POLi(AKRiLAMiT-KROTONiK ASiT)/SODYUM ALJiNAT, POLi(AKRiLAMiT-KROTONiK ASiT)/K-KARRAGENAN, POLi(AKRiLAMiT-SiTRAKONiK ASiT)/SODYUM ALJiNAT, POLi(AKRiLAMiT-SiTRAKONiK ASiT)/K-KARRAGENAN HiDROJELLERiNDE LAKKAZ iMMOBiLiZASYONU

Selva Zeynep KÖKLÜKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAZİRAN 2008
ANKARA

Selva Zeynep Köklükaya tarafından hazırlanan POLi(AKRiLAMiT-KROTONiK ASiT)/SODYUM ALJiNAT, POLi(AKRiLAMiT-KROTONiK ASiT)/K-KARRAGENAN, POLi(AKRiLAMiT-SiTRAKONiK ASiT)/SODYUM ALJiNAT, POLi(AKRiLAMiT-SiTRAKONiK ASiT)/K-KARRAGENAN HiDROJELLERiNDE LAKKAZ iMMOBiLiZASYONU 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. Muzaffer TALU …….
(Kimya, Gazi Üniversitesi)

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

Prof. Dr. Semra BİLGİÇ …….
(Kimya, Ankara 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.

Selva Zeynep KÖKLÜKAYA

POLi(AKRiLAMiT-KROTONiK ASiT)/SODYUM ALJiNAT,
POLi(AKRiLAMiT-KROTONiK ASiT)/K-KARRAGENAN,
POLi(AKRiLAMiT-SiTRAKONiK ASiT)/SODYUM ALJiNAT,
POLi(AKRiLAMiT-SiTRAKONiK ASiT)/K-KARRAGENAN
HiDROJELLERiNDE LAKKAZ iMMOBiLiZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)

Selva Zeynep KÖKLÜKAYA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2008

ÖZET

Bu çalışmada, lakkaz enzimi, poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat, P(AAm-CrA)/Alj, poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan, P(AAm-CrA)/K-kar, poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat, P(AAm-CA)/Alj, poli(akrilamit-sitrakonik asit)/K-karragenan, P(AAm-CA)/K-kar yarı iç içe geçmiş ağ yapılı polimerlerinde (semi-IPN'ler), hapsetme yöntemi ile immobilize edildi. Serbest lakkaz ve immobilize lakkazlar için optimum pH değerlerinin 5,0-6,0 aralığında değiştiği gözlendi. Serbest lakkaz ve immobilize lakkazlar için optimum sıcaklık 40 ^{0}C - 50 ^{0}C aralığında değiştiği gözlendi. Serbest lakkaz ve P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazlar 4 ^{0}C' da 42 gün depolandıklarında, başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %55 ve %71, %70, %73, %68' sini korudukları gözlendi. P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazların 10 kez kullanımları sonucunda başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %62, %56, %53 ve %50' sini korudukları bulundu.

Serbest lakkaz, P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazlar için K_m değerleri sırasıyla $6,70x10^{-2}$ mM , $7,90x10^{-3}$ mM, $8,40x10^{-3}$ mM, $7,00x10^{-3}$ mM, $1,02x10^{-2}$ mM, V_{mak} değerleri sırasıyla $1,80x10^{-3}$ mM.dak^{-1}, $3,70x10^{-3}$ mM.dak^{-1}, $3,50x10^{-3}$ mM.dak^{-1}, $8,01x10^{-4}$ mM.dak^{-1}, $1,01x10^{-2}$ mM.dak^{-1} olarak bulundu. İmmobilize lakkazın 30 ^{0}C ve 50 ^{0}C de inaktivasyon sabitleri 0,0013 – 0,0085 ve 0,0036 – 0,0201 aralığında olduğu bulundu. Metil oranjın renginin giderilmesinde, serbest ve P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, hidrojellerinde immobilize edilen lakkazlar için renk giderme yüzdeleri sırasıyla %63 ve %38, %45, olduğu bulundu. Mediyatör kullanıldığında ise serbest lakkaz için renk giderme yüzdesi %73 ve P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, hidrojellerinde immobilize edilen lakkazlar için renk giderme yüzdeleri %72 olduğu bulundu.

Bilim Kodu : 405.1.117

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

Sayfa Adedi : 140

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Serpil AKSOY

IMMOBILIZATION OF LACCASE IN POLY(ACRYLAMIDE-CROTONIC ACID)/SODIUM ALGINATE, POLY(ACRYLAMIDE-CROTONIC ACID)/K-CARRAGEENAN POLY(ACRYLAMIDE-CITRACONIC ACID)/SODIUM ALGINATE, POLY(ACRYLAMIDE-CITRACONIC ACID)/K-CARRAGEENAN

(M.Sc. Thesis)

Selva Zeynep KÖKLÜKAYA

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
June 2008

ABSTRACT

In this study, laccase enzyme was immobilized using entrapment method in poly(acrylamide-crotonic acid)/sodium alginate, P(AAm-CrA)/Alj, poly(acrylamide-crotonic acid)/K-carrageenan, P(AAm-CrA)/K-kar, poly(acrylamide-citraconic acid)/sodium alginate, P(AAm-CA)/Alj, poly(acrylamide-citraconic acid)/K-Carrageenan, P(AAm-CA)/K-kar semi-interpenetrating network (semi-IPNs). Optimum pH was determined between 5,0-6,0 for free laccase and immobilized laccases. Optimum temperature was determined between 40 ^{0}C - 50 ^{0}C for free laccase and immobilized laccases. After 42 days of storage at 4 ^{o}C, free laccase and P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CA)/K-kar immobilized enzymes retained %55 and % 71, % 70, % 73, % 68 of their original activities, respectively. P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CA)/K-kar immobilized enzymes used repeatedly 10 times in a day and they were retained %62, % 56 % 53, %50 of their original activities, respectively. K_m and V_{max} were calculated for free laccase as K_m value is 6,70x10^{-3} mM, V_{max} value is 1,80x10^{-3} mM.min^{-1} and for P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar,

P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CA)/K-kar immobilized laccases K_m values are $7{,}90x10^{-3}$ mM, $8{,}40x10^{-3}$ mM, $7{,}00x10^{-3}$ mM and $1{,}02x10^{-2}$ mM and V_{max} values are $3{,}70x10^{-3}$ mM.min^{-1}, $3{,}50x10^{-3}$ mM.min^{-1}, $8{,}01x10^{-4}$ mM.min^{-1} and $1{,}01x10^{-2}$ mM.min^{-1}, respectively. Inactivation rate constants (k_i) of immobilized laccases at 30 °C and 50 °C were found between 0,0013 min^{-1}-0,0085 min^{-1} and 0,0036 min^{-1}-0,0201 min^{-1}. Percent decolorization of methyl orange by free enyzme and enyzmes immobilized in P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, were found as %63 and %38, %45. Percent decolorization of methyl orange in the presence of mediator by free enyzme was found %73 and enyzmes immobilized in P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, were found as %72.

Science Code :405.1.117

Key Words :Entrapment, enzyme immobilization, K-Carrageenan, alginate, laccase

Page Number : 140

Adviser :Prof. Dr. Serpil AKSOY

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Serpil AKSOY' a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yine tecrübelerinden ve yardımlarından faydalandığım Yrd. Doç. Dr. Haydar ALTINOK'a

Çalışmalarımda önemli katkıları bulunan manevi destekleriyle ve yardımlarıyla beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli laboratuvar arkadaşlarım Volkan BABACAN, Yeldem Gizem Makas'a ve Nüzhet Ayça KALKAN'a,

Her zaman sabır ve anlayışla beni yalnız bırakmayan, desteğini ve yakın ilgisini esirgemeyen çok değerli aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……...…….... .. iv

ABSTRACT…….…… vi

TEŞEKKÜR…….……...….. viii

İÇİNDEKİLER……..……...……...……..... .ix

ÇİZELGELERİN LİSTESİ……..……...……...…...xv

ŞEKİLLERİN LİSTESİ……...…….....xvii

SİMGELER VE KISALTMALAR……. ……..….....xxi

1.GİRİŞ…….……..1

2. GENEL BİLGİLER…….....3

2.1. Hidrojeller……..…...3

2.1.1. Hidrojellerin sınıflandırılması…….....…3

2.2. Enzimler……....7

2.2.1. Enzimlerin sınıflandırılması…….....8

2.2.2. Enzimlerin etkisi…….…...8

2.2.3. Enzimlerin uygulama alanları…….…..12

2.3. Enzim İmmobilizasyonu…….……12

2.4. İmmobilizasyonun Enzim Aktivitesine Etkisi ……...…..21

2.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri……...……...……22

2.5.1. Kimyasal yöntemler……...24

2.5.2. Fiziksel yöntemler……..26

2.6. İmmobilizasyon Yönteminin Seçimi……30

Sayfa

2.7. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması……31

2.8. Çalışmada Kullanılan Enzim, Substrat ve Destek Materyalinin Özellikleri…….……..33

2.8.1. Lakkaz……..……...….33

2.8.2. Siringaldazin……..…….….37

2.8.3 Sodyum aljinat……..…..…….….37

2.8.4. Karragenan……..…….…...39

2.8.5. Destek materyali……..…….…..40

2.8.6. Azo boyaları……..……...43

2.8.7. ABTS……..…….……..44

2.9. Enzimatik Renk Giderme……...…..45

2.10. Lakkazın İmmobilizasyonu ve Renk Giderme ile İlgili Yapılan Çalışmalar …….....……49

3. DENEYSEL KISIM…….59

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler…….……..60

3.2. Çözeltilerin Hazırlanması…….…63

3.2.1. Sitrat tamponu…….…….……....63

3.2.2. Sodyum hidroksit……63

3.2.3. Fosfat tamponu……...……..……..……..63

3.2.4. Siringaldazin çözeltisi…….……..…...…….……63

3.2.5. Lakkaz çözeltisi……..……63

3.2.6. Sodyum asetat tamponu…….……..……..……64

Sayfa

3.2.7. Metil oranj çözeltisi…..……...……..64

3.2.8. ABTS çözeltisi……...……..…..64

3.3. Siringaldazin Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması……..……64

3.4. Enzim İmmobilizasyonu……...…….…….…….....66

3.4.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde enzim immobilizasyonu……..….....66

3.4.2. Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde enzim immobilizasyonu……..…….....….....66

3.4.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde enzim immobilizasyonu……..….....….67

3.4.4. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/ K-karragenan hidrojelinde enzim immobilizasyonu……..….....67

3.5. Aktiflik Tayini……..68

3.5.1. Serbest enzimin aktiflik tayini……..68

3.5.2. İmmobilize enzimin aktiflik tayini……...….68

3.6. Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi……...……...…..……. 69

3.6.1. Serbest enzim aktifliğine pH etkisi.....69

3.6.2. İmmobilize enzim aktifliğine pH etkisi.....69

3.7. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi……...……..69

3.7.1. Serbest enzim aktifliğine sıcaklık etkisi……...…….69

3.7.1. İmmobilize enzim aktifliğine sıcaklık etkisi……...…....70

3.8. Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi……...……70

3.8.1. Serbest enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....70

3.9. Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi……...……71

Sayfa

3.9.1. Serbest enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi.....71

3.9.2. İmmobilize enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi.....71

3.10. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi.....71

3.11. Hidrojellerin Şişme Değerlerinin Zamanla Değişiminin İncelenmesi.....72

3.12. İmmobilize Lakkazın Termal İnaktivasyonu.....72

3.13. Enzimatik Renk Giderme.....73

3.13.1. Serbest lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi.....73

3.13.2. İmmobilize lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi.....74

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....75

4.1. Serbest Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi.....76

4.2. İmmobilize Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi.....76

4.2.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....76

4.2.2. Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....78

4.2.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....79

4.2.4. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi.....81

4.3. Serbest Enzim Aktifliğine SıcaklığınEtkisi.....83

4.4. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....85

4.4.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi.....85

Sayfa

4.4.2. Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi…..……87

4.4.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi….....88

4.4.4. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi……..90

4.5. Serbest Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi……..…….....92

4.6. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi.....….95

4.6.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....95

4.6.2. Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi……..…….....…....96

4.6.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi……...….....……98

4.6.4. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi……..…….....…….99

4.7. Serbest Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi…..…..……..101

4.8. İmmobilize Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi……..…..103

4.8.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi……..…….....……..103

4.8.2. Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi……...…… …….....… ….105

4.8.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi….....…….....……...106

Sayfa

4.8.4. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi…….....…...……108

4.9. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi……110

4.9.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi…….....……..110

4.9.2. Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi…….....…111

4.9.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi…….....…113

4.9.4. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/ K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi……..….....…114

4.10. Hidrojellerin Şişme Değerlerinin Zamanla Değişimi…….....…116

4.11. İmmobilize Lakkazın Termal İnaktivasyonu.....118

4.12. Serbest Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilmesi 123

4.13. İmmobilize Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilmesi.....124

4.13.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi.....124

4.13.2. Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi.....125

5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ……..127

KAYNAKLAR.....129

ÖZGEÇMİŞ.....140

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri…….….17

Çizelge 2.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması……..…….32

Çizelge 3.1. Siringaldazin derişimi ile absorbansın değişimi……..……...65

Çizelge 4.1. Serbest lakkaz enzimi aktifliğine pH' nın etkisi….…….75

Çizelge 4.2. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi……...……..……77

Çizelge 4.3. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi…….…..78

Çizelge 4.4. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi…….....…80

Çizelge 4.5. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi……...81

Çizelge 4.6. Serbest lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi…….84

Çizelge 4.7. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi……...……86

Çizelge 4.8. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi……..…….87

Çizelge 4.9. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi…….….89

Çizelge 4.10. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi……..……...90

Çizelge 4.11. Serbest enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi…….94

Çizelge 4.13. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi……..……..97

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.14. P(AAm-CA)/aljnat hidrojelinde immobilize edilen lakkazaktifliğine substrat derişiminin etkisi……..…98

Çizelge 4.15. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi……..……100

Çizelge 4.16. Serbest enzim ve immobilize enzim için K_m ve V_{mak} değerleri……..……101

Çizelge 4.17. Serbest enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi…….102

Çizelge 4.18. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi……..…104

Çizelge 4.19. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.....…….……105

Çizelge 4.20. P(AAm-CA)/Alj hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi……107

Çizelge 4.21. P(AAm-CA)/K-kar hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi……..…108

Çizelge 4.22. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi…….……110

Çizelge 4.23. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi……..…112

Çizelge 4.24. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi……..…113

Çizelge 4.25. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi……..……115

Çizelge 4.26. Hidrojellerin % şişme değerlerinin zamanla değişimi…….117

Çizelge 4.27. 30 ^{0}C ve 50 ^{0}C' da immobilize lakkazların ki sabitleri……122

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli ……..…...11

Şekil 2.2.. İmmobilizasyonun enzim aktifliğine etkisi……...….21

Şekil 2.3. İmmobilizasyon prosesi…….…22

Şekil 2.4. İmmobilizasyon metotlarının şematik gösterimi.....23

Şekil 2.5. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon…….…….25

Şekil 2.6. Mikrokapsülleme ile immobilizasyon yöntemleri…….…….29

Şekil 2.7. Kafes tipi hapsetme metodu ile immobilizasyon……..……30

Şekil 2.8. Lakkaz üreten *Trametes versicolor* mantarı…….……34

Şekil 2.9. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması…….……..34

Şekil 2.10. Siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime ……...36

Şekil 2.11. *Trametes versicolor'* dan elde edilen lakkaz enziminin üç boyutlu yapısı…….……..36

Şekil 2.12.Sodyum aljinat'ın kimyasal yapısı……..…38

Şekil 2.13. Karragenanın tekrarlanan birimlerinin yapısı……..39

Şekil 2.14. K-karragenanın yapısı…….…40

Sekil 2.15. Yarı iç içe geçmis ağ yapı (yarı-IPN)……...41

Şekil 2.16. Semi IPN oluşumu…….……..43

Şekil 2.17. ABTS ve $ABTS^{\bullet+}$ nin oluşumu ……44

Şekil 2.18. Metil oranjın lakkaz varlığında önerilen bozunma mekanizması…….……..47

Şekil 2.19. Lakkazın mediyatör valığında önerilen tepkime mekanizması…….…….……..48

Şekil **Sayfa**

Şekil 3.1. Siringaldazin kalibrasyon eğrisi……..……66

Şekil 4.1. Serbest lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile
değişimi……..76

Şekil 4.2. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz
enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi…….....77

Şekil 4.3. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz
enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi……79

Şekil 4.4. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz
enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi…….……80

Şekil 4.5. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz
enziminin maksimun aktifliğinin pH ile değişimi……..…..…...82

Şekil 4.6. Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi..…84

Şekil 4.7. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın
maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....……86

Şekil 4.8. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın
maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi……..88

Şekil 4.9. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın
maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi……..…89

Şekil 4.10. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın
maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi…….……91
.
Şekil 4.11. Serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği……94

Şekil 4.12. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın
Lineweaver-Burk grafiği…….……96

Şekil 4.13. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın
Lineweaver-Burk grafiği…….……97

Şekil 4.14. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın
Lineweaver-Burk grafiği…….……..99

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.16. Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi……..……..102

Şekil 4.17. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi……...104

Şekil 4.18. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi……...106

Şekil 4.19. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi……...107

Şekil 4.20. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi……..…109

Şekil 4.21. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi …….111

Şekil 4.22. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi……..…112

Şekil 4.23. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi……...…....114

Şekil 4.24. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi……..……115

Şekil 4.25. Hidrojellerin % şişmelerinin zamanla değişimi…….……..…117

Şekil 4.26. 30 ^{0}C' da P(AAm-CrA)/Alj-L için $\ln A_t$ – t grafiği…….118

Şekil 4.27. 30 ^{0}C' da P(AAm-CrA)/K-kar-L için $\ln A_t$ – t grafiği……...….119

Şekil 4.28. 30 ^{0}C' da P(AAm-CA)/Alj-L için $\ln A_t$ – t grafiği……..119

Şekil 4.29. 30 ^{0}C' da P(AAm-CA)/K-kar-L için $\ln A_t$ – t grafiği……...…..120

Şekil 4.30. 50 ^{0}C' da P(AAm-CrA)/Alj-L için $\ln A_t$ – t grafiği…….120

Şekil 4.32. 50 ^{0}C' da P(AAm-CA)/Alj-L için $\ln A_t$ – t grafiği……..121

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.34. SL, DSL, SL+ABTS, DSL+ABTS ile metil oranjın renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi……...123

Şekil 4.35. P(AAm-CrA)/Alj-L, P(AAm-CrA)/Alj-DL, P(AAm-CrA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-CrA)/Alj-DL+ABTS ile metil oranjın renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi ...124

Şekil 4.36. P(AAm-CrA)/K-kar-L, P(AAm-CrA)/K-kar -DL, P(AAm-CrA)/K-kar -L+ABTS, P(AAm-CrA)/ K-kar -DL+ABTS metil oranjın renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi.....125

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 hidrojel kütlesi
W_w	Şişirilmiş hidrojel kütlesi

Kısaltmalar	Açıklama
DSL	Denatüre serbest lakkaz
DSL+ABTS	Denatüre serbest lakkaz ve ABTS
P(AAm-CrA)/Alj	Poli(akrilamit-krotonik asit)/Sodyum aljinat
P(AAm-CrA)/K-kar	Poli(akrilamit- krotonik asit)/K-karregenan
P(AAm-CA)/Alj	Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/Sodyum aljinat
P(AAm-CA)/K-kar	Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/Sodyumaljinat
P(AAm-CrA)/Alj-L	Poli(akrilamit-krotonik asit)/Sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilmiş lakkaz

Kısaltmalar	Açıklama
P(AAm-CrA)/Alj-DL	Poli(akrilamit- krotonik asit)/Sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilmiş denatüre lakkaz
P(AAm-CrA)/Alj-L+ABTS	Poli(akrilamit-krotonik asit)/Sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilmiş lakkaz ve ABTS
P(AAm-CrA)/Alj-DL+ABTS	Poli(akrilamit-krotonik asit)/Sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilmiş denatüre lakkaz ve ABTS
P(AAm-CrA)/K-kar-L	Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilmiş lakkaz
P(AAm-CrA)/K-kar-DL	Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilmiş denatüre lakkaz
P(AAm-CrA)/K-kar-L+ABTS	Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilmiş lakkaz ve ABTS
P(AAm-CrA)/K-kar-DL+ABTS	Poli(akrilamit- krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilmiş denatüre lakkaz ve ABTS
P(AAm-CA)/Alj-L	Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/Sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilmiş lakkaz
P(AAm-CA)/K-kar-L	Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilmiş lakkaz
SL	Serbest lakkaz
SL+ABTS	Serbest lakkaz ve ABTS

1.GİRİŞ

Tüm dünyada karşılaşılan çevre kirliliği sorunu doğada süre gelen dengeleri bozar duruma gelmiştir. Günümüzde sanayileşmenin hızla gelişmesi çevre kirliliğine karşı daha duyarlı olmayı gerektirmektedir. Doğa kendi içinde ekolojik dengesi ile bu kirliliği belli ölçüde yok edebilmektedir. Ancak sanayileşmenin hızla büyümesi, nüfüsun hızla artması doğanın çok daha hızlı kirlenmesine sebep olmaktadır.

Çevre kirleticileri, fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sınıflandırılabilir. Çevre kirliliğinin bir çok nedeni vardır. Bunlar endüstriyel katı, sıvı, gaz atıkları, yer altı suyunun kirlenmesine yol açan gübreleme atıkları, ağır metallerin toprağı kirletmesi olarak sayılabilir. Endüstrinin meydana getirdiği tehlikeli atıklar endüstriyel üretimle doğru orantılı olarak büyümektedir. Arıtma tesislerinin yetersizliği, atıkların boşaltımının gelişi güzel yapılması insan sağlığı için çok ciddi tehlikeler oluşturmaktadır. Doğadaki mikro organizmalar bazı atıkları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak zararlı etkilerini azaltmaktadır. Fakat bu atıklar mikro organizmaların özümleyeceği kapasitenin üzerine çıkarsa ekolojik denge olumsuz yönde etkilenir.

Son yıllarda atıkların oluşturacağı problemleri önlemek için, depolama ve arıtma sistemleri üzerinde çalışılmıştır. Fakat bu yöntemler tüm atıklar için uygulanabilir bir çözüm değildir. Günümüzde yapılan çalışmalarda biyolojik arıtım yöntemleri üzerinde durulmuş ve böylece enzim üretimi ve yöntemleri ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Biyoteknoloji, organizmaların biyolojik sistemlerini ve bunların süreçlerinin pratik ve ticari amaçlar için kullanılması olarak tanımlanabilir. Biyoteknolojik teknikler, enzim teknolojisi, fermantasyon, hücre dokusu ve kültürü teknikleri gibi aktiviteleri içermektedir [1]. Enzim teknolojisi, mikrobiyal işlemler, enzimlerin fermantasyon yoluyla üretilmesi, katalitik etkinliğin arttırılması ve immobilizasyon çalışmalarını kapsar.

Enzimlerin hemen hepsi protein yapısında olan doğal olarak sadece canlılar tarafından sentezlenir biyokimyasal tepkimelerin ilerlemesini ve düzenlemesini sağlar. Biyolojik katalizör olarak görev yaparak kimyasal tepkimelerin aktivasyon enerjilerini düşürürler. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan bir çok enzim pH' sı 5 den küçük 9 dan büyük çözeltilerde ve 40 ^{0}C nin üzerinde aktifliklerini kaybederler. Enzimler 2 ^{0}C – 5 ^{0}C da muhafaza edildiklerinde aktifliklerini uzun süre koruyabilirler. Enzimlerin kullanıldığı proseslerde enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanılmasıyla birlikte diğer yöntemlerde kullanılabilir. Bu yöntemlerde havalandırma, çöktürme tankları gibi proseslere ihtiyaç olmayacağı için yatırım masrafları azdır. Enzimler seçici ve aktif biomoleküllerdir. Geniş pH ve sıcaklık aralıklarında aktiflik göstermelerinden dolayı mikro organizmalara göre kullanım alanları daha geniştir. Sanayide, enzim bir destek üzerine immobilize edilerek kullanılması, mikroorganizmalara ve serbest enzime göre daha 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 için oldukça önemli avantajlardandır.

Bu tez çalışmasında, lakkaz enzimi P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/K-kar, P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerine hapsetme yöntemiyle immobilize edildi. Serbest ve immobilize lakkazın aktifliğine, pH, sıcaklık, depolama süresi, substrat derişimi gibi parametrelerin etkisi araştırıldı. Termal kararlılık, kinetik parametreler, termal inaktivasyon, immobilize enzimin tekrar kullanabilirliği ve hidrojellerin şişme kapasiteleri incelendi. Ayrıca metil oranj boyasına lakkaz enziminin etkisi araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hidrojeller

Hidrojeller, suda şişebilen, yapılarına çözücü alabilen ve çözücü alma kapasitesi yüksek olan ağ yapısına sahip çapraz bağlı polimerlere denir. 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 çözünmezler [2]. Su içeriği kendi kütlesinin % 100' ün den fazla olan hidrojellere de süper absorbant denilir [3]. Hidrojellerin üç boyutlu yapısı kimyasal bağlar, iyonik etkileşme, hidrojen bağı veya hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşir. Hidrofobik etkileşimler, fiziksel çapraz bağ benzeri etkileşimler olduğundan jelin şişme davranışını doğrudan etkilemektedir [4].
Hidrojeller genellikle gözenekli süngerimsi yapıda ve gözeneksiz jeller halinde, optikçe geçirgen filmler şeklinde ya da sıvı olarak elde edildikten sonra çeşitli biyomateryallere yüzeyden kaplanmak suretiyle değişik boyutlarda hazırlanabilmektedir [5].

2.1.1. Hidrojellerin sınıflandırılması

Polimerik hidrojeller hazırlanma yöntemlerine, iyonik yüklerine, içerdikleri yan gruplarına, fiziksel yapılarına ve çapraz bağlanma durumlarına bağlı olarak sınıflandırılabilir [6].

Hazırlama yöntemine göre

- Çoklu Polimer Hidrojeller
- Ipn Hidrojeller
- Homopolimer Hidrojeller
- Kopolimer Hidrojeller

Fiziksel yapılarına göre

- Poliamfolitik Hidrojeller
- Amorf Hidrojeller
- Yarı-Kristalin Hidrojeller

İçerdikleri yan gruplara göre

- Nötral Hidrojeller
- İyonik Hidrojeller
- Anyonik Hidrojeller
- Katyonik Hidrojeller
- Poliamfolitik Hidrojeller

Su içeriklerine göre

- Düşük Şişme Dereceli (20-50 %)
- Orta Şişme Dereceli (50-90%)
- Yüksek Şişme Dereceli (90-99,5%)
- Süper Absorbant (>99,5 %)

Kaynaklarına göre

- Doğal Hidrojeller
- Sentetik Hidrojeller

Kimyasal kararlılıklarına göre

- Biobozunur
- Biobozunmayan

Çapraz bağlanma durumlarına göre

- Fiziksel Hidrojeller
- Kimyasal Hidrojeller

Homopolimer hidrojeller

Tek tür monomerden oluşturulan hidrojellerdir. Poli(2-hidroksi etil metakrilat) (PHEMA), poli(gliseril metakrilat), poli(3-hidroksi propil metakrilat) lar bu hidrojellere örnek olarak verilebilir [6]. Yumuşak kontak lens yapımı ve kontrollü ilaç salım aparatları gibi önemli uygulama alanları vardır [7].

Kopolimer hidrojeller

İki komonomerin çapraz bağlanması ile hazırlanırlar; ancak monomerlerden en az bir tanesi hidrofilik yapıda olmalıdır. Kopolimerik hidrojellerde çapraz bağlanma kovalent ya da iyonik olarak gerçekleşebilir [3].

Çoklu polimer hidrojeller

Üç ya da daha fazla monomerden oluşan yapılardır [8]. Bu tür hidrojellere, hem pH ya hem de sıcaklığa duyarlı olan poli(N-izopropilakrilamit-ko-AA-ko-HEMA) örnek olarak verilebilir [9].

IPN veya iç içe geçmiş polimerik ağ yapılı hidrojeller

Çapraz bağlı iki polimerik örgünün fiziksel olarak birleşmesi ile oluşur. Bu yapılardan en az biri diğerinin varlığında sentezlenir ve/veya çapraz bağlanır [10]. IPN' yi oluşturan iki polimerik örgünün birbiriyle uyumlu olması IPN oluşumunu artırır, faz oluşumunu engeller. Ayrıca IPN' yi oluşturan polimerler arasında kimyasal bağ bulunmadığından her iki bileşen de kendi özelliklerini korur ve aranan şartlara sahip bir yapı oluşumunu sağlayabilir [3,6]. Yarı-IPN

tipi hidrojellerde polimerlerden biri çapraz bağ içerirken diğeri içermez. Bu tür polimerlerde misafir polimer zincirleri, ev sahibi ağ yapının içinde kovalent bağlı veya kovalent bağsız olarak yer alabilirler [3].

İyonik olmayan hidrojeller

Yapılarında yüklü guruplar bulundurmayan homopolimerik veya kopolimerik nötr hidrojellerdir. Çözücünün ozmotik basıncı yan zincirin gerilme enerjisi ile dengelendiği zaman denge değerine kadar şişerler. Bu hidrojellerin şişme ve büzüşme durumları genellikle çevre sıcaklığındaki değişimin bir sonucu olarak meydana gelir [6].

İyonik hidrojeller

Polielektrolitler olarak da bilinen iyonik hidrojeller, iyonik yüklü monomerlerden hazırlanırlar. Bu hidrojeller monomer yüklerinin pozitif yada negatif olmasına göre katyonik ya da anyonik hidrojeller olarak adlandırılır. İyonik hidrojellerin ana zincirinde yüklü gurupların bulunması uyarılara duyarlılıkları artırır [9].

Anyonik hidrojeller

Anyonik hidrojeller, genellikle negatif yüklü asidik veya anyonik monomerlerin homopolimerlerden ya da bir anyonik monomerle bir nötr monomerin kopolimerinden oluşur. Bunlar dış ortam pH' sına bağlı olarak denge şişme davranışlarında ani değişimler gösterir [9].

Katyonik hidrojeller

Katyonik hidrojeller, pozitif yüklü bazik veya katyonik monomerlerin homopolimerlerinden ya da bir katyonik monomerle bir nötr monomerin kopolimerinden oluşurlar. Katyonik hidrojellerin hazırlanmasında yaygın

olarak kullanılan monomerlerden bazıları aminoetil metakrilat ve türevleri, 4-vinil piridindir [6].

2.2. Enzimler

Enzimler, protein yapısında olup ve doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenebilirler. Enzimler tepkimenin kinetiğini etkiler. Buna karşılık tepkimenin termodinamiği üzerinde etkisi yoktur. Enzimler diğer katalizörler gibi katalizledikleri tepkimenin aktivasyon enerjisini (E_a) düşürürler ve hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenlerler [10].

Enzimlerle birlikte katalitik tepkimelere giren ve yapısal değişikliğe uğrayan maddelere substrat denir. Enzimatik tepkimeler kimyasal kinetikte olduğu gibi tek, iki ya da daha fazla substratlı olabilirler. Enzimatik tepkimelerinin hızı, ortamın sıcaklığına, pH' sına, iyon şiddetine, hidrolik basıncına, inhibitör ve aktivatörün varlığına bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir [5].

Enzimi oluşturan amino asitlerin sayısı, sırası, dizilişi ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir ve bu düzen enzimin substratı için seçicilik sağlar. Kofaktörü ile birleşmiş ve aktif halde bulunan enzimlere *''haloenzim''* adı verilmektedir. Haloenzimin protein kısmına ise *''apoenzim''* denilir. Apoenzimlerin protein yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve özgüllüğünü belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzimler tek başlarına aktiflik gösteremezler, ancak koenzimle birlikteyken katalitik aktiflik kazanırlar [11,12].

Kofaktörler; inorganik iyonlar ve koenzimler olarak gruplandırılabilirler. Bazı enzimler tek başlarına da aktiflik gösterebilirken büyük bir çoğunluğunun aktiflik gösterebilmesi için başka moleküllerle kompleks oluşturması gerekmektedir. Bu maddelere ''koenzim''denir. Koenzimler metal iyonları

veya vitamin yapısında, veya bu yapıya benzeyen organik moleküller olabilir. Koenzimler; tepkime sırasında enzimin aktif merkezine gevşek olarak bağlanırlar ve aktiflik sonunda enzim molekülünden ayrılırlar [13,14]. Endüstriyel boyutta üretimi ve kullanımı giderek önem kazanan enzimler, günümüzde bitkisel ve hayvansal dokulardan ve genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bununla beraber, daha hızlı çoğalmaları, gelişme koşullarının kontrolünün kolay olması ve üretimlerinin mevsimlere bağlı olmaması vb. nedenlerle mikroorganizmalar ticari enzimlerin üretiminde tercih edilen önemli kaynaklardır [15].

2.2.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler başlıca altı sınıfa ayrılır. Bunlar kısaca şunlardır:

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon yani yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini katalize eden enzimler bu sınıftandır.
2. Transferazlar: Fonksiyonel bir grubun transfer tepkimesini katalize eden enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik tepkimeleri katalize eden enzimlerdir.
4. Liyazlar: Bu enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağlarını hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave ederler .
5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri yani izomerirasyon tepkimelerini katalize ederler.
6. Ligazlar (Sentetazlar): C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir [11].

2.2.2. Enzimlerin etkisi

Enzimler genellikle sustratlardan daha büyük moleküllerdir. Enzim molekülü üzerindeki kofaktör ve koenzimlerin yer aldığı, enzim-substrat kompleksinin

şekillendiği dar bir bölge aktif merkezi teşkil eder. 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 engelinin 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 diğer 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 10^3 ile 10^8 kere daha hızlı olarak gerçekleşir. Tipik olarak bir enzim molekülü saniyede 100 -1.000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. Enzim başına düşen ürüne çevrilmiş substrat molekülü sayısına “Turnover sayısı” denir [12,13].

Aktif bölgedeki değişiklikler

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

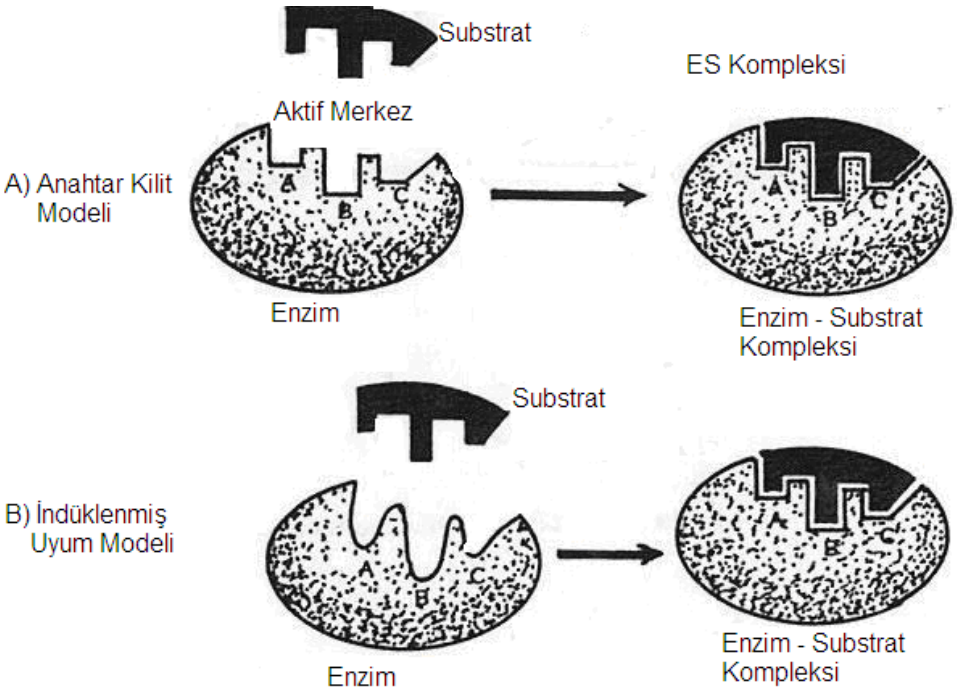
Aktif merkez, bir enzimin substrata yapıştığı bölge, bir de kataliz olayının gerçekleştirildiği bölge (katalitik yer) olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Bir enzimin yapısındaki amino asit artıklarının çoğu subtratla temas halinde değildir. Birçok enzimde katalitik yerde serin, sistin, histidin, tirozin ve lisin bulunur.

Aktif merkez substrata uyumlu olan üç-boyutlu bir yüzey oluşturan aminoasit yan zincirleri içerir. 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 [10,13,16].

Enzim molekülü özel bir cep içerir. Aktif taraf olarak tanımlanan bu bölge substratı bağlayarak enzim-substrat kompleksi oluşturur. Enzim ürün yapısına çevrilir ve sonra üründen enzim ayrılır. Bir enzimatik tepkime şu şekilde gerçekleşmektedir.

$$E + S \longleftrightarrow ES \longrightarrow E + Ü$$

Bu tepkimeye göre enzim (E), substratı (S) ile birleşerek bir enzim-substrat kompleksi (ES) kompleksi oluşturmakta, daha sonra da bu ES kompleksinden ürün oluşmakta, enzim ise tepkime ortamında tekrar serbest hale geçmektedir [17].



Şekil 2.1. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli

<u>Aktif merkezin bazı özelikleri:</u>

- Aktif merkez enzimin protein kısmında yer alır.
- Aktif merkez belirli çeşit, sayı ve dizilişte aminoasitlerden oluşmuştur.
- Substrat aktif merkeze H-bağları, van-der Waals ve elektrostatik güçlerle çok zayıf olarak bağlanmaktadır.
- Bazı enzimlerin birden fazla aktif merkezi olabilmektedir.
- Aktif merkez enzimin toplam hacminin çok küçük bir bölümünü oluşturmaktadır [14].

2.2.3. Enzimlerin uygulama alanları

Enzimler; bitkisel, hayvansal kaynaklardan ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Enzim kaynağı olarak mikroorganizmalar; kolay çoğalabilmeleri, enzim oluşumunun kolay kontrol edilebilmesi gibi nedenlerden dolayı bugün tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, kağıt, tekstil, deterjan vb. birçok alanda enzimler kullanılmaktadır. Son yıllarda biyoteknoloji alanında gelişmelerle elde edilen enzimlerin kullanımının en fazla olduğu alan gıda endüstrisi ve eczacılıktır. Enzim kullanımının en fazla olduğu alanlardan biri de deterjan endüstrisidir. Deri endüstrisinde de enzimlerden yararlanılmaktadır. Yapılan pek çok araştırma sonucunda, enzimlerin kullanım alanlarının giderek arttığı görülmektedir.

Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 30-35' i deterjan sanayiinde, % 20-25' i nişasta ile ilgili alanlarda, % 20' si süt ve süt ürünleri sanayiinde kullanılmaktadır. Bira, meyve ve şarap, unlu mamuller, tekstil, kağıt, deri ve yem sanayisinde kullanılan enzimler için her alanın yaklaşık %1- 5 arasında bir payı bulunmaktadır [18].

2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu, katalitik proseslerde enzim moleküllerinin kinetik etkisini kaybetmeden aktifliğini koruyarak tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla bir destek maddesine yerleştirilerek veya hapsedilerek fiziksel ve kimyasal bağlanması olarak tanımlanabilir [19].

Tarihte ilk enzim immobilizasyonu 1916 yılında Nelson ve Griftin tarafından adsorpsiyon yöntemiyle yapılmıştır. Nelson ve Griftin sakkarozu hidroliz etmek için maya invertazını mangal kömürüne adsorbe etmişlerdir. İmmobilize enzim sistemlerinin pratik olarak ilk kullanımı ise Grobhofer ve Scheilth (1954) tarafından yapılmıştır. Araştırmalarında; karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz enzimlerini poliaminostiren reçinesine

kovalent bağlanma ile immobilize etmişler ve bu immobilize enzim türevlerinin kinetik parametrelerini incelemişlerdir. Daha sonra da immobilizasyon çalışmaları dünyanın her tarafında yaygınlaşmış ve çeşitli enzimler değişik amaçlarla immobilize edilmiştir [16].

Protein yapılarından dolayı enzimler sıcaklık, ışık, basınç, kuvvetli asit ve baz etkisi ile bozunurlar. Aslında her enzimin kendine özgü sıcaklık, pH ve basınç koşulları bulunmakla beraber etkinlik optimumu 40 ^{0}C dolaylarındadır. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin, aktifliğini yitirmeden geri kazanılması oldukça zor ve pahalı bir proses gerektirir. Serbest enzim, tepkime ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından tepkimenin kontrolü çok güçtür. Tepkimenin istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan tepkime ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi tepkime ortamından aktifliğini yitirmeden çıkarabilmek zor olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etkendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar [14,20,21].
Bilim adamları tüm bu sorunları olumlu yönde çözümleyebilmek, enzimleri endüstriyel ve biyoteknolojik alanda daha çekici hale getirmek için, daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yönelmişlerdir. Böylece enzimlerin ısısal, mekanik ve kimyasal kararlılıklarını arttırma ve birçok kez kullanılabilme düşüncesi immobilize enzim olgusunu doğurmuştur. Özellikle son yıllarda gıda ve ilaç sanayilerinde, analitik kimya uygulamalarında saf ürün elde etmek amacıyla katalizör olarak kullanılan enzimlerin immobilize edilerek teknolojide de kullanılmaları büyük önem kazanmıştır. Özellikle son 30 yılda enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmış olup bu alanda yapılan yayınların sayısı yıldan yıla artmaktadır. Enzimler suda çözünmeyen bir matrikse bağlandıklarında,

matriksin içinde tutuklandıklarında veya katalitik etkileri kaybolmadan birbirlerine bağlandıklarında immobilize olurlar. İmmobilize enzimlerin özelikleri 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]. Matriks enzim için yeni bir ortam oluşturarak enzimin aktifliğini değişik yollarla etkiler. Kelime anlamı olarak hareketi sınırlandırma anlamına gelen "immobilizasyon" tutuklanmış enzim moleküllerinin sürekli bir işlemde kullanılmasıdır.

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 süretiyle yapılmaktadır. Her durumda enzimin yerleşmesi için suda çözünmeyen bir materyal gereklidir [14].

Enzim immobilizasyonunda dikkat edilmesi gereken hususlar; enzim immobilize edilirken aktif merkezin bu işlemlerden kesinlikle etkilenmemesi gerekir. Aktif merkezde iki bölge vardır. Bunlardan biri katalitik merkez diğeri ise substrat spesifikliği sağlayan merkezdir. Aktif merkezdeki amino asitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değişirse katalitik aktiflik düşer ve substrat spesifikliği 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 gerçekleşmeyeceği

destekler seçilmeli veya immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Bu koruma görevi bazen kompetitif inkübatör tarafından sağlanır. İmmobilizasyon işlemi ılıman koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yüksek basınç, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözücüler veya yüksek tuz konsatrasyonu 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 aktifliğinin korunması çok önemli olup, özellikle kovalent bağlanma ile immobilizasyonda enzim ile destek arasında oluşan bağların aktifliği ve kararlılığı doğrudan etkilediği 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.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan destek materyalinin önemi büyüktür. Uygun olarak seçilen bir destek materyali, üzerine immobilize edilen enzimin aktifliğini korumasını sağlar ve işlemsel kararlılığını artırır [22,23]. İyi bir destek materyali büyük yüzeysel alan, geçirgenlik, hidrofilik karakter, çözünmezlik, kimyasal, mekanik ve termal kararlılık, yüksek tutuculuk, uygun biçim ve parça büyüklüğü, mikrobiyolojik saldırılara karşı

direnç gibi özelliklere sahip olmalıdır. Destek maddesi; organik ve inorganik olarak kullanılırlar.

Organik destekler; doğal polimerler, proteinler, aktif karbon ve sentetik polimerler olmak üzere sınıflandırılabilir. Organik desteklere oldukça fazla sayıda ve çeşitli fonksiyonel gruplar katılabildiği için ticari olarak kullanılan pek çok immobilize enzim sistemi bu desteklerle hazırlanır [24]. Yaygın olarak kullanılan polisakkarit desteklerinden olan yosunlar ve selülozlar (agaroz, dekstran, selüloz türevleri) enzimleri bağlamada ve aljinat ile karregenan ise hapsetme amacıyla kullanılır [25,26]. Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan polisakkarit türevlerinin en büyük avantajı hidroksil gruplarına sahip olmasıdır. Polisakkarit desteklerde hidroksil grupları enzimlerin elektrofilik grupları ile etkileşerek enzim immobilizasyonu sağlar. Bununla birlikte polisakkarit desteklerin nükleofilik özelliklerinin zayıf olması nedeni ile aktivasyonu alifatik veya aromatik, karboksil veya tiyol grupları ilavesi ile sağlanır.

Sentetik polimerler fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak çok kullanılırlar. Sentetik polimerler mikroorganizmaların saldırılarına karşı dirençlidirler ve saflıklarını korurlar. Yaygın olarak kullanılan sentetik taşıyıcılar polistiren, vinil ve allil polimerler, poliamitler, poliakrilatlar, polimetakrilatlar ve bunların türevleridir. Akrilik polimerleri enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan asidik sentetik polimerlerdir. Bu polimerler, enzim hapsetme veya kovalent bağlama amacıyla kullanılmıştır. Poliakrilat ve polihidroksi alkil metakrilat ve bunların türevlerinin ticari olarak bulunması, enzim immobilizasyonu amacıyla kullanılmasına olanak sağlamıştır. Poliakrilat ve polimetakrilat, akrilik asit ve metakrilik asitlerin polimerizasyonuyla elde edilir. Akrilatlar esas olarak daha hidrofobik veya negatif yüklü matriksler hazırlanmasında diğer organik bileşiklerle kopolimer oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Polihidroksialkil metakrilatlar, hidrofilik organik matriks olarak hidroksil gruplarının sayısına göre geliştirilmiş mekanik özelliklere sahiptirler ve biyolojik dirençleri

yüksektir. Enzim bağlanmasında bu tip matriksler daha çok çözünür karbodiimitlerle aktiflenir. Makrogözenekli taşıyıcılar, bir çapraz bağlayıcı reaktif ve hidroksialkil metakrilatın radikalik süspansiyon kopolimerleşmesi ile küresel formda hazırlanırlar [27].

Enzim immobilizasyonunda destek olarak doğal ve sentetik birçok organik ve anorganik materyal kullanılmaktadır [28]. Çizelge 2.1' de enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri verilmiştir.

Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri

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

Enzimlerin immobilizasyonu sırasında aktif gruplar korunmalı ve enzim aktifliğini yitirmemelidir. Enzimlerin çeşitli yöntemlerle inert ve genellikle katı polimerik desteklere tutturularak immobilize edilmesi halen pek çok bilim adamının ilgilendiği araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır. Belli destek

malzemesi üzerinde tutuklanan enzimler immobilizasyon sırasında gerekli olan fizikokimyasal özelliklere sahip olmalıdır. Her uygulama için geçerli olabilen doğal makromoleküllerden hazırlanacak destek materyali bulmak kolay değildir. Ayrıca, gerekli özelliklere sahip destek materyallerini hazırlamak için protein ve polisakkaritleri modifiye etmek oldukça zordur.

Destek materyaline bağlanmada enzim molekülünün protein yapısından yararlanılır. Enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar bağlanmada etkilidir. Bunların yanında immobilizasyonda kullanılacak destek materyallerinde bazı özellikler de aranır, bunlar şu şekilde sıralanabilir [23].

1. Hidrofilik karakter
2. Suda çözünmeme
3. Gözenekli yapı
4. Mekanik dayanıklılık ve uygun partikül büyüklüğü
5. Kimyasal ve termal dayanıklılık
6. Mikroorganizmalara karşı dirençli olma
7. Ucuzluk
8. Zehirsizlik

İmmobilizasyon sırasında enzim molekülleri konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. İmmobilize enzimin zincir hareketleri çeşitli faktörlere bağlıdır.
Bunlar aşağıda verilmiştir.

- İmmobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi
- Destek ile enzimin karşılıklı etkileşmesi
- Aktifleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesi

gibi. Enzimler içinde bulundukları çevre tarafından etkilenirler. Enzimin katı destek üzerinde immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikro çevreyi

etkileyebilir. Bu da enzmin görünen davranışları üzerinde bazı değişiklikler oluşturur [29].

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

Bölme etkisi: Poliiyonik 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 gurupları 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 [30].

İmmobilize enzimlerin en önemli avantajları şu şekilde sıralanabilir [14,31,32].

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 kararlıdır.
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.

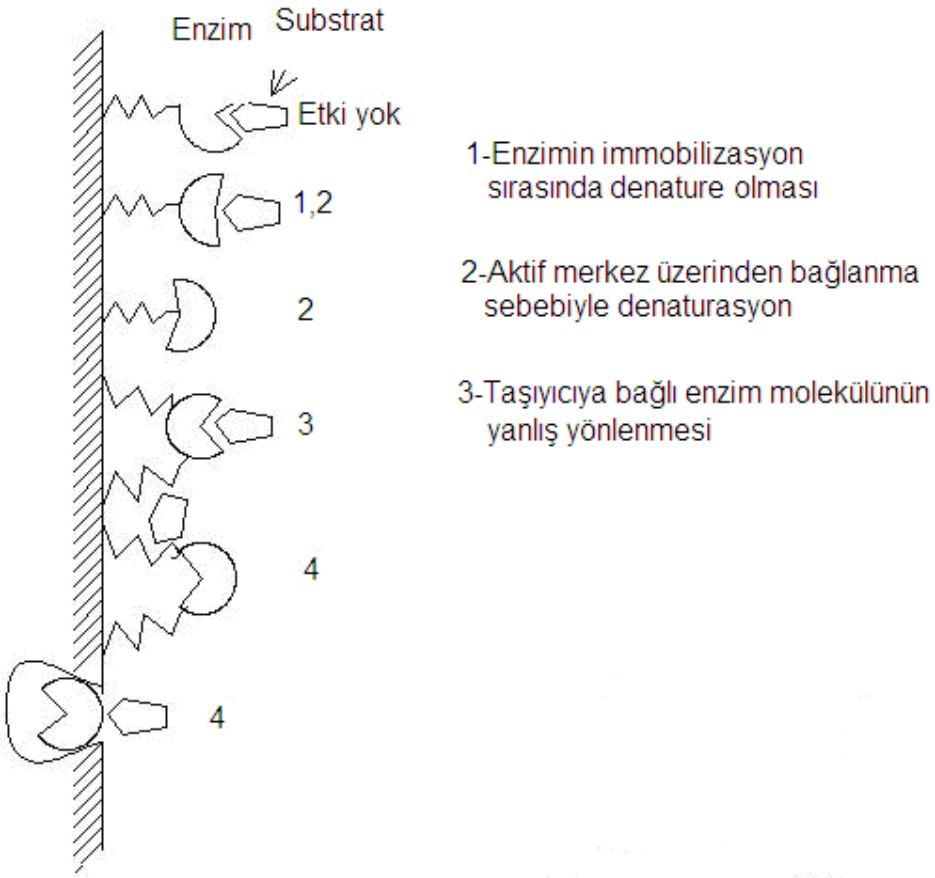
Enzimin immobilize edilmesinin bazı dezavantajları da vardır. Bunların başlıcaları aşağıda özetlenmiştir.

1. İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir veya kaybolabilir.
2. Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
3. Enzim desteklerinin maliyeti yüksektir [33].

2.4. İmmobilizasyonun Enzim Aktifliğine Etkisi

Teorik olarak immobilizasyondan sonra enzimin spesifik aktifliğinde düşme beklenir. Fakat hiç değişmediği veya arttığı örneklere de literatürde rastlanmaktadır. Enzim aktifliğindeki düşmenin başlıca sebepleri Şekil 2.2' de verilmiştir.

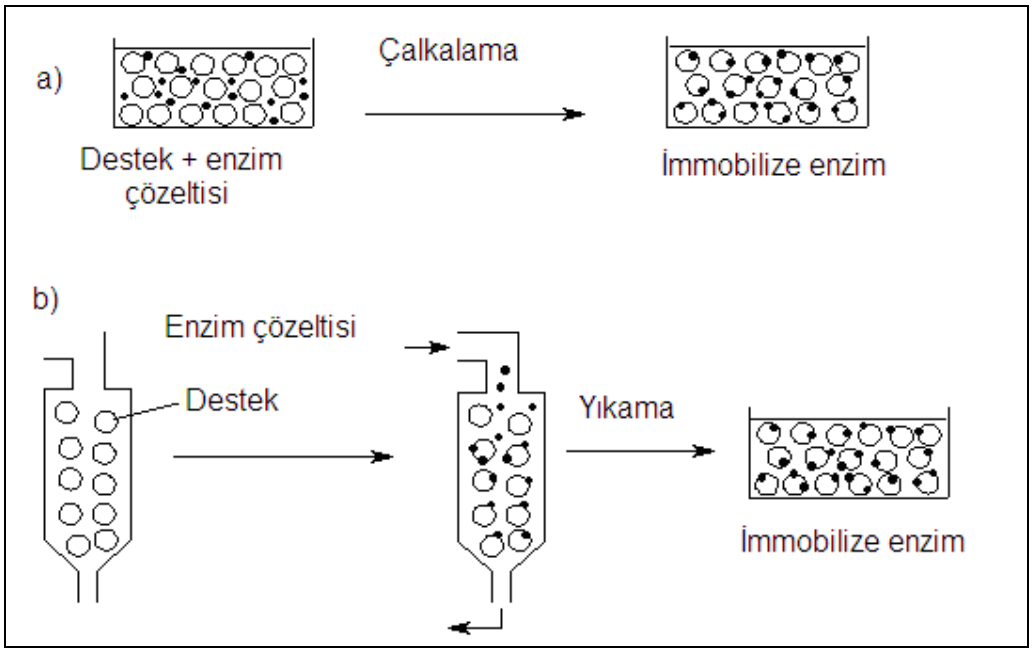
Enzim immobilizasyonunun verimi aktifliği hakkında fikir vermez. Bağlı enzimin ne oranda aktif enzim molekülü içerdiği ancak "aktif merkez tayini' ile belirlenebilir [34].



Şekil 2.2. İmmobilizasyonun enzim aktifliğine etkisi

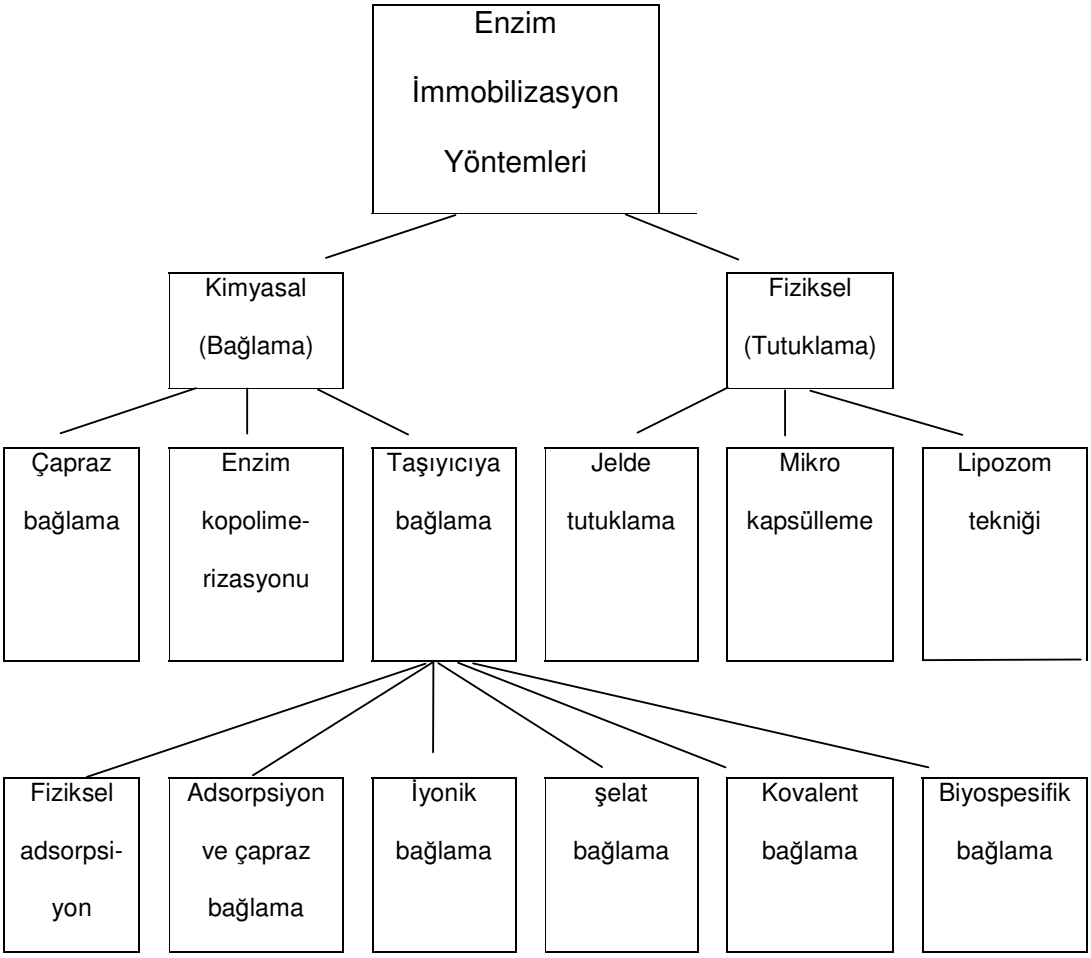
2.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon enzim moleküllerinin hareketini veya serbest difüzyonunu sınırlayan bir proses olarak tanımlanabilir. Genellikle bu proses enzimin suda çözünmeyen bir desteğe bağlanması ile gerçekleşir.



Şekil 2.3. İmmobilizasyon prosesi

1960'lı yıllardan bu yana enzimlerin immobilizasyonu için birçok immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Genel olarak enzimlerin immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.3' de verilmiştir [14,35].



Sekil 2.4. İmmobilizasyon metotlarının şematik gösterimi

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile destek arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği destekler seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır [36].

Enzim immobilizasyon yöntemleri çok farklı kaynaklarda değişik şekillerde sınıflandırılmalarına karşın fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir.

1) Kimyasal yöntemler
a) Kovalent bağlama
b) Çapraz bağlama
2) Fiziksel yöntemler
a) Adsorpsiyon ile immobilizasyon
b) Hapsetme ile immobilizasyon
-Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi
-Kafes tipi hapsetme yöntemi

2.5.1. Kimyasal yöntemler

Kimyasal immobilizasyon yöntemleri, suda çözünmeyen aktifleştirilmiş polimer ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu veya birden fazla enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumunu gerektirir. Kimyasal yöntemler çoğunlukla tersinmezdir. Serbest enzimin yeniden geri kazanılması mümkün değildir [23,37]. Kimyasal bağlanma ile immobilizasyon yöntemlerinin, immobilize enzimin çok kararlı olması, destek maddesinin dayanıklı olması gibi önemli avantajları vardır. Bunun yanında immobilizasyon veriminin sınırlı olması, tepkime şartlarının çok özel olması, kimyasal olarak inert olan destek maddelerine uygulanamaması gibi bazı dezavantajları da vardır [38]. Kimyasal yöntemler kovalent ve çapraz bağlanma ile immobilizasyon olmak üzere iki gruba ayrılır.

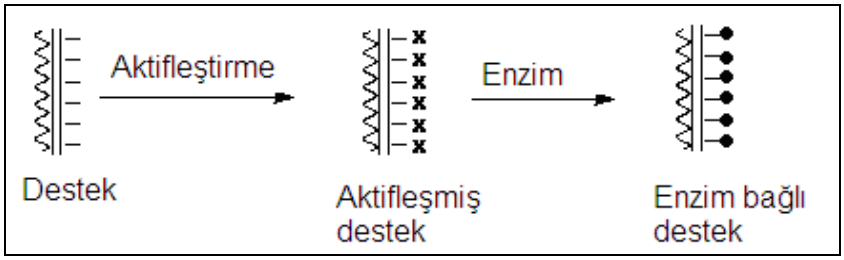
<u>Kovalent bağlanma</u>

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 çözeltiye geçmesini engeller [37]. 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 [39,40].

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 [22].

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir (Şekil 2.5). 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 2.5. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon

<u>Çapraz bağlanma</u>

Enzim molekülleri başka bir destek maddesi olmadan, kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlanarak immobilize olabilirler. Bu yöntem üç boyutlu çapraz bağlanmış enzim oluşumu esasına dayanmaktadır. Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulumu zordur [39]. Enzim aktifliği, tepkime süresi, sıcaklık, iyonik şiddet, pH, çapraz bağlayıcı madde

ve enzim derişimi gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu yöntemin en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki ya da çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Bu yöntemin dezavantajı ise yüksek aktiflik gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma tepkimesinin kontrol edilmesindeki zorluklardır. Çapraz bağlayıcı olarak enzim immobilizasyonunda kullanılan çok fonksiyonlu maddeler, diazobenzidin, 1,5-diflor-2-4-dinitro benzen, glutaraldehit, triklor-s-triazin, hekzametilen diizosiyanat, 2,4-diizotiyosiyanotoluendir [41].

2.5.2. Fiziksel yöntemler

Fiziksel yöntemler kovalent bağ oluşumuna bağlı olmadan, enzimin belirli bir yere tutturulmasını içerir. Enzimlerin immobilizasyonu bazı fiziksel kuvvetlerin etkileşmesiyle (elektrostatik, protein-protein etkileşmesi, iyonik bağların oluşumu, v.b) enzimin destek maddesindeki mikrobölmeler içerisinde veya gözenekli membranlarda tutturulmasıyla sağlanır. Esas itibariyle fiziksel immobilizasyon yöntemleri tamamen tersinirdir. Bununla birlikte çoğu özel örneklerde göz ardı edilemeyecek kadar tersinmez bağ oluşumları da gözlenir. Fiziksel yöntemler adsorpsiyon ve hapsetme ile immobilizasyon olmak üzere iki gruba ayrılır.

<u>Adsorpsiyon ile immobilizasyon</u>

Adsorpsiyon yöntemi en eski ve basit bir immobilizasyon yöntemidir [38,42]. 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 etkileşmelerdir [24]. İyonik bağlanma ile immobilizasyon, proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karşıt yükleri arasındaki çekim kuvvetlerine dayanır. Enzimin suda çözünmeyen materyallerde adsorpsiyonu, pH, çözücü karekteri, iyonik kuvvet, protein ve

adsorbanın derişimi, sıcaklık gibi deney koşullarına bağlıdır. Enzim ile destek maddesi arasındaki zayıf bağlardan dolayı adsorblanan 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 kullanılabildiği 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 [43]. Çeşitli aktif yüzeyli malzemeler enzim-adsorpsiyon komplekslerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. En çok kullanılanlardan bazıları anyon ve katyon değiştiricili reçineler, sentetik polimerler, aktif karbon, silikajel, diatomik topraklar ve killer, alumina, gözenekli camlar ve seramiklerdir [25].

Hapsetme ile immobilizasyon

Bu yöntem polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesine dayanır [44]. Enzim sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer oluşumu ve/veya çapraz bağlanma ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınlarıyla başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir [44,45]. Polimerik matriks yapısının, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeteri derecede sıkı olması gerekir. Bu yöntem her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için çok genel kullanılabilir [22]. Hapsetme yöntemi mikrokapsül ve kafes tipi olmak üzere iki gruba ayrılır.

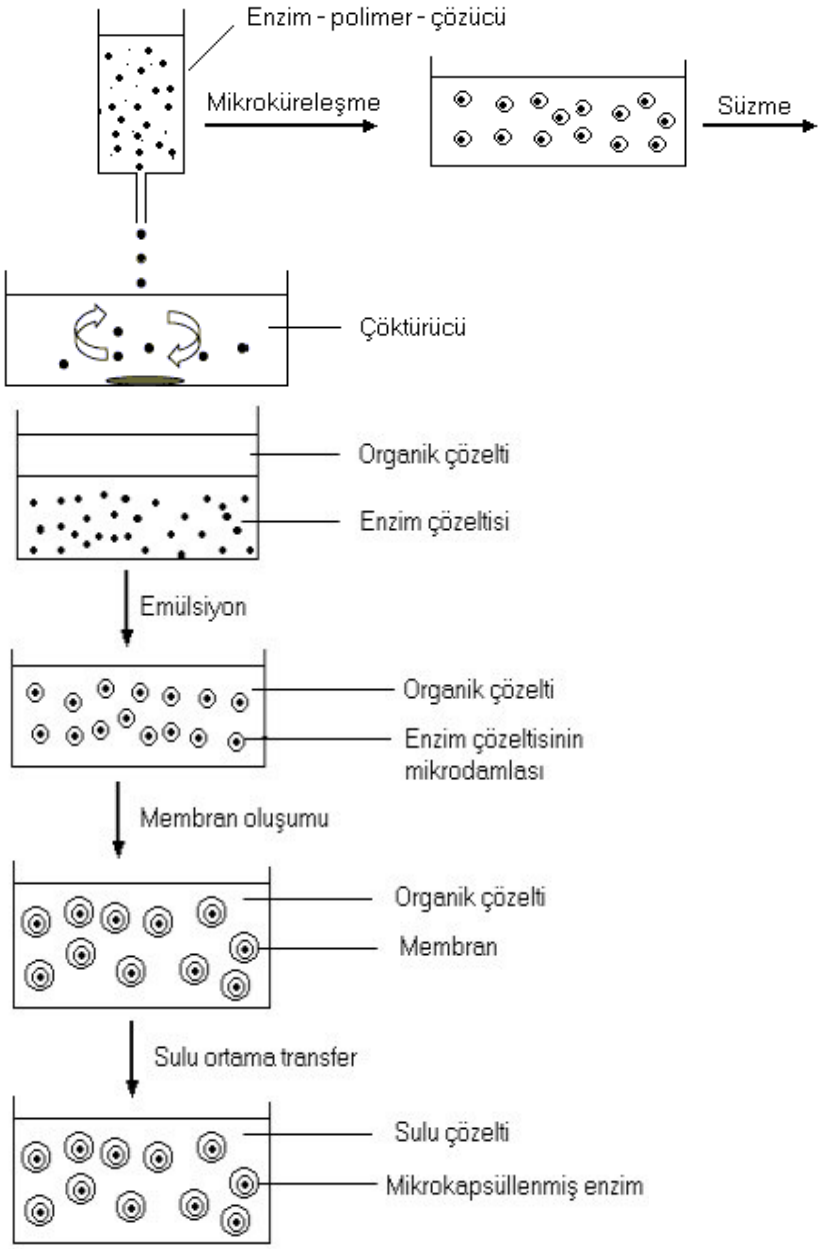
Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi

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

mikrokapsüllenmesi 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 emülsiye edilir. Ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikro damlalarının etrafında membran oluşturur. Böylece enzim polimerik membran tarafından sarılarak mikrokapsüllenmiş olur (Şekil 2.6).

Mikrokapsülleme yönteminde herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır [46] . 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.

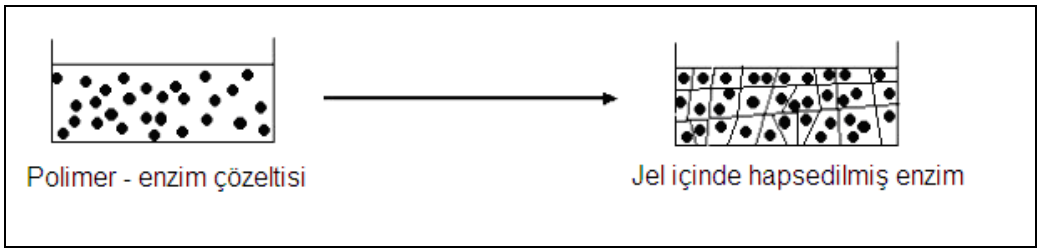


Şekil 2.6. Mikrokapsülleme ile immobilizasyon yöntemleri

<u>Kafes tipi hapsetme yöntemi</u>

Kafes tipi hapsetme yöntemi, 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 şebekesi oluşturulur. Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisinde tutulur ve jel matriksin dışına çıkamaz, fakat substrat ve ürün bu şebeke içerisine sürekli olarak girip çıkabilir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Kafes tipi hapsetme metodu ile immobilizasyon

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 [37, 38, 46, 47].

Bu yöntemin dezavantajları çapraz bağlı polimer şebekesinden enzimin sızması, yalnızca küçük hacimli substratlar için sınırlı olması ve makromoleküler substratlar için çok düşük aktiflik göstermesidir.

2.6. İmmobilizasyon Yönteminin Seçimi

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde öncelikle enzimin bağlanacağı destek materyalinin yapısı dikkate alınmalıdır [48].

Başarılı bir immobilizasyon için aşağıdaki faktörler gözönünde bulundurulmalıdır [34].

1. Destek materyalinin mekanik özellikleri, özellikle fiziksel formu ve mekanik kararlılığı göz önünde bulundurulmalıdır.
2. Enzim, tepkimenin yürütüleceği koşullarda kararlı olmalıdır.
3. Çapraz bağlayıcı reaktifler, enzimin aktif uçları ile tepkimeye girmemelidir veya çapraz bağlayıcı reaktif, enzimin aktif ucuna nüfuz etmemesi için olabildiğince büyük olmalıdır.
4. Mümkünse enzimin aktif ucu bir şekilde korunmalıdır. Örneğin sülfidril enzimleri, glutatiyon veya sistein ile tepkimeye sokularak korunabilir ve daha sonra enzim tekrar aktifleştirilebilir.
5. İmmobilizasyonda, bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulanan yıkama işlemi enzimi etkilememelidir.
6. İmmobilize enzim, bazı kimyasal tepkimelerde devamlı katalizör olarak kullanılacak ise immobilizasyon yöntemini seçmeden önce tepkimenin doğası göz önünde bulundurulmalıdır.

2.7. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Günümüze kadar birçok enzim için birçok farklı immobilizasyon yöntemi uygulanmış ve önerilmiştir. Ancak enzimlerin birbirlerinden çok farklı kimyasal karakteristikleri ve bileşenleri olması, ayrıca kullanılan substrat ve ürünün farklı kimyasal özellikleri olması nedeniyle bütün enzimler için ve bütün şartlarda uygulanabilecek kesin bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Ayrıca her immobilizasyon yönteminin uygulama şartlarına göre avantajları ve dezavantajları vardır [49]. Bu nedenle immobilizasyon işlemi sırasında veya immobilizasyondan sonra aktif merkezin zarar görmeyeceği bir yöntem seçilmelidir. Böyle bir seçimin sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir [43,49]. Çizelge 2.2' de immobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

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

2.8. 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, ABTS mediyatörü kullanılmıştır.

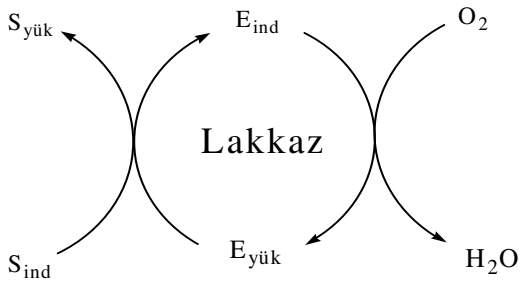
2.8.1. Lakkaz

Lakkaz (*Trametes versicolor'*dan elde edilen, E.C.1.10.3.2.) enzimi, her molekülü dört bakır iyonu taşıyan bir oksidoredüktazdır. Lakkaz redoks enzimlerinin bir alt sınıfıdır. Karbohidraz ve proteazlar gibi hidrolitik enzimlerinin substrat özgünlüğünün aksine redoks enzimlerinin substrat özgünlüğü oldukça azdır [50].

Lakkaz enzimi bilinen en eski enzimlerdendir, ilk olarak 1883 yılında Yoshida tarafından, *Rhus vernicifera*'nın özsuyundan izole edilmiştir. Lakkaz enzimleri bakteriler, böcekler, yüksek yapılı bitkiler ve mantarlar olmak üzere 4 canlı grubunda üretilmektedir [51,52]. Lakkaz kaynağı olan mantarlara, *Trametes versicolor, Rhus vernicifera, Trametes hirsuta, Panus tigrinus, Flavodon flavus, Agaricus bisporus* örnek olarak verilebilir. Bunlardan beyaz çürükçül mantarlar daha çok kullanılmaktadır. Şekil 2.8.'de beyaz çürükçül mantarlardan biri olan *Trametes versicolor* görülmektedir.

Şekil 2.8. Lakkaz üreten *Trametes versicolor* mantarı

Lakkaz fungal lignolitik sistem içerisinde önemli rolü olan enzimlerden birisidir. Lakkaz bir fenol oksidaz enzimidir ve serbest radikal şekilenmesi ile bir hidroksil grubundan bir elektron ve bir proton uzaklaştırılması sonucunda orto ve para difenoller ve aromatik aminlerin tek elektron oksidasyonunu katalizler. Oksidasyon aktifliği moleküler oksijenin su ile tepkimesiyle birlikte gerçekleşir (Şekil 2.9).



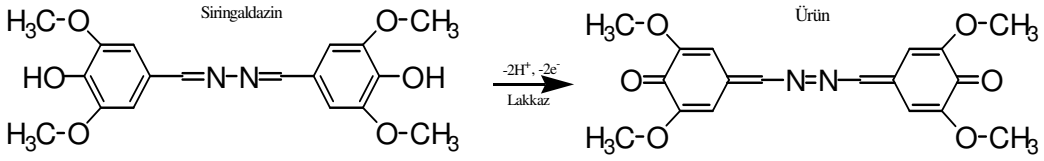
Şekil 2.9. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması

Lakkaz enzimi, aromatik substratı oksitlerken, aynı zamanda oksijen molekülünün suya indirgenmesini katalizler (Şekil 2.7.) [51,52]. 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. T1 tip bakır (mavi bakır) elektron transferini katalizler. T2 tip bakır moleküler oksijeni aktive eder ve T3 tip bakır ise oksijeni tutmadan sorumlu bir bakır dimeridir [53].

Bir lakkaz enzimi, kaynağından molekül kütlesi, 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 [54].

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 ^{0}C arasında değişiklik göstermektedir. Lakkaz enziminin optimum pH değeri kullanılan substrata göre de değişmektedir [52].

Lakkaz enziminin tepkime verdiği substratlar, geniş bir aralıkta değişmektedir. Bu substratlardan bazıları 4-benzendiol, siringaldazin, naftol, diklorofenol, metoksifenol, askorbat, pirogallol, kresol, syringic asit vb. türevleridir [55]. Genel olarak fenoller, amino fenoller ve aromatik diaminler ile benzer özellikler gösteren substratlar, lakkaz enzimi tarafından oksitlenebilir [56] . Şekil 2.10' da siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime ve sonuçta oluşan ürün gösterilmektedir [57].



Şekil 2.10. Siringaldazinin lakkaz ile verdiği tepkime

Günümüzde enzimlerin 3 boyutlu yapıları ayrıntılı bir şekilde X-ışınları kristalografisiyle görüntülenebilmektedir. Bu şekilde pek çok enzimin üç boyutlu yapısı aydınlatılabilmiştir. Şekil 2.11' de *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz enziminin üç boyutlu yapısı görülmektedir [58].

Şekil 2.11. *Trametes versicolor'* dan elde edilen lakkaz enziminin üç boyutlu yapısı

Lakkaz enziminin önemi ve kullanıldığı yerler:

Son yıllarda yapılan pek çok biyoteknolojik çalışmada lakkaz enzimi önemli bir yer tutmaktadır. Lakkazın biyoteknolojik olarak kullanım aşamaları şöyle sıralanabilir.

- Endüstriyel atık suların biyolojik arıtımı
- Biyolojik kağıt hamuru yapımı ve biyolojik ağartma işlemlerinde yardımcı olarak
- Meşrubatların lezzetinin artırılmasında ve berraklaştırılması için
- Kömürün sıvılaştırılması için [59].

2.8.2. Siringaldazin

4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin'nin molekül 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.

2.8.3. Sodyum aljinat

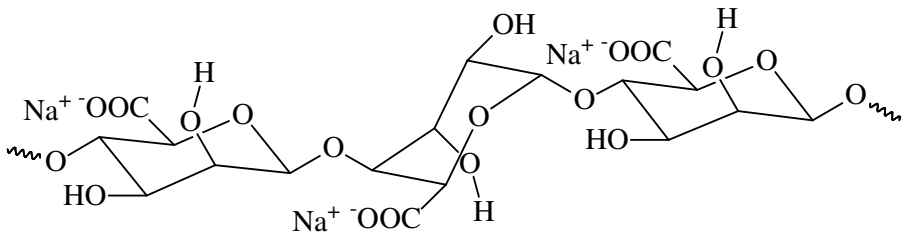
Aljinik asit kahverengi alglerin hücre duvarlarında bulunan lineer asidik bir polisakkarittir. Aljinik asidin elde edildiği belli başlı algler aşağıda verilmiştir;

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

- *Lessonia,*

Bu yosunlardaki aljinik asit içeriği %20-40 arasında değişmekle birlikte, hücre zarının temel bileşenini oluşturur [60].

Aljinik asit 1881 yılında, Stanford tarafından kahverengi su yosunlarından ekstraksiyonla elde edilmiştir [60]. 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 (Şekil 2.12). 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 çözündüğünde viskoz kolloidal bir çözelti oluşturur.

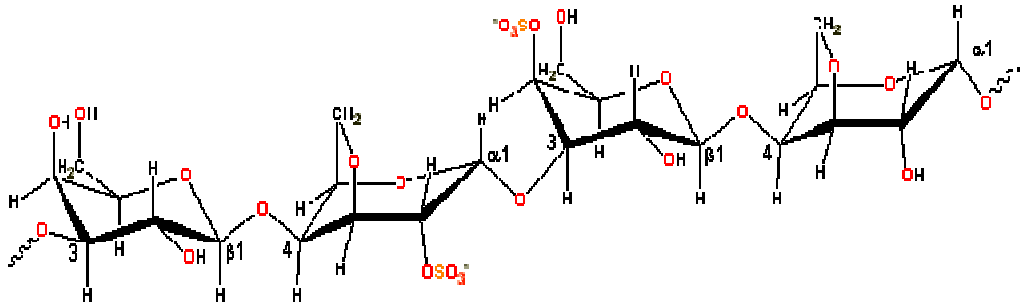


Şekil 2.12. Sodyum aljinat'ın kimyasal yapısı

Aljinatın yüksek molekül kütlesi, 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 [61].

2.8.4. Karragenan

Karragenan kırmızı deniz yosunlarından elde edilen lineer bir polisakkarittir. 3-β-D-galaktopiranoz ve 4-α-D-galaktopiranoze birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşan bir polisakkarittir [62] (Şekil 2.13).

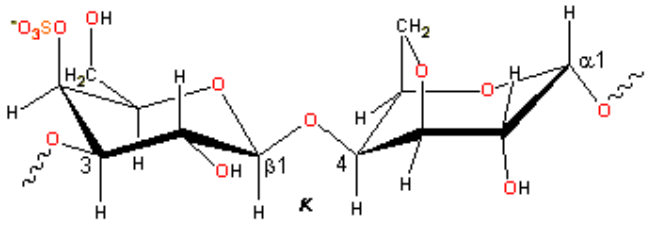


Şekil 2.13. Karragenanın tekrarlanan birimlerinin yapısı

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* (ı) ve *lambda* (λ) karragenandır. K-karragenan en fazla bulunan ve kullanılan türüdür (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. 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 [63,64].

2.8.5. Destek materyali

IPN yapılar ilk kez Millar tarafından ortaya atılan iç içe geçmiş ağ yapılı (interpenetrating network, IPN) en basit tanımıyla, doğal veya sentetik iki bileşenden en az bir bileşenin diğerinin varlığında çapraz bağlı olduğu yapılardır [65]. IPN oluşumu, polimerik bileşenlerin birbirleri ile uyumunu artırmak için mükemmel bir yoldur. Bir IPN, belirli bir uygulamada makromoleküler yapıdaki benzerine göre daha üstün performans gösterir [66].

Çok sayıda araştırmacının, IPN formu hazırlamak için, doğal ve sentetik polimerlerin çeşitli kombinasyonlarını kullandıkları kaydedilmiştir. Çeşitli yöntemler ile eşsiz topolojiye sahip IPN' ler üretilebilmektedir.

Ard 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 polimer eş değer olduğu koşullarda her iki yöntemde kullanılarak, homo-IPN'ler hazırlanabilir.
Pek çok polimer termodinamik yönden düşük ya da yüksek oranda birbirleri ile uyumsuz olduklarından, IPN'lerin çoğu kısmen iç içe geçerek ağ yapıyı oluştururlar. Ferry (1980) tarafından bu tip IPN'ler, yarı uyumlu ya da kısmi IPN'ler olarak sınıflandırılmaktadır. Polimer ağ yapılar, yalnızca tamamen birbiri içinde karışabildikleri durumda ideal iç içe geçmiş ağ yapıları oluştururlar [67].

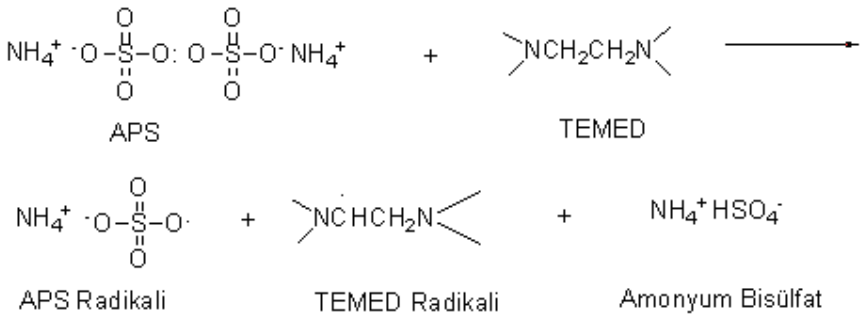
Bazı bilim adamları, sentez mekanizması yönünden IPN'leri, aşı kopolimerlerinin paraleli olarak kabul etmektedirler. Ancak aşı kopolimer sentezi çapraz bağlı polimerin; diğer monomer, bu monomerin çapraz bağlayıcısı ve başlatıcısı içinde çözünmesi ile gerçekleşir. IPN sentezinde ise; polimer 1 çapraz bağlanır ve 2 karışımı içinde çözünmez. Ayrıca, polimerler arası kovalent zincirler oluşmaktadır.

Yarı-IPN sistemlerde, polimerlerden biri çapraz bağlı iken, diğeri lineer ya da dallanmış yapıdadır. Ard arda IPN sentezi ile 4 farklı, eş zamanlı IPN sentezi ile 2 farklı yarı-IPN hazırlanabilir. Sekil 2.15' de yarı iç içe geçmiş bir ağ yapının açık görünümü verilmiştir.

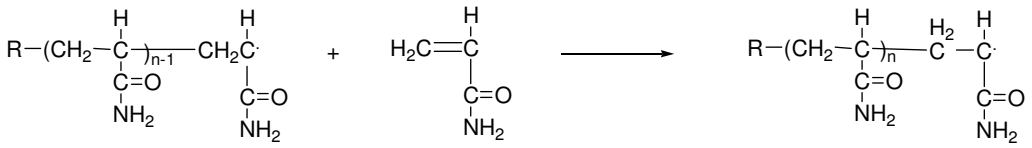
Sekil 2.15. Yarı iç içe geçmiş ağ yapı (yarı-IPN)

Bu çalışmada, P(AAm-CrA)/sodyum aljinat, P(AAm-CrA)/K-karragenan, P(AAm-CA)/sodyum aljinat, P(AAm-CA)/K-karragenan yarı ağ yapılı hidrojelleri destek materyali olarak kullanıldı. P(AAm-CrA)/sodyum aljinat yarı-IPN oluşumu Şekil 2.16' da gösterildi.

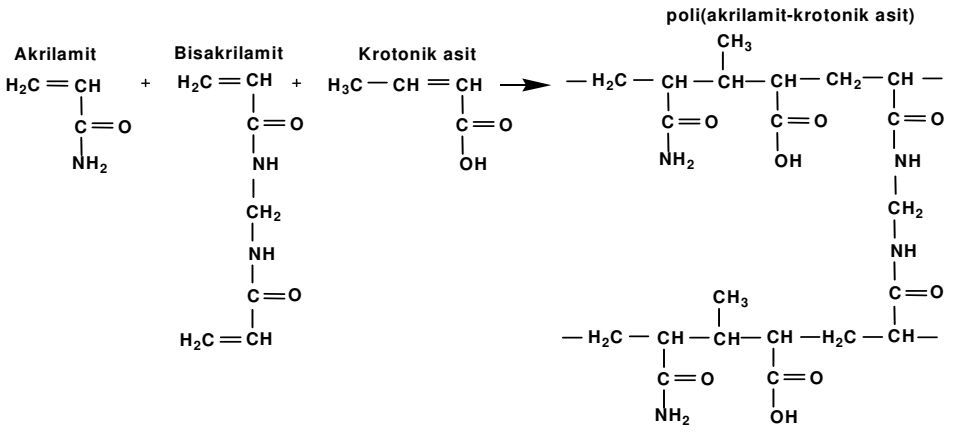
APS ve TEMED in radikallerinin oluşumu;



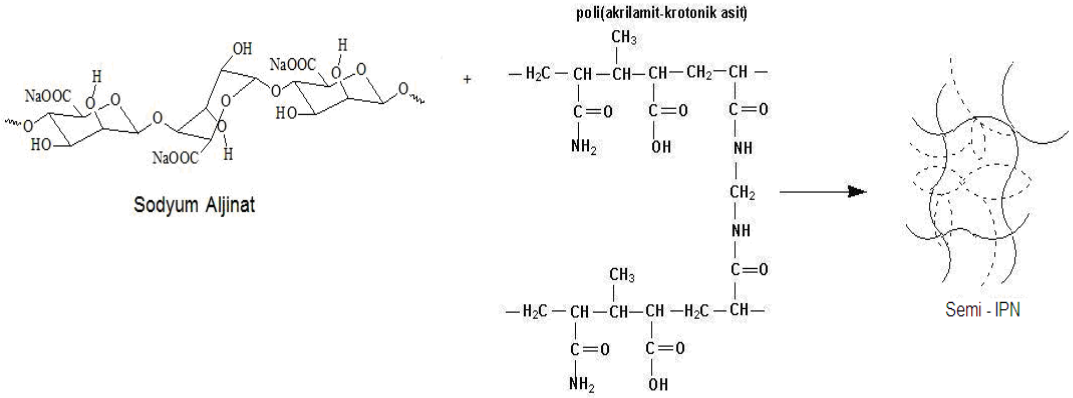
Radikalik katılma ile polimer zincirinin uzaması;



Çapraz bağlı polimerin oluşumu;



Yarı-IPN oluşumu;



Şekil 2.16. Semi - IPN oluşumu

2.8.6. Azo Boyaları

Azo boyaları başlıca iki kısma ayrılırlar.

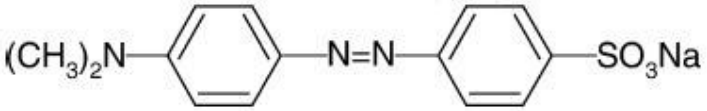
1- Monoazo boyaları: Bu tür boyalarda, kromofor grubu azo (-N=N-) bağı ile benzen halkasına bağlanmıştır ve asit karakterdedirler. Halkaya, OH grubunun katılması asit ve NH_2 grubunun ilavesi de bazik karakter oluşturur (bordo kırmızısı, brillnat sarısı-S, krisoidin -Y, fast sarısı, janus yeşili-B, metil oranj, metil kırmızısı, oranj-G, oranj -II, Sudan-R, Sudan-II).

2- 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) [68].

<u>Metil oranj</u>

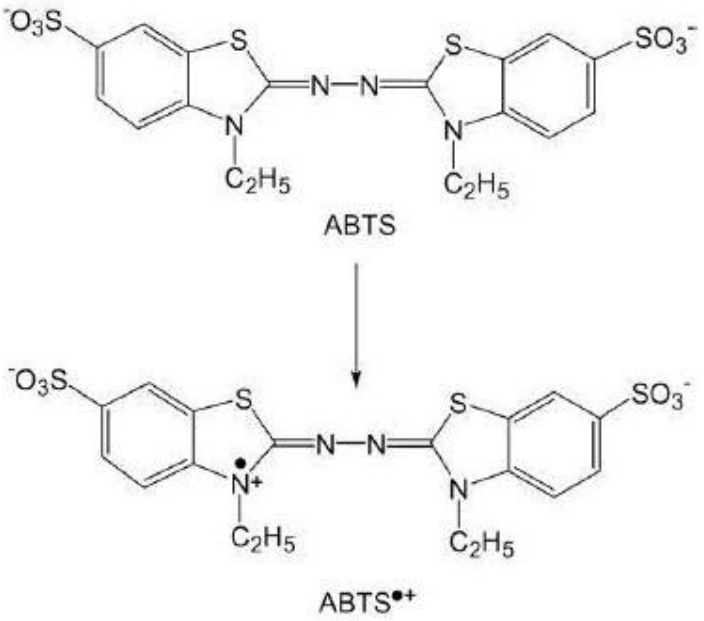
Metil oranj, tekstil, baskı, kağıt, ilaç, gıda endüstrisinde ve araştırma labaratuvarlarında geniş kullanım alanı olan suda çözünebilen bir azoboyadır. Metil oranjın sulu çözeltisi zayıf asit gibi davrandığı için asit-baz indikatörü olarak analitik kimya laboratuvarlarında kullanılır. Metil oranjın

bazik rengi kırmızı asidik rengi ise sarıdır. pH geçiş aralığı 3,1- 4,4 arasındadır [69].



2.8.7. 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 absorbsiyonu pikleri gösterir. ABTS ile çeşitli organik ve inorganik radikallerin tepkimeleri sonucunda $ABTS^{\bullet+}$ radikalinin hızla oluştuğu bildirilmektedir [70,71]. ABTS serbest radikal tepkimelerinin kinetik çalışmalarında ve kimyasal yükseltgenlerin kantitatif analizlerinde reaktif olarak kullanılmaktadır [72].



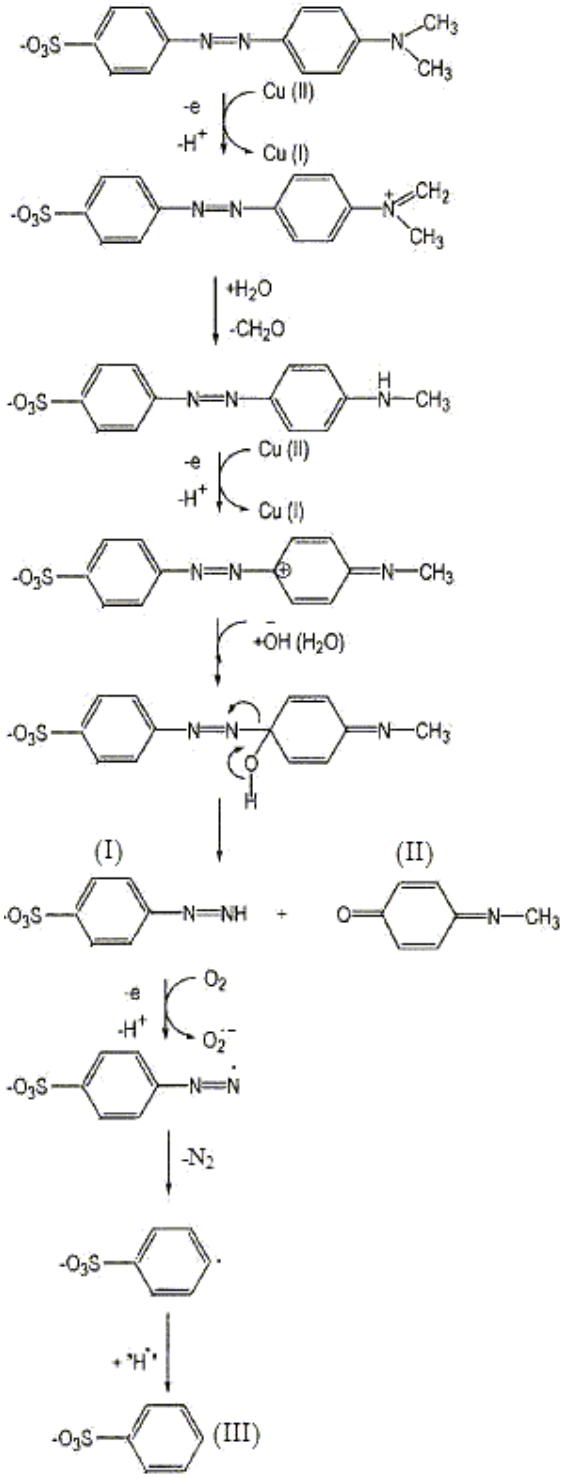
Şekil 2.17. ABTS ve $ABTS^{\bullet+}$ nin oluşumu

2.9. Enzimatik Renk Giderme

Sentetik boyalar, tekstil, kağıt, kozmetik ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [73]. Bu boyaların atıklarının çoğu doğada zor parçalandığı için çevre kirliliğine neden olmaktadır, bu da insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır [69]. Boya atıklarının bozunarak renksizleştirilmesi çeşitli fiziksel ve kimyasal metotlarla gerçekleştirilebilir. Bu metotlar arasında adsorpsiyon, koagülasyon-flokülasyon, iyon değiştirme, yükseltgenme sayılabilir. Bu metotların maliyetinin yüksek olması kullanımlarını sınırladığı için boya atıklarının biyobozunmasının enzimatik yoldan gerçekleştirilmesi bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır [73].

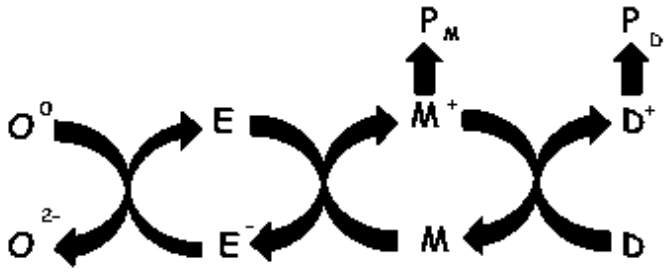
Enzimatik renk gidermenin avantajları arasında, bozunmaya dirençli atıkların parçalanmasının sağlanması, yüksek ve düşük atık derişimlerinde geniş bir pH ve sıcaklık aralığında kullanılabilmesi sayılabilir [74]. Enzimatik renk giderme proseslerinde serbest enzimin yanı sıra enzimin bir destek üzerine 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 [74]. Lakkaz, ve çeşitli destek materyallere immobilize edilmiş lakkaz, azo-triaril metan, antrakinon ve indigo tipindeki boyaların renginin giderilmesinde kullanılır [75]. Örneğin bir azo boya olan metil oranjın (Acid Orange 52) renginin lakkazla giderilmesi Şekil 2.18' de gösterilmektedir. Şekil 2. 18' de önerilen mekanizmaya göre metil oranjın bozunma mekanizmasının ilk basamağı lakkazın yapısındaki Cu^{+2} iyonunun bir elektron alarak Cu^{+1}'e indirgenirken metil oranjın 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 azot molekülü kaybetmesi ile benzen sülfonik asit radikali meydana gelir. Bu radikalin hidrojen radikaliyle birleşmesiyle de benzen sülfonik asit oluştuğu (III) önerilmektedir. Bu bozunma mekanizmasına göre zehirli aromatik aminler oluşmamaktadır, bu da çevre kirliliğinin önlenmesinde oldukça faydalıdır [76].



Şekil 2.18. Metil oranjın 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 azo boyaların renginin giderildiği, renk giderme hızının ve oranının arttırıldığı bildirilmektir [75]. Mediyatörler, geniş substrat alanı olan lakkaz enzimlerini destekleyen ve elektron transferini gerçekleştiren katalizör benzeri bileşiklerdir. Ancak tepkime sırasında tüketildikleri için gerçek katalizör değildirler [77]. Bu mediyatörler arasında ABTS, HBT (1-hidroksibenzotriyazol) sıklıkla kullanılmaktadır [73]. Bir oksidoredüktaz olan lakkaz mediyatör olarak kullanılan ABTS' yi yükseltger ve katyon radikali ($ABTS^{\bullet+}$) oluşur. Bu radikal bozunarak enzimatik yükseltgenme ürünlerini oluşturabilir (P_M). ($ABTS^{\bullet+}$), 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. 19' da gösterilmiştir.



Şekil 2.19. Lakkazın mediyatör valığında önerilen tepkime mekanizması

M = Mediyatör (ABTS), $M^+_{(yük)}$ = Mediyatör$_{(yük)}$ ($ABTS^{\bullet+}$)
D = Boya, $D^+_{(yük)}$ = Boya$_{(yük)}$
P_M= Mediyatörün bozunma ürünleri, P_D = Boyanın bozunma ürünleri

Bu çalışmada serbest lakkaz ve P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilmiş lakkaz bir azo boya olan metil oranjın renginin giderilmesinde kullanıldı.

2.10. Lakkazın İmmobilizasyonu ve Renk Giderme İle İlgili Yapılan Çalışmalar

1988 yılında Leonowicz, A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes versicolor'*dan elde edilen lakkazı, 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) ve glutaraldehit ile aktifleştirlmiş cam boncuklar üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize etmişler ve immobilize enzimin 6 kullanımdan sonra aktifliğini kaybetmediğini bulmuşlardır [78].

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 ^{o}C' da iki hafta süreyle depolandığında aktifliğini %100 koruduğunu belirtmişlerdir [79].

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 ^{0}C' de saklandığında başlangıç aktifliğinin %95' ini, aynı koşullarda serbest enzimin başlangıç aktifliğinin % 40' ını koruduğunu bulmuşlardır [80].

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 sıcaklık sırasıyla 50 ^{0}C ve 60 ^{0}C, Km değerleri sırasıyla 77 μM ve 256 μM olarak bulmuşlardır. Bu

çalışmada zeytinyağı fabrikalarında atık sulardaki fenollerin uzaklaştırılması üzerine çalışmışlardır [81].

2000 yılında Jolivalt, 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 fenil üre pestisitini gidermek için uygulamışlardır [82].

2000 yılında Hublik, G. and Schinner, F. yaptıkları çalışmalarında, *Plerotus ostreatus* 'dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma yöntemi ile Eupergit üzerine immobilize etmişlerdir. pH 5,8 ve 50 ^{0}C de, 40 mM fosfat tamponunda siringaldazin substratı ile lakkazın maksimum yükseltgenme hızı gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca immobilize lakkaz 25 ^{0}C da 10 gün boyunca depolandığında başlangıç aktifliğinