60
3.2.9. ABTS çözeltisi.....	60
3.2.10. Metil oranj çözeltisi.....	60
3.3. Siringaldazin Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması.....	60
3.4. Enzim İmmobilizasyonu.....	62
3.5. Aktiflik Tayini.....	64
3.5.1. Serbest enzimin aktiflik tayini.....	64
3.5.2. İmmobilize enzimin aktiflik tayini.....	65
3.6. Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi.....	65
3.6.1. Serbest lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	65
3.6.2. İmmobilize lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	65
3.7. Enzim Aktifliğine pH Etkisi.....	66
3.7.1. Serbest lakkazın aktifliğine pH etkisi.....	66
3.7.2. İmmobilize lakkazın aktifliğine pH etkisi.....	66
3.8. Enzim Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi.....	66
3.8.1. Serbest lakkazın aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	66
3.8.2. İmmobilize enzim aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	67
3.9. Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	67
3.9.1. Serbest lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	67
3.9.2. İmmobilize lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	67
3.10. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi.....	68

Sayfa

3.11. Hidrojellerin Şişme Değerlerinin Zamanla Değişiminin İncelenmesi.....	68
3.12. İmmobilize Lakkazın Termal İnaktivasyonu.....	69
3.13. Serbest Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilmesi.....	69
3.14. İmmobilize Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilmesi.....	70
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	72
4.1. Serbest Lakkazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	72
4.2. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	74
4.2.1. Poli(akrilamid-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	74
4.2.2. Poli(akrilamid-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	75
4.2.3. Poli(akrilamid-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığı etkisi.....	77
4.2.4. Poli(akrilamid-itakonik asit)/K-Karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	78
4.3. Serbest Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi.....	80
4.4. İmmobilize Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi.....	82
4.4.1. Poli(akrilamid-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	82
4.4.2. Poli(akrilamid-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	83
4.4.3. Poli(akrilamid-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	85
4.4.4. Poli(akrilamid-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	86
4.5. Serbest Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi.....	89

Sayfa

4.6. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi.....	91
4.6.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	91
4.6.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	93
4.6.3. Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	94
4.6.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	96
4.7. Serbest Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	98
4.8. İmmobilize Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	100
4.8.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	101
4.8.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	102
4.8.3. Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	103
4.8.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	105
4.9. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi.....	107
4.9.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	107
4.9.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	109
4.9.3. Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	110

Sayfa

4.9.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	112
4.10. Hidrojellerin Şişme Değerlerinin Zamanla Değişimi.....	113
4.11. Immobilize Lakkazın Termal İnaktivasyonu.....	115
4.11.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal inaktivasyonu.....	115
4.11.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal inaktivasyonu.....	117
4.11.3. Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal inaktivasyonu.....	119
4.11.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal inaktivasyonu.....	121
4.12. Serbest Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilmesi.....	124
4.13. Immobilize Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilmesi.....	125
4.13.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi.....	125
4.13.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi.....	126
4.13.3. Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi.....	127
4.13.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi.....	128
5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	130
KAYNAKLAR.....	132
ÖZGEÇMİŞ.....	142

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Yaygın olarak kullanılan destekler.....	18
Çizelge 2.2. İmmobilizasyonda göz önünde bulundurulması gereken kriterler.....	28
Çizelge 3.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan madde miktarları.....	63
Çizelge 4.1. Serbest lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	73
Çizelge 4.2. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	74
Çizelge 4.3. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzim aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	76
Çizelge 4.4. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	77
Çizelge 4.5. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	79
Çizelge 4.6. Serbest lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	81
Çizelge 4.7. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	82
Çizelge 4.8. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	84
Çizelge 4.9. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	85
Çizelge 4.10. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	87
Çizelge 4.11. Serbest lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	90
Çizelge 4.12. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişimi etkisi.....	92
Çizelge 4.13. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişimi etkisi.....	93

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.14. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişimi etkisi.....	95
Çizelge 4.15. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişimi etkisi.....	96
Çizelge 4.16. Serbest ve immobilize lakkazlar için K_m ve V_{mak} değerleri.....	98
Çizelge 4.17. Serbest lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	99
Çizelge 4.18. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	101
Çizelge 4.19. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	102
Çizelge 4.20. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	104
Çizelge 4.21. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	105
Çizelge 4.22. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	108
Çizelge 4.23. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	109
Çizelge 4.24. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	111
Çizelge 4.25. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	112
Çizelge 4.26. Hidrojellerin % şişme değerlerinin zamanla değişimi.....	114
Çizelge 4.27. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 30 °C' da termal kararlılığı.....	116
Çizelge 4.28. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 50 °C' da termal kararlılığı.....	116
Çizelge 4.29. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 30 °C' da termal kararlılığı.....	118

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.30. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 50 °C' da termal kararlılığı.....	118
Çizelge 4.31. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 30 °C' da termal kararlılığı.....	120
Çizelge 4.32. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 50 °C' da termal kararlılığı.....	120
Çizelge 4.33. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 30 °C' da termal kararlılığı.....	122
Çizelge 4.34. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 50 °C' da termal kararlılığı.....	122
Çizelge 4.35. İmmobilize lakkazlar için k_i ve $t_{1/2}$ değerleri.....	123

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Enzimatik tepkimenin hızı üzerine substrat derişiminin etkisi.....	10
Şekil 2.2. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli.....	12
Şekil 2.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	21
Şekil 2.4. Kovalent bağlama ile immobilizasyon.....	23
Şekil 2.5. Çapraz bağlama yöntemleri.....	25
Şekil 2.6. Matrikste hapsetme.....	26
Şekil 2.7. Mikrokapsülleme.....	27
Şekil 2.8. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması.....	31
Şekil 2.9. Siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime.....	31
Şekil 2.10. Sodyum aljinat'ın kimyasal yapısı.....	34
Şekil 2.11. Karragenanın tekrarlanan birimlerinin yapısı.....	34
Şekil 2.12. K-karragenanın yapısı.....	35
Şekil 2.13. IPN tipi hidrojelilerin türleri.....	37
Şekil 2.14. Semi-IPN oluşumu.....	38
Şekil 2.15. Metil oranjin yapısı.....	39
Şekil 2.16. ABTS ve ABTS ⁺ ' nin oluşumu.....	40
Şekil 2.17. Metil oranjin lakkaz varlığında önerilen bozunma mekanizması.....	43
Şekil 2.18. Lakkazın mediyatör varlığında önerilen tepkime mekanizması.....	44
Şekil 3.1 Siringaldazin kalibrasyon eğrisi.....	61
Şekil 4.1. Serbest lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	73

Şekil	Sayfa
Şekil 4.2. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	75
Şekil 4.3. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	76
Şekil 4.4. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	78
Şekil 4.5. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	79
Şekil 4.6. Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi.....	81
Şekil 4.7. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	83
Şekil 4.8. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	84
Şekil 4.9. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	86
Şekil 4.10. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....	87
Şekil 4.11. Serbest lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği.....	91
Şekil 4.12. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.....	92
Şekil 4.13. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.....	94
Şekil 4.14. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.....	95
Şekil 4.15. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.....	97
Şekil 4.16. Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi.....	99
Şekil 4.17. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	101

Şekil	Sayfa
Şekil 4.18. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	103
Şekil 4.19. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	104
Şekil 4.20. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....	106
Şekil 4.21. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	108
Şekil 4.22. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	110
Şekil 4.23. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	111
Şekil 4.24. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	113
Şekil 4.25. Hidrojellerin % şişmelerinin zamana karşı değişimi.....	114
Şekil 4.26. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	117
Şekil 4.27. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	119
Şekil 4.28. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	121
Şekil 4.29. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	123
Şekil 4.30. Serbest lakkaz ile metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi.....	124
Şekil 4.31. P(AAm-AA)/Alj-L, P(AAm-AA)/Alj-DL, P(AAm-AA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-AA)/Alj-DL+ABTS ile metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi.....	125

Şekil	Sayfa
Şekil 4.32. P(AAm-IA)/Alj-L, P(AAm-IA)/Alj-DL, P(AAm-IA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-IA)/Alj-DL+ABTS ile metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi.....	126
Şekil 4.33. P(AAm-AA)/K-kar-L, P(AAm-AA)/K-kar-DL, P(AAm-AA)/K-kar-L+ABTS, P(AAm-AA)/K-kar-DL+ABTS ile metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi.....	127
Şekil 4.34. P(AAm-IA)/K-kar-L, P(AAm-IA)/K-kar-DL, P(AAm-IA)/K-kar-L+ABTS, P(AAm-IA)/K-kar-DL+ABTS ile metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi.....	128

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Lakkaz üreten <i>Trametes versicolor</i> mantarı.....	30
Resim 2.2. <i>Trametes versicolor</i> ' dan elde edilen lakkazın üç boyutlu yapısı.....	32

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
ΔA	Absorbans değişimi
A_0	t = 0 anında absorbans değeri
A_t	t anında absorbans değeri
k_i	İnaktivasyon sabiti
K_m	Michaelis-Menten sabiti
S	Substrat derişimi
$t_{1/2}$	Yarılanma süresi
T	Zaman
V	Aktiflik (hız)
V_{mak}	Maksimum hız
W_0	Kuru jel kütlesi
W_w	Şişirilmiş jel kütlesi
Kısaltmalar	Açıklama
DSL	Denatüre serbest lakkaz
DSL+ABTS	Denatüre serbest lakkaz ve ABTS
P(AAm-AA)/Alj	Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat
P(AAm-IA)/Alj	Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat
P(AAm-AA)/K-kar	Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan
P(AAm-IA)/K-kar	Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan
P(AAm-AA)/Alj-L	Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojeline immobilize edilmiş lakkaz

Kısaltmalar	Açıklama
P(AAm-AA)/Alj-L+ABTS	Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojeline immobilize edilmiş lakkaz ve ABTS
P(AAm-AA)/Alj-DL+ABTS	Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojeline immobilize edilmiş denatüre lakkaz ve ABTS
P(AAm-IA)/Alj-L	Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojeline immobilize edilmiş lakkaz
P(AAm-IA)/Alj-DL	Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojeline immobilize edilmiş denatüre lakkaz
P(AAm-IA)/Alj-L+ABTS	Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojeline immobilize edilmiş lakkaz ve ABTS
P(AAm-IA)/Alj-DL+ABTS	Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojeline immobilize edilmiş denatüre lakkaz ve ABTS
P(AAm-AA)/K-kar-L	Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojeline immobilize edilmiş lakkaz
P(AAm-AA)/K-kar-DL	Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojeline immobilize edilmiş denatüre lakkaz
P(AAm-AA)/K-kar-L+ABTS	Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojeline immobilize edilmiş lakkaz ve ABTS
P(AAm-AA)/K-kar-DL+ABTS	Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojeline immobilize edilmiş denatüre lakkaz ve ABTS
P(AAm-IA)/K-kar-L	Poli(akrilamit- itakonik asit)/K-karragenan hidrojeline immobilize edilmiş lakkaz

Kısaltmalar	Açıklama
P(AAm-IA)/K-kar-DL	Poli(akrilamit- itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilmiş denatüre lakkaz
P(AAm-IA)/K-kar-L+ABTS	Poli(akrilamit- itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilmiş lakkaz ve ABTS
P(AAm-IA)/K-kar-DL+ABTS	Poli(akrilamit- itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilmiş denatüre lakkaz ve ABTS
SL	Serbest lakkaz
SL+ABTS	Serbest lakkaz ve ABTS

1. GİRİŞ

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

Enzimlerin kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarda kullanılmaya başlanması bilim çevrelerini bu katalizörlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir. Bilindiği gibi enzimler suda çözünen spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin geri kazanımı ekonomik değildir. Buda enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti arttıran önemli bir etmendir. Serbest enzimin reaksiyon ortamından istenildiği an uzaklaştırılmaması nedeniyle reaksiyon kontrolünde güçtür. Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümlenebilmek, enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için özellikle son otuz yılda enzim immobilizasyonu araştırmaları yoğunluk kazanmıştır.

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

olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar. Akrilamit, akrilik asit ve itakonik asit monomerleri destek materyali olarak kullanılan hidrojel üretiminde sık kullanılan monomerlerdir. Kolayca polimerleşebilmeleri, kopolimer oluşturabilmeleri, biyouyumlulukları bu monomerlerin tercih edilmesine yol açmaktadır. Akrilik asit ve itakonik asit yapısındaki karboksil grupları bu monomerlerin hidrofilik ve iyonik hidrojel üretiminde kullanılmasını sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında, lakkaz enzimi P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/ K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde hapsetme yöntemiyle immobilize edildi. Serbest ve immobilize lakkazın aktifliğine, pH, sıcaklık, depolama süresi, substrat derişimi gibi parametrelerin etkisi araştırıldı. Kinetik parametreler, termal inaktivasyon, immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği ve hidrojellerin şişme kapasiteleri incelendi. Ayrıca lakkaz enzimi ile metil oranj boyasının renginin giderilmesi araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hidrojeller

Hidrojeller, suda şişebilen, üç boyutlu, çapraz-bağlı polimerik ağ yapılarıdır. Bir ya da daha çok sayıda monomerin polimerizasyon tepkimesi ile hazırlanırlar. Ana zincirler arasında hidrojen bağları veya Van der Waals etkileşimleri gibi bağlanmalar mevcuttur. Bu nedenle çözünmezdirler. Hidrojeller, yapılarında çok fazla su bulundurmaları, yumuşak ve esnek yapıları gibi taşıdıkları birçok fiziksel özellik açısından canlı dokularla karşılaştırıldıklarında büyük bir benzerlik göstermektedirler.

Hidrojellerin ilk uygulaması, kontakt lensler olarak ortaya çıkmıştır. Mekanik kararlılıklarının iyi oluşu, yüksek oksijen geçirgenliği ve uygun kırınım indisine sahip oluşları, kontakt lenslerde kullanılmalarının temel nedenidir. Hidrojellerin diğer uygulamaları; yapay tendon materyalleri, yara iyileşmesinde biyoyapışkan madde, yapay böbrek zarları, yapay deri, estetik cerrahide malzeme olarak kullanımları şeklinde sıralanabilir.

Son yıllardaki en önemli uygulamalardan biriyse eczacılık alanında, kontrollü ilaç salınan sistemlerdeki kullanımlardır. Örnek olarak, insülin salımı verilebilir. İnsülin salımının kontrolü, glikoz seviyesinde artma olduğunda daha fazla insülin salabilen akıllı hidrojellerin yardımıyla başarılabilmektedir [1].

2.1.1. Hidrojellerin sınıflandırılması

Polimerik hidrojeller; hazırlanma yöntemlerine, iyonik yüklerine, fiziksel yapılarına ve çapraz bağlanma durumlarına bağlı olarak sınıflandırılabilirler [2].

- Hazırlanma yöntemlerine göre
 - Homopolimer hidrojel
 - Kopolimer hidrojel
 - Çoklu polimer hidrojel
 - IPN (interpenetrating networks) hidrojel
- Fiziksel yapılarına göre
 - Amorf hidrojel
 - Yarı-kristalin hidrojel
 - Hidrojen bağlı hidrojel
- İçerdikleri yan gruplara göre
 - Nötral (iyonik olmayan) hidrojel
 - İyonik hidrojel (anyonik, katyonik, poliamfolitik)
- Çapraz bağlanma durumlarına göre
 - Fiziksel hidrojel
 - Kimyasal hidrojel
- Kaynaklarına göre
 - Doğal hidrojel
 - Sentetik hidrojel
- Su içeriklerine göre
 - Düşük şişme dereceli (20-50 %)
 - Orta şişme dereceli (50-90 %)
 - Yüksek şişme dereceli (90-99,5 %)
 - Süper absorbant ($\geq 99,5$ %)

- Kimyasal kararlılıklarına göre
Biobozunur
Biobozunmayan

Homopolimer hidrojel

Tek bir hidrofilik monomerin çapraz bağlanmasıyla oluşmuş yapılardır.

Kopolimer hidrojel

İki monomerin çapraz bağlanmasıyla oluşur. Ancak monomerden en az birinin hidrofilik yapıda olması gerekir.

Çoklu polimer hidrojel

İki ya da daha fazla sayıda komonomerin tepkimesi ile oluşur.

IPN veya iç içe geçmiş polimerik ağ yapılı hidrojel

Çapraz bağlı iki ayrı sentetik veya doğal polimerin fiziksel olarak birleşerek iç içe geçmesiyle oluşan ağ yapılı polimerler (IPN, Interpenetrating Polymer Network) tipi hidrojel olarak tanımlanırlar. Bu yapılardan en az biri diğerinin varlığında sentezlenir ve/veya çapraz bağlanır [3].

Yarı-IPN tipi hidrojelde ise polimerlerden biri çapraz bağ içerirken diğeri doğrusal yapıdadır [3,4]. Bu tür hidrojelde misafir polimer zincirleri, ev sahibi ağ yapının içinde kovalent bağlı veya kovalent bağısız olarak yer alabilirler.

Amorf hidrojel

Makromolekül zincirleri gelişigüzel yerleşmiştir.

Yarı-kristalin hidrojel

Yapı içerisinde makromolekül zincirlerinin düzenli yerleştiği yoğun kısımlar (kristalit) mevcuttur.

Hidrojen bağlı yapılar

3 boyutlu yapı hidrojen bağlarıyla oluşmuştur

2.2. Enzimler

2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri

Enzimler, protein yapısında olan, doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenebilen biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin temel özellikleri aşağıda verilmiştir [5].

- Çok yüksek katalitik etkinlik

Enzimlerin katalitik etkinliği, kimyasal katalizörlerinkinden binlerce kat daha çoktur. Birçok enzimde katalitik etkinlik sabit olmayıp değişkendir (alosterik etki) ; böylece, metabolizmanın ortam koşullarına uyumluluğu sağlanır.

- Etki alanları dardır.

Enzimlerin optimum etkinlikleri ortam koşullarının, (pH, iyon şiddeti, sıcaklık, basınç v.b.) dar sınırları içindedir; bu sınırların dışına çıkıldığında enzim etkinliği hızla düşer.

- Yan ürün meydana gelmez.

Enzim tepkimelerinde yan ürün meydana gelmez, yani substratın tamamı ürüne dönüştürölür; oysa tüm kimyasal tepkimelerde yan ürün meydana gelir.

- Özgüllük (spesifiklik) ve enzim türünün çokluğu

Özgüllük, her substrat veya substrat grubunun özel bir enzimi olması demektir. Hücre içinde çok sayıda biyokimyasal tepkime meydana geldiği için buna çok sayıda enzim karşılık gelir. Oysa çok sayıda kimyasal tepkimenin oldukça az kimyasal katalizörü vardır.

- Enzim ve substrat moleküllerinin büyüklükleri

Enzimler substratlara göre binlerce kat daha büyük moleküllerdir.

- Aktif merkez ve bağlanma yeri

Enzim çok büyük bir molekül olmakla birlikte aktif merkezi yani asıl tepkimeyi yürüten kısmı oldukça küçük bir bölgedir; bu bölge, substratın bağlanma yerine bağlanarak tepkime meydana gelir.

2.2.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliğinin (IUB) düzenlemesine göre enzimler katalizlediği kimyasal tepkime tipine ve tepkime metabolizmasına dayanılarak adlandırma ve sınıflandırma yapılmaktadır.

IUB sisteminin özellikleri şunlardır:

1 - Tepkimeler ve onları katalizleyen enzimler 6 sınıfa bölünürler; bunların her birinin 4-13 alt sınıfı vardır.

2 - Enzim adının iki kısmı vardır. İlki substrat veya substratların adıdır; "-az" ile sonlanan ikincisi katalize olunan tepkime tipini gösterir.

3 - Söz konusu tepkimenin doğasını aydınlatmak için eğer ek bilgi gerekli ise, parantez içinde verilebilir.

4 - Her enzimin bir kod numarası (EC) vardır; bu numarada tepkime tipini 1. sayı, vericinin etkilediği grubu 2. sayı, alıcı olarak yararlanılan grubu 3. sayı ve adlandırılan enzimi 4. sayı belirlemektedir [6].

2.2.3. Enzim aktifliğini etkileyen faktörler

Enzimler biyolojik sistemlerde çok az miktarlarda bulunurlar. Bu nedenle proteinin miktarından ziyade biyolojik sistemde gösterdiği aktiflik ölçülür [7]. Bir ünite enzim: Standart koşullarda 1 mikromol (μmol) substratı ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir.

Enzimler tarafından katalizlenen tepkimelerin hızını etkileyen faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- Ortamın pH' sı
- Sıcaklık
- Enzim derişimi
- Substrat derişimi
- Zaman
- Tepkimenin ürünü
- Çeşitli iyonların derişimi ve özellikleri
- Işık ve diğer fiziksel faktörlerin etkisi

Ortam pH' sı

Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu derişimine bağlı olarak aktiflikleri değişmektedir. Bazı enzimler düşük pH seviyelerinde (asidik ortamda) daha aktif olmakla beraber, bazıları ise yüksek pH' lı ortamlarda (bazik ortamda) aktiftirler. Fakat çoğunlukla enzim aktifliği nötral ortamlarda en fazla olmaktadır. Enzimin maksimum aktiflik gösterdiği pH' ya o enzimin optimum pH 'sı adı verilir.

Enzimatik çalışmalarda pH' yı optimumda sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu derişimini elverişli durumda tutmak için tamponlar kullanılır. Optimum pH, kullanılan tamponun cinsine, özel substratın yapısına ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlıdır.

Sıcaklık

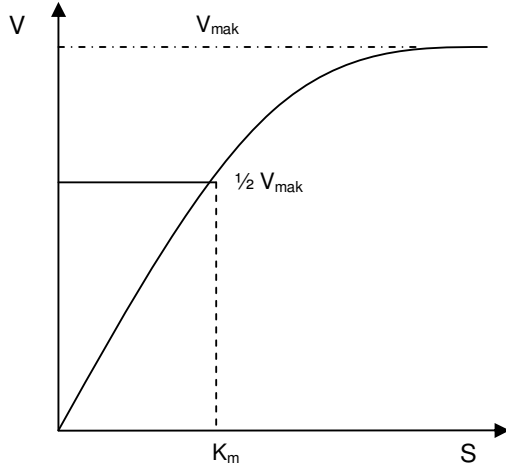
Sıcaklık enzimatik tepkimeleri de diğer tepkimelerde olduğu gibi hızlandırır. Her 10  C sıcaklık artmasına karşılık enzimatik tepkimenin hızı 2 kat kadar artmaktadır. Ancak enzimler protein yapılı olduklarından belli bir sıcaklığın üzerinde dayanıklılığını yitirerek denatüre olurlar. Enzimin maksimum aktiflik gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilir.

Enzim derişimi

Enzimatik tepkimenin hızı, enzimin substratına doygun olduğu koşullarda enzim derişimine bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekl ne kadar çoksa tepkime o kadar hızlı yrr. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterince substrat bulunmadığı için tepkime o derece yüksek düzeyde meydana gelmez. Substratın bol olduğu koşullarda enzim derişimi tepkime hızı ile doğru orantılıdır.

Substrat derişimi

Substrat derişimi tepkime hızını belli bir süre lineer olarak artırmaktadır. Enzim substratına karşı doygunluğa ulaştığında tepkime hızı değişmeden devam eder (şekil 2.1). Bu durumda enzim maksimum hız ile çalışıyor demektir. Maksimum hız V_{mak} ile gösterilir. Enzim maksimum hız ile çalışırken enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat derişimine *Michaelis-Menten sabiti* (K_m) denilmektedir. Enzimin substratına ilgisi ne kadar fazla ise K_m değeri o kadar kktr.



Şekil 2.1. Enzimatik tepkimenin hızına substrat derişiminin etkisi

Zamanın etkisi

Bir enzimatik tepkimenin hızı belirli bir zamanda üretilen ürünün miktarı ile belirlenmektedir. Bir enzim tarafından katalize edilen tepkime sürerken tepkimenin hızı giderek düşer. Bunun nedeni tepkime devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir tepkime oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, tepkimeyi önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık % 10' unun sarf edildiği tepkimenin başlangıç aşamasında gerçekleştirilir.

İnhibitör

İnhibitörler, enzimatik tepkimelerin hızını azaltan maddelerdir. İnhibitörler, substratın enzimin aktif merkezine bağlanmasını ve böylece enzim-substrat kompleksinin oluşmasını önlerler [7].

2.2.4. Enzimlerin etkisi

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

Aktivasyon enerjisi

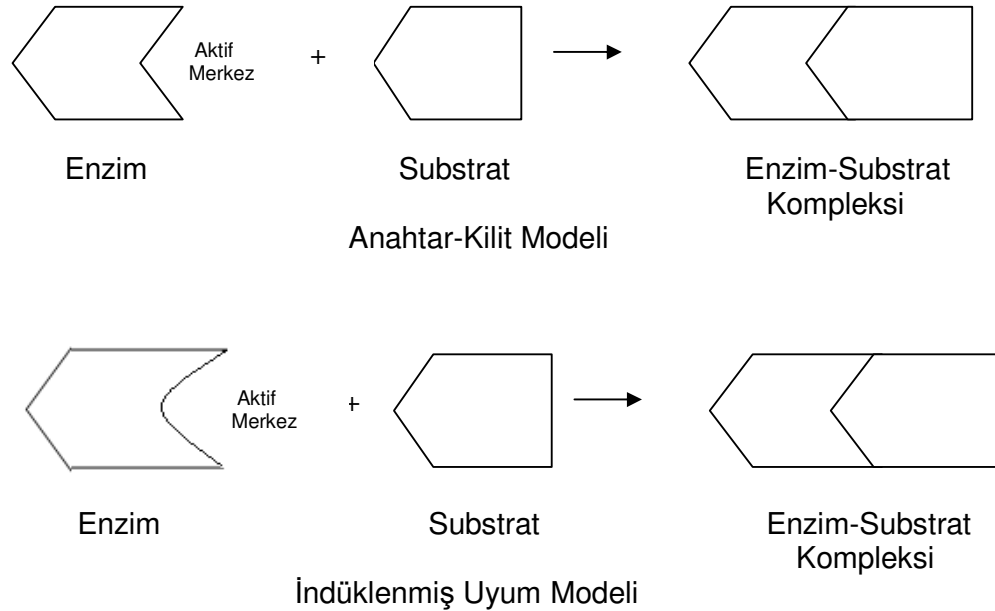
Moleküllerin birbirleri ile tepkimeye girebilmeleri için dışarıdan enerji almaları gereklidir. Bütün kimyasal tepkimelerde aktivasyon enerjisi olarak bir enerji engelini aşılması gerekmektedir. Tepkimenin hızını belirleyen en önemli faktör aktivasyon enerjisi (E_a) denilen bu enerji ihtiyacının büyüklüğüdür. Enerji engeli ne kadar yüksek olursa, birim zaman içerisinde bu engeli aşan moleküllerin sayısı da o oranda az olacaktır. Tepkime hızını artırabilmek için sisteme kimyasal veya biyolojik bir katalizör ilave edilebilir. Bu durumda katalizör substrat ile (ES) kompleksi yaparak aktivasyon enerjisini aşağılara çekebilir.

ES kompleksinin oluşması ile daha çok substrat aktivasyon enerji engelini aşabilmekte, tepkime hızı artmakta ve birim zamanda oluşan ürün miktarı artmaktadır. Tepkime sonunda serbest kalan enzim ortamdaki diğeri substrat moleküllerine bağlanarak onların da aktivasyon enerjisini düşürecek ve onların da ürüne dönüşümünü hızlandıracaktır. Hücresel koşullarda enzimler daha düşük aktivasyon enerjisi gerektiren alternatif yollar oluşturarak tepkimelerin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Enzimle katalizlenen tepkimelerin çoğu katalizlenmeyen tepkimelere göre 103 ile 108 kere daha hızlı olarak gerçekleşir. Tipik olarak bir enzim molekülü saniyede 100–1000 substrat molekölünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. Enzim başına düşen ürüne çevrilmiş substrat molekölü sayısına “Turnover sayısı” denir [8].

Aktif bölgedeki değişiklikler

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

Aktif merkez, bir enzimin substrata yapıştığı bölge, bir de kataliz olayının gerçekleştirildiği yer (katalitik bölge) olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Bir enzimin yapısındaki amino asit artıklarının çoğu substratla temas halinde değildir. Birçok enzimde katalitik bölgede serin, sistin, histidin, tirozin ve lizin bulunur [9]. Aktif merkez ile substrat, bir anahtar ile kilit gibi birbirine uygunluk gösterir. Bu şekil Emil-Fischer' in tarif ettiği "anahtar ve kilit" durumuna uyar (Şekil 2.1). Ancak substrat ile buluştuktan sonra enzim özel yapısını almakta ve substrat aktif bölgeye bağlanmaktadır. Bu dinamik tanıma olayına "indüklenmiş uyum" veya "sonradan olma uyum" denir [10].



Şekil 2.2. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli

2.2.5. Enzimlerin kullanım alanları

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

Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %30-35'i deterjan sanayinde, %20-25'i nişasta ile ilgili alanlarda, %20'si süt ve süt ürünleri sanayinde kullanılmaktadır. %1-5 arasında değişen oranlarda bira, meyve ve şarap, unlu mamüller, tekstil, kağıt, deri ve yem sanayinde kullanılmaktadırlar [11].

2.3. Enzim İmmobilizasyonu ve İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimlerin, tepkimeleri spesifik ve yüksek bir hızla katalizlemelerinden faydalanmak amacıyla onları canlı organizma dışında kullanabilmek düşüncesi bilim adamlarını harekete geçirmiştir. İlk olarak 1926 yılında Sumner tarafından üreaz enzimi kristal halde elde edilmiştir. Daha sonraları çok sayıda enzim çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve oldukça saf preparatlar şeklinde ve çoğu kristalize halde piyasaya sürülmüştür.

Enzim saflaştırılması özel teknikler gerektirdiğinden maliyeti de oldukça yüksektir. Bunun yanı sıra, serbest enzimin aktifliğini kaybetmeden istenildiği anda tepkime ortamından uzaklaştırılması çok güçtür. Bu durum pahalı olan enzimlerin tekrar tekrar kullanılmasına engel olur. Tepkimenin istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması durumunda ise zaten enzim tarafından kirlenmiş olan tepkime ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürünlerin bu kirlilikten arıtılması için kompleks ayırma işlemlerine gerek vardır ki bu da maliyeti bir kat daha artırır. Yukarı da sayılan teknik ve ekonomik problemlerden dolayı serbest enzim yerine tutuklanmış enzim kullanılmasının

daha uygun olabileceği düşünölmüş ve bu amaçla tutuklanmış enzim sistemlerinin hazırlanması ve teknolojiye kullanımı son senelerde büyük önem kazanmıştır [12].

İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, " tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış, çözünmez hale getirilmiş " demektir. Enzimlerin ya da mikroorganizmaların fiziksel ve / veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara tutturulmasıdır [12,13].

Enzimler suda çözünmeyen bir matrikse bağlandıklarında, matriksin içinde tutuklandıklarında veya katalitik etkileri kaybolmadan birbirlerine bağlandıklarında immobilize olurlar. İmmobilize enzimlerin özellikleri kullanılan metoda ve matriksin yapısına bağlı olarak değişebilir.

İmmobilizasyon işlemi ile:

1. İmmobilize enzimin optimum pH' sı değişebilir.
2. K_m değeri immobilizasyondan etkilenebilir.
3. Enzimin optimum sıcaklığında artışlar olabilir.
4. Matriks enzim için yeni bir ortam oluşturarak enzimin aktifliğini değişik yollardan etkiler. Enzimin aktif bölgesi değişikliğe uğrayabilir veya matriks substratın hareketini engelleyebilir [14].

Enzim moleküllerinin tutuklanma işlemi :

1. Enzimin suda çözünmeyen polimere kovalent olarak bağlanması
2. Suda çözünmeyen organik veya inorganik desteklerde adsorpsiyonu
3. Suda çözünmeyen jel matriksler veya yarı geçirgen mikrokapsüller içinde tutulması suretiyle yapılmaktadır. Her durumda enzimin yerleşmesi için suda çözünmeyen bir materyal gereklidir [14].

Son yıllarda immobilizasyon teknolojisinin önemi hızla artmakta olan araştırma alanlarının başlıcalarındandır. Uygun destek maddelerine ilaç, protein, enzim, mikroorganizma, bitki ya da hayvan hücreleri yüksek düzeylerde tutuklanıp yapay organ sistemleri biyosensör ve reaktör uygulamaları ile kontrollü ilaç salınım sistemlerinde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır.

Tarihte ilk enzim immobilizasyonu Nelson ve Grifftin (1916) tarafından adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Modern anlamda ise ilk olarak Grubhofer ve Schleith (1954) tarafından bazı immobilize enzim türevleri hazırlanarak kinetik parametreleri incelenmiştir. Daha sonra bu alandaki çalışmalar dünyanın her tarafında popülerite kazanmış olup enzimler değişik amaçlar ile immobilize edilmiştir [10].

Başta Amerika Birleşik Devletleri ve Japonya olmak üzere birçok ülkede immobilize enzimler yardımıyla üretim yapan fabrikalar kurulmuştur. Ülkemizde ise bu konuda endüstriyel boyutta herhangi bir uygulamaya henüz rastlanmamıştır [10,14].

Enzimlerin adlandırılmasında olduğu gibi immobilize enzimler için kullanılan terimlerde de bir kargaşa meydana gelmiştir. 1971 yılında yapılan 3.Biyoteknoloji Biyomühendislik Sempozyumu ve 1.Enzim Mühendisliği Konferansında "immobilize enzim" terimi tavsiye edilmiş böylece modifiye enzimlerin isimlendirilmesine açıklık getirilmiştir. Immobilize enzim çerçeve bir isim olup tüm değerleri kapsarken "tutuklanmış", "çözünmez hale getirilmiş", "bağlanmış" gibi terimler yalnız alt bir immobilizasyon yöntemini ifade etmektedirler [14].

Enzim immobilizasyonunda dikkat edilmesi gereken hususlar söz konusudur. Enzim immobilize edilirken, aktif merkezin bu işlemlerden kesinlikle etkilenmemesi gerekir. Aktif merkezde iki bölge vardır. Bunlardan biri katalitik merkez diğeri ise substrat spesifikliğı sağlayan merkezdir. Aktif merkezdeki

amino asitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değişirse katalitik aktiflik düşer ve substrat spesifikliğı değişir. İmmobilizasyonun sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir. Enzim ile destek arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise, bu bağlanmanın aktif merkez üzerinde gerçekleşmeyeceğı destekler seçilmeli veya immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Bu koruma görevi bazen kompetitif inhibitör tarafından sağlanır. İmmobilizasyon işlemi ılıman koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yüksek basınç, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözücüler veya yüksek tuz derişimi ile muamele denatürasyona dolayısıyla aktiflik kaybına neden olur [14].

İmmobilizasyon yöntemi seçiminde :

- Güvenirlik
 - Enzim aktifliğinin korunması
 - Maliyet
 - İmmobilize enzimin kararlılığı
- dikkat edilmesi gereken 4 ana husustur.

Enzimatik aktifliğin korunması çok önemli olup, özellikle kovalent bağlanma ile immobilizasyonda enzim ile destek arasında oluşan bağların aktifliği ve kararlılığı doğrudan etkilediğı göz önünde bulundurulmalıdır.

Destek seçiminde ise, immobilizasyon yöntemi, birim hacimdeki aktiflik ve istenen mekanik özellikler üzerinde durulur. İyonik veya kovalent bağlanma ile gerçekleştirilen immobilizasyonda desteğin fonksiyonel gruplar içermesi zorunludur. Yüklü desteklerin kullanılması enzimin optimum pH' sının 1-2 birim, K_m değerinin ise 10 katı kadar değişimine sebep olabilir. Substrat büyük ise tutuklanma yöntemleri ve poröz destekler uygun değildir. Gözeneksiz destekler için enzim aktifliği, destek partikülün dış yüzeyi ile orantılıdır [15].

İmmobilize enzimlerin en önemli avantajları şu şekilde sıralanabilir [14,16]

1. İmmobilize enzimler, tepkime ortamından kolayca uzaklaştırılabilir. (süzme, santrifüjleme gibi) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
 2. İmmobilize enzimler, çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı dayanıklıdır.
 3. İmmobilize enzimler birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
 4. İmmobilize enzimler doğal enzime göre daha karardır.
 5. İmmobilize enzimlerde ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
 6. İmmobilize enzimler, birbirini izleyen çok adımlı tepkimeler için uygundur.
 7. İmmobilize enzimler bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktiflik gösterebilirler.
 8. İmmobilize enzimlerde kendi kendini parçalama olasılığı azdır.
 9. Enzimin immobilize edilmesinin bazı dezavantajları da vardır. Bunların başlıcaları aşağıda özetlenmiştir [17].
- İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir veya kaybolabilir.
 - Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
 - Enzim destek materyalinin maliyeti yüksektir.

Enzim immobilizasyonunda destek materyalinin seçimi çok önemlidir. Destek materyalinin seçiminde partikül büyüklüğü, toplam yüzey, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve desteğin kimyasal bileşimi kriterleri esas alınır. Bağlanmış enzim miktarı ve enzimin immobilizasyon sonrasındaki aktifliği destek materyalinin yapısına bağlıdır. Genel olarak desteğin hidrofik karakteri ve yüzeyi arttıkça birim destek başına bağlı enzimin miktarı da artar.

Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan destek materyalleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Yaygın olarak kullanılan destekler

Anorganik	Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamidler
Bentonit	Dekstran	Naylonlar
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerleri
Titandioksit	Karragenan	Oksiranlar
Zirkonyumdioksit	Kollojen	Metakrilat polimerleri
Nikeloksit	Kitin ve kitosan	İyon değiştirici reçineler
Ponza taşı	Jelatin	Maleik anhidrit polimerleri
Aktif karbon	Albümin	
Metaller	İpek	
Metal oksitler	Aljinat	

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Destek membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Destek materyalde olması gereken özellikler aşağıda verilmiştir [16,18].

- Hidrofil karakter
- Suda çözünmeme
- Gözenekli (poröz) yapı
- Mekanik kararlılık ve uygun partikül formu
- Kimyasal ve termal kararlılık
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik
- Zehirsizlik
- Rejenere olabilme

İmmobilizasyon sırasında enzim molekülleri konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. İmmobilize enzimin zincir hareketleri çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar, immobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi, destekle enzimin

karşılıklı etkileşmesi, aktiveleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesi olarak belirtilebilir. Enzimler içinde buldukları çevre tarafından etkilenirler. Enzimin katı destek üzerinde immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikro çevreyi etkileyebilir, bu da enzimin görünen davranışları üzerinde aşağıda belirtildiği gibi bazı değişiklikler oluşturur [15,19].

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

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

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

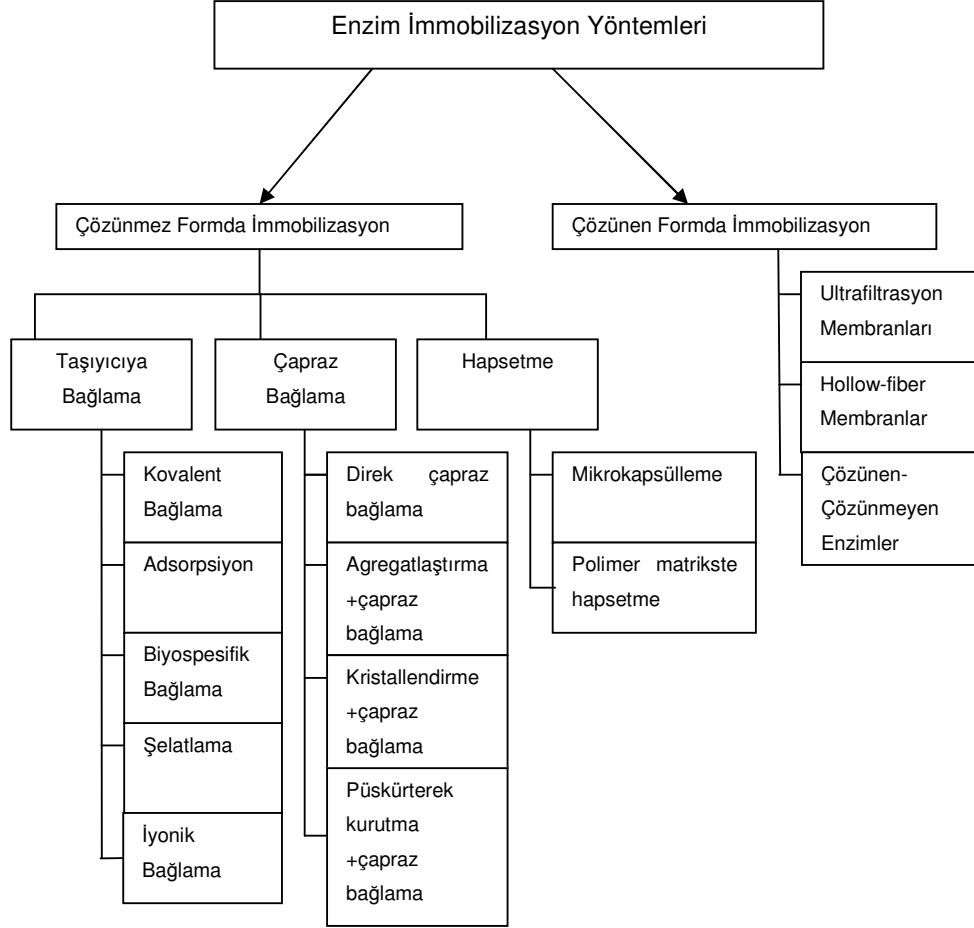
Yapısal değişiklikler: Enzim immobilizasyonunda, enzim yapısının belli bir pozisyonda uzun süre korunması ile enzim ve destek materyali arasında çok sayıda bağlanma oluşabilir. Enzimin katalitik aktifliği yapısal değişmelere bağlı olduğundan K_m ve/veya V_{mak} değerlerinde de farklılıklar, enzim aktifliğinde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

Sterik sınırlamalar: Eğer immobilize enzimin aktif uçları substrat molekülünün yaklaşmasına elverişli pozisyonda değil ise sterik problemler ortaya çıkar. Örneğin enzimin aktif grupları destek maddesine dönük ise substratın aktif

merkeze yaklaşması engellenir. Enzim polimerik kafeste hapsedildiğinde, substrat moleküllerinin enzime yaklaşıp direk temasa geçmesi matriks tarafından engellenebilir.

İnaktivasyon: Zor tepkime şartlarında (örneğin yüksek pH, ortamda serbest radikallerin, oksitleyici reaktiflerin varlığı gibi) gerçekleşen immobilizasyon işlemleri enzimin bir kısmının veya tamamının aktifliğini yitirmesine sebep olabilir. Böylece immobilize edilmiş enzimin spesifik aktifliği, serbest enzimin aktifliğinden oldukça düşük olabilir. Enzim herhangi bir konformasyonel değişim olmaksızın aktifliğini kaybedebilir.

İmmobilize enzimleri hazırlanmasında çeşitli yöntemler kullanılır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri

2.3.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemi, enzim aktif konformasyonu ve gerekli katalitik esnekliğini sürdürmesine/korumasına izin verecek şekilde seçilmelidir. Enzimin yapısal karakteristikleri hakkında bilgi, yüksek performansta biyokatalizör elde etmek için yardımcıdır. Temelde, enzimleri yüzeye immobilize etmek için dört yol vardır:

a) Enzim aktivasyonu ve taşıyıcıya bağlama

Bu yaklaşım genelde aktiflikte önemli bir kayba neden olur; çünkü proteinlerin, yüksek reaktivitedeki kimyasal bileşiklerle modifikasyonu katalitik veya yapısal açıdan esansiyel dizileri değiştirebilir. Ayrıca molekül içi ya da moleküller arası çapraz bağlanmalar da göz önünde tutulmalıdır.

b) Destek materyalinin modifikasyonu ve aktivasyonu

Doğal enzim, bir sonraki adımda bağlanır. Enzimlerin taşıyıcı yüzeye kovalent bağlanmasında en önde gelen tekniktir.

c) Enzim üzerindeki fonksiyonel grup ve taşıyıcının bi- veya multifonksiyonel ajanlarla bağlanması

Aynı zamanda molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanmalara neden olur.

d) Biyospesifik grup içeren bir protein üretmek için enzimin rekombinant DNA teknikleriyle modifikasyonu

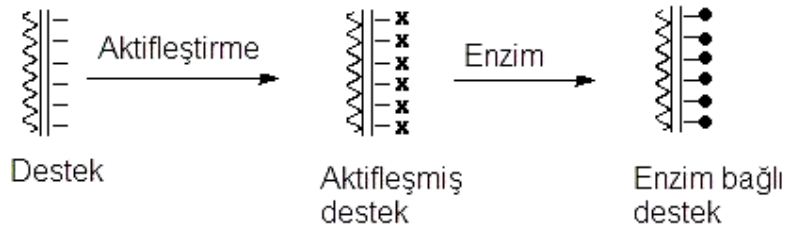
Böylece biyoafinite bağlama kullanılarak özel taşıyıcılara adsorplama gerçekleştirilebilir.

Taşıyıcı; elde edilen immobilize biyokatalizörün katalitik olmayan özelliklerinin kolay kontrol edilebilmesini sağlar. Seçilen taşıyıcı sadece enzim bağlanabilen fonksiyonel grubu için yapı iskelesi görevini üstlenmekle kalmaz; bunun yanında fiziksel ve kimyasal yapısı (gözenek boyutu, hidrofilik/hidrofobik dengesi, yüzey kimyası vb.) enzimin katalitik özelliklerini önemli ölçüde etkiler. Bu bağlamda taşıyıcı enzim modifikasyonunda kullanılıyor gibi düşünülebilir. Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir [20].

Kovalent bağlama ile immobilizasyon

Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Bu teknik enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiliye geçmesini engeller [21]. Kovalent bağlanma, genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Enzim immobilizasyonunda, enzimin özellikleri, aktif ucunun yapısı, pH, sıcaklık ve organik çözücüler gibi faktörlerden dolayı sınırlı sayıda yöntem kullanılabilir [22,23].

Kovalent bağlı destek-enzim kompleksinin aktifliği doğal enziminkinden farklı olabilir. Bu farkın büyüklüğü taşıyıcı materyalin biçim ve büyüklüğüne, etkileşme yönteminin doğasına, taşıyıcı materyalin bileşimine, enzim yapısına ve tepkime sırasındaki spesifik şartlara bağlıdır [24]. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir (Şekil 2.4). Destek maddesi; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar taşımalıdır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak siyanojen bromür, epiklorhidrin, glutaraldehit, karbodiimit, siyanürik klorür gibi çeşitli aktifleyici maddeler kullanılabilir.



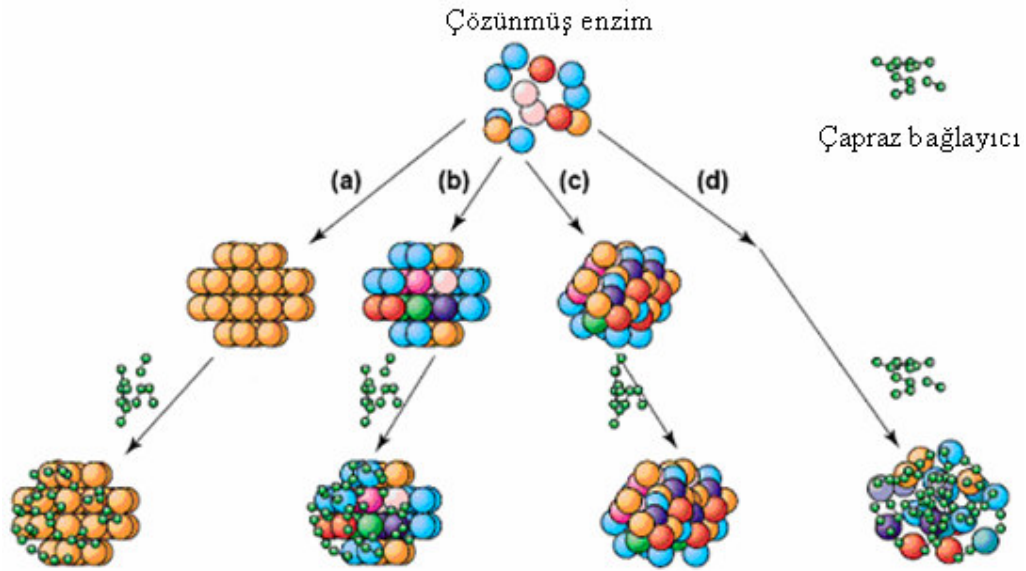
Şekil 2.4. Kovalent bağlama ile immobilizasyon

Adsorpsiyon ile immobilizasyon

Adsorpsiyon yöntemi en eski ve basit bir immobilizasyon yöntemidir [25,26]. Adsorpsiyon yöntemi ile enzimin immobilizasyonu katı matriks üzerinde enzimin fiziksel adsorpsiyonuna veya iyonik bağlanmasına dayanır. Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyondan sorumlu kuvvetler hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir [27]. Enzimin suda çözünmeyen materyallerde adsorpsiyonu, pH, çözücü karakteri, iyonik kuvvet, protein ve adsorbanın derişimi, sıcaklık gibi deney koşullarına bağlıdır. Enzim ile destek maddesi arasındaki zayıf bağlardan dolayı, adsorplanan enzim kullanım esnasında taşıyıcıdan uzaklaşabilir ve bu da yöntemin bir dezavantajıdır. Adsorpsiyonla immobilizasyon yöntemi basit olduğu, çeşitli yüklü taşıyıcılar seçilebildiği ve taşıyıcılar farklı fiziksel şekillerde kullanılabilirdiği için avantajlıdır. Ayrıca bu yöntemde enzim, aktifliğini büyük ölçüde veya tamamıyla korur. Bu yöntem tersinirdir ve bu da destek maddesinin ve enzimin başka amaçlarda tekrar kullanımını sağlar [28]. Çeşitli aktif yüzeyli malzemeler enzim-adsorpsiyon komplekslerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. En çok kullanılanlardan bazıları anyon ve katyon değiştiricili reçineler, sentetik polimerler, aktif karbon, silika jel, diatomili topraklar ve killer, alumina, gözenekli camlar ve seramiklerdir [29].

2.3.2. Çapraz bağlama yöntemleri

Küçük molekülü bi- veya multi- fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlama derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH' ya ve immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. Moleküller arası bağlanmalar yanında molekül içi bağlanmalar da söz konusudur. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu genel olarak çözünmüş (a), kristal (b), püskürtülerek kurutulmuş (c) ya da fiziksel olarak agregatlaştırılmış (d) enzimlerin direkt olarak çapraz bağlanmasıyla gerçekleştirilir (Şekil 2.5) [20].



Şekil 2.5. Çapraz bağlama yöntemleri

2.3.3. Hapsetme yöntemleri

Prensip olarak immobilizasyon enzim molekülünü belli bir ortamda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarı çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

Polimer matrikste hapsetme

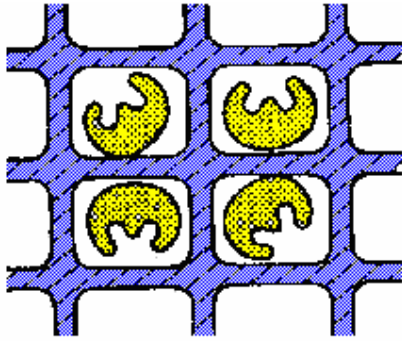
Bu yöntem, suda çözünmeyen çapraz bağlı polimerlerin boşlukları içinde enzimin tutulması esasına dayanır. Bu yöntemde enzim içeren monomer veya polimer çözeltilerine UV veya gama ışınları uygulayarak yüksek oranda çapraz bağlı bir polimer ağı oluşturulur. Enzim molekülleri fiziksel olarak

polimer kafes içerisinde tutulur ve jel matriksin dışına çıkamaz, fakat substrat ve ürün bu ağı içerisine sürekli olarak girip çıkabilir [30].

Bu yöntemin sahip olduğu avantajlar aşağıda verilmiştir.

1. Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzim yapısını ve aktifliğini kimyasal proseslerden daha az etkiler.
2. Ortamdaki çapraz bağlayıcı ve monomer derişimini değiştirmek suretiyle farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafes üretilebilir.
3. Polimerleşme genelde hem kolay hem de hızlı bir şekilde gerçekleştirilir [31,32,33,34].

Bu yöntemin dezavantajları çapraz bağlı polimer ağından enzimin sızması, yalnızca küçük hacimli substratlar için sınırlı olması ve makromoleküler substratlar için çok düşük aktiflik göstermesidir. (Şekil 2.6.)



Şekil 2.6. Matrikste hapsetme

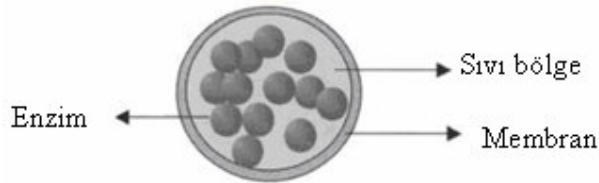
Mikrokapsülleme

Bu yöntemde enzim molekülleri 10-1000 µm çaplı küçük yarı geçirgen membranlara hapsedilir. Yarı geçirgen membran, büyük protein veya enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürün moleküllerinin serbestçe giriş-çıkışına izin verir. Enzimlerin

mikrokapsüllemesi için iki yöntem kullanılır. Bunlar faz ayrımı ve ara yüzey polimerizasyonudur.

Faz ayrımı yönteminde, enzim ve mikrokapsülü oluşturan çözelti damlalar şeklinde çöktürücüye ilave edilir. Ara yüzey polimerizasyonun da ise enzimin sudaki çözeltisi, suyla karışmayan organik çözelti içerisinde emülsiyeye edilir. Ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikro damlalarının etrafında membran oluşturur. Böylece enzim polimerik membran tarafından sarılarak mikrokapsüllemiş olur (Şekil 2.7).

Mikrokapsülleme yönteminde herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır [35]. Bu oranının büyük olması da mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat tepkimesinin olasılığını arttırır. Bu yöntemde mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein derişimine gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler gerektirmesi gibi dezavantajlar söz konusudur.



Şekil 2.7. Mikrokapsülleme

Suda çözünen enzim immobilizasyonu çözünmeyen formda enzim immobilizasyonuna göre bazı durumlarda daha kullanışlıdır. Suda çözünmeyen formda hazırlanan immobilize enzimlerin aktiflik ve spesifikliklerinde değişme olabilmektedir. Çünkü bu enzimler, modifikasyona uğrayabildikleri gibi mikroçevreleri de değişmektedir. Enzim çözeltisi bir membran ile ürün ve substrattan ayrılırsa doğal durumda kalması sağlanmış olur. Bu amaçla ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon membranlarından yararlanılır. Kofaktöre gereksinim duyan enzimlerin immobilizasyonu söz

konusu ise küçük molekülü olan kofaktörlerin yarı geçirgen membrandan çıkmamaları için polietilen glikol (PEG) gibi suda çözünen polimerlere kovalent bağlanması gerekir [20].

2.4. İmmobilizasyon Yöntemi ve Taşıyıcı Seçimi

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde dört ana kriter göz önüne alınmalıdır: güvenilirlik, maliyet, aktifliğin korunması ve kararlılık. İmmobilizasyon esnasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem seçilmelidir. Böyle bir seçimin sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır.

Çizelge 2.2. İmmobilizasyonda göz önünde bulundurulması gereken kriterler

Enzim	Biyokimyasal Özellikler Moleküler kütle, prostetik gruplar, protein yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, saflık
	Kinetik Parametreler Spesifik aktiflik, pH ve sıcaklık profilleri, aktiflik ve inhibisyon için kinetik sabitler, çözücülere karşı kararlılık, kontaminantlar
	Kimyasal Karakteristikler Kimyasal temel ve kompozisyon, Fonksiyonel gruplar, kimyasal kararlılık, por büyüklüğü, şişme özellikleri
Taşıyıcı	Mekanik Özellikler Partikül çapı, sedimentasyon sabiti, aşınma
	İmmobilizasyon Metodu, Kütle Transfer Etkisi, Kararlılık Bağlı protein, aktif enzim verimi, gerçek kinetik parametreler, difüzyon, operasyonel kararlılık, verimlilik
İmmobilize Enzimler	

Enzim immobilizasyonu için değişik yöntemler kullanılabilir. Bunların içinde aktifliğin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir. Ayrıca

Üretim için biyokatalizör açısından optimal koşulların saptanmasında yalnız immobilizasyon yöntemi değil aynı zamanda taşıyıcı ve reaktör tipi de önemli rol oynamaktadır [20].

2.5. Çalışmada Kullanılan Enzim, Substrat ve Destek Materyalinin Özellikleri

Bu çalışmada enzim olarak lakkaz, substrat olarak siringaldazin, destek materyali olarak yarı-ağ yapılı hidrojeller (yarı-IPN), renk gideriminde boya olarak metil oranj ve mediyatör olarak ABTS kullanılmıştır.

2.5.1. Lakkaz

Lakkaz (*Trametes versicolor*' dan elde edilen, E.C.1.10.3.2.) enzimi, her molekülü dört bakır iyonu taşıyan bir oksidoredktazdır. Lakkaz redoks enzimlerinin bir alt sınıfıdır. Karbohidraz ve proteazlar gibi hidrolitik enzimlerinin substrat özgünlüğünün aksine redoks enzimlerinin substrat özgünlüğü oldukça azdır [36].

Lakkazlar ilk olarak 1883' de Japon lake ağacı *Rhus vernicifera*' dan izole edilmiş olup moleküler kütleleri 45 ile 110 kDa arasında değişmektedir [37]. Lakkaz enzimleri bakteriler, böcekler, yüksek yapılı bitkiler ve mantarlar olmak üzere 4 canlı grubundan üretilmektedir [38,39]. Lakkaz kaynağı olan mantarlara, *Trametes versicolor*, *Rhus vernicifera*, *Trametes hirsuta*, *Panus tigrinus*, *Flavodon flavus*, *Agaricus bisporus* rnek olarak verilebilir. Bunlardan beyaz çürükçül mantarlar daha çok kullanılmaktadır. Resim 2.1' de beyaz çürükçül mantarlardan biri olan *Trametes versicolor* görülmektedir.



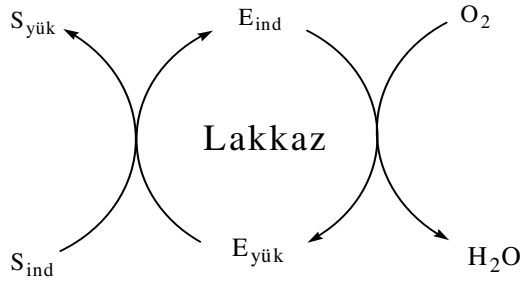
Resim 2.1. Lakkaz üreten *Trametes versicolor* mantarı

Bir lakkaz enzimi, kaynağından molekül ağırlığı, optimum pH, substrat özgüllüğü gibi özellikleri farklı olan, birkaç tipte elde edilebilir. Lakkaz enzimi, glikoprotein yapısındadır. Enzimin karbonhidrat miktarı, ağırlıkça % 15-45 ini oluşturur.

Enzim heksozamin, glukoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve arabinoz gibi karbonhidratları içerir [40]. Beyaz çürükçül mantarlardan elde edilen lakkazların çoğu 55-85 kDa molekül ağırlığındadır, yaklaşık 500 amino asitten oluşmaktadır. Lakkaz enziminin optimum pH aralığı 3,0 - 7,5, optimum sıcaklık aralığı ise 40-80 °C arasında değişiklik göstermektedir. Lakkaz enziminin optimum pH değeri kullanılan substrata göre de değişmektedir [39].

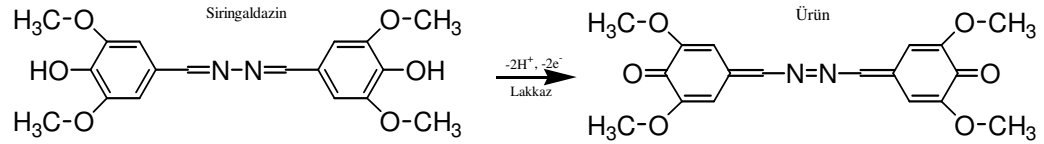
Lakkaz enzimi, aromatik substratı oksitlerken, aynı zamanda oksijen molekülünün suya indirgenmesini katalizler (Şekil 2.8) [41,42]. Lakkazın aktif bölgesinde hidratlaşmış elektron, oksijen ve değişik tiplerde bakır atomları

bulunur. Bu bakır atomları enzimin katalitik aktifliğinde önemli bir role sahiptir. Bakır atomları bağlanma şekillerine göre T1,T2,T3 olmak üzere 3 grupta incelenebilirler. T 1 tip bakır (mavi bakır) elektron transferini katalizler. T 2 tip bakır moleküler oksijeni aktive eder ve T 3 tip bakır ise oksijeni tutmadan sorumlu bir bakır dimeridir [43].



Şekil 2.8. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması

Lakkaz enziminin tepkime verdiği substratlar, geniş bir aralıkta değişmektedir. Bu substratlardan bazıları 4-benzendiol, siringaldazin, naftol, diklorofenol, metoksifenol, askorbat, pirogallol, kresol vb. türevleridir [44]. Genel olarak fenoller, amino fenoller ve aromatik diaminler ile benzer özellikler gösteren substratlar, lakkaz enzimi tarafından oksitlenebilir [45]. Şekil 2.9' da siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime ve sonuçta oluşan ürün gösterilmektedir [46] .

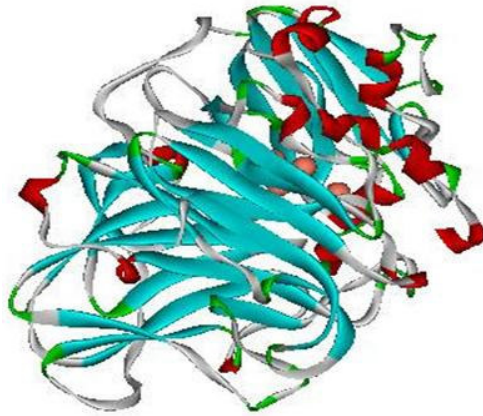


Şekil 2.9. Siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime

Düşük substrat özgüllüğü sayesinde bu enzimler birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılmaktadır [47]. Bunlar arasında;

- Odun hamurundan lignin giderimi
- Benzopiren, dioksin ve çeşitli ksenobiyotikler gibi çevresel kirleticilerin yıkımı
- Çevresel kirleticilerin biyolojik yıkımı
- Polisiklik aromatik hidrokarbonların yıkımı
- Fenolik kirleticilerin uzaklaştırılması
- Pestisit transformasyonu
- Boya ve tekstil atık suyunun renginin giderimi
- Biyolojik iyileştirme
- Besin endüstrisi
- Biyosensör gibi uygulamalar sayılabilir.

Günümüzde enzimlerin 3 boyutlu yapıları ayrıntılı bir şekilde X-ışınları kristalografisiyle görüntülenebilmektedir. Bu şekilde pek çok enzimin üç boyutlu yapısı aydınlatılabilmektedir. Resim 2.2' de *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz enziminin üç boyutlu yapısı görülmektedir [48].



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

2.5.2. Siringaldazin

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

2.5.3. Sodyum aljinat

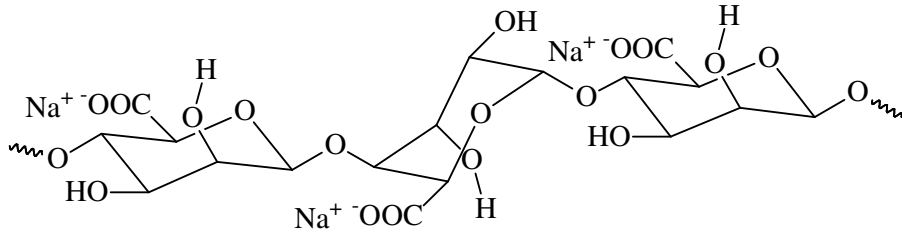
Aljinik asit, kahverengi alglerin hücre duvarlarında bulunan lineer asidik bir polisakkarittir. Aljinik asidin elde edildiği belli başlı algler aşağıda verilmiştir;

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

Bu yosunlardaki aljinik asit içeriği %20-40 arasında değişmekle birlikte, hücre zarının temel bileşenini oluşturur [49].

Aljinik asit 1881 yılında, Stanford tarafından kahverengi su yosunlarından ekstraksiyonla elde edilmiştir [49]. Aljinik asit; üronik asidin iki türünün birleşmesiyle meydana gelen heteroblok bir kopolimerdir. Aljinik asit genellikle sodyum, potasyum, amonyum tuzları ve propilen glikol esteri şeklinde bulunur. Aljinik asit ve kalsiyum aljinatın sudaki çözünürlüğü son

derece sınırlı iken sodyum, potasyum, amonyum tuzları ile propilen glikol esteri suda kolaylıkla çözünebilirler. Sodyum aljinat, kokusuz tatsız bir toz olup suda çözüldüğünde viskoz koloidal bir çözelti oluşturur.

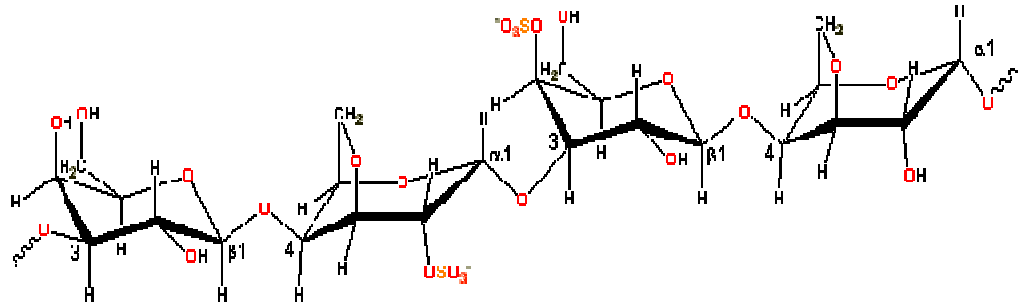


Şekil 2.10. Sodyum aljinat'ın kimyasal yapısı

Aljinat yüksek molekül ağırlığı, suda çözünürlüğünün iyi olması ve biyouyumluluğu nedeniyle birçok uygulama alanı vardır. Gıda endüstrisinde stabilizatör ve koyulaştırıcı olarak kullanıldığı gibi, kozmetik, kağıt, plastik ve ilaç endüstrisinde sıkça kullanılmaktadır [50].

2.5.4. Karragenan

Karragenan kırmızı deniz yosunlarından elde edilen lineer bir polisakkarittir. 3-β-D-galaktopiranoz ve 4-α-D-galaktopiranoz birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşan bir polisakkarittir (Şekil 2.11) [51].

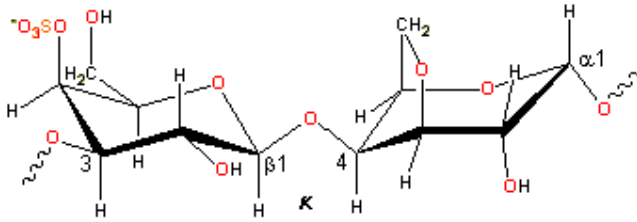


Şekil 2.11. Karragenanın tekrarlanan birimlerinin yapısı

Karragenanların elde edildiği belli başlı algler aşağıda verilmiştir;

- *Rhodophyceae*
- *Chondrus crispus*
- *Mastocarpus stellatus*
- *Eucheuma*
- *Gigartina*
- *Iridaea*

Karragenanın 3 değişik formu bulunmaktadır. Bunlar *kappa* (K), *iota* (I) ve *lambda* (λ) karragenandır. K-Karragenan en fazla bulunan ve kullanılan türüdür.



Şekil 2.12. K-karragenanın yapısı

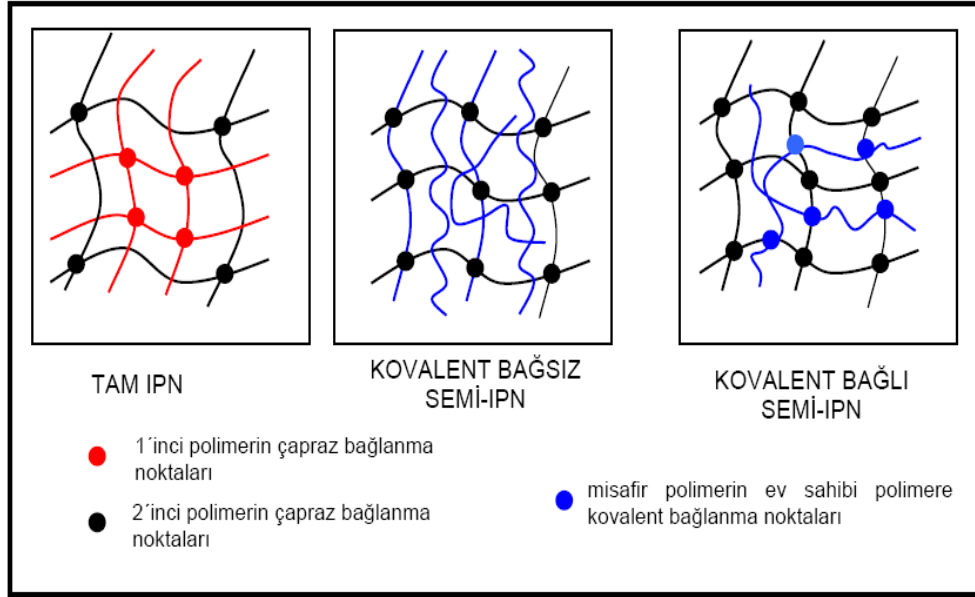
Farklı deniz yosunlarından elde edilen karragenanlar farklı özellikler gösterirler. Değişik tipdeki karragenanlar jel haline getirilebilir. Jellerin akıcılığı, esnek yada sert olmaları ısıtma ile istenildiği şekilde elde edilebilir. Oluşan karragenan çözeltisinin akışkanlığı; polimer derişimine, çözelti sıcaklığına ve karragenanın tipine bağlıdır [52,53].

2.5.5. Destek materyali

İlk kez Millar (1960) tarafından ortaya atılan iç içe geçmiş ağ yapı (interpenetrating network, IPN) en basit tanımıyla, doğal veya sentetik iki bileşenden en az bir bileşenin diğerinin varlığında çapraz bağlı olduğu yapılardır. IPN oluşumu, polimerik bileşenlerin birbiriyle uyumunu arttırmak için mükemmel bir yoldur. Bir IPN, belirli bir uygulamada makromoleküler yapıdaki benzerine göre daha üstün performans gösterir.

Çok sayıda araştırmacının, IPN formu hazırlamak için, doğal ve sentetik polimerlerin çeşitli kombinasyonlarını kullandıkları kaydedilmiştir. Çeşitli yöntemlerle eşsiz topolojiye sahip IPN'ler üretilebilmektedir. Art arda gerçekleşen IPN sentezinin ilk basamağında, monomerlerden biri çapraz bağlanır ve ardından bu çapraz bağlı yapı; ikinci monomer, bu monomerin başlatıcısı ve çapraz bağlayıcısı varlığında şişerken ikinci monomer polimerleşir. Eş zamanlı gerçekleşen IPN sentezinde ise; her iki monomer, bu monomerlere özgü olan polimerizasyon başlatıcıları ve çapraz bağlayıcıları varlığında farklı sentetik modlarda (basamak ve zincir polimerizasyonu) eş zamanlı olarak polimerleşirler. İki polimerin eşdeğer olduğu koşulda her iki yöntem de kullanılarak, homo-IPN'ler hazırlanabilir [54].

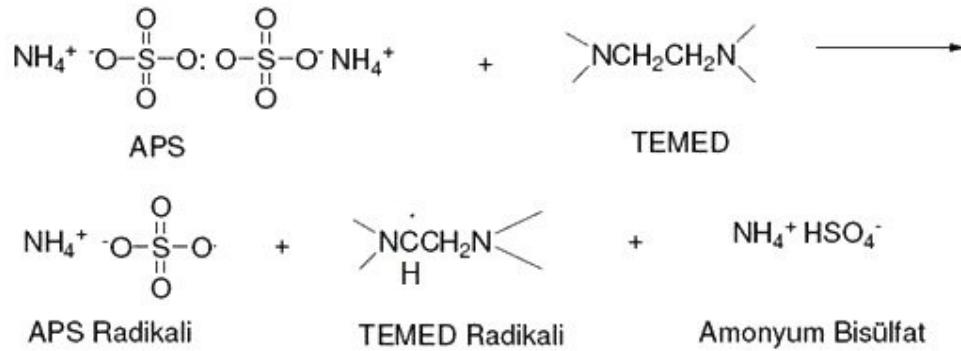
Yarı-IPN tipi hidrojellerde polimerlerden biri çapraz bağ içerirken diğeri içermez. Bu tür hidrojellerde misafir polimer zincirleri, ev sahibi ağ yapının içinde kovalent bağlı veya kovalent bağısız olarak yer alabilirler. IPN ve yarı-IPN tipi hidrojeller için şematik bir gösterim Şekil 2.13' de sunulmuştur.



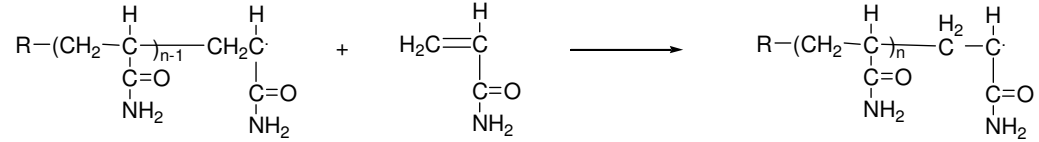
Şekil 2.13. IPN tipi hidrojellerin türleri

Bu çalışmada, P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar yarı ağ yapılı hidrojelleri destek materyali olarak kullanıldı. P(AAm-AA)/Alj yarı-IPN oluşumu Şekil 2.14' de gösterildi.

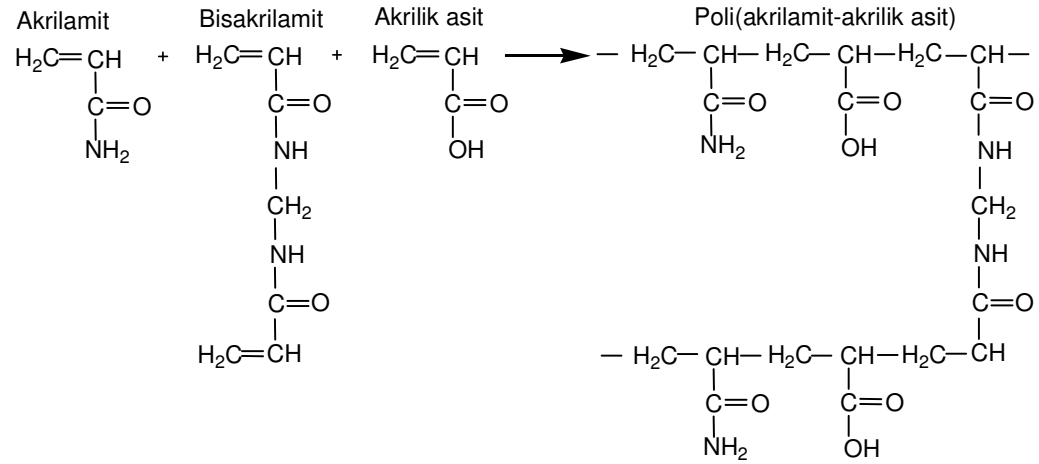
APS ve TEMED in radikallerinin oluşumu;



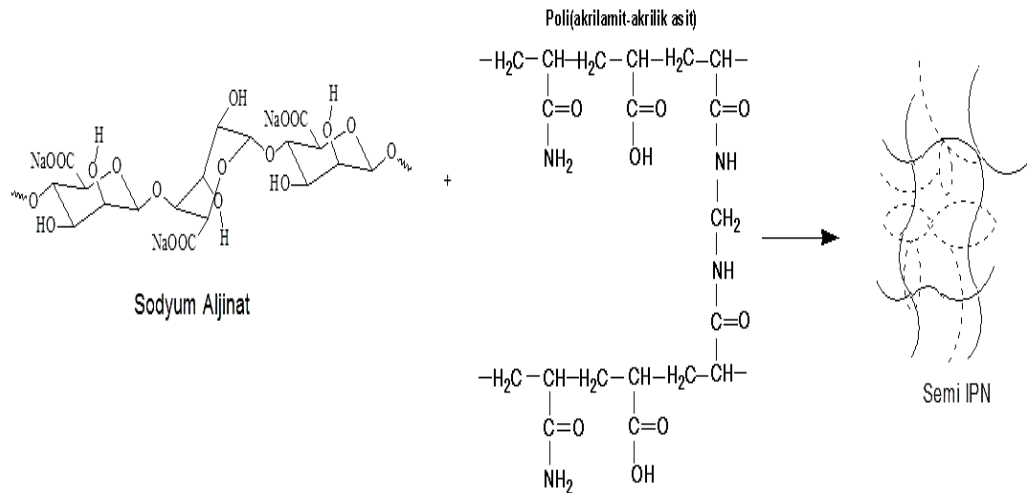
Radikalik katılma ile polimer zincirinin uzaması;



Çapraz bağlı polimerin oluşumu;



Yarı-IPN oluşumu;



Şekil 2.14. Yarı-IPN (Semi-IPN) oluşumu

2.5.6. Azo boyaları

Azo boyaları başlıca iki kısma ayrılırlar.

- Monoazo boyaları

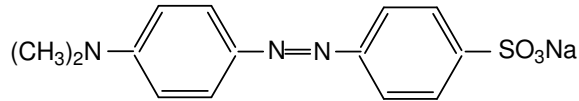
Bu tür boyalarda, kromofor grubu azo (-N=N-) bağı ile benzen halkasına bağlanmıştır ve asit karakterdedirler. Halkaya, OH grubunun katılması asidik ve NH₂ grubunun ilavesi de bazik karakter yaratır (bordo kırmızısı, brillant sarısı-S, krisoidin -Y, fast sarısı, janus yeşili-B, metil oranj, metil kırmızısı, oranj-G, oranj -II, Sudan-R, Sudan-II)

- Diazo ve poliazo boyaları

Molekülde birden fazla azo grubunun bulunması sonu bu tür boyalar meydana gelirler (azo mavisi, biebrich scarlat, bismark braun-Y, brillant purpurin-R, klorazol siyahı-E, kongo kırmızısı, evans mavisi, sudan siyahı -B, sudan kırmızısı -7B, tripan mavisi, vital kırmızısı) [55].

Metil oranj

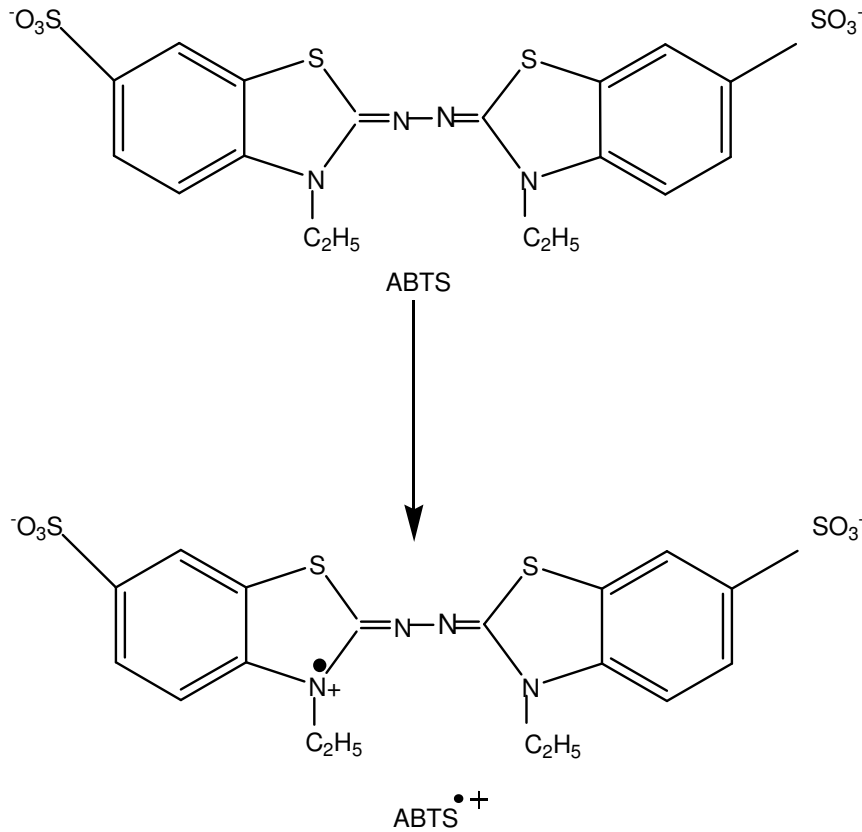
Metil oranj, tekstil, baskı, kağıt, ilaç, gıda endüstrisinde ve araştırma laboratuvarlarında geniş kullanım alanı olan suda çözünebilen bir monoazo boyadır. Metil oranjın sulu çözeltisi zayıf asit gibi davrandığı için asit-baz indikatörü olarak analitik kimya laboratuvarlarında kullanılır [56]. Metil oranjın bazik rengi kırmızı asidik rengi ise sarıdır. pH geçiş aralığı 3,1 - 4,4 arasındadır.



Şekil 2.15. Metil oranjın yapısı

2.5.7. ABTS

2,2-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu, ABTS ($C_{18}H_{24}N_4O_6S_4$: 548,68 g/mol) çeşitli kimyasal yükseltgenlerin kolorimetrik analizlerinde çok bilinen bir bileşiktir. Renksiz ABTS molekülü, mavi yeşil renkte bir radikal, $ABTS^{\bullet+}$, oluşturur (Şekil 2.17). $ABTS^{\bullet+}$ radikali 415, 648, 728 ve 812 nm' de kuvvetli UV-görünür bölge absorpsiyon pikleri gösterir. ABTS ile çeşitli organik ve inorganik radikallerin tepkimeleri sonucunda $ABTS^{\bullet+}$ radikalinin hızla oluştuğu bildirilmektedir [57,58]. ABTS, serbest radikal tepkimelerinin kinetik çalışmalarında ve kimyasal yükseltgenlerin kantitatif analizlerinde reaktif olarak kullanılmaktadır [59].



Şekil 2.16. ABTS ve $ABTS^{\bullet+}$ nin oluşumu

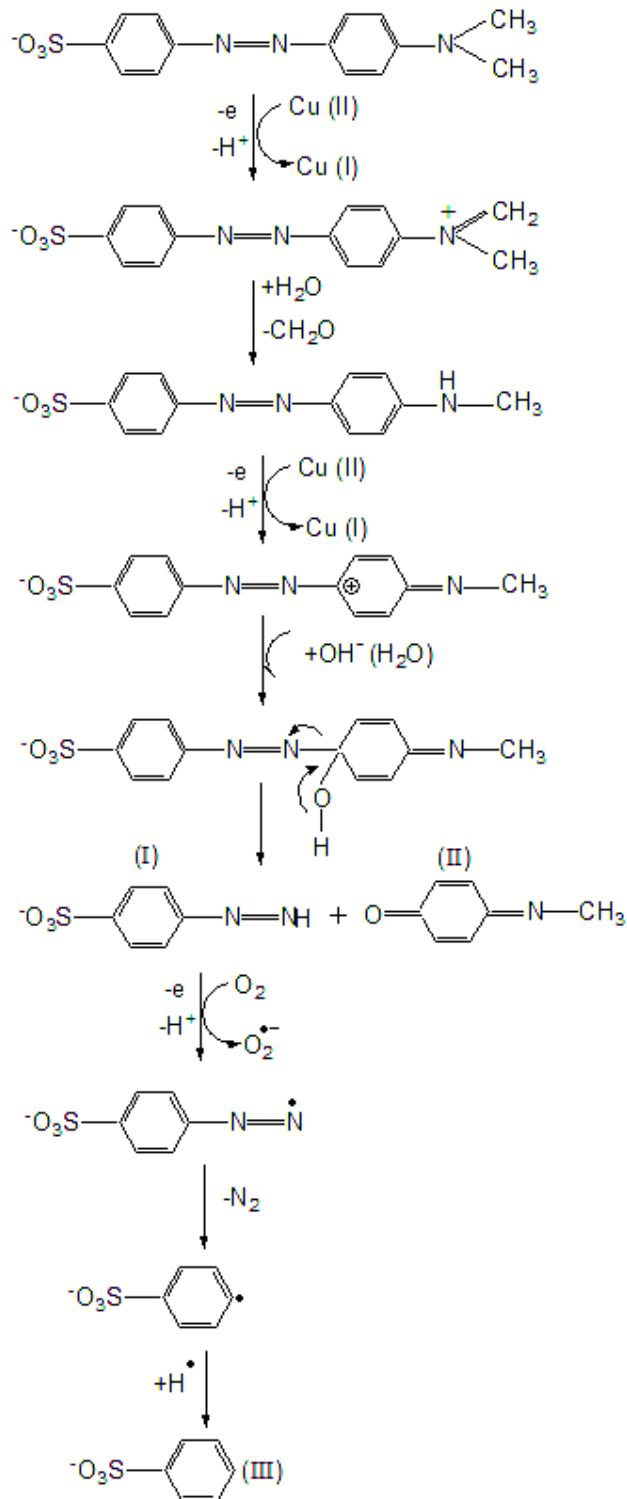
2.6. Enzimatik Renk Giderme

Sentetik boyalar, tekstil, kağıt, kozmetik ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [60]. Bu boyaların atıklarının çoğu doğada zor parçalandığı için çevre kirliliğine neden olmaktadır, bu da insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır [61]. Boya atıklarının bozunarak renksizleştirilmesi çeşitli fiziksel ve kimyasal metotlarla gerçekleştirilebilir. Bu metotlar arasında adsorpsiyon, koagülasyon-flokülasyon, iyon değiştirme, yükseltgenme sayılabilir. Bu metotların maliyetlerinin yüksek olması kullanımlarını sınırladığı için boya atıklarının biyobozunmasının enzimatik yoldan gerçekleştirilmesi bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır [60].

Enzimatik renk gidermenin avantajları arasında, bozunmaya dirençli atıkların parçalanmasının sağlanması, yüksek ve düşük atık derişimlerinde, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında kullanılabilmesi sayılabilir. Enzimatik renk giderme proseslerinde serbest enzimin yanı sıra enzimin bir destek üzerine immobilize edilerek kullanılmasıyla, geniş pH ve sıcaklık aralığında çalışılabilmesi, katalitik proseslerde aktifliklerini koruyarak tekrar tekrar kullanılabilmesi, tepkime ortamında bulunan tepken veya ürünlerin ayrılması zorluğunun ortadan kalkması ve yöntemin maliyetinin düşürülmesi oldukça önemli avantajlardandır. Son yıllarda bir oksidoredüktaz olan lakkaz enzimi boyaların renksizleştirilmesinde kullanılmasından dolayı araştırmacıların dikkatini çekmiştir [62].

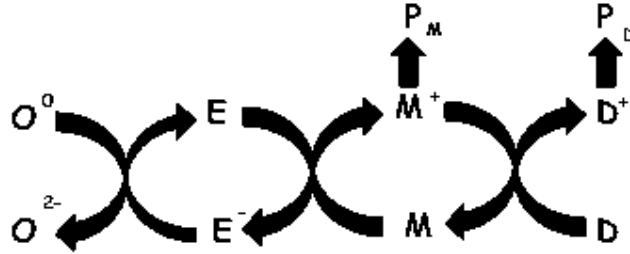
Lakkaz ve çeşitli destek materyallere immobilize edilmiş lakkaz, azo, triaril metan, antrakinon ve indigo tipindeki boyaların renginin giderilmesinde kullanılır [63]. Örneğin, bir azo boya olan metil oranjin (Acid Orange 52) renginin lakkazla giderilmesi Şekil 2.18' de gösterilmiştir. Şekil 2.18' de önerilen mekanizmaya göre metil oranjin bozunma mekanizmasının ilk basamağı, lakkazın yapısındaki Cu^{+2} iyonunun 1 elektron alarak Cu^{+1} e indirgenirken, metil oranjin üçüncül amin grubunun iminyum katyonuna yükseltgenmesidir. Bu katyonun hidrolizi ile yapıdan formaldehit ayrılarak bu

iyon ikincil amin grubuna dönüşür. Sonrasında lakkaz ikincil amin grubunu yükseltgeyerek karbonyum iyonunu oluşturur. İleri basamaklarda gerçekleşen hidroliz ile 3-diazenil-benzensülfonik asit (I) ve 4-metilimino-siklohekza-2,5-dienon (II) oluşur. I numaralı ürünün oksijenle yükseltgenmesi ve bir N₂ molekülü kaybetmesiyle benzensülfonik asit radikali meydana gelir. Bu radikalın hidrojen radikali ile birleşmesiyle de benzen sülfonik asit (III) oluştuğu önerilmektedir. Bu bozunma mekanizmasına göre zehirli aromatik aminler oluşmamaktadır, bu da çevre kirliliğinin önlenmesinde oldukça fayda sağlar [64].



Şekil 2.17. Metil oranjin lakkaz varlığında önerilen bozunma mekanizması

Lakkazın substrat seçiciliğinden dolayı, lakkazla bazı azoboyaların parçalanması sınırlanmaktadır. Bu sorunun çözülmesi için, lakkaz/mediyatör sistemleri kullanılarak daha fazla türde azoboyaların renginin giderildiği, renk giderme hızının ve oranının artırıldığı bildirilmektedir [63]. Mediyatörler, geniş substrat alanı olan lakkaz enzimlerini destekleyen ve elektron transferini gerçekleştiren katalizör benzeri bileşiklerdir. Ancak tepkime sırasında tüketildikleri için gerçek katalizör değildirler [65]. Yapılan çalışmalarda ABTS ve HBT (1-hidroksibenzotriazol) sıklıkla kullanılan mediyatörlerdir [60]. Bir oksidoredüktaz olan lakkaz mediyatör olarak kullanılan ABTS'yi yükseltger ve katyon radikali ($ABTS^{+\cdot}$) oluşur. Bu radikal bozunarak enzimatik yükseltgenme ürünlerini oluşturabilir (P_M). $ABTS^{+\cdot}$, boya moleküllerini (D) yükseltger ve yükseltgenmiş boya molekülleri kararsız olduğu için bozunma ürünleri meydana gelir (P_D). Lakkaz, boya ve mediyatörün yer aldığı renk giderme mekanizması Şekil 2.18' de gösterilmiştir [66].



Şekil 2.18. Lakkazın mediyatör varlığında önerilen tepkime mekanizması

M = Mediyatör (ABTS), $M^+_{(yük)}$ = Mediyatör_(yük) ($ABTS^{+\cdot}$)
D = Boya, $D^+_{(yük)}$ = Boya_(yük)

P_M = Mediyatörün bozunma ürünleri

P_D = Boyanın bozunma ürünleri

Bu çalışmada serbest lakkaz ve P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-Kar, P(AAm-IA)/K-Kar, hidrojellerinde immobilize edilmiş lakkaz bir azo boya olan metil oranjin renginin giderilmesine kullanıldı.

2.7. Lakkazın İmmobilizasyonu ve Renk Giderme ile İlgili Yapılan Çalışmalar

1988 yılında Leonowicz, A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes versicolor'* dan elde edilen lakkazı, 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES) ve glutaraldehit ile aktifleştirilmiş cam boncuklar üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize etmişler ve immobilize enzimin 6 kullanımdan sonra aktifliğini kaybetmediğini bulmuşlardır [67].

1995 yılında Rogalski, J. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Phlebia radiata'* dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma yöntemi ile γ -aminopropil-trietoksisilanla aktifleştirilmiş gözenekli cam üzerine immobilize etmişlerdir. Enzim bağlanma kapasitesini % 98 ve immobilize enzimin aktifliğini %96 olarak bulmuşlardır. İmmobilize enzim 4 °C' de iki hafta süreyle depolandığında aktifliğini %100 koruduğunu belirtmişlerdir [68].

1998 yılında Luterek, J. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Cerrena unicolor'* dan elde edilen lakkazı silanlanmış gözenekli cam boncuklar üzerine immobilize etmişlerdir. Bu çalışmalarında substrat olarak siringaldazin kullanmışlardır. Enzim bağlanma kapasitesini %94 olarak bulmuşlar ve immobilizasyonla optimum pH' nın 5,5' den 5,7' ye kaydığını belirlemişlerdir. İmmobilize enzim 7 ay 4 °C' de saklandığında başlangıç aktifliğinin %95' ini, aynı koşullarda serbest enzimin başlangıç aktifliğinin %40' ını koruduğunu bulmuşlardır [69].

1999 yılında D'Annibale, A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Lentinula edodes'* ten elde edilen lakkazı glutaraldehit ile çapraz bağlanma ve adsorpsiyon yöntemini kullanarak kitosan üzerine immobilize etmişler, substrat olarak DMP (2,6- dimetoksifenol) kullanmışlardır. Optimum pH, serbest ve immobilize enzim için 4,0, optimum sıcaklıklar sırasıyla 50 °C ve 60 °C, K_m değerlerini sırasıyla 77 μ M ve 256 μ M olarak bulmuşlardır. Bu

çalışmada zeytinyağı fabrikalarında atık sulardaki fenollerin uzaklaştırılması üzerine çalışmışlardır [70].

2000 yılında Jolival, C. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma yöntemi ile modifiye edilmiş PVDF (polviniliden florid) mikrofiltrasyon membran üzerine immobilize etmişler, bu işlemi kirli sudaki fenilüre pestisitini gidermek için uygulamışlardır [71].

2000 yılında Hublik, G. ve Schinner, F. yaptıkları çalışmalarında, *Plerotus ostreatus*' dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma yöntemi ile Eupergite üzerine immobilize etmişlerdir. pH 5,8 ve 50 °C' de, 40 mM fosfat tamponunda siringaldazin substratı ile lakkazın maksimum yükseltgenme hızı gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca immobilize lakkaz 25 °C' de 10 gün boyunca depolandığında başlangıç aktifliğinin %2' sini kaybettiğini belirlemişlerdir [72].

2000 yılında D'Annibale, A. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarında, *Lentinula edodes*' ten elde edilen lakkazı Eupergite üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize ederek kinetik parametreleri ve zeytinyağı fabrikalarının atık sularındaki fenol bileşikleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Serbest ve immobilize lakkazın K_m sabitini substrat olarak DMP kullandıklarında sırasıyla 0,070 mM ve 0,014 mM, ABTS kullandıklarında sırasıyla 0,150 mM ve 0,022 mM olarak bulmuşlardır [73].

2000 yılında Ruiz, A.I. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı adsorpsiyon yöntemiyle cam, silika jel, naylon-66 membran üzerine immobilize etmişlerdir. Enzimin dietil eter, etil asetat ve metilen klorür içinde aktifliğini ve kararlılığını belirlemişlerdir. Siringaldazin yükseltgenme başlangıç hızının, çözücü ve destek materyaline bağlı olarak 245 kat arttığını gözlemlemişler, naylon-66 membrana immobilize edilen lakkaz kullanarak en iyi sonuçlara ulaşmışlardır [74].

2000 yılında Lante, A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Pyricularia oryzae*' dan elde edilen lakkazı adsorpsiyon yöntemi ile polietersülfon membrana immobilize etmişlerdir. Siringaldazin substratını kullanarak serbest ve immobilize lakkaz için sırasıyla optimum pH' yı 6,3 ve 6,6, optimum sıcaklığı ise sırasıyla 40 °C ve 35 °C olarak bulmuşlardır. Ayrıca immobilize lakkazın atık sulardaki farklı fenol türevlerini uzaklaştırması üzerine çalışmışlardır [75].

2001 yılında Freire, R.S. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile aktifleştirilmiş karbon fiber mikro elektrotlar üzerine immobilize etmişlerdir. Substrat olarak katekol kullanmışlar ve optimum pH' yı 5,0 olarak bulmuşlardır. 2 ay süresince immobilize lakkazın aktifliğini koruduğunu belirlemişlerdir [76].

2002 yılında Al-Adhami, A.J.H. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, üç farklı beyaz çürükçül mantardan (*Trametes versicolor*, *Cerrena unicolor* ve *Heterobasidion annosum*), elde ettikleri lakkazı DEAE-Granocel 500, CM-Granocel ve akrilik taşıyıcılara kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. Siringaldazin substratı kullanarak *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkazın optimum pH' sını 5,2, DEAE-Granocel üzerine immobilize edilmiş lakkazın optimum pH' sını 5,0 bulmuşlardır. Optimum sıcaklığın, serbest enzim ve immobilize enzim için 40°C – 55°C aralığında olduğunu bulmuşlardır. *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkaz DEAE-Granocel 500 üzerine immobilize edildiğinde 4 °C' de 4 ay depolandıktan sonra başlangıç aktifliğinin %98' ini koruduğunu tespit etmişlerdir [77].

2002 yılında Yinghui, D. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Panus conchatus*' den elde edilen lakkazı N-hidroksisüksinimit' le aktifleştirilmiş çapraz bağlı karboksillenmiş PVA (polivinil alkol) üzerine kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. Substrat olarak ABTS kullanmışlar ve immobilize lakkaz için optimum pH' yı 3,2, sıcaklığı 40 °C, depolama süresini 12 saat

olarak bulmuşlardır. İmmobilize lakkazın 10 kullanımdan sonra başlangıç aktifliğinin %60' ını, 17 kullanımdan sonra ise başlangıç aktifliğinin %50' sini koruduğunu tespit etmişlerdir [78].

2003 yılında Zille, A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes villosa*' dan elde edilen lakkazı silanlanmış alümina üzerine kovalent bağlanma yöntemi immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize lakkazla endüstriyel boya atıklarından bir di-azo sülfonik boya olan Reactive Black 5 (RB5)' in renginin giderilmesini incelemişlerdir. 24 saat sonunda serbest lakkaz ile boya atığının rengi %80 giderilirken, immobilize lakkazla % 93 renk giderildiğini bulmuşlardır. İmmobilize lakkazla adsorpsiyonla da renk giderildiğini belirtmişlerdir [79].

2003 yılında Peralta-Zamora, P. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı, silika temelli, bazı destek materyallerine kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimle çeşitli boyar maddelerin (Remazol Brilliant Blue R, Remazol Black B, Reactive Orange 122, Reactive Red 251) renk giderimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Serbest lakkazın mediyatörsüz hiç renk gidermediğini, Serbest ve immobilize lakkazın mediyatör (HBT) varlığında 30 dakika sonunda boyaların renklerini sırasıyla %5-%35 aralığında ve %10-%52 aralığında renk giderdiğini bulmuşlardır [62].

2004 yılında Dodor, D.E. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı kaolinit üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize etmişler, immobilize enzim için optimum pH' ı 4,5 olarak belirlemişlerdir. Serbest ve immobilize lakkaz için optimum sıcaklıkların sırasıyla 40 °C ve 60 °C olduğunu bulmuşlardır. 4 °C' de 4 ay depolandığında serbest lakkazın başlangıç aktifliğinin %90' ını kaybettiğini, immobilize lakkazın 4 °C' de 90 gün depolanması sonucu ise başlangıç aktifliğinde bir kayıp olmadığını belirlemişlerdir. Ayrıca immobilize lakkazla

PAHs (polisiklik aromatik hidro karbonlar; piren, benzopiren, benzoantrasen gibi) bileşiklerini uzaklaştırma çalışmaları yapmışlardır [80].

2005 yılında Araujo, J.H.B. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarında, *Pleurotus ostreatus*, *Botryosphaeria sp'* den elde edilen lakkazı ve *Aspergillus sp'* den elde edilen ticari lakkazı adsorpsiyon yöntemi ile kitosan üzerine immobilize etmişler, ABTS ve DMP olarak iki substrat kullanarak enzim aktifliğini araştırmışlardır. İmmobilize lakkazla beyaz şarapta istenilmeyen fenolik bileşiklerin giderilmesi için kullanmışlardır [81].

2005 yılında Jiang, D. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında *Pycnoporus sanguineus'* dan elde edilen lakkazı, süspansiyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikrokürelerine adsorpsiyonla immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize lakkaz için optimum pH' yı 3,0, K_m değerlerini sırasıyla 0,037 mM ve 0,171 mM olarak bulmuşlardır [82].

2005 yılında Radha, K.V. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Phanerochaete chrysosporium'* dan elde edilen lakkazı Ca-aljinat boncuklara hapsedme yöntemi ile immobilize etmişlerdir. İmmobilize lakkaz 7 farklı sentetik boyanın (Acid Red 114, Methyl Orange, Methyl Violet, Acid Orange, Vat Magenta, Methylene Blue, Congo Red) renginin giderilmesinde kullanmışlardır. İmmobilize lakkazın Methyl Violet ve Acid Orange boyaalarının renklerini %98 oranında, Vat Magenta, Methylene Blue, Congo Red ve Acid Red boyaalarının (boya derişimi 20-400 mg/L, pH: 2-7, sıcaklık 20°C - 45°C) renklerini %88 – %92 oranında giderdiğini tespit etmişlerdir [83].

2006 yılında Yang, W.Y. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Rhus vernicifer'* dan elde edilen lakkazı glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünen kitosan, kitosan mikroküreler ve Fe^{+3} geçiş metali kelatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Serbest lakkaz ve suda çözünen kitosan üzerine immobilize lakkazın optimum sıcaklığı 45 °C ve optimum pH değeri 8 olarak bulunmuştur. 4 °C' de 3 ay depolandığında Fe^{+3}

geçiş metali kelatları üzerine immobilize lakkazın ve suda çözünen kitosan üzerine immobilize lakkazın başlangıç aktifliklerinin %10' unu kaybettiği, mikro küreler üzerine immobilize lakkazın ise başlangıç aktifliğinin %15' ini kaybettiğini bulmuşlardır. Ayrıca 15 kullanımdan sonra suda çözünebilen kitosan üzerine immobilize lakkazın başlangıç aktifliğinin %80' ini, Fe^{+3} geçiş metali kelatları üzerine immobilize lakkazın başlangıç aktifliğinin ise %85' ini koruduğunu tespit etmişlerdir [84].

2006 yılında Xiao, H. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Pycnoporus sanguineus*' dan elde edilen lakkazı glutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile amin sonlu nanokompozitler (CuTPAc)- Fe_3O_4 (bakır tetraamino ftalosiyanın) üzerine iki basamaklı tepkime üzerinden immobilize etmişlerdir. Birinci basamakta çapraz bağlanma koşulları ikinci basamakta ise enzimin nanokompozitlere kovalent bağlanması koşulları incelemişlerdir. Substrat olarak ABTS kullandılarında optimum pH' yı 7, K_m sabitini $2,38 \times 10^{-5}$ mM olarak bulmuşlardır. Ayrıca immobilize lakkazın 5 kez art arda kullanımından sonra başlangıç aktifliğinin %80' ini koruduğunu tespit etmişlerdir [85].

2006 yılında Zawisza, I. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkazı altın elektrotlar üzerine biriktirilen tetrametoksisilan (TMOS)' dan elde edilen ince hidrofilik silika jelde mikrokapsülleme yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Immobilize lakkazın sadece ABTS mediyatörü varlığında aktif olduğunu tespit etmişlerdir. Immobilize lakkazın maksimum aktiflik gösterdiği pH' yı 4,2–5,2 aralığında, sıcaklığı ise 40 °C – 50 °C aralığında olduğunu bulmuşlardır [86].

2006 yılında Roy, J.J. ve Abraham T.E. yaptıkları çalışmalarında, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı amonyum persülfatla kristallendirip, glutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile immobilize ederek çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC) elde etmişler, CLEC' in serbest lakkaza göre kararlılığını incelemişlerdir. Substrat olarak ABTS kullandıklarında, optimum pH' yı serbest lakkaz için 3,0, CLEC için ise 5,5 olarak belirlemişlerdir. Serbest ve

immobilize lakkaz için K_m sabitlerini sırasıyla 0,141 mM ve 0,859 mM olarak bulmuşlardır [87].

2007 yılında Hu, X. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile nanopartiküler (hegzagonal mezogözenekli silika) ve kaolinit üzerine immobilize etmişlerdir. Substrat olarak katekol kullanmışlardır. Lakkaz kaolinit üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 50 °C, nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 45 °C, kaolinit ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 45 °C olarak belirlemişlerdir. Kaolinit üzerine adsorpsiyon ile immobilize edilen lakkazın optimum pH' sı 5,5, nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen lakkazın pH' sı 6,0, kaolinit ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen lakkazın optimum pH' sı 6,0 olarak bulmuşlardır [88].

2007 yılında Dominguez, A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı, kalsiyum aljinat boncuklara hapsetme yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Substrat olarak ABTS kullandıklarında, optimum pH' nın 4,5-5,0 civarında olduğunu saptamışlardır [89].

2007 yılında Lu, L. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, endüstriyel lakkazı aljinat-kitosan mikrokapsüllerine immobilize etmişlerdir. ABTS substratını kullanarak optimum pH' nın 2,6-6,2 aralığında olduğunu belirlemişlerdir. Serbest lakkaz için optimum sıcaklık 60°C iken, immobilize lakkaz için optimum sıcaklığı 65 °C olarak bulmuşlardır. Serbest ve immobilize lakkaz için K_m sabitlerini sırasıyla 0,068 mM ve 0,187 mM olarak bulmuşlardır. Ayrıca lakkazı ile Alizarin Red boyasının renginin giderilmesinde kullanmışlardır. Serbest lakkaz ile Alizarin Red boya çözeltisinin (100 mg/L) rengini mediyatör kullanılmadan giderilmediğini ancak

0,1 mM ABTS eklendiğinde ilk bir saatte serbest lakkaz için %66, immobilize lakkaz için ise %35 renk giderimi sağlandığını belirlemişlerdir [61].

2007 yılında Silva, C. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes hirsuta*' dan elde edilen lakkazı örülmüş poliamit 6,6 (nylon) liflerinde glutaraldehit ile çapraz bağlayarak immobilize etmişlerdir. Optimum koşullarda (29 U/mL lakkaz, %10' luk glutaraldehit ve pH 5,5) immobilize lakkazın termal kararlılığının serbest lakkaza göre %18 kadar daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir [90].

2007 yılında Couto, S.R. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes hirsuta*' dan elde edilen lakkazı alümina pelletler üzerine zıt yüklü elektrolitler yardımıyla adsorpsiyon yöntemi ile lakkazın kararlılığını arttırmak için immobilize etmişlerdir. Lakkazın alümina üzerine immobilize edilerek oluşturulan tabakalarda en dış katmandaki enzim aktifliğinin 1. 2. ve 3. tabakaya göre daha düşük olduğunu, en iyi aktifliğin ise 3. tabaka olduğunu saptamışlardır. Bu nedenle renk giderimi için en uygun lakkaz kaplanmış tabakanın 3. tabaka olduğunu belirtmişler, Methyl Green' in rengini giderme hızının Remazol Brilliant Blue R' ye göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [91].

2007 yılında Bryjak, J. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma yöntemi ile bütül akrilat-etilen glikol dimetakrilat kopolimeri üzerine immobilize etmişlerdir. Optimum sıcaklığı serbest lakkaz için 58 °C, immobilize lakkaz için ise 30 °C ve 40 °C olmak üzere iki değer gözlemlemişlerdir. Serbest ve immobilize lakkaz için optimum pH değerlerini 5,0-6,5 aralığında olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca serbest lakkazın ve immobilize lakkazın 30 °C ve 60 °C' de termal inaktivasyonunu incelemişlerdir. Serbest lakkaz 30 °C' de 3 gün tampon içinde saklandığında başlangıç aktifliğinin %50' sini kaybettiğini ancak immobilize lakkazın aktifliğinde bir kayıp olmadığını gözlemlemişlerdir. Serbest lakkaz 60 °C' de 21 saat tampon içinde saklandığında aktifliğini

tamamen kaybettiğini ancak immobilize lakkazın ise başlangıç aktifliğinin %60' ını koruduğu sonucuna ulaşmışlardır. Serbest ve immobilize lakkaz için K_m değerleri sırasıyla 0,183 mM ve 0,059 mM olarak bulmuşlardır [92].

2007 yılında Champagne, P.-P. ve Ramsay, J.A. yaptıkları çalışmalarında, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma ile silika boncuklar üzerine immobilize ederek Reactive blue 19 boyasının renk gideriminde kullanmışlardır. 6 saat sonunda %70 oranında renk giderimi olduğunu tespit etmişlerdir [93].

2008 yılında Kunamneni, A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Myceliophthora thermophila*' dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma yöntemi ile epoksi grupları aktifleştirilmiş polimetakrilat bazlı polimerlere (Sepabeads EC-EP3 ve Dilbeads NK) immobilize etmişlerdir. Immobilize lakkaz altı sentetik boyanın (Reactive Black 5, Acid Blue 25, Methyl Orange, Remazol Brilliant Blue B, Methyl Green ve Acid Green 27) renklerinin giderilmesinde kullanılmıştır. Sepabeads EC-EP3 üzerine immobilize edilen lakkazı 5 kullanım sonunda Methyl Green boyasının rengini %41 oranında giderdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca immobilize lakkazın, 6 saat inkübasyon sonunda HBT kullanılmadan Methyl Orange boya çözeltisinin (%0,02 w/v) rengini % 61, HBT varlığında ise 6 saat sonunda %82 oranında renk giderdiğini bulmuşlardır [60].

2008 yılında Georgieva, S. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Rhus vernicifera*' dan elde edilen lakkazı kromik asitle kimyasal olarak modifiye edilmiş polipropilen membran üzerine kovalent bağlamayla immobilize etmişlerdir. Substrat olarak fenol kullandıklarında, serbest ve immobilize lakkaz için optimum pH 7,5, optimum sıcaklığı serbest ve immobilize lakkaz için sırasıyla 40 °C ve 50 °C olarak bulmuşlardır. Serbest ve immobilize lakkazı 60 °C' da 150 dak. inkübe etmişler ve bu süre sonunda serbest ve immobilize lakkazın başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %15,7 ve %41,8' ini koruduğunu tespit etmişlerdir [94].

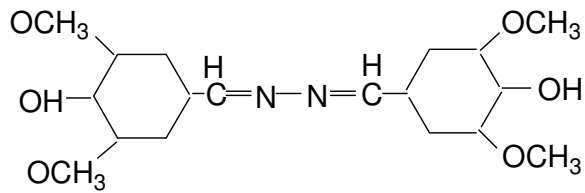
2008 yılında Rekuc, A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkazı adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemiyle selüloz-bazlı Granocel taşıyıcıya immobilize etmişlerdir. Matriksi glutaraldehit ile aktifleştirdiklerinde, 1 ay süreyle 4 °C' de depolandığında başlangıç aktifliğinin %79' unu, divinilsülfonla aktifleştirdiklerinde başlangıç aktifliğinin % 81,8' ini koruduğunu bulmuşlardır [95].

3. DENEYSEL KISIM

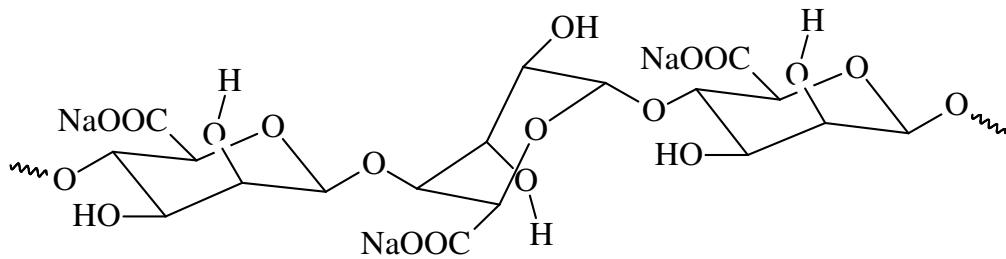
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler

Lakkaz : (Trametes versicolor (E.C. 1.10.3.2), 27,5 U/mg) Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.

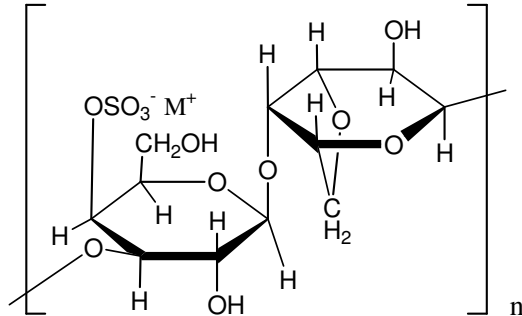
Siringaldazin (4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin) : ($C_{18}H_{20}N_2O_6$: 360,37 g/mol) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



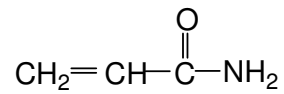
Sodyum Aljinat : (Orta viskozite, $\geq 2,000$ cP, %2 ,25 °C,) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



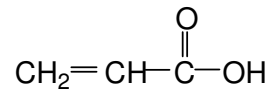
K-karragenan : (Viskozitesi, 5-25 mPa.s (%0,3 suda) (25 °C)) Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.



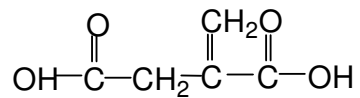
Akrilamit : (C₃H₅NO : 71,08 g/mol) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.



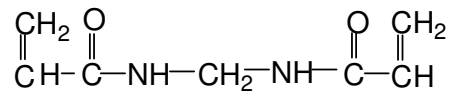
Akrilik asit : (C₃H₃O₂ : 72,06 g/mol) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.



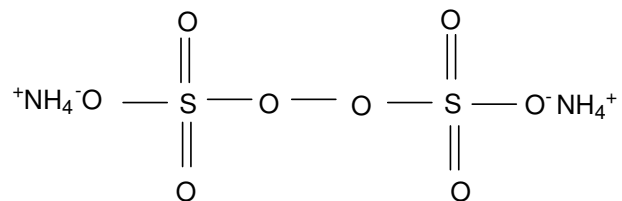
İtakonik asit : (C₅H₆O₄ : 130,09 g/mol) Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.



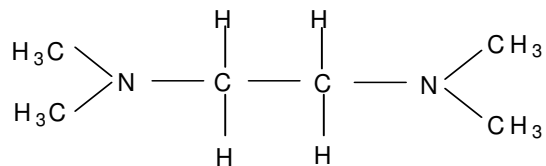
N,N'- Metilenbisakrilamit : ($C_7H_{10}O_2N_2$: 154,2 g/mol) Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.



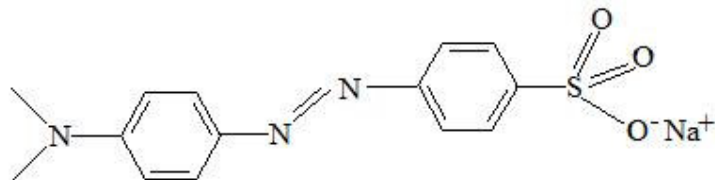
Amonyum persülfat : ($(NH_4)_2S_2O_8$: 228,2 g/mol) BDH (İngiltere) firmasından temin edildi.



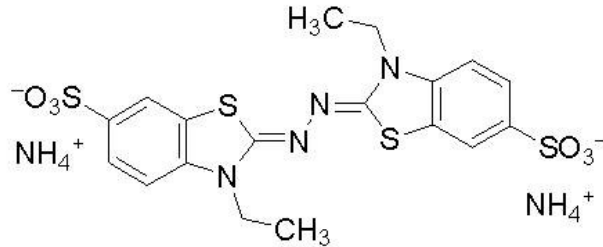
N,N,N',N'- Tetrametiletilendiamin (TEMED) : ($C_6H_{16}N_2$: 116,2 g/mol) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.



Metil Oranj : ($C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$: 327,33 g/mol, C.I. 13025) Fisher (Amerika) firmasından temin edildi.



2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS) :
($C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$: 548,64 g/mol) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



Fosforik asit : (H_3PO_4 : 98,9 g/mol, $d = 1,71$ kg/L) Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edildi.

Sitrik asit : ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$: 210,14 g/mol) BDH (İngiltere) firmasından temin edildi.

Asetik asit : (CH_3COOH : 60,05 g/mol) Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edildi.

Sodyum asetat : ($NaCH_3COO_3 \cdot H_2O$: 136,08 g/mol) Carlo-Erba Reagents (İtalya) firmasından temin edildi.

Etil alkol (Mutlak) : (C_2H_5OH : 46,07 g/mol) Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edildi.

Sodyum hidroksit : ($NaOH$: 40,00 g/mol) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

Spektrofotometre: Shimadzu PharmaSpec 1700 (Tokyo, Japonya)

Çalkalamalı su banyosu: Memmert WNB 7-45 (Schwabach, Almanya)

3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. Sitrat tamponu

2,104 g sitrik asit deiyonize suda çözüldü ve hacmi 250 mL' ye tamamlandı. 2 M sodyum hidroksit kullanılarak, çözeltinin pH' sı 5,3 olarak ayarlandı (0,04M, pH: 5,3).

3.2.2. Sodyum hidroksit çözeltisi

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

3.2.3. Fosfat tamponu

0,27 mL fosforik asit deiyonize suda çözülerek hacmi 100 mL' ye tamamlandı. 2,0 M sodyum hidroksit kullanılarak, çözeltinin pH' sı 6,5 olarak ayarlandı (0,04M, pH: 6,5).

3.2.4. Siringaldazin çözeltisi

0,0090 g siringaldazin mutlak etil alkolde çözüldü, hacmi 50 mL' ye tamamlandı (0,5 mM).

3.2.5. Lakkaz çözeltisi

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

3.2.6. Akrilik asit çözeltisi

5 mL akrilik asit deiyonize suda çözüldü ve hacmi 10 mL ye tamamlandı (%50 v/v).

3.2.7. TEMED çözeltisi

2 mL TEMED deiyonize suda çözüldü ve hacmi 10 mL' ye tamamlandı (%20 v/v).

3.2.8. Sodyum asetat tamponu

4,8 g sodyum asetat-trihidrat ve 3,6 mL asetik asit alınarak deiyonize suda çözülp hacmi 1 L' ye tamamlandı. 2,0M NaOH ile pH' sı 4,5 olarak ayarlandı (0,1M, pH: 4,5)

3.2.9. ABTS çözeltisi

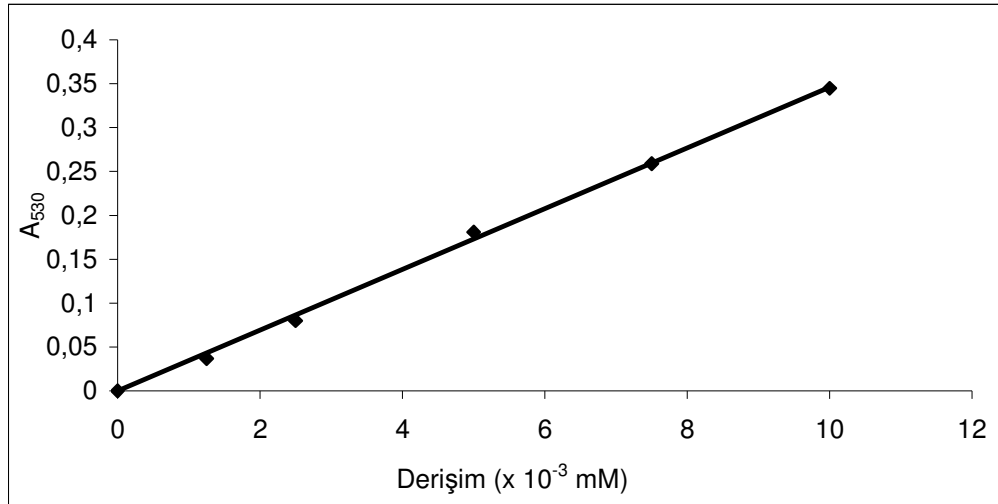
0,0014 g ABTS deiyonize suda çözülererek, hacmi 25 mL' ye tamamlandı. 4 °C de, buz içinde saklandı (0,1mM).

3.2.10. Metil oranj çözeltisi

$3,0 \times 10^{-5}$ M' lik metil oranj çözeltisi sodyum asetat tamponunda (0,1M, pH: 4,5) hazırlandı.

3.3. Siringaldazin Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Siringaldazin kalibrasyon eğrisini hazırlamak amacıyla farklı derişimlerde (0,0100mM, 0,0750mM, 0,0500mM, 0,0250mM, 0,0125mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, tepkime balonuna 9 mL sitrat tamponu (0,04M, pH: 5,3) ve farklı derişimlerde hazırlanan 1 mL siringaldazin çözeltileri eklendi. Çözeltilere 0,1 mL lakkaz enzimi (0,01 mg/mL) ilave edilerek tepkime balonları 10 dakika 25 °C' daki çalkalamalı su banyosunda tutulduktan sonra çıkarılarak 12. dakikada UV-görünür bölge spektrofotometresi (Shimadzu PharmaSpec 1700) kullanılarak 530 nm dalga boyunda absorbanları okundu. Siringaldazin çözeltilerinin derişimlerine karşılık gelen absorban değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği hazırlandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Siringaldazin kalibrasyon eğrisi

3.4. Enzim İmmobilizasyonu

Lakkaz enzimi, poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat (P(AAm-AA)/Alj), poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat (P(AAm-IA)/Alj), poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan, (P(AAm-AA)/K-kar), poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan, (P(AAm-IA)/K-kar) yarı-iç içe geçmiş ağ yapılı hidrojellerinde hapsedme yöntemi ile immobilize edildi. Destek materyalinin elde edilmesi ve immobilizasyon için yapılan polimerizasyonda;

- Monomer olarak; akrilamit, akrilik asit, itakonik asit
- Doğal polimer olarak; aljinat ve K-karragenan
- Çapraz bağlayıcı olarak; N,N'- Metilenbisakrilamit
- Başlatıcı olarak; amonyum persülfat (APS)
- Hızlandırıcı olarak; N,N,N',N'- Tetrametiletildiamin (TEMED)

maddeleri kullanıldı.

Genel olarak immobilizasyonda; polimerleşme ortamı olarak kullanılan fosfat tamponuna (0,04M pH: 6,5) doğal polimer konularak manyetik karıştırıcıda çözünene kadar karıştırıldı. Homojen bir çözelti oluştuğunda içine lakkaz enzimi ilave edilerek karıştırma işlemine devam edildi. Daha sonra ortama monomerler eklendi ve karıştırmaya devam edildi. Karışımın üzerine sırasıyla, N,N'- Metilenbisakrilamit ve amonyum persülfat eklendi ve çözünene kadar karıştırıldı. Homojen karışım elde edildiğinde TEMED eklendi, 2 dakika karıştırıldıktan sonra karışım pipetlere döküldü. 10 dakika içinde oda sıcaklığında jelleşen immobilize enzim 4°C' da buzdolabında saklandı. Enzim immobilizasyonunda kullanılan monomer, doğal polimer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve hızlandırıcı olarak kullanılan maddelerin miktarları Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan madde miktarları

Hidrojel	Monomer	Doğal Polimer (g)	Lakkaz (g)	N,N'- Metilenbis akrilamit (g)	APS (g)	Fosfat tamponu 0,04M pH: 6,5 (mL)	TEMED (mL)
P(AAm-AA)/Alj	0,750 g Akrilamit 0,5 mL (%50 v/v) Akrilik asit	0,025 Aljinat	0,025	0,038	0,020	12,0	0,5
P(AAm-IA)/Alj	0,750 g Akrilamit 0,250 g İtakonik asit	0,025 Aljinat	0,025	0,085	0,020	12,0	0,5
P(AAm-AA)/K-kar	0,750 g Akrilamit 0,5 mL (%50 v/v) Akrilik asit	0,025 K-karragenan	0,025	0,038	0,020	12,0	0,5
P(AAm-IA)/K-kar	0,750 g Akrilamit 0,250 g İtakonik asit	0,025 K-karragenan	0,025	0,085	0,020	12,0	0,5

3.5. Aktiflik Tayini

3.5.1. Serbest enzimin aktiflik tayini

Serbest lakkazın aktiflik tayini Leonowicz ve Grzywnowicz tarafından önerilen yönteme göre yapıldı [96]. Aktiflik tayininde 9 mL sitrat tamponu (0,04M pH: 5,3) üzerine 1 mL siringaldazin çözeltisi (0,1mM) ve 0,1 mL lakkaz çözeltisi (0,01 mg/mL) eklenerek tepkime başlatıldı. Çözelti çalkalamalı su banyosunda 25 °C' da 10 dakika çalkalandı. Tepkime sonunda oluşan pembe renkli çözeltinin, UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak 530 nm' de absorbans değeri ölçüldü. Tepkime hızı ölçülen absorbans değerleri ve siringaldazin kalibrasyon eğrisinin eğiminden ($\Delta A_{530}/\Delta c$) faydalanarak aşağıdaki bağıntıya göre hesaplandı.

$$\text{Hız (V)} = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{530}}{\Delta t} \times \frac{\Delta c}{\Delta A_{530}} \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte Δc , mM olarak siringaldazin derişimindeki değışimi, ΔA_{530} ($A_0 - A_t$) absorbansdaki değışimi ve Δt zamandaki değışimi gösterir. 1 ünite lakkaz ; 25 °C' da ve pH: 5,3' de 1 μ mol benzendiölü (siringaldazin) kinona çeviren enzim miktarıdır. Bütün aktiflik tayinlerinde deneyler iki kere yapıldı.

3.5.2. İmmobilize enzimin aktiflik tayini

İmmobilize lakkazın aktiflik tayini için 0,05 g (P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar) hidrojellerinde immobilize lakkaz enzimi üzerine 9 mL sitrat tamponu (0,04M, pH: 5,3), 1 mL siringaldazin (0,1mM) eklendi. Karışım çalkalamalı su banyosunda 25 °C' da 10 dakika çalkalandı ve 12. dakikada ölçüm alındı. Ölçülen absorbands değerlerinden aktiflikler Bölüm 3.5.1' de anlatıldığı gibi hesaplandı.

3.6. Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi

3.6.1. Serbest lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi farklı sıcaklıklarda (25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C) araştırıldı. Bu sıcaklıklar için aktiflik tayini Bölüm 3.5.1' de anlatılan yöntemle yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

3.6.2. İmmobilize lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile 0,05 g P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize lakkaz enzimleri hazırlanarak farklı sıcaklıklarda (25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C) aktiflik tayini Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntemle yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

3.7. Enzim Aktifliğine pH Etkisi

3.7.1. Serbest lakkazın 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) fosfat tamponları hazırlandı. Her bir pH' da aktiflik Bölüm 3.5.1' de anlatılan yöntemle göre tayin edildi. Tepkime süresince, sıcaklık (25 °C) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

3.7.2. İmmobilize lakkazın aktifliğine pH etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacı ile 0,05 g P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize lakkaz enzimleri ve farklı pH' larda (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5) fosfat tamponları hazırlanarak, her bir pH' da aktiflik tayini Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince, sıcaklık (25 °C) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

3.8. Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

3.8.1. Serbest lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 4 farklı derişimde (0,0125 mM, 0,0250 mM, 0,0500 mM, 0,0750 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 3.5.1' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu.

3.8.2. İmmobilize lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile 0,05 g P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar immobilize lakkaz enzimleri ve 4 farklı derişimde (0,0125 mM, 0,0250 mM, 0,0500 mM, 0,0750 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 3.5.2.'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince pH (5,3) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu.

3.9. Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

3.9.1. Serbest lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için 0,04M, pH: 6,5 fosfat tamponunda, 0,01 mg/mL derişiminde lakkaz çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler buzdolabında 4 °C' da saklandı ve bu çözeltilerden belirli aralıklarla (0., 3., 9., 15., 20., 28., 35., 39., 42., 52., 58., 65. gün) 0,1 mL örnek alınarak Bölüm 3.5.1'de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu.

3.9.2. İmmobilize lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla hazırlanan P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojenlerinde immobilize lakkazlar buzdolabında 4 °C' da saklandı. Bu hidrojenlerden belirli aralıklarla (0., 3., 5. , 10., 13., 17., 19., 24., 26., 31., 36., 42. gün) 0,05 g örnek alınarak Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu.

3.10. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

İmmobilize lakkazın tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla immobilize lakkazlar 1 günde 10 kez tekrar kullanıldı. Bu amaçla 0,05 g P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkaz alınarak Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu.

3.11. Hidrojellerin Şişme Değerlerinin Zamanla Değişiminin İncelenmesi

P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinin şişme değerlerinin zamanla değişimi 25 °C' de pH 5,3' de sitrat tamponunda 24 saat süreyle incelendi. Belirli zaman aralıklarında ortamdan alınan hidrojeller, yüzeyleri hafif bir şekilde kâğıtla kurularak tartıldı (W_w) ve tekrar şişme ortamına konuldu. Bu işleme hidrojeller denge şişme değerine ulaşınca kadar devam edildi ve hidrojellerin kütlelerindeki değişimler kaydedildi. Her bir hidrojelin % Şişme değeri ;

$$\% \text{ Şişme} = \frac{W_w - W_0}{W_0} \times 100 \quad (3.2)$$

eşitliğine göre hesaplandı.

W_w : Şişirilmiş hidrojel kütlesi

W_0 : Kuru hidrojel kütlesi

3.12. İmmobilize Lakkazın Termal İnaktivasyonu

P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize lakkazın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla, iki farklı sıcaklıkta (30 °C ve 50 °C) ve farklı zaman aralıklarında (15-75 dak.) inkübe edilen immobilize lakkazların aktiflikleri Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi tayin edildi. Tepkime süresince, pH (5,3) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

Birinci dereceden inaktivasyon sabitleri, k_i , ve yarılanma süreleri, $t_{1/2}$, aşağıdaki eşitlikler yardımıyla hesaplandı.

$$-\frac{dA}{dt} = k_i \times A \quad (3.3)$$

$$\ln A_t = \ln A_0 - k_i \times t \quad (3.4)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} \quad (3.5)$$

Bu eşitliklerde, A_0 başlangıç aktiflik değerini, A_t t süre sonraki aktiflik değerini belirtir.

3.13. Serbest Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilmesi

54 mL metil oranj çözeltisine ($3,0 \times 10^{-5}$ M) 6 mL lakkaz çözeltisi, SL, (0,4 mg/mL) eklenerek manyetik karıştırıcıda düşük hızda 30 °C' da inkübe edildi. 0., 15., 30., 45., 60., dakikalarda ve sonra birer saat aralıklarla 6 saat boyunca tepkime ortamından örnekler alınarak UV-görünür bölge spektrofotometresinde 466 nm' de absorbans değeri ölçüldü.

Metil oranjin renginin giderilmesinde ABTS mediyatörünün (0,1 mM) etkisini incelemek amacıyla, 51 mL metil oranj çözeltisine ($3,2 \times 10^{-5}$ M), 6 mL lakkaz çözeltisi ve 3 mL ABTS çözeltisi eklenerek manyetik karıştırıcıda düşük hızda 30 °C' da inkübe edildi. 0., 15., 30., 45., 60., dakikalarda ve sonra birer saat aralıklarla 6 saat boyunca tepkime ortamından, SL+ABTS, örnekler alınarak UV-görünür bölge spektrofotometresinde 466 nm' de absorbens değeri ölçüldü.

Serbest lakkazın metil oranjin rengini giderme yüzdeleri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplandı;

$$\text{Renk Giderme (\%)} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (3.6)$$

eşitliğine göre hesaplandı.

A_0 : t= 0 anındaki absorbens değeri

A_t : t anındaki absorbens değeri

Kontrol deneyleri için denatüre lakkaz, DSL, kullanıldı. Lakkaz denatürasyonu için 10 mL lakkaz çözeltisi bir balona alınarak 100 °C' da su banyosunda 30 dak. boyunca denatüre edildi. Denatüre lakkaz için de renk giderme deneyi yapıldı.

3.14. İmmobilize Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilmesi

54 mL metil oranj çözeltisine ($3,0 \times 10^{-5}$ M), 0,6 g immobilize poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat, P(AAm-AA)/Alj-L, immobilize poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat, P(AAm-IA)/Alj-L, immobilize poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan, P(AAm-AA)/K-kar-L, immobilize poli(akrilamit-itakonik asit)/K-

karragenan, P(AAm-IA)/K-kar-L, eklenerek manyetik karıştırıcıda düşük hızda 30 °C' da inkübe edildi. 0., 15., 30., 45., 60., dakikalarda ve sonra birer saat aralıklarla 6 saat boyunca tepkime ortamından örnekler alınarak UV-görünür bölge spektrofotometresinde 466 nm' de absorbans değeri ölçüldü.

Metil oranjin renginin giderilmesinde ABTS mediyatörünün (0,1 mM) etkisini incelemek amacıyla, 51 mL metil oranjin çözeltisine ($3,2 \times 10^{-5}$ M), 0,6 g immobilize lakkaz ve 3 mL ABTS çözeltisi eklenerek manyetik karıştırıcıda düşük hızda 30 °C' da inkübe edildi. 0., 15., 30., 45., 60., dakikalarda ve sonra birer saat aralıklarla 6 saat boyunca tepkime ortamından, (P(AAm-AA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-IA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-AA)/K-kar-L+ABTS, P(AAm-IA)/K-kar-L+ABTS), örnekler alınarak UV-görünür bölge spektrofotometresinde 466 nm' de absorbans değeri ölçüldü.

Kontrol deneyleri için denatüre immobilize lakkaz, P(AAm-AA)/Alj-DL, P(AAm-IA)/Alj-DL, P(AAm-AA)/K-kar-DL, P(AAm-IA)/K-kar-DL, kullanıldı. 0,6g immobilize lakkaz alınarak üzerine 10 mL asetat tamponu konuldu ve 100 °C' da su banyosunda 30 dak. boyunca denatüre edildi. Denatüre immobilize lakkaz için de renk giderme deneyi yapıldı.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

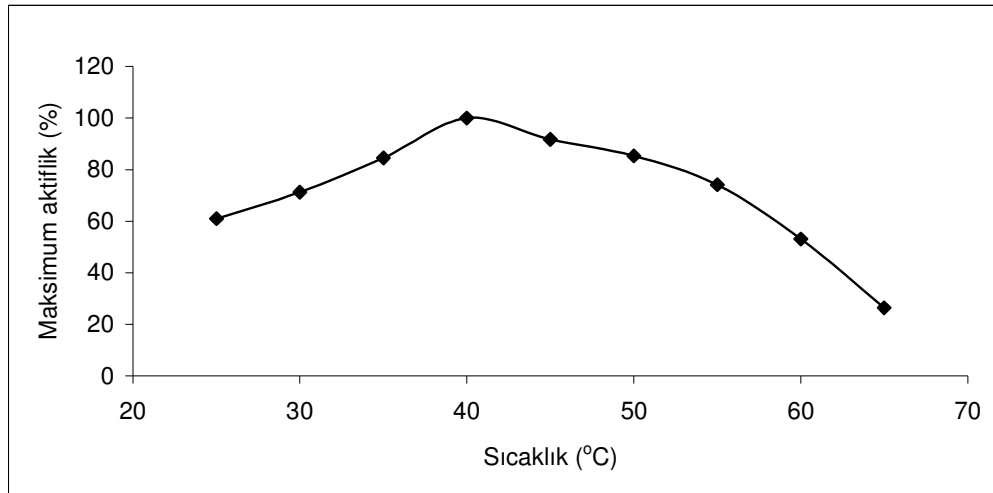
4.1. Serbest Lakkazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Serbest enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5.1' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.1' de verildi. Serbest lakkaz için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.1' de gösterildi.

Serbest lakkaz için optimum sıcaklık 40 °C bulundu, bu sıcaklığın altındaki ve üstündeki sıcaklıklarda enzim aktifliğinde azalmalar gözlemlendi. Bütün kimyasal tepkimelerde olduğu gibi enzimatik tepkimelerde de tepkime hızı sıcaklıkla artar. Ancak yüksek sıcaklıklara çıktığında enzim yapısında meydana gelen denatürasyon nedeni ile aktiflikte düşüş gözlenir [8]. Sıcaklık arttıkça enzim molekülünün önce tersiyer yapısı, sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapısı) bozulur. Bu olaylardan enzimin aktif merkezi de etkilenir ve enzim aktifliğini yitirir [97].

Çizelge 4.1. Serbest lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
25	0,420	6,1	61
30	0,490	7,1	71
35	0,581	8,4	84
40	0,688	9,9	100
45	0,631	9,1	92
50	0,587	8,5	85
55	0,510	7,4	74
60	0,365	5,3	53
65	0,182	2,6	26



Şekil 4.1. Serbest lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi incelendiğinde 35°C - 50°C arasında oldukça geniş bir aralıkta başlangıç aktifliğinin %80 ile %83' ünü koruduğu gözlemlendi. Literatürde, *Cerreana unicolor*' dan elde edilen

lakkazın optimum sıcaklığı 40 °C, *Trametes versicolor* dan elde edilen lakkazın optimum sıcaklığının da 40 °C olduğu bulunmuştur [77,80].

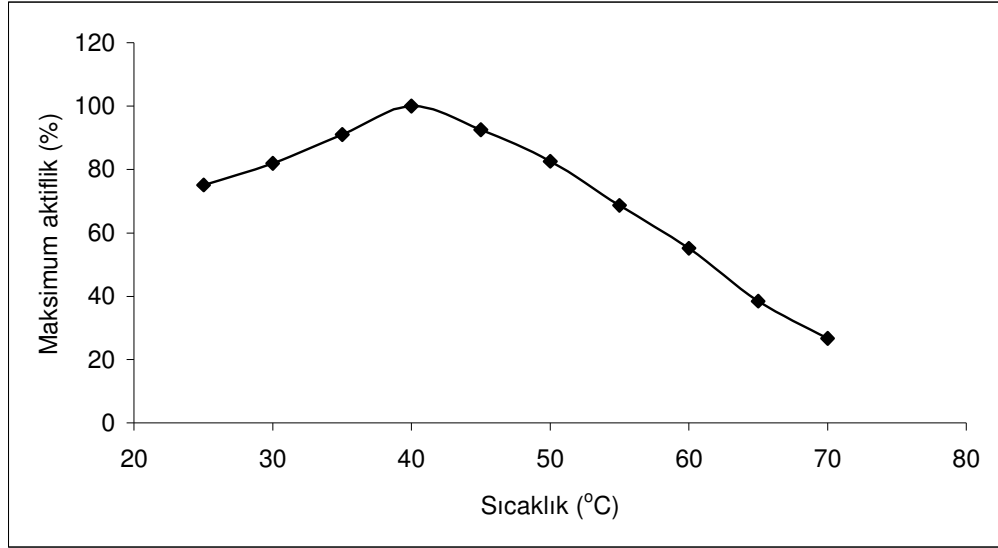
4.2. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

4.2.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.2' de verildi. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 40°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.2' de gösterildi.

Çizelge 4.2. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
25	0,738	9,5	75
30	0,805	10,4	82
35	0,895	11,5	91
40	0,983	12,7	100
45	0,910	11,7	93
50	0,812	10,5	83
55	0,675	8,6	68
60	0,542	6,9	55
65	0,378	4,9	38
70	0,263	3,4	27



Şekil 4.2. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

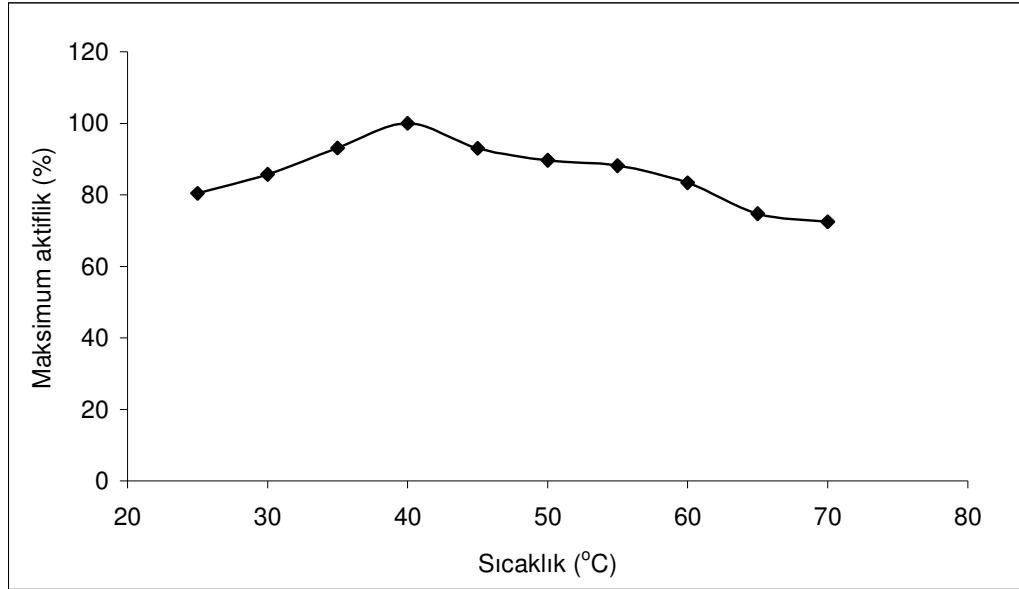
P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi incelendiğinde 30°C - 50°C arasında oldukça geniş bir sıcaklık aralığında başlangıç aktifliğinin %82 - %83' ünü koruduğu gözlemlendi.

4.2.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.3' de verildi. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 40°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.3' de gösterildi.

Çizelge 4.3. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
25	0,863	20,4	80
30	0,920	21,7	86
35	0,999	25,4	93
40	1,073	23,6	100
45	0,998	23,6	93
50	0,962	22,7	89
55	0,946	22,4	88
60	0,895	21,1	83
65	0,802	19,0	74
70	0,778	18,4	72



Şekil 4.3. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

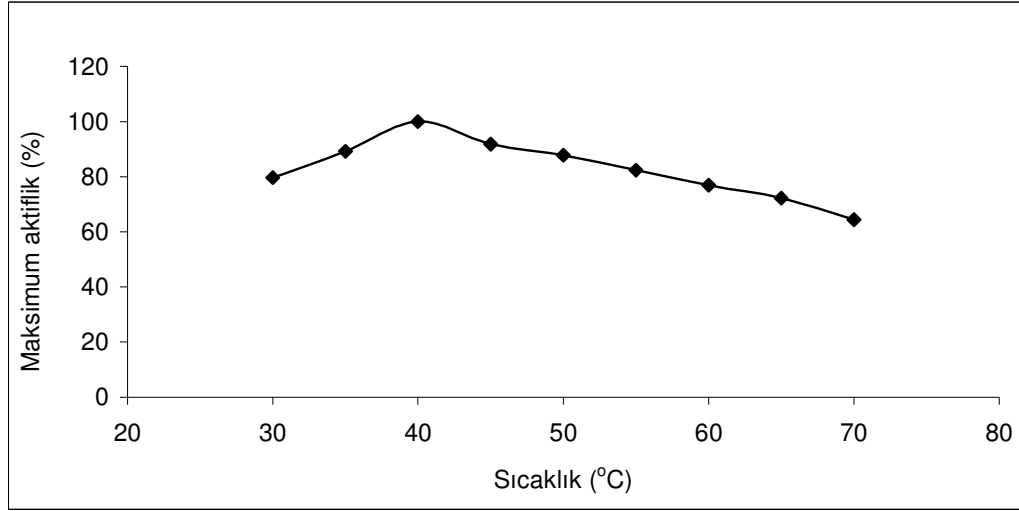
P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi incelendiğinde 25°C - 60°C arasında oldukça geniş bir sıcaklık aralığında başlangıç aktifliğinin %80 - %83' ünü koruduğu gözlemlendi.

4.2.3. Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.4' de verildi. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.4' de gösterildi.

Çizelge 4.4. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
30	0,930	22,0	80
35	1,042	24,6	89
40	1,168	27,6	100
45	1,072	25,3	92
50	1,026	24,2	88
55	0,962	22,7	82
60	0,898	21,2	76
65	0,844	19,9	72
70	0,752	17,8	64



Şekil 4.4. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

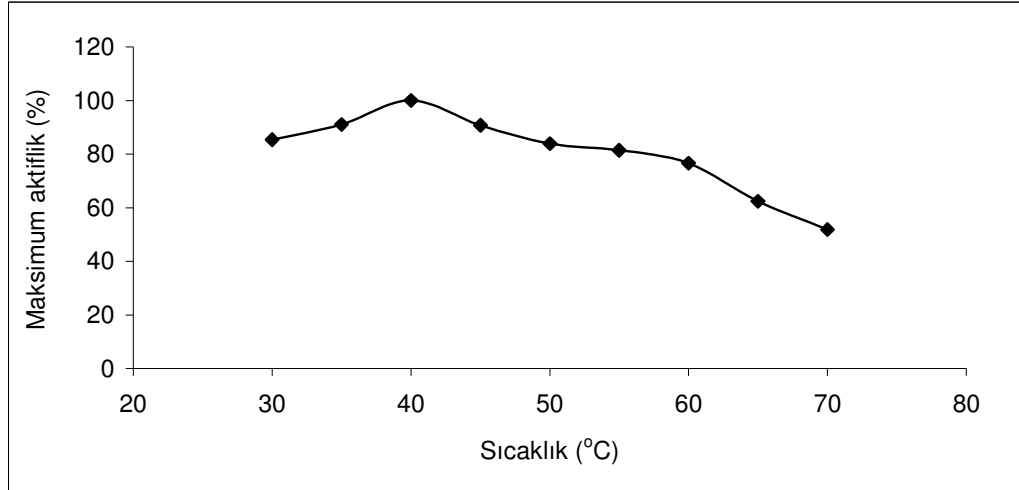
P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi incelendiğinde 30°C - 55°C arasında oldukça geniş bir sıcaklık aralığında başlangıç aktifliğinin %80 - %82' sini koruduğu gözlemlendi.

4.2.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.5' de verildi. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.5' de gösterildi.

Çizelge 4.5. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
30	0,905	21,4	85
35	0,965	22,8	91
40	1,060	25,0	100
45	0,962	22,7	91
50	0,889	21,0	84
55	0,863	20,4	81
60	0,812	19,2	77
65	0,662	15,7	62
70	0,550	13,0	52



Şekil 4.5. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi incelendiğinde 30°C - 55°C arasında oldukça geniş bir sıcaklık aralığında başlangıç aktifliğinin %81 - %85' ini koruduğu gözlemlendi.

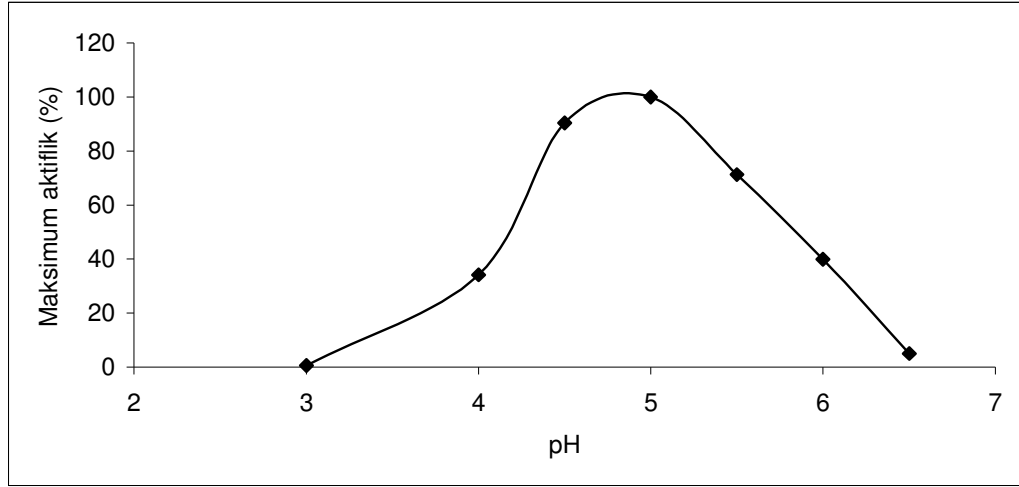
Literatürde, *Lentinula edodes*' den elde edilen lakkaz adsorpsiyonla kitosan üzerine immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 60 °C bulunmuştur [70]. *Trametes hirsuta*' dan elde edilen lakkaz alümina üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edildiğinde optimum sıcaklık 60 °C bulunmuştur [98]. *Pleurotus ostreatus*' dan elde edilen lakkaz, kovalent bağlanma yöntemi ile Eupergite üzerine immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 50 °C olarak bulunmuştur [72]. *Rhus vernicifera*' dan elde edilen lakkaz, glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünebilir kitosan, kitosan mikroküreler ve Fe⁺³ geçiş metali klatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde, optimum sıcaklığı 45 °C olarak belirlenmiştir [84]. *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz, kaolinit üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 50 °C, nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 45 °C, kaolinit ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 45 °C olarak belirlenmiştir [88].

4.3. Serbest Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla çeşitli pH' larda Bölüm 3.5.1' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.6' da verildi. Serbest lakkaz enzimi için optimum pH 5,0 olarak bulundu ve maksimum aktifliğin pH ile değişimi Şekil 4.6' da gösterildi.

Çizelge 4.6. Serbest lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,003	0,01	0,6
4,0	0,177	2,55	34
4,5	0,469	6,77	90
5,0	0,519	7,49	100
5,5	0,370	5,34	71
6,0	0,207	3,00	39
6,5	0,026	0,37	5



Şekil 4.6. Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

Literatürde, *Pycnoporus sanguineus*' dan elde edilen lakkazın optimum pH sı substrat olarak ABTS kullanıldığında 3,0 ve siringaldazin kullanıldığında 5,0 olarak bulunmuştur [65]. Menşei farklı olan lakkaz ve farklı substratlar kullanıldığında optimum pH nın 5,0-6,3 arasında değiştiği belirtilmiştir [75,77].

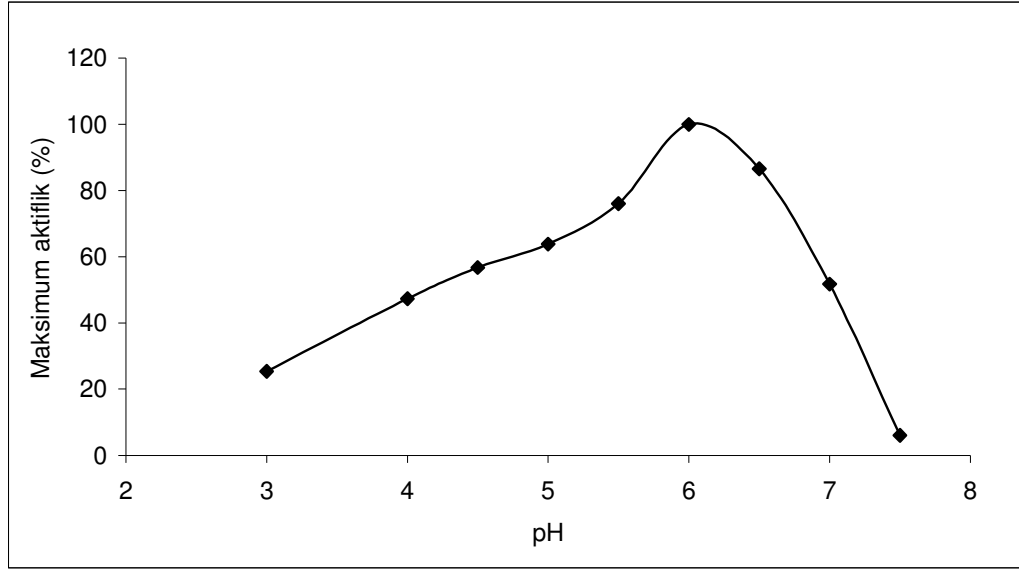
4.4. İmmobilize Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi

4.4.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.7' de verildi. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 6,0 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.7' de gösterildi.

Çizelge 4.7. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,108	1,39	25
4,0	0,201	2,59	47
4,5	0,241	3,10	57
5,0	0,271	3,49	64
5,5	0,323	4,16	76
6,0	0,425	5,47	100
6,5	0,368	4,74	87
7,0	0,220	2,83	52
7,5	0,026	0,33	6



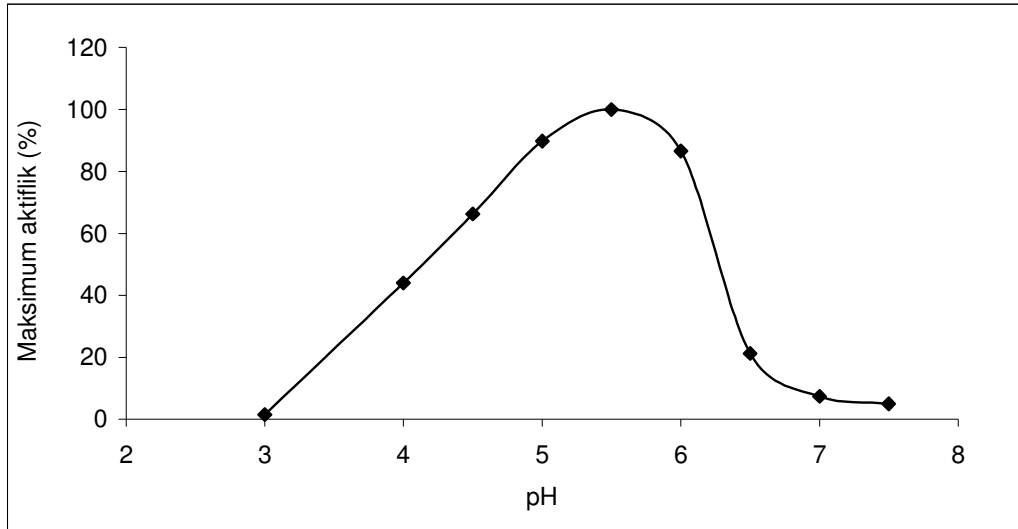
Şekil 4.7. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

4.4.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktivlik değerleri Çizelge 4.8' de verildi. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,5 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.8' de gösterildi.

Çizelge 4.8. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,016	0,4	1
4,0	0,487	11,5	44
4,5	0,734	17,3	66
5,0	0,995	23,5	90
5,5	1,108	26,2	100
6,0	0,959	22,6	86
6,5	0,235	5,6	21
7,0	0,082	1,9	7
7,5	0,055	1,3	5



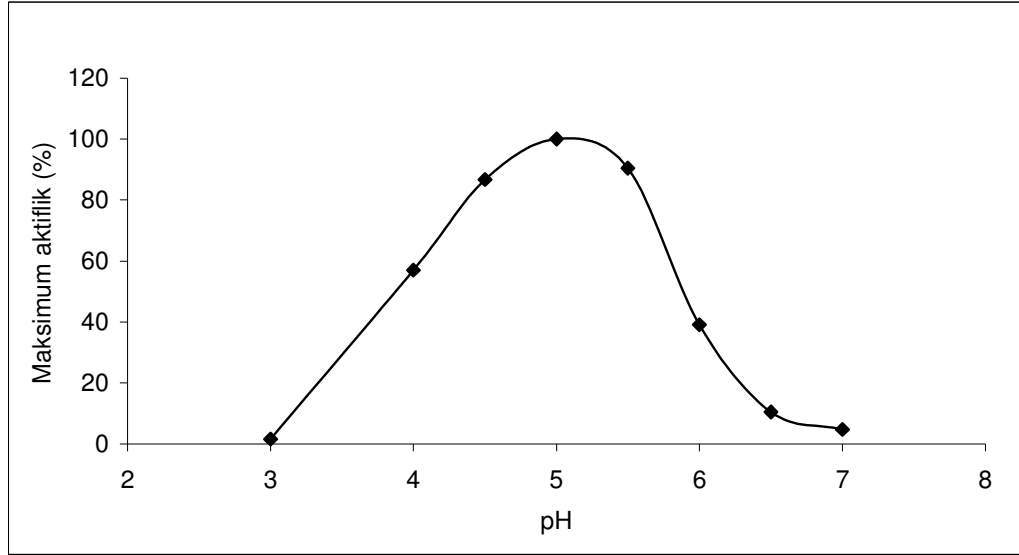
Şekil 4.8. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

4.4.3. Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.9' da verildi. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,0 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.9' da gösterildi.

Çizelge 4.9. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,015	0,4	2
4,0	0,560	13,2	57
4,5	0,852	20,1	87
5,0	0,982	23,2	100
5,5	0,888	21,0	90
6,0	0,384	9,1	39
6,5	0,102	2,4	10
7,0	0,046	1,1	5



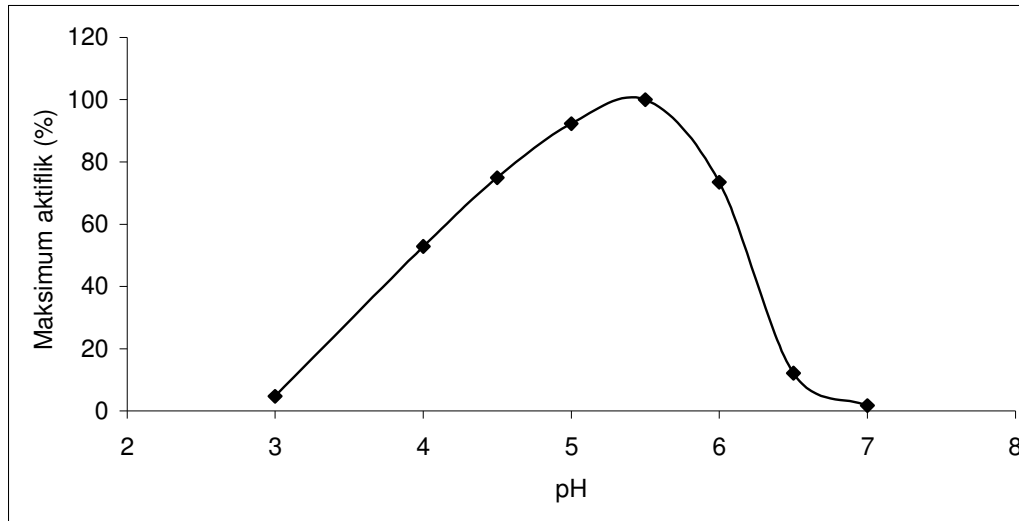
Şekil 4.9. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

4.4.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.10' da verildi. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,5 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.10' da gösterildi.

Çizelge 4.10. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

pH	Absorbans değışimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,048	1,1	5
4,0	0,539	12,7	53
4,5	0,765	18,1	75
5,0	0,942	22,3	92
5,5	1,020	24,1	100
6,0	0,750	17,7	74
6,5	0,124	2,9	12
7,0	0,018	0,4	2



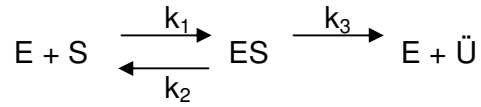
Şekil 4.10. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazın optimum pH' sınırın 5,0 - 6,0 aralığında değıştiği bulundu.

Literatürde, *Trametes hirsuta*' dan elde edilen lakkaz alümina üzerine kovalent bağlama ile immobilize edildiğinde ve substrat olarak DMP (2,6-dimetoksifenol) kullanıldığında optimum pH 4,5 bulunmuştur [98]. *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkaz, gözenekli cam boncuklar üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde optimum pH' sının 5,7 olduğu tespit edilmiştir [69]. *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz, adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile karbon fiber mikro elektrotlar üzerine immobilize edildiğinde optimum pH' sı 5,0 olarak bulunmuştur [76]. *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz, adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile nanopartikül (hegzagonal mezogözenekli silika) ve kaolinit üzerine immobilize edilmiş ve substrat olarak ABTS kullanılmıştır. Kaolinit üzerine adsorpsiyon ile immobilize edilen lakkazın optimum pH' sı 5,5, nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen lakkazın pH' sı 6,0, kaolinit ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen lakkazın optimum pH' sı 6,0 olarak bulunmuştur [88]. *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz, kalsiyum aljinat boncuklara hapsedme yöntemi ile immobilize edilmiş, substrat olarak DMP, ABTS, promazin kullanıldığında optimum pH' nın 5, siringaldazin kullanıldığında ise 5,5 olduğu belirlenmiştir [89]. *Myceliophthora thermophila*' dan elde edilen lakkaz, kovalent bağlanma yöntemi ile epoksi grupları aktifleştirilmiş polimetakrilat bazlı polimerlere(Sepabeads EC-EP3 ve Dilbeads NK) immobilize edilmiş, serbest ve immobilize lakkaz için optimum pH 3 olarak bulunmuştur [60].

4.5. Serbest Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

Enzim – substrat tepkimesi aşağıda verildiği gibi gösterilir



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

$$V_0 = \frac{V_{\text{mak}} \times S}{K_m + S} \quad (4.1)$$

Bu mekanizmaya göre Michaelis-Menten sabiti aşağıda verilmiştir.

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (4.2)$$

V_0 : Başlangıç hızı

V_{mak} : Maksimum hız

K_m : Michaelis-Menten sabiti

S: Substrat derişimi

Michaelis-Menten Eşitliğinin d \ddot{U} zenlenmesi ile Lineweaver-Burk Eşitliği elde edilir:

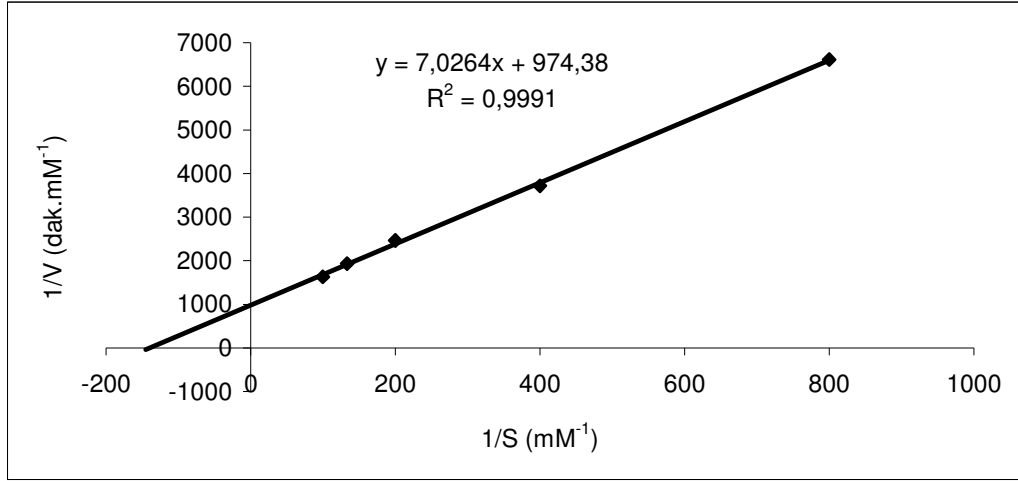
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{mak}}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{mak}}} \quad (4.3)$$

Lineweaver-Burk Eşitliğine göre, $1/S'$ nin $1/V'$ ye karşı çizilen grafiği bir doğru verir. Bu doğrunun y-kayması $1/V_{\text{mak}}$ 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 etkisi incelemek amacıyla 4 farklı derişimde (0,0125mM-0,0750mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 3.5.1' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25 °C) sabit tutuldu. Çizelge 4.11' de verilen $1/S$ ve $1/V$ değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile serbest lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.11). Şekil 4.11' deki Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla, serbest lakkazın K_m değeri 0,0073 mM ve V_{mak} değeri $1,04 \times 10^{-3} \text{ mM.dak}^{-1}$ olarak bulundu.

Çizelge 4.11. Serbest lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S (mM^{-1})	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	1/V (dak.mM $^{-1}$)
10,0	100,0	0,260	6,14	1628
7,50	133,3	0,219	5,18	1929
5,00	200,0	0,172	4,07	2456
2,50	400,0	0,114	2,70	3697
1,25	800,0	0,064	1,51	6635



Şekil 4.11. Serbest lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği

Literatürde, *Lentinula edodes*' ten elde edilen lakkazın K_m değerini substrat olarak DMP kullanıldığında 0,07 mM olarak bulunmuştur [73]. *Rhus vernicifera*' dan elde edilen lakkaz için K_m ve V_{mak} değerleri sırası ile 0, 20 mM ve $0,37 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulunmuştur [94].

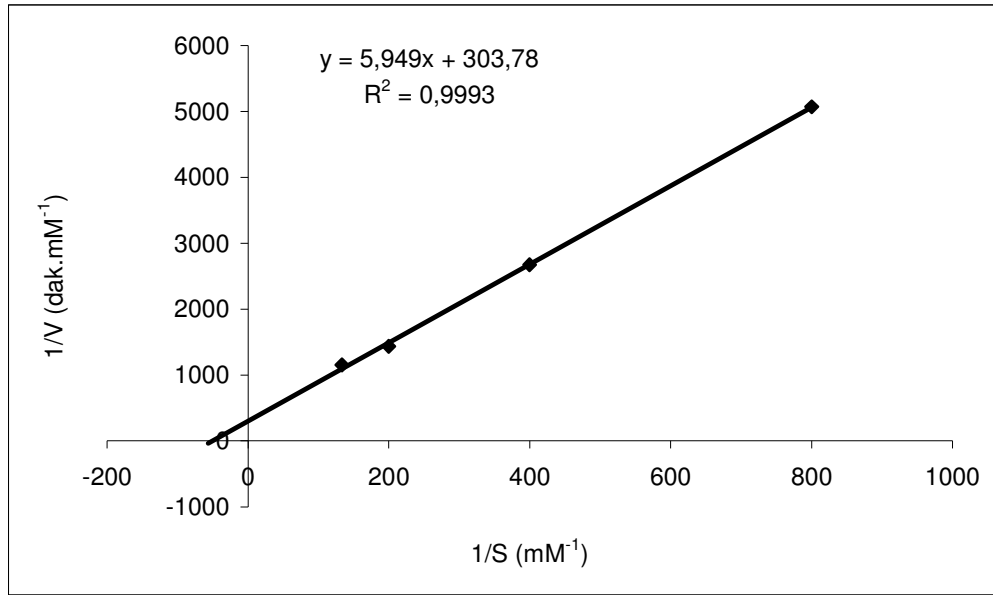
4.6. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

4.6.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Çizelge 4.12' de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.12). P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için K_m değeri 0,0196 mM ve V_{mak} değeri $3,29 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 4.12. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişimi etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S (mM^{-1})	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	1/V (dak.mM $^{-1}$)
7,50	133,3	0,672	8,66	1150
5,00	200,0	0,541	6,97	1434
2,50	400,0	0,290	3,74	2675
1,25	800,0	0,153	1,97	5071



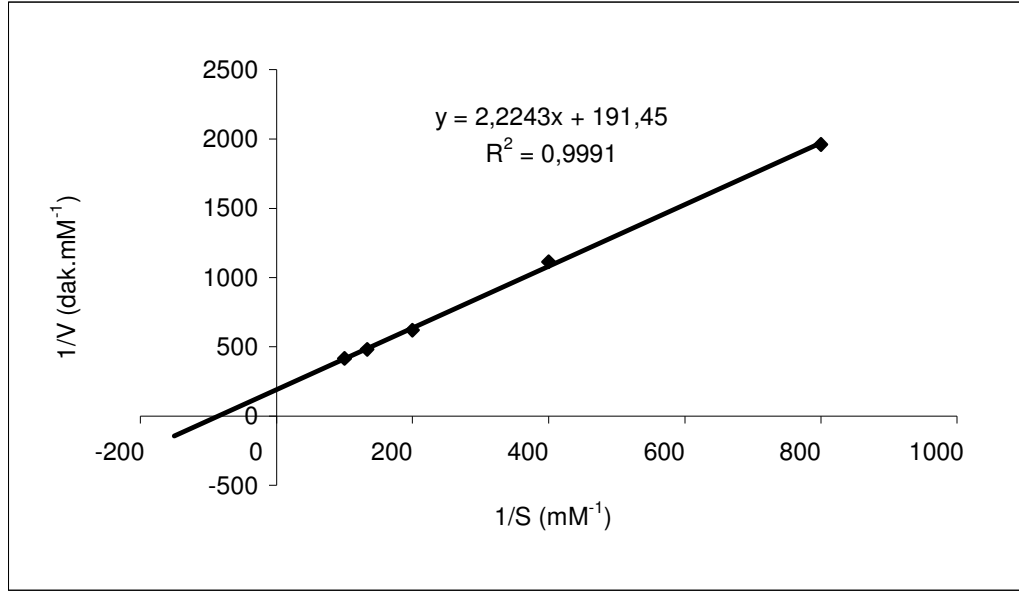
Şekil 4.12. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

4.6.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljnat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Çizelge 4.13' de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.13). P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için K_m değeri 0,0116mM ve V_{mak} değeri $5,22 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 4.13. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişimi etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S (mM ⁻¹)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	1/V (dak.mM ⁻¹)
10,00	100,0	1,016	24,0	416
7,50	133,3	0,881	20,8	480
5,00	200,0	0,683	16,1	620
2,50	400,0	0,380	8,9	1114
1,25	800,0	0,216	5,1	1960



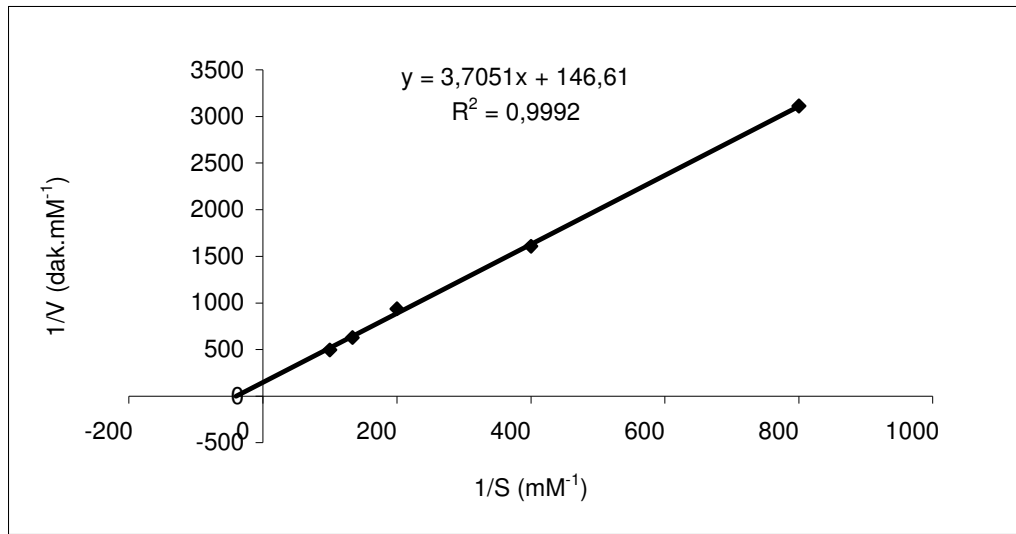
Şekil 4.13. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

4.6.3. Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Çizelge 4.14' de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.14). P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için K_m değeri 0,0252 mM ve V_{mak} değeri $6,80 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 4.14. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktivliğine substrat derişimi etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S (mM^{-1})	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	1/V (dak.mM $^{-1}$)
10,00	100,0	0,851	20,1	498
7,50	133,3	0,675	15,9	627
5,00	200,0	0,451	10,6	938
2,50	400,0	0,263	6,2	1609
1,25	800,0	0,136	3,2	3112



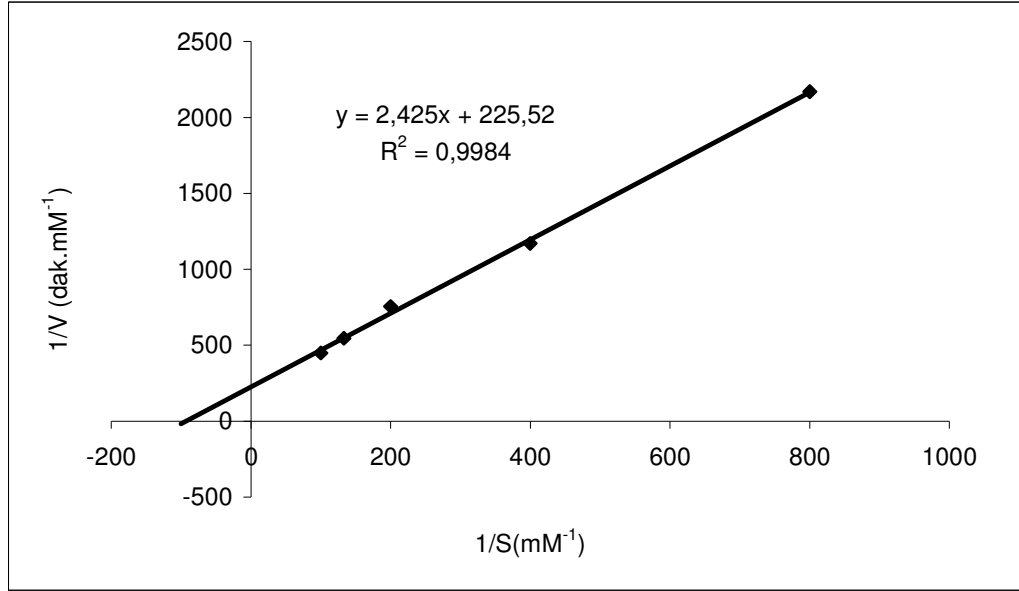
Şekil 4.14. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

4.6.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Çizelge 4.15' de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.15). P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için K_m değeri 0,0108 mM ve V_{mak} değeri $4,40 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 4.15. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişimi etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S (mM ⁻¹)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	1/V (dak.mM ⁻¹)
10,00	100,0	0,945	22,3	447
7,50	133,3	0,775	18,3	546
5,00	200,0	0,561	13,2	754
2,50	400,0	0,362	8,5	1169
1,25	800,0	0,195	4,6	2170



Şekil 4.15. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

Substrat ve polimerik destek arasındaki etkileşmeyle, substrat-enzim kompleks oluşumunun ihtimalini düşüren enzimdeki yapısal değişmelerle, sterik etkilerle, difüzyonel sınırlamalarla K_m değişebilir. K_m sabiti enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür. Deney sonuçlarında enzim immobilize edildiğinde K_m değerinin arttığı yani enzimin substrata olan ilgisinin azaldığı görülmektedir.

Literatürde *Lentinula edodes*' ten elde edilen lakkazın K_m sabiti $77 \mu\text{M}$, kitosana immobilize edildiğinde $256 \mu\text{M}$ olarak bulmuşlardır [70]. *Lentinula edodes*' den elde edilen lakkaz eupergite üzerine immobilize edildiğinde K_m nin $0,150 \text{ mM}$ olduğunu tespit etmişler [73]. *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazın kaolinit üzerine immobilize ettiklerinde ABTS substratını kullanarak K_m değerini $0,165 \text{ mM}$ olarak bulmuşlardır [80].

Serbest lakkaz ve immobilize lakkazlar için K_m ve V_{mak} değerleri toplu olarak Çizelge 4.16' da gösterildi.

Çizelge 4.16. Serbest ve immobilize lakkazlar için K_m ve V_{mak} değerleri

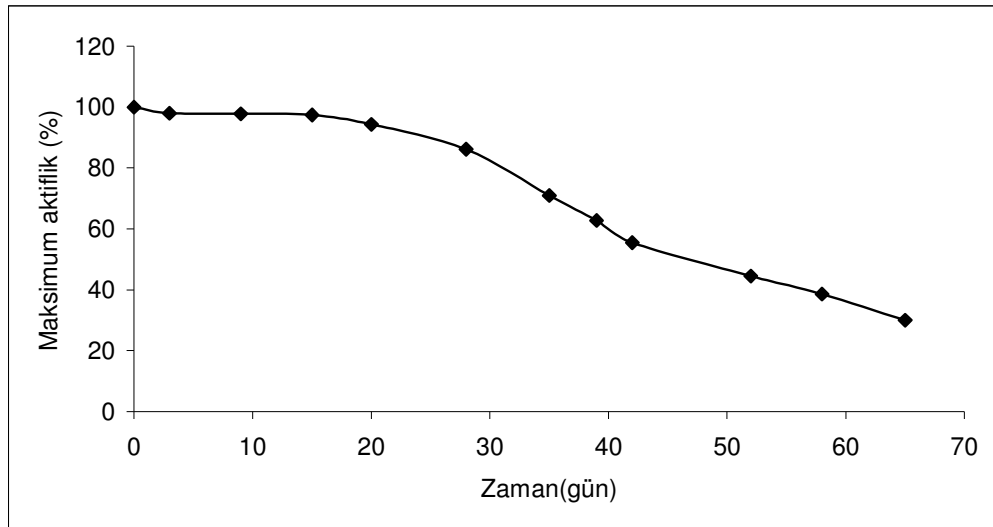
Serbest ve immobilize lakkaz	K_m (mM)	V_{mak} (mM.dak ⁻¹)
Serbest lakkaz	0,0073	$1,04 \times 10^{-3}$
P(AAm-AA)/Alj-L	0,0196	$3,29 \times 10^{-3}$
P(AAm-IA)/Alj-L	0,0116	$5,22 \times 10^{-3}$
P(AAm-AA)/K-kar-L	0,0252	$6,80 \times 10^{-3}$
P(AAm-IA)/K-kar-L	0,0108	$4,40 \times 10^{-3}$

4.7. Serbest Enzimin Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla, 4°C' de saklanan lakkaz çözeltilerinin 65 gün boyunca Bölüm 3.5.1' de anlatıldığı gibi aktiflikleri tayin edildi. Serbest enzimin maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.17 ve Şekil 4.16' da gösterildi.

Çizelge 4.17. Serbest lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,586	15,0	100
3	0,574	14,7	98
9	0,573	14,7	98
15	0,571	14,6	97
20	0,553	14,1	94
28	0,505	12,9	86
35	0,416	10,7	70
39	0,368	9,4	63
42	0,325	8,3	55
52	0,261	6,7	44
58	0,226	5,8	38
65	0,176	4,5	30



Şekil 4.16. Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Serbest lakkazın 4 °C' da 65 gün boyunca depolanması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 30' unu koruduğu gözlemlendi.

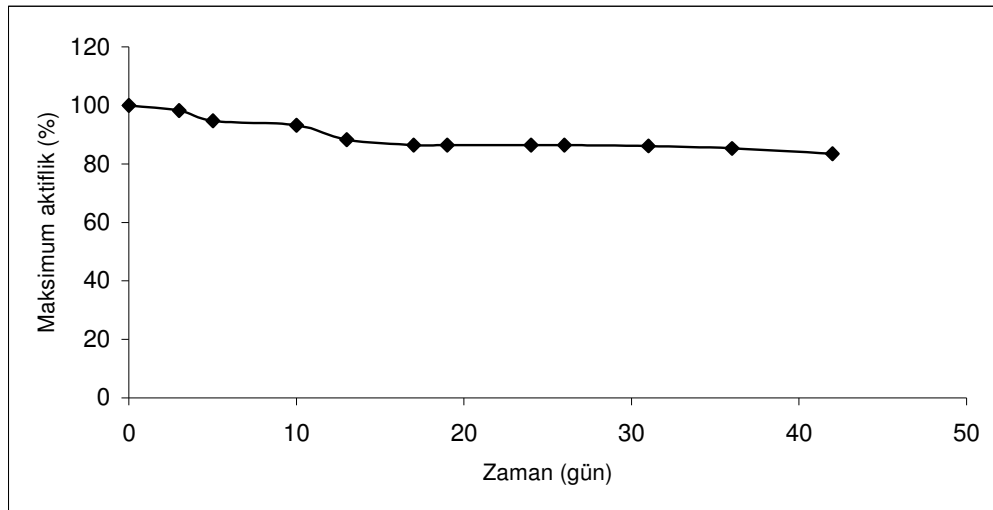
4.8. İmmobilize Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

4.8.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4 °C' de saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 42 gün boyunca Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.18 ve Şekil 4.17' de gösterildi.

Çizelge 4.18. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,805	10,4	100
3	0,791	10,2	98
5	0,763	9,8	97
10	0,750	9,6	93
13	0,711	9,2	88
17	0,696	8,9	86
19	0,696	8,9	86
24	0,696	8,9	86
26	0,696	8,9	86
31	0,693	8,8	86
36	0,687	8,7	85
42	0,672	8,6	83



Şekil 4.17. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

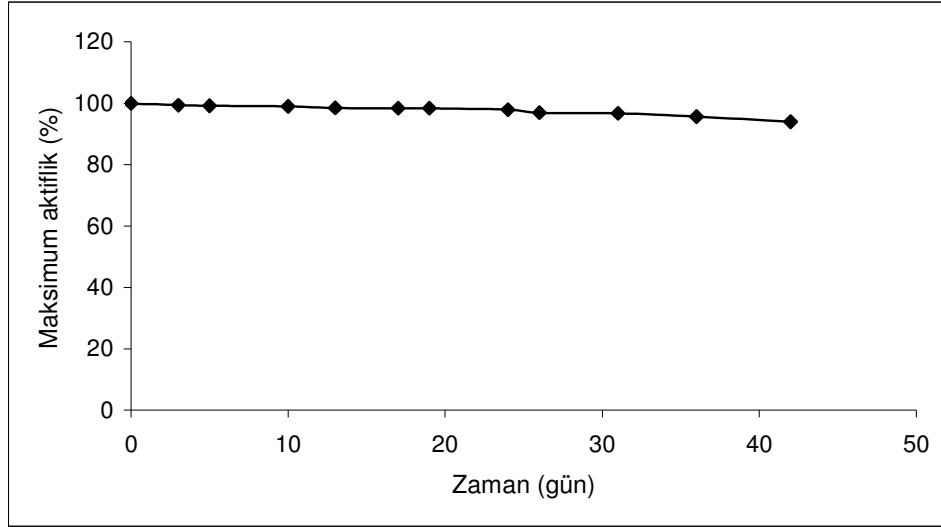
İmmobilize lakkazın 4 °C' de 42 gün depolanması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 83' ünü koruduğu gözlemlendi.

4.8.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4 °C' de saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 42 gün boyunca Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.19 ve Şekil 4.18' de gösterildi.

Çizelge 4.19. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,996	23,5	100
3	0,990	23,4	99
5	0,988	23,3	99
10	0,986	23,3	98
13	0,981	23,2	98
17	0,980	23,1	98
19	0,980	23,1	98
24	0,975	23,0	97
26	0,965	22,8	96
31	0,963	22,7	96
36	0,953	22,5	95
42	0,936	22,1	94



Şekil 4.18. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

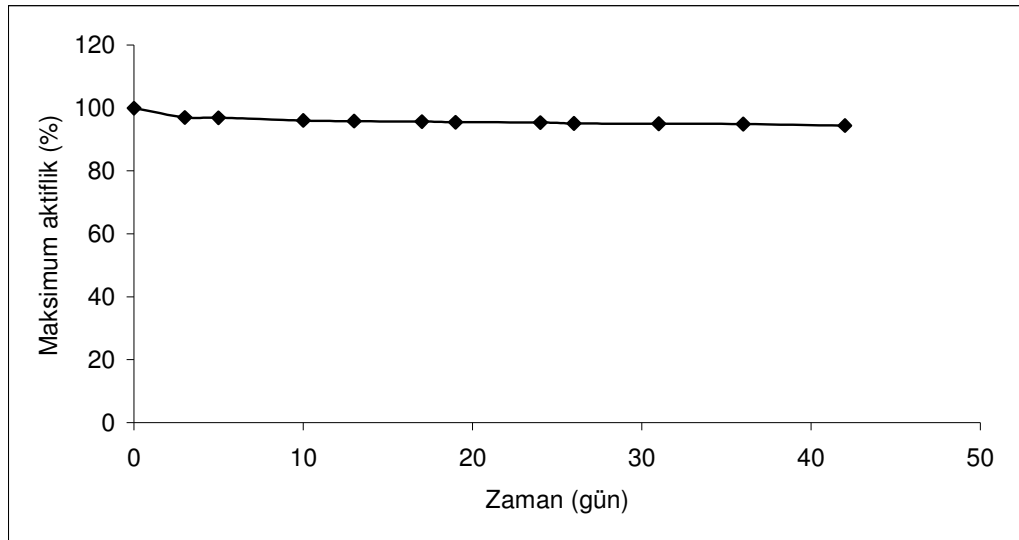
İmmobilize lakkazın 4 °C' de 42 gün depolanması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 94' ünü koruduğu gözlemlendi.

4.8.3. Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4 °C' de saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 42 gün boyunca Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.20 ve Şekil 4.19' da gösterildi.

Çizelge 4.20. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,995	23,5	100
3	0,965	22,8	97
5	0,964	22,7	97
10	0,956	22,6	96
13	0,954	22,5	96
17	0,952	22,4	95
19	0,950	22,4	95
24	0,949	22,4	95
26	0,946	22,3	95
31	0,945	22,3	94
36	0,944	22,3	94
42	0,940	22,2	94



Şekil 4.19. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

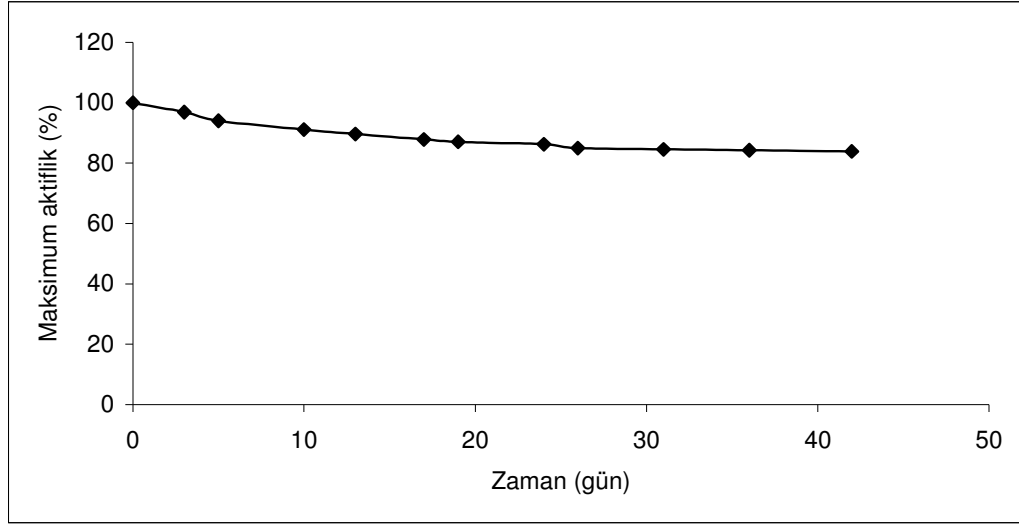
İmmobilize lakkazın 4 °C' de 42 gün depolanması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 94' ünü koruduğu gözlemlendi.

4.8.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4 °C' de saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 42 gün boyunca Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.21 ve Şekil 4.20' de gösterildi.

Çizelge 4.21. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,960	22,7	100
3	0,930	21,9	97
5	0,903	21,3	94
10	0,875	20,7	91
13	0,861	20,3	89
17	0,843	19,9	88
19	0,836	19,8	87
24	0,828	19,6	86
26	0,816	19,3	85
31	0,812	19,2	84
36	0,809	19,1	84
42	0,805	19,0	83



Şekil 4.20. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

İmmobilize lakkazın 4 °C' de 42 gün depolanması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 83' ünü koruduğu gözlemlendi.

Serbest lakkaz 4 °C' da depolandığında, 42. günde başlangıç aktifliğinin %55' ini korurken, immobilize lakkazlar aynı koşullarda depolandıklarında, 42. günde başlangıç aktifliklerinin % 83 - % 94 ' ünü korudukları gözlemlendi. İmmobilizasyonla, uygun saklama koşullarında lakkazın aktifliğini kaybetmeden uzun süre koruduğu sonucuna ulaşıldı.

Literatürde, *Pleurotus ostreatus*' dan elde edilen lakkazın, 25 °C' da 10 gün boyunca depolanması sonucu aktifliğini kaybettiği, kovalent bağlamayla euperjit üzerine immobilize edildiğinde, aynı şartlarda depolanması sonucu başlangıç aktifliğinin yaklaşık % 2' sini kaybettiği gözlenmiştir [72]. *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazın, 4 °C' da 4 ay depolandığında başlangıç aktifliğinin % 90' ını kaybettiği, kaolinit üzerine immobilize edildiğinde, aynı şartlarda depolanması sonucu aktifliğinde kayıp olmadığı gözlenmiştir [80]. *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkaz DEAE-Granocel 500 üzerine immobilize edildiğinde 4 °C' da 4 ay depolandıktan sonra başlangıç

aktifliğinin %98' ini koruduğu gözlenmiştir [77]. *Rhus vernicifera*' dan elde edilen lakkaz, glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünen kitosan, kitosan mikroküreler ve Fe⁺³ geçiş metali kelatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde, 4 °C' de 3 ay sonunda kelat üzerine immobilize edilmiş lakkaz ve suda çözünebilen kitosan üzerine immobilize edilmiş lakkazın başlangıç aktifliğinin %10' unu kaybettiğini, mikro küreler üzerine immobilize edilmiş lakkazın ise aktifliğinin %15' ini kaybettiği bulunmuştur [84].

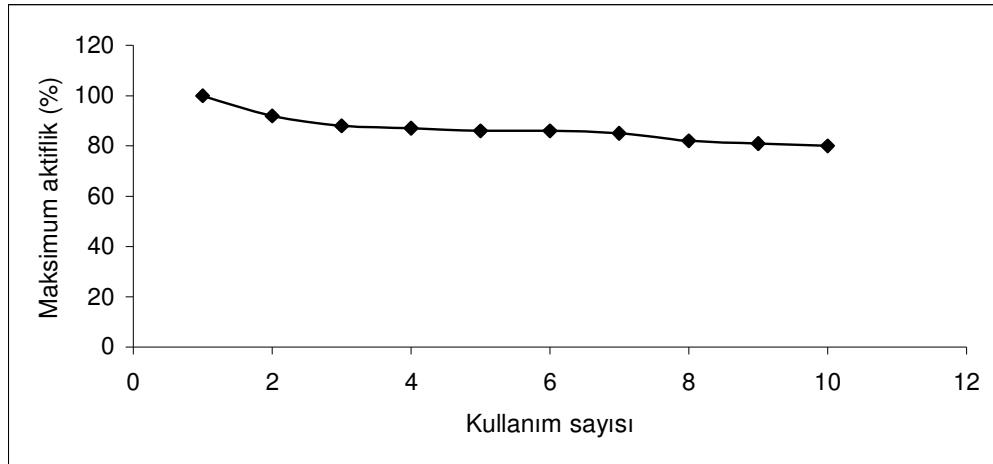
4.9. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

4.9.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 10 kez kullanılarak Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi aktifliği tayin edildi. İmmobilize lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 4.22 ve Şekil 4.21' de gösterildi.

Çizelge 4.22. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4} \text{mM.dak}^{-1}$)	Maksimum aktiflik (%)
1	0,602	7,76	100
2	0,301	7,14	92
3	0,364	6,82	88
4	0,332	6,80	87
5	0,478	6,73	86
6	0,479	6,71	86
7	0,455	6,66	85
8	0,412	6,37	82
9	0,431	6,34	81
10	0,517	6,22	80



Şekil 4.21. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

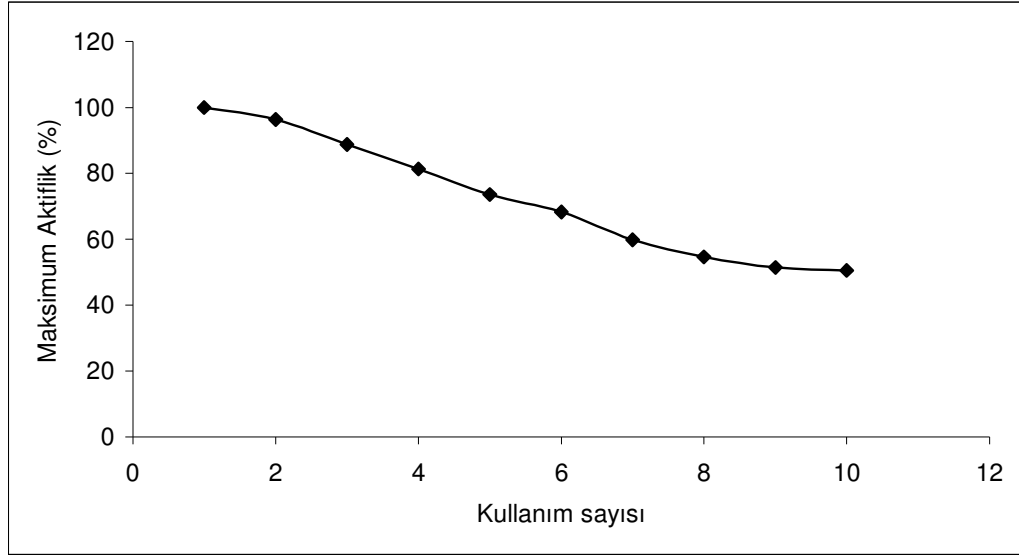
İmmobilize lakkazın 10 kez kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin %80' ini koruduğu gözlemlendi.

4.9.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 10 kez kullanılarak Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi aktifliği tayin edildi. Immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 4.23 ve Şekil 4.22' da gösterildi.

Çizelge 4.23. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4} \text{mM.dak}^{-1}$)	Maksimum aktiflik (%)
1	0,889	21,0	100
2	0,856	20,2	96
3	0,789	18,6	88
4	0,723	17,1	81
5	0,654	15,5	74
6	0,607	14,3	68
7	0,532	12,6	60
8	0,486	11,5	55
9	0,457	10,8	51
10	0,449	10,6	50



Şekil 4.22. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

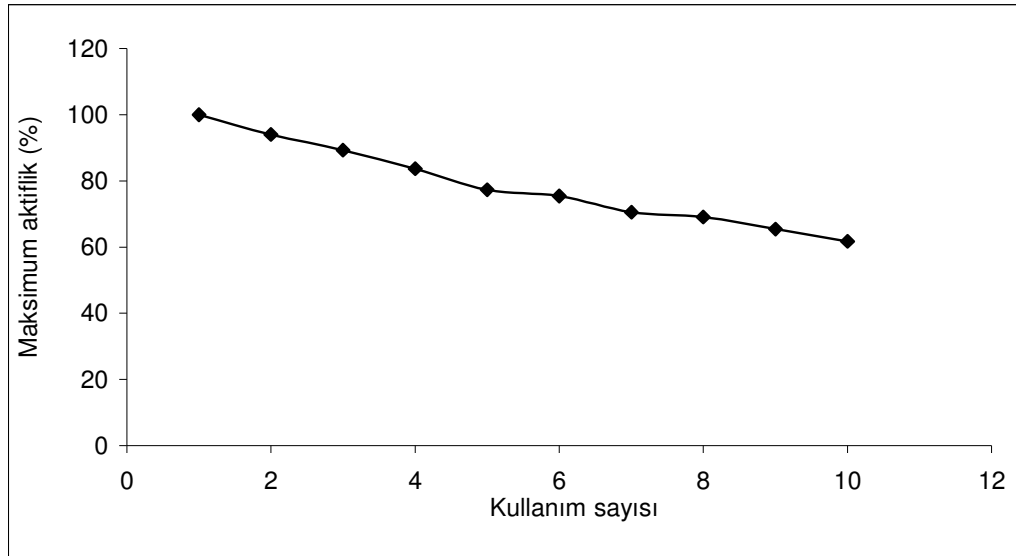
İmmobilize lakkazın 10 kez kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin %50' sini koruduğu gözlemlendi.

4.9.3. Poli(akrilamid-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 10 kez kullanılarak Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi aktifliği tayin edildi. İmmobilize lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 4.24 ve Şekil 4.23' de gösterildi.

Çizelge 4.24. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4} \text{mM.dak}^{-1}$)	Maksimum aktiflik (%)
1	0,953	22,5	100
2	0,896	21,2	94
3	0,851	20,1	89
4	0,798	18,9	84
5	0,737	17,4	77
6	0,719	16,9	75
7	0,672	15,8	70
8	0,658	15,5	69
9	0,624	14,7	65
10	0,588	13,8	62



Şekil 4.23. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

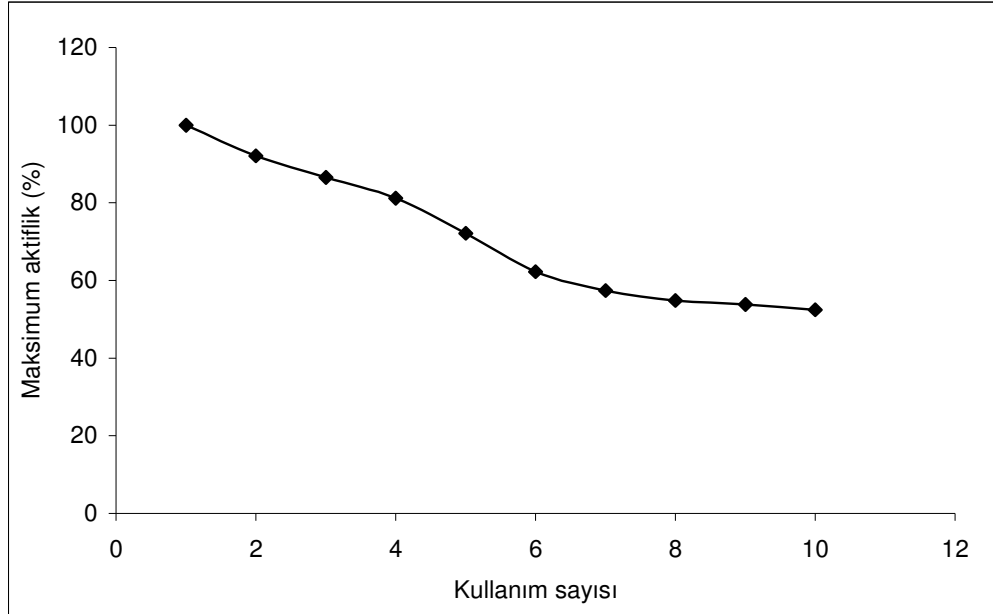
İmmobilize lakkazın 10 kez kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin %62' sini koruduğu gözlemlendi.

4.9.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 10 kez kullanılarak Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi aktifliği tayin edildi. Immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 4.25 ve Şekil 4.24' de gösterildi.

Çizelge 4.25. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4} \text{mM.dak}^{-1}$)	Maksimum aktiflik (%)
1	1,041	24,6	100
2	0,959	22,6	92
3	0,901	21,3	87
4	0,845	19,9	81
5	0,751	17,7	72
6	0,648	15,3	62
7	0,597	14,1	57
8	0,571	13,5	55
9	0,560	13,2	54
10	0,546	12,9	52



Şekil 4.24. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

İmmobilize lakkazın 10 kez kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin %52' sini koruduğu gözlemlendi.

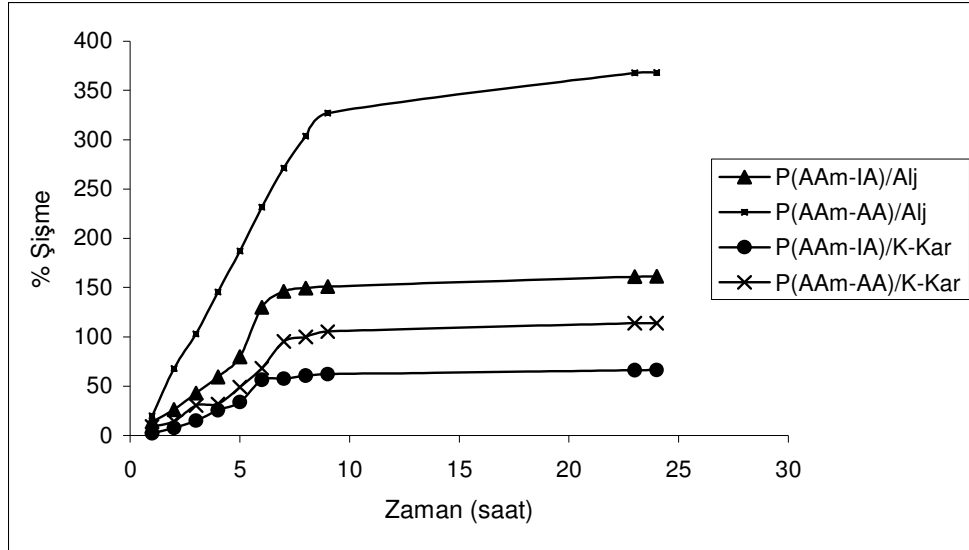
Literatürde, *Rhus vernicifera*' dan elde edilen lakkaz, glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünen kitosan, kitosan mikroküreler ve Fe^{+3} geçiş metali kelatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde, 15 kullanım sonunda başlangıç aktifliğinin %80 – %85' ini koruduğu gözlemlenmiştir [84]. *Panus conchatus*' dan elde edilen lakkaz, aktive edilmiş karboksillenmiş PVA üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edildiğinde 10 kullanımdan sonra başlangıç aktifliğinin %60 ını koruduğu belirtilmiştir [78].

4.10. Hidrojellerin Denge Şişme Değerleri

P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinin şişme yüzdelerinin zamanla Çizelge 4.26' da verildi ve bu değerler Şekil 4.25' de grafiğe geçirildi.

Çizelge 4.26. Hidrojellerin % şişme değerlerinin zamanla değişimi

Zaman (saat)	% Şişme P(AAm-IA)/Alj	% Şişme P(AAm-AA)/Alj	% Şişme P(AAm-IA)/K-kar	% Şişme P(AAm-AA)/K-kar
1	13,6	19,7	2,0	9,13
2	26,1	67,8	7,5	14,4
3	42,9	103,0	14,8	30,4
4	59,5	145,6	25,5	31,9
5	79,7	187,0	33,8	49,0
6	130,1	231,7	56,2	68,3
7	146,1	271,2	57,5	95,4
8	149,6	303,5	60,5	100,0
9	150,9	326,9	62,0	105,3
23	161,0	367,8	66,0	113,8
24	161,2	367,9	66,3	113,8



Şekil 4.25. Hidrojellerin % şişmelerinin zamana karşı değişimi

Hidrojellerin şişme özelliğini etkileyen en önemli faktörlerden biri çapraz bağlanma oranıdır. Yüksek çapraz bağlı hidrojellerin yapıları daha sıkıdır ve düşük çapraz bağ oranlarına sahip olan hidrojellere göre daha az şişerler. Çapraz bağlanma polimer zincirinin hareketini engellemekte ve bunun

sonucunda da hidrojelin şişme oranı azalmaktadır. Hidrofilik gruplara sahip olan hidrojeller, hidrofobik grup içerenlerle kıyaslandığında daha yüksek derecede şişerler. Hidrofobik gruplar, suyun bulunduğu ortamlarda kendi içlerine kapanarak su moleküllerinin yapıya nüfuz etmesine engel olurlar. İyonik hidrojeller, yapılarında bulunan iyonik ağ yapılardan dolayı şişerler. Uygun pH ve iyonik şiddetteki sulu ortamda bu gruplar iyonize olur ve jelde sabit yükler meydana getirirler. Bu da ağ yapının artan hidrofilik özelliğe sahip olmasına neden olur ve yüksek şişme oranları elde edilir [99]. Hidrojellerin % şişme değerlerinin zamanla önce arttığı ve 24 saat civarında sabit bir değere ulaştığı gözlemlendi. P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-Kar, P(AAm-IA)/K-Kar hidrojelleri için denge şişme yüzdeleri sırasıyla; % 367,9, % 161,2, % 113,8, % 66,3 olarak bulundu. Bulunan sonuçlara göre; aljinat içeren hidrojellerin K-karragenan içeren hidrojellere göre daha çok şiştiği görüldü. Bunun nedeni aljinatın yapısında bulunan iyonik grupların, K-karragenandan daha fazla olmasıyla açıklanabilir. İyonik grupları fazla olan hidrojellerde artan elektrostatik itmeye bağlı olarak şişme oranlarının arttığı gözlemlendi. İtakonik asit içeren hidrojellerin, akrilik asit içeren hidrojellere göre yapısında daha çok hidrofilik grup bulunmasıyla şişme değerlerinin artması beklenir. Ancak itakonik asit içeren hidrojeller hazırlanırken çapraz bağlayıcı oranının, akrilik asit içeren hidrojellere göre yaklaşık 2,5 kat daha fazla konulmasından dolayı itakonik asit içeren hidrojellerin daha az şiştikleri görüldü.

4.11. İmmobilize Lakkazın Termal İnaktivasyonu

4.11.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal inaktivasyonu

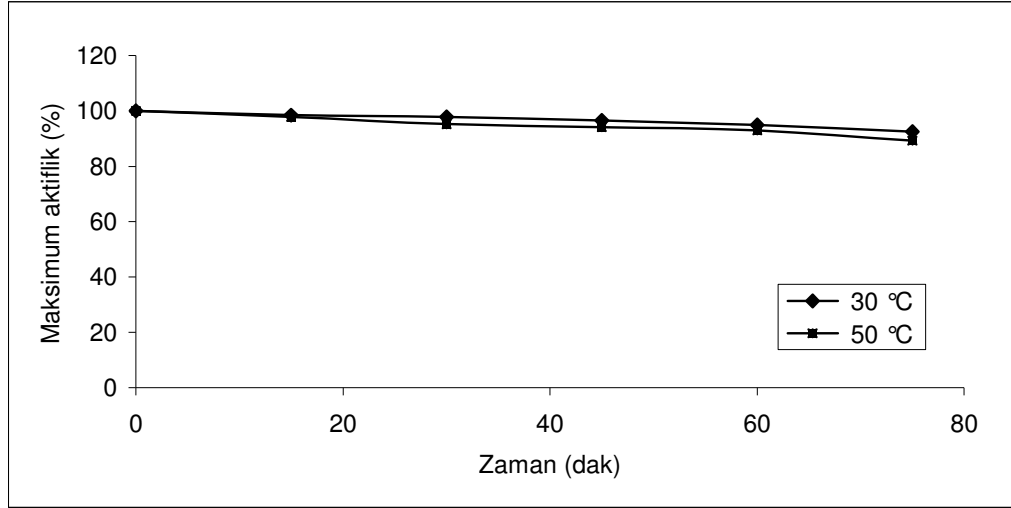
P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla Bölüm 3.12.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri 30 °C için Çizelge 4.27' de, 50 °C için Çizelge 4.28' de verildi.

Çizelge 4.27. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 30 °C'da termal kararlılığı

Zaman (dak)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,954	22,5	100
15	0,940	22,2	99
30	0,920	21,7	98
45	0,908	21,5	97
60	0,892	21,1	95
75	0,870	20,6	93

Çizelge 4.28. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 50 °C' da termal kararlılığı

Zaman (dak.)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,952	22,5	100
15	0,932	22,0	98
30	0,907	21,4	95
45	0,897	21,2	94
60	0,885	21,0	93
75	0,850	20,1	89



Şekil 4.26. P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi

Şekil 4.26' da görüldüğü gibi P(AAm-AA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için 30 °C ve 50 °C' de 75 dak. sonunda başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %93 ve %89' unu koruduğu gözlemlendi.

4.11.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal inaktivasyonu

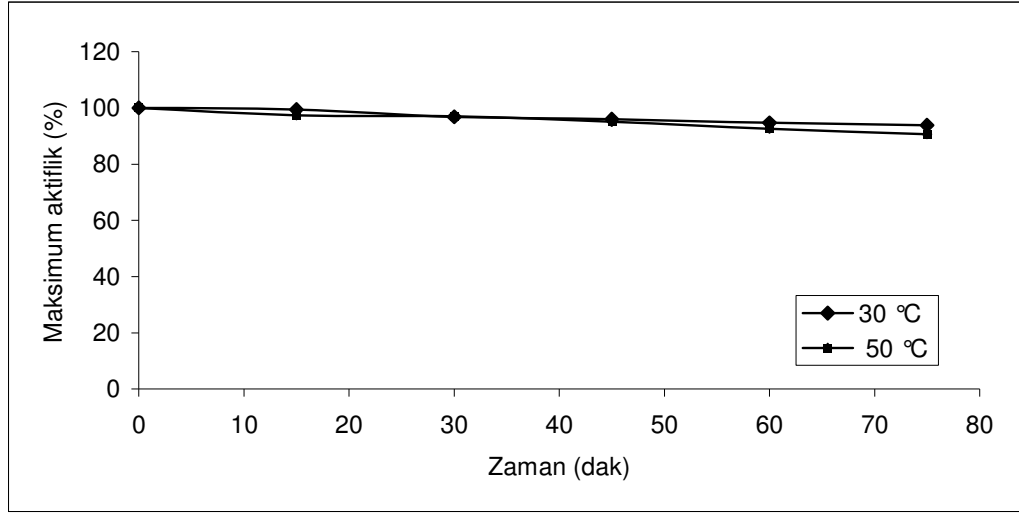
P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla Bölüm 3.12.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri 30 °C için Çizelge 4.29' da, 50 °C için Çizelge 4.30' da verildi.

Çizelge 4.29. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 30 °C' da termal kararlılığı

Zaman (dak)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,912	21,6	100
15	0,906	21,4	99
30	0,883	21,2	96
45	0,875	21,1	95
60	0,864	20,4	94
75	0,856	20,2	93

Çizelge 4.30. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 50 °C' da termal kararlılığı

Zaman (dak)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	1,015	24,0	100
15	0,988	23,3	97
30	0,985	23,2	97
45	0,965	22,8	95
60	0,940	22,2	93
75	0,920	21,7	91



Şekil 4.27. P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi

Şekil 4.27' de görüldüğü gibi P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için 30 °C ve 50 °C' de 75 dak. sonunda başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %93 ve %91' ini koruduğu gözlemlendi.

4.11.3. Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal inaktivasyonu

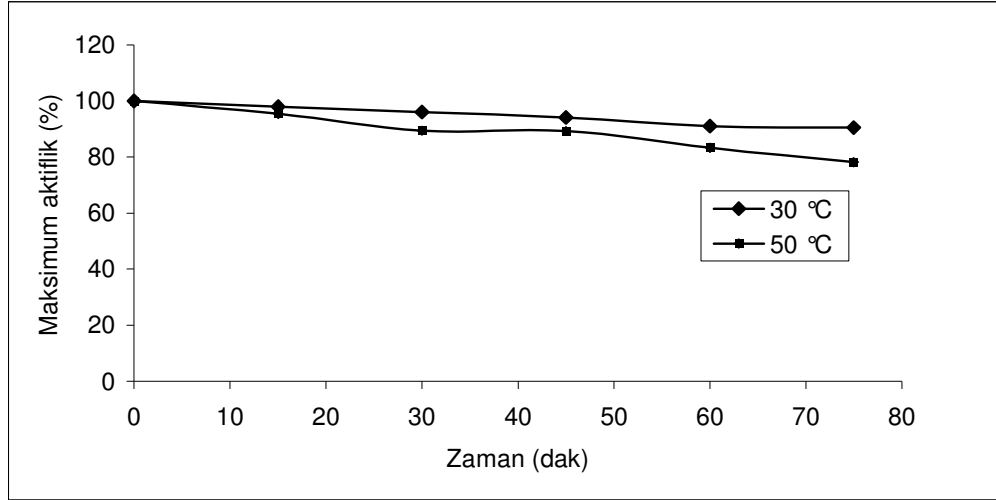
P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla Bölüm 3.12.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri 30 °C için Çizelge 4.31' de, 50 °C için Çizelge 4.32' de verildi.

Çizelge 4.31. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 30°C' da termal kararlılığı

Zaman (dak)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,870	21,1	100
15	0,852	20,1	98
30	0,835	19,7	96
45	0,819	19,4	94
60	0,792	18,7	91
75	0,787	18,6	90

Çizelge 4.32. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 50°C' da termal kararlılığı

Zaman (dak)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,885	20,9	100
15	0,844	19,9	95
30	0,791	18,7	89
45	0,790	18,6	89
60	0,737	17,4	83
75	0,692	16,4	78



Şekil 4.28. P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi

Şekil 4.28' de görüldüğü gibi P(AAm-AA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için 30 °C ve 50 °C' de 75 dak. sonunda başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %90 ve %78' ini koruduğu gözlemlendi.

4.11.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal inaktivasyonu

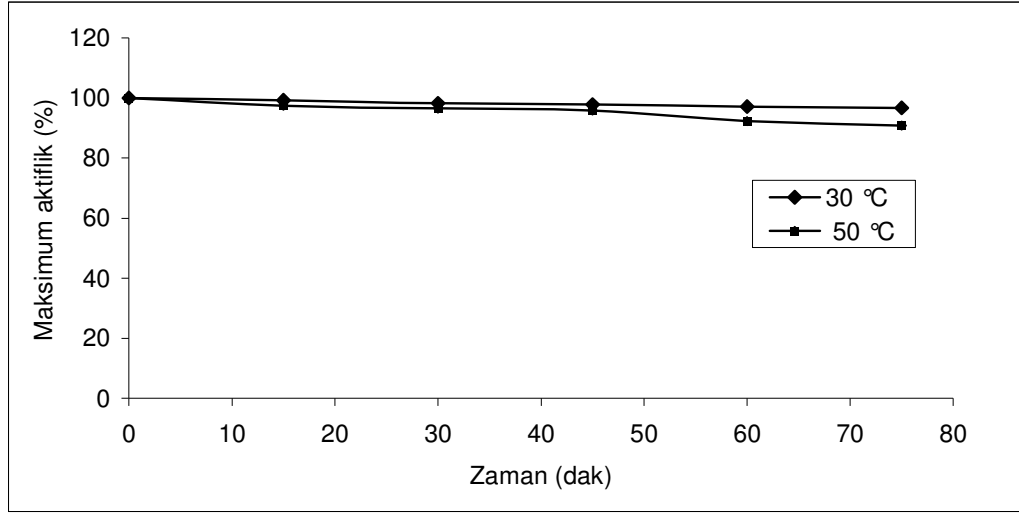
P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla Bölüm 3.12.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri 30 °C için Çizelge 4.33' de, 50 °C için Çizelge 4.34' de verildi.

Çizelge 4.33. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 30 °C' da termal kararlılığı

Zaman (dak)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	1,033	24,4	100
15	1,025	24,2	99
30	1,015	23,9	98
45	1,003	23,7	97
60	0,995	23,5	97
75	0,991	23,4	96

Çizelge 4.34. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilmiş lakkazın 50 °C' da termal kararlılığı

Zaman (dak)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum aktiflik (%)
0	1,005	23,7	100
15	0,979	23,1	97
30	0,970	22,9	96
45	0,963	22,8	95
60	0,928	21,9	92
75	0,913	21,6	91



Şekil 4.29. P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın termal kararlılığına sıcaklığın etkisi

Şekil 4.29' da görüldüğü gibi P(AAm-IA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için 30 °C ve 50 °C' de 75 dak. sonunda başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %96 ve %91' ini koruduğu gözlemlendi.

İmmobilize lakkazlar için Eş. 3.4 ve Eş. 3.5 yardımıyla hesaplanan k_i ve $t_{1/2}$ değerleri Çizelge 4.35' de verildi.

Çizelge 4.35. İmmobilize lakkazlar için k_i ve $t_{1/2}$ değerleri

İmmobilize lakkaz	k_i (dak^{-1})		$t_{1/2}$ (dak)	
	30 °C	50 °C	30 °C	50 °C
P(AAm-AA)/Alj-L	0,0012	0,0014	578,1	495,4
P(AAm-IA)/Alj-L	0,0009	0,0013	770,0	533,9
P(AAm-AA)/K-kar-L	0,0014	0,0031	495,1	224,6
P(AAm-IA)/ K-kar-L	0,0006	0,0012	1155,0	578,3

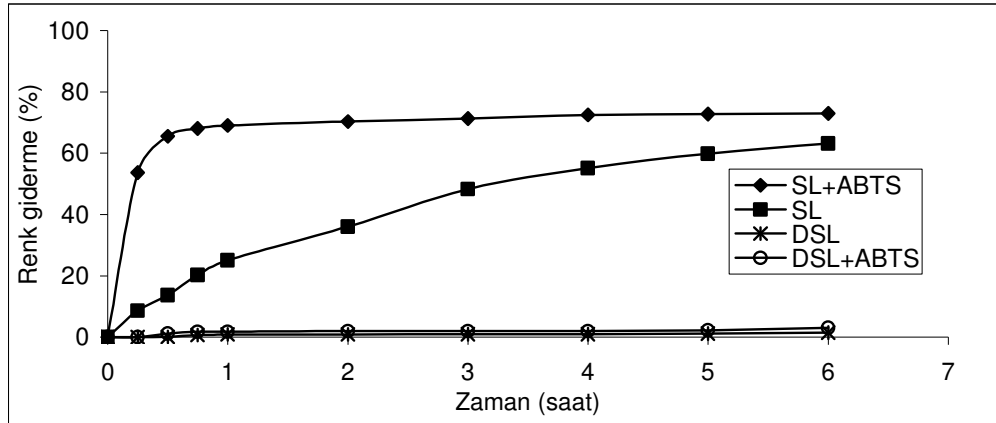
P(AAm-AA)/Alj ve P(AAm-IA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazlar karşılaştırıldığında, k_i ve $t_{1/2}$ değerlerinden de görüldüğü gibi itakonik asit

içeren hidrojel inaktivasyona karşı daha dirençli olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde P(AAm-AA)/K-kar ve P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazlar karşılaştırıldığında, yine itakonik asit içeren hidrojel inaktivasyona karşı daha dirençli olduğu gözlemlendi.

Sıcaklık arttıkça immobilize lakkazların k_i değerlerinin arttığı gözlemlendi. Immobilize lakkazların sıcaklık artışı ile meydana gelebilecek denatürasyona karşı daha dirençli olabileceği sonucuna ulaşıldı. Literatürde de termal inaktivasyon için benzer değişimler gözlemlenmiştir [87,100].

4.12. Serbest Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilmesi

SL, DSL, SL+ABTS, DSL+ABTS kullanılarak metil oranjın renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi Şekil 4.30' da gösterildi.



Şekil 4.30. Serbest lakkaz ile metil oranjın renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi

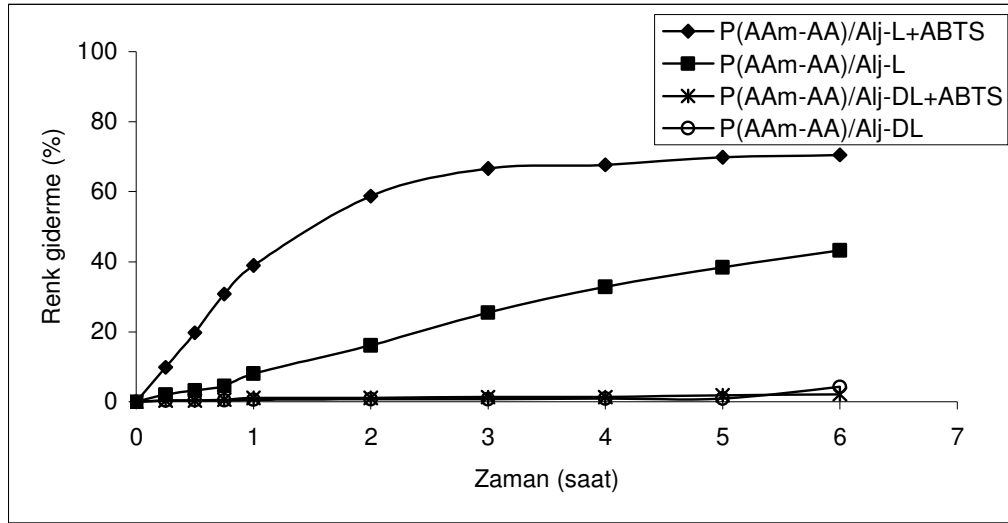
Şekil 4.30' da görüldüğü gibi 6 saat sonunda SL metil oranjın rengini %63 oranında giderirken, tepkime ortamına ABTS mediyatörü eklendiğinde, SL+ABTS, bu değer %73' e çıktığı görüldü. Kontrol deneyleri için DSL, DSL+ABTS' nin metil oranjın rengini gidermediği gözlemlendi.

Literatürde, *Corioloopsis rigida*' dan elde edilen lakkaz ile mediyatör kullanmadan metil oranjin rengi 1 gün sonunda %80 -%90 oranında giderilmiştir. *Trametes hirsuta*' dan elde edilen lakkaz ile metil oranjin renk giderime deneyinde 24 saat sonunda %65 oranında renk giderme sağlanmıştır [101,102].

4.13. İmmobilize Lakkaz ile Metil Oranjin Renginin Giderilmesi

4.13.1. Poli(akrilamit-akrilik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjin renginin giderilmesi

P(AAm-AA)/Alj-L, P(AAm-AA)/Alj-DL, P(AAm-AA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-AA)/Alj-DL+ABTS kullanılarak metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi Şekil 4.31' de gösterildi.



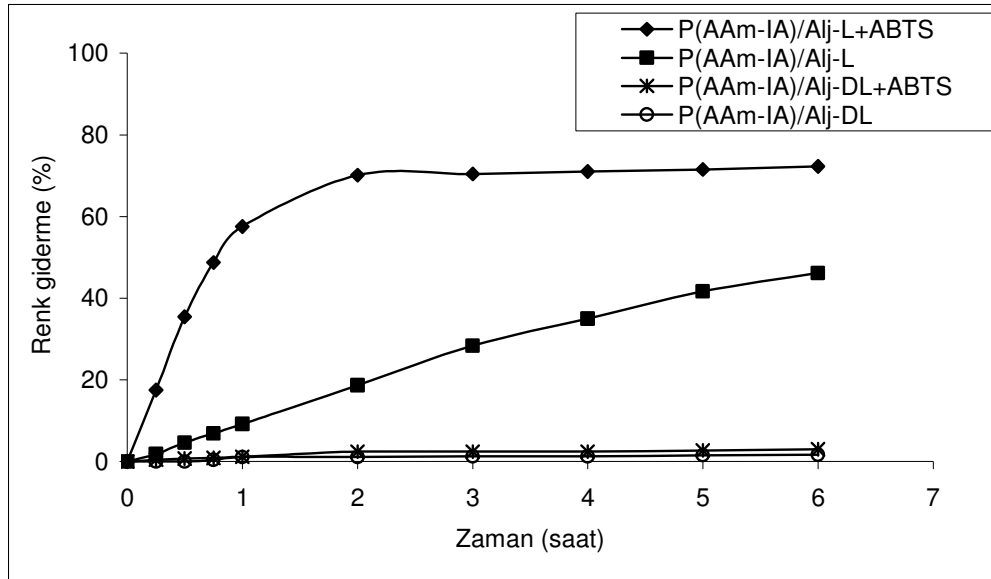
Şekil 4.31. P(AAm-AA)/Alj-L, P(AAm-AA)/Alj-DL, P(AAm-AA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-AA)/Alj-DL+ABTS ile metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi

Şekil 4.31' de görüldüğü gibi 6 saat sonunda P(AAm-AA)/Alj-L metil oranjin rengini %43 oranında giderirken, tepkime ortamına ABTS mediyatörü eklendiğinde, P(AAm-AA)/Alj-L+ABTS, bu değer %71'e çıktığı görüldü.

Kontrol deneylerinde P(AAm-AA)/Alj-DL ve P(AAm-AA)/Alj-DL+ABTS' nin metil oranjin rengini %2 - %4 oranında giderdiği gözlemlendi. Bu sonuçlar ışığında hidrojellerle boyar madde arasında kayda değer bir etkileşim olmadığı görüldü [61].

4.13.2. Poli(akrilamit-itakonik asit)/Aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjin renginin giderilmesi

P(AAm-IA)/Alj-L, P(AAm-IA)/Alj-DL, P(AAm-IA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-IA)/Alj-DL+ABTS kullanılarak metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi Şekil 4.32' de gösterildi.



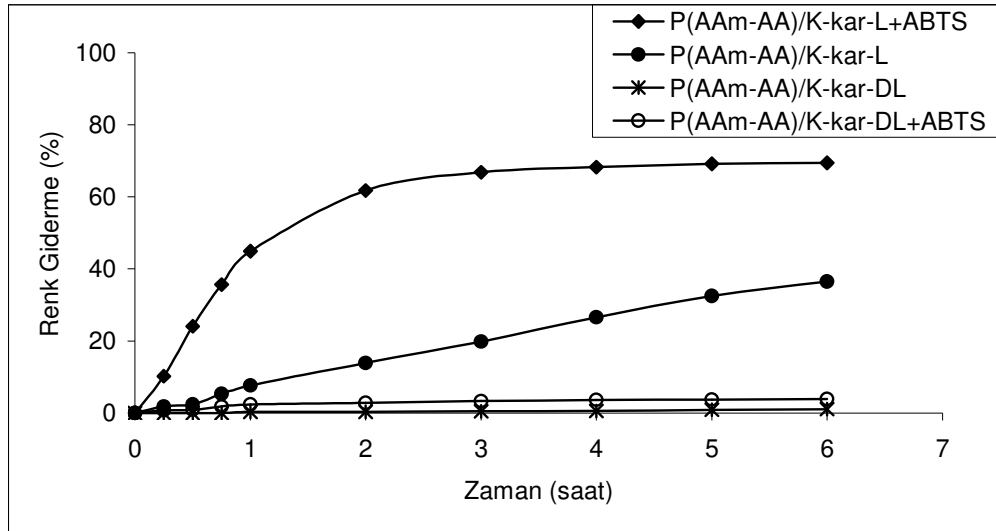
Şekil 4.32. P(AAm-IA)/Alj-L, P(AAm-IA)/Alj-DL, P(AAm-IA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-IA)/Alj-DL+ABTS ile metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi

Şekil 4.32' de görüldüğü gibi 6 saat sonunda P(AAm-IA)/Alj-L metil oranjin rengini %46 oranında giderirken, tepkime ortamına ABTS mediyatörü eklendiğinde, P(AAm-IA)/Alj-L+ABTS, bu değer %72' ye çıktığı görüldü. Kontrol deneylerinde P(AAm-IA)/Alj-DL ve P(AAm-IA)/Alj-DL+ABTS' nin metil oranjin rengini %2 - %3 oranında giderdiği gözlemlendi. Bu sonuçlar ışığında

hidrojellerle boyar madde arasında kayda değer bir etkileşim olmadığı görüldü.

4.13.3. Poli(akrilamit-akrilik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjin renginin giderilmesi

P(AAm-AA)/K-kar-L, P(AAm-AA)/K-kar-DL, P(AAm-AA)/K-kar-L+ABTS, P(AAm-AA)/K-kar-DL+ABTS kullanılarak metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi Şekil 4.33' de gösterildi.

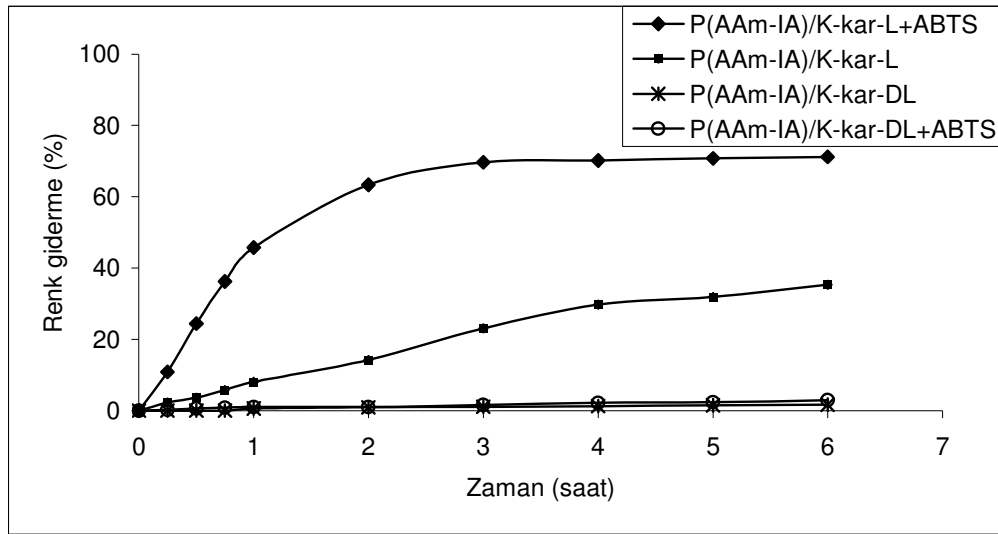


Şekil 4.33. P(AAm-AA)/K-kar-L, P(AAm-AA)/K-kar-DL, P(AAm-AA)/K-kar-L+ABTS, P(AAm-AA)/K-kar-DL+ABTS ile metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi

Şekil 4.33' de görüldüğü gibi 6 saat sonunda P(AAm-AA)/K-kar-L metil oranjin rengini %36 oranında giderirken, tepkime ortamına ABTS mediyatörü eklendiğinde, P(AAm-AA)/K-kar-L+ABTS, bu değer %69'a çıktığı görüldü. Kontrol deneylerinde P(AAm-AA)/K-kar-DL ve P(AAm-AA)/K-kar-DL+ABTS'nin metil oranjin rengini %1 - %4 oranında giderdiği gözlemlendi. Bu sonuçlar ışığında hidrojellerle boyar madde arasında kayda değer bir etkileşim olmadığı görüldü.

4.13.4. Poli(akrilamit-itakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjin renginin giderilmesi

P(AAm-IA)/K-kar-L, P(AAm-IA)/K-kar-DL, P(AAm-IA)/K-kar-L+ABTS, P(AAm-IA)/K-kar-DL+ABTS kullanılarak metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi Şekil 4.34' de gösterildi.



Şekil 4.34. P(AAm-IA)/K-kar-L, P(AAm-IA)/K-kar-DL, P(AAm-IA)/K-kar-L+ABTS, P(AAm-IA)/K-kar-DL+ABTS ile metil oranjin renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi

Şekil 4.34' de görüldüğü gibi 6 saat sonunda P(AAm-IA)/K-kar-L metil oranjin rengini %35 oranında giderirken, tepkime ortamına ABTS mediyatörü eklendiğinde, P(AAm-IA)/K-kar-L+ABTS, bu değer %71'e çıktığı görüldü. Kontrol deneylerinde P(AAm-IA)/K-kar-DL ve P(AAm-IA)/K-kar-DL+ABTS'nin metil oranjin rengini %2 - %3 oranında giderdiği gözlemlendi. Bu sonuçlar ışığında hidrojellerle boyar madde arasında kayda değer bir etkileşim olmadığı görüldü.

Literatürde, *Myceliophthora thermophila*' dan elde edilen lakkaz, kovalent bağlanma yöntemi ile epoksi grupları ile aktive edilmiş polimetakrilat bazlı polimere (Sepabeads EC-EP3) immobilize edildiğinde, 6 saat inkübasyon

sonunda HBT kullanılmadan metil oranjın rengini 61 oranında giderirken, HBT varlığında ise 6 saat sonunda %82 oranında giderdiğini bulmuşlardır [60].

5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Serbest lakkaz için optimum pH değeri 5,0, P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar ve P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkaz için optimum pH değerleri sırasıyla 6,0, 5,5, 5,0 ve 5,5 olarak bulundu.
2. Serbest lakkaz ve P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklıklar 40 °C olarak bulundu.
3. Serbest lakkaz için K_m değeri 0,0073 mM, V_{mak} değeri $1,04 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, ve P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkaz için K_m değerleri sırasıyla 0,0196 mM, 0,0116 mM, 0,0252 mM ve 0,0108 mM, V_{mak} değerleri sırasıyla $3,29 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $5,22 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $6,80 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ ve $4,40 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.
4. Serbest lakkazın, 4 °C' de depolamada 42. günde başlangıç aktifliğinin %55' ini koruduğu gözlemlendi. P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazlar için, 4 °C' de depolamada 42. günde başlangıç aktifliğinin sırasıyla %83, %94, %94 ve %83' ünü koruduğu gözlemlendi.
5. P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazın, 10 kez kullanımı sonunda başlangıç aktifliğinin sırasıyla %80, %50 %62 ve %52' sini koruduğu bulundu.

6. P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojelleri için %şişme değerleri sırasıyla; %367,9, %161,2, %113,8 %66,3 olarak bulundu.
7. P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazların 75. dakikada 30 °C' da başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %93, %93, %90, %96' sını, 50 °C' da başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %89, %91, %78, %91' ini korudukları gözlemlendi.
8. Serbest ve immobilize lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi incelendiğinde mediyatör kullanmadan yapılan deneylerde, serbest lakkaz, P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkaz için renk giderme yüzdeleri sırasıyla %63, %43, %46, %36, %35 olarak bulundu. Mediyatör kullanılarak yapılan deneylerde ise serbest lakkaz, P(AAm-AA)/Alj, P(AAm-IA)/Alj, P(AAm-AA)/K-kar, P(AAm-IA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkaz için renk giderme yüzdeleri sırasıyla %73, %70,5, %72, %69, %71 olarak bulundu.

Bu sonuçlara göre, hazırlanan immobilize lakkazlar 4 °C' da depolamada ve geniş bir sıcaklık aralığında serbest enzime göre oldukça yüksek aktiflik göstermektedir. Depolama süresi, şişme değerleri, renk giderme ve termal inaktivasyon sonuçlarına bakıldığında P(AAm-IA)/Alj ve P(AAm-IA)/Alj hidrojellerinde immobilize lakkazların en iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Immobilize lakkazın tekrar kullanılabilirliği sonuçlarından, immobilize lakkazın tekstil, kağıt, sentetik kimya ve kozmetik gibi çeşitli endüstri alanlarında, renk giderme deneyleri sonuçlarından da serbest ve immobilize lakkazın başta tekstil sanayi olmak üzere birçok endüstri alanında kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. İnternet : TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi “Yeni Ufuklara Biyomalzemeler”
<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/biyomalzemeler.pdf>
(2002).
2. Swami, S.N., “Radiation synthesis of polymeric hydrogels for swellingcontrolled drug released studies”, Doktora Tezi, **University of Western Sydney**, New South Wales, Australia 120-149 (2004).
3. Zhang, J., Peppas, N.A., “Synthesis and characterization of pH- and temperature-sensitive poly(methacrylic acid)/poly(N-isopropylamide) interpenetrating polymeric networks” , **Macromolecules**, 33: 102-107 (2000).
4. Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Dubovik, A.S., Grinberg, N.V., Burova, T.V., Grinberg, V.Y., “Temperature-sensitive chitosan-poly(N’isopropylacrylamide) interpenetrated networks with enhanced loading capacity and controlled release properties”, **Journal of Controlled Release**, 102 : 629-641 (2005).
5. Tüzün, C., “Enzimler”, Biyokimya, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 81-82 (2002).
6. Murray, R.K., Granner D.K., Mayes, P.A., ”Harper’ın Biyokimyası”, Menteş, G., Ersöz, B., **Barış Kitabevi**, 73-74, 341-349 (1993).
7. Öztan, D., “Tirozinaz enziminin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve fenollerin gideriminde kullanımı”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 11-14 (2007).
8. Tekman, Ş., Öner, N., “Genel Biyokimya”, **İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi**, İstanbul, 47 (1994).
9. Onat T., Emerk K., Sözman, E.Y., “İnsan Biyokimyası”, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 197-202 (2002).
10. Aksoy, C., Yanardağ, R., “Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu” Yüksek Lisans Tezi, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 1-2 , 1-10 (2003).
11. Telefoncu, A., “Enzimoloji”, **Ege Üniversitesi Fen Fakültesi**, İzmir, 1-305 (1997).

12. Bickerstaff, G.F., "Immobilization of enzymes and cells", **Humana Press**, Totowa, New Jersey, 33 : 5-9, 199-205 (1997).
13. Zaborsky, O., "Immobilized enzymes", **1-3 CRC Pres**, Ohio, 58 : 287-292 (1974).
14. Telefoncu A., "Immobilize Enzimler ve Immobilizasyon Yöntemleri", **Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu**, İzmir, 193-249 (1986).
15. Rempp, P., Merrill, E.W., "Polymers", Polymer Synthesis 2nd ed., **Hüthig&Wepf Verlag**, USA, 331-320 (1991).
16. Shan, Y., Shan, D., "Immobilized enzymes; industrial biocatalysts", **Indian Journal of Hospital Pharmacy**, 29 (2) : 51-58 (1992).
17. Trevon, M.D., "Techniques of Immobilization in Immobilized Enzyme", **John Wiley and Sons**, New York, 1-11 (1985).
18. Monsan, P., Combes, D., "Enzyme Stabilization by Immobilization, Methods in Enzymology", **Academic Press**, New York, 137 (1988).
19. Hızır, M., "Poli(2-hidroksietil metakrilat-itakonik asit) taneciklerine kovalent bağlanma ile invertazın immobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 5-6 (2006).
20. Habib, Ö., "Tripsin immobilizasyonu ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İzmir , 14-15, 21-22, 24-26 (2007).
21. Carr, P. W. and Bowers, L. D., "Support considerations in chemical analysis", Enzymes, **Academic Press**, New York, 56: 167-170 (1980).
22. Glick, D., "Methods of biochemical analysis", Enzyme Immobilization, **Academic Press**, New York, 25: 135-201 (1979).
23. Sreere, P. A. and Uyeda, K., "Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices", Methods in Enzymology, (Edited by Mosbach, K.), **Academic Press Inc.**, New York, 44: 11-19 (1976).
24. Dumitriu, S., Popa, M. and Dumitriu, M., "Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers", **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, 3: 243-312 (1988).
25. Kaetsu, I., Kumakura, M. and Yoshida, M., "Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low temperature", **Biotechnology and Bioengineering**, 21: 847-849 (1979).

26. Yıldız, H. B., Kıralp, S., Toppare, L. and Yağcı, Y., “ Immobilization of invertase in conducting polypyrrole/PMMA-co-PMTM graft copolymers”, **Journal of Applied Polymer Science**, 96: 502-507 (2005).
27. Chen, S., Liu, Y. and Yu, P., “Study on column reactor of chitosan immobilized”, **Chemical Abstracts**, 127 (4): 127-129 (1996).
28. Zaborsky, O., “Adsorption Immobilized Enzyme”, Ed. by Weast, R. C., **CRC Press**, Ohio, 75-78 (1973).
29. Bachman S., Gebicka, M.L., Gasyna, Z.” Some properties of whole-cell glucose isomerase immobilized in polyacrylamide gel by radiation”, **Inter Science**, 33 (11): 366 – 369 (2006).
30. Kara, F., “Üreazın aljinat/kitosan polielektrolit ve poli(akrilamid-ko-akrilik asit)/K-karragenan interpolimer komplekslerine immobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 16 (2006).
31. Saburo, F. and Atsuo, T., “Application of biocatalyst immobilized by polymer methods”, Enzyme Engineering, **Plenum Press**, New York, 201-203 (1985).
32. Cinderalla, M., Canteralla, L. and Alfani, F., “Entrapping of acid phosphatase in HEMA: Preparation and kinetic properties”, **British Polymer Journal**, 20: 477-485 (1988).
33. Michael, D. T., “Immobilized enzyme” Methods in Enzymology, **John Wiley and Sons**, New York, 80-85 (1980).
34. Kaetsu, I., Kumakura, M. and Yoshida, M., “Immobilization of Streptomyces phaeochromogenes by radiation-induced polymerization of glass-forming monomers”, **Biotechnology and Bioengineering**, 21 (4) : 679-688 (1979).
35. İnam, R., Çaykara, T. and Özyürek, C., “Polarographic determination of uranyl ion adsorption on poly(2-hydroxyethyl methacrylate-itaconic acid) hydrogels”, **Separation Science and Technology**, 36 (7) : 1451-1461 (2001).
36. Taylor, P.B., Ashman, S., Baddeley, M.S., Bartram, L.S., “Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases”, **Journal of Biomolecular Screening**, 7 : 537-543 (2002).

37. Ikehata, K., Buchanan, I.D., Smith D.W., "Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment", **Journal of Environmental Engineering and Science**, 3: 1-19 (2004).
38. Delanoy, G., Li, Q.X. and Yu, J. "Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan.", **International Journal of Biological Macromolecules**, 35: 89-95 (2005).
39. Birhanlı, E., "Mikroorganizmaların lakkaz üretimine çeşitli faktörlerin etkisi", Yüksek Lisans Tezi, **İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Malatya, 37- 44 (2003).
40. Baybalı, M., "Resorsinol'ün enzimatik polimerizasyon kinetiğinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 37- 44 (2003).
41. Daigle, F., Trudeau, F., Robinson, G., Smyth, M.R. and Leech, D., "Mediated reagentless enzyme inhibition electrodes", **Biosensors and Bioelectronics**, 13: 417-425 (1998).
42. Freire, R.S., Durán, N. and Kubota, L.T., "Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices", **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 13: 456-462 (2002).
43. Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T., Gorton, L., "Laccase-based biosensors for monitoring lignin", **Enzyme and Microbial Technology**, 39 : 835-840 (2006).
44. Durán, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A. and Gianfreda, L., "Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports a review", **Enzyme and Microbial Technology**, 31: 907-931 (2002).
45. Quan, D. and Shin, W., "Modification of electrode surface for covalent immobilization of laccase", **Material Science and Engineering: C**, 24: 113-115 (2004).
46. 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", **Analytica Chimica Acta**, 553: 99-104 (2005).
47. Kuru, F., " Katı substrat fermentasyonu ile lakkaz üretimi", Yüksek Lisans Tezi, **İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Malatya, 10 (2007).

48. Piontek, K. and Biol, J., "Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers", ***Journal of Biological Chemistry***, 277: 37663-37669 (2002).
49. Sağ, Y., "Atık sulardaki ağır metal iyonlarının giderilmesi ve geri kazanılması için en uygun biyosorptent türünün seçilmesi", Doktora Tezi, ***Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 11-14 (1993).
50. Rousseau, I., Le Cerf, D., Picton, L., Argillier, J.F. and Muller G., "Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SDS) from calcium alginate gel beads", ***European Polymer Journal***, 40: 2709-2715 (2004).
51. Anderson, N.S., Campbell, J.W., Harding, M.M., Rees, D.A. and Samuel, J.W.B. "X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates; double helix model for K-carrageenan and ι-carrageenans" ***Journal of Molecular Biology***, 45: 85-99 (1969).
52. Nickerson, M.T. and Paulson, A.T. "Rheological properties of gellan, κ-carrageenan and alginate polysaccharides: Effect of potassium and calcium ions on macrostructure assemblages" ***Carbohydrate Polymers***, 58: 15-24 (2004).
53. Nickerson, M.T., Paulson, A.T. and Hallent, F.R. "Dilute solution properties of κ-carrageenan polysaccharides: Effect of potassium and calcium ions on chain conformation" ***Carbohydrate Polymers*** 58: 25-33 (2004).
54. Erce, D., "Protein salımı için süpergözenekli IPN/yarı-IPN hidrojelilerin sentezi ve salım kinetiğinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, ***Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 20-21 (2006).
55. Arda, M., "Temel Mikrobiyoloji", ***Medisan Yayıncılık***, Ankara, 46-48 (2000).
56. Mittal, A., Malviya, A., Kaur, D., Mittal, J., Kurup, L., "Studies on the adsorption kinetics and isotherms for the removal and recovery of Methyl Orange from wastewaters using waste materials", ***Journal of Hazardous Materials***, 148 : 229-240 (2007).
57. Forni, L.G., Mora-Arellano, V.O., Packer, J.E., Wilson, R.L., "Nitrogen dioxide and related free radicals: electron-transfer reactions with organic compounds in solutions containing nitrite or nitrate" ***Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions***, 2 : 1-6 (1986).

58. Neta, P., Huie, R.E., Maruthamuthu, P., Steenken, "Solvent effects in the reactions of peroxy radicals with organic reductants. Evidence for proton-transfer-mediated electron transfers", **Journal of Physical Chemistry**, 93: 7654–7659 (1989).
59. Lee, C. and Yoon, J., "UV direct photolysis of 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) in aqueous solution: Kinetics and mechanism" **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 197 : 232-238 (2008).
60. Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, J.F., Alcade, M., "Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers" **Process Biochemistry**, 43: 169-178 (2008).
61. Lu, L., Zhao, M., Wang, Y., "Immobilization of laccase by alginate-chitosan microcapsules and its use in dye decolorization" **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23: 159-166 (2007).
62. Peralta-Zamora, P., Pereira, C.M., Tiburtius, E.R.L., Moraes, S.G., Rosa, M.A., Minussi, R.C., Duran, N., "Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase" **Applied Catalysis B: Environmental**, 42 : 131-144 (2003).
63. Zille, A., "Laccase reactions for textile applications", Doktora Tezi, **Universidade do Minho**, İtalya, 35 (2005).
64. Zille, A., Gornacka, B., Rehorek, A., Cavaco-Paulo, A., "Degradation of Azo Dyes by *Trametes villosa* Laccase over Long Periods of Oxidative Conditions" **Applied and Environmental Microbiology**, 71 : 6711–6718 (2005).
65. Bar, M., " Kinetics and physico-chemical properties of white-rot fungal laccases", Yüksek Lisans Tezi, **University of the Free State**, Güney Afrika, 8-9,74 (2001).
66. Wong, Y. and Yu, J., "Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes", **Water Research**, 33 (16): 3512–3520 (1999).
67. Leonowicz, A., Sarkar, J.M., Bollag J.M., "Improvement in stability of an immobilized fungal laccase" **Applied Microbiology and Biotechnology**, 29: 129–135 (1988).
68. Rogalski, J., Jozwik, E., Hatakka, A. and Leonowicz, A., "Immobilization of laccase from *Phlebia radiata* on controlled porosity glass", **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, 95: 99–108 (1995).

69. Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, NS., Rogalski, J. and Jaszek, H., "Activity of free and immobilized extracellular *Cerrena unicolor* laccase in water miscible organic solvents", ***Holzforschung***, 52: 589–595 (1998).
70. 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 waste water treatment", ***Process Biochemistry***, 34: 697–706 (1999).
71. Jolival, C., Brenon, S., Caminade, E., Mougine, C., Pontie, 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", ***Journal of Membrane Science***, 180: 103–113 (2000).
72. Hublik, G. and Schinner, F., "Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants." ***Enzyme and Microbial Technology***, 27: 330–336 (2000).
73. D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Sermanni, G.G., "Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater", ***Journal of Biotechnology***, 77: 265–73 (2000).
74. Ruiz, A.I., Malave, A.J., Felby, C., Griebenow, K., "Improved activity and stability of an immobilized recombinant laccase in organic solvents", ***Biotechnology Letters***, 22: 229–233 (2000).
75. Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A., Spettoli, P., "Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor", ***Process Biochemistry***, 36: 51–58 (2000).
76. Freire, R.S., Durán, N., Kubota, L.T., "Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds", ***Talanta***, 54: 681-686 (2001).
77. Al-Adhami, A.J.H., Bryjak, J., Greb-Markiewicz, B., Peczyńska-Czoch, W., "Immobilization of wood-rotting fungi laccase on modified cellulose and acrylic carriers", ***Process Biochemistry***, 37: 1387-1394 (2002).
78. Yinghui, D., Qiuling, W., Shiyu, F., "Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier", ***Letters in Applied Microbiology***, 35: 451–456 (2002).

79. Zille, A., Tzanov, T., Gübitz, G.M., Cavaco-Paulo, A., "Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent", ***Biotechnology Letters***, 25 (17): 1473-1477 (2003).
80. Dodor, D.E., Hwang, H., Ekunwe, S.I.N., "Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*" ***Enzyme and Microbial Technology***, 35: 210-217 (2004).
81. Araujo, J.H.B, Uemura, V.O., Moraes, F.F., "A comparative study on fungal laccase immobilized on chitosan", ***Brazilian Archives of Biology and Technology***, 48: 1-6 (2005).
82. Jiang, D., Long, S., Huang, J., Xiao, H., Zhou, J., "Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres" ***Biochemical Engineering Journal***, 25: 15–23 (2005).
83. Radha, K.V., Regupathi, I., Arunagiri, A., Murugesan, A., "Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics", ***Process Biochemistry***, 40: 3337-3345 (2005).
84. Yang, W.Y., Min, D.Y., Wen, S.X., Jin, L., Rong, L., Tetsuo, M., Bo, C., "Immobilization and characterization of laccase from Chinese *Rhus vernicifera* on modified chitosan", ***Process Biochemistry***, 41: 1378-1382 (2006).
85. Xiao, X., Huang, J., Liu, C., Jiang, D., "Immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutaraldehyde crosslinking method", ***Transaction of Nonferrous Metals Society of China***, 16: 414-418 (2006).
86. Zawisza, I., Rogalski, J., Opallo, M., "Electrocatalytic reduction of dioxygen by redox mediator and laccase immobilized in silicate thin film" ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, 588: 244-252 (2006).
87. Roy, J.J. and Abraham, T.E., "Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase", ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 38: 31-36 (2006).
88. Hu, X., Zhao, X., Hwang, H., "Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite", ***Chemosphere***, 66: 1618–1626 (2006).
89. 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 inducer", ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, 23: 367-373 (2007).

90. Silva, C., Silva, C.J., Zille, A., Guebitz, G.M., Cavaco-Paulo, A., "Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres", ***Enzyme and Microbial Technology***, 41: 867-875 (2007).
91. Couto, R.S., Osma, J.F., Saravia, V., Gübitz, G.M., Herrera, J.L.T., "Coating of immobilised laccase for stability enhancement: A novel approach" ***Applied Catalysis A: General***, 329: 156-160 (2007).
92. Bryjak, J., Kruczkiewicz, P., Rekc, A., Peczynska-Czoch, W., "Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate" ***Biochemical Engineering Journal***, 35: 325-332 (2007).
93. Champagne, P.-P., and Ramsay, J.A., "Reactive blue 19 decolouration by laccase immobilized on silica beads" ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 77: 819-823 (2007).
94. Georgieva, S., Godjevargova, T., Portaccio, M., Lepore, M., Mita, D.G., "Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*" ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 55: 177-184 (2008).
95. Rekc, A., Kruczkiewicz, P., Jastrzemska, B., Liesiene, J., Peczynska-Czoch, W., Bryjak, J., "Laccase immobilization on the tailored cellulose-based Granocel carriers", ***International Journal of Biological Macromolecules***, 42 : 208–215 (2008).
96. Leonowicz, A. and Grzywnowicz, K., "Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate", ***Enzyme and Microbial Technology***, 3: 55-58 (1981).
97. Mosbach, K., "Methods in Enzymology", Enzymology, Academic Pres, New York, 44-49, (1976).
98. Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K., Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G.M., "Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*", ***Applied and Environmental Microbiology***, 66: 3357–3362 (2000).
99. Pulat, M., Eksi, H., "Determination of swelling behavior and morphological properties of poly(acrylamide-co-itaconic acid) and poly(acrylic acid-co-itaconic acid) copolymeric hydrogels", ***Journal of Applied Polymer Science***, 102: 5994-5999 (2006).

100. Kurniawati, S., and Nicell, J.A., "Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol", ***Enzyme and Microbial Technology***, 41: 353-361 (2007).
101. Gomez, J., Pazos, M., Couto, R., Sanroman, M., "Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriopsis rigida* under solid-state conditions", ***Journal of Food Engineering***, 68 : 315-319 (2005).
102. Moldes, D., Gallego, P., Couto, R., Sanroman, A., "Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*", ***Biotechnology Letters***, 25: 491-495 (2003).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : MAKAS, Yeldem Gizem
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 02.12.1983 Ankara
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (312) 250 61 80
e-mail : gzmerdm@hotmail.com

Eğitim

Derece tarihi	Eğitim Birimi	Mezuniyet
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	2008
Lisans	Kırıkkale Üniversitesi/Kimya Bölümü	2005
Lise	Kaya Bayazıtöğlu Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2001

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

İzcilik ve doğa sporları, Bilgisayar teknolojileri, Görsel sanatlar, Sinema, tiyatro, seyahat etmek, kitap okumak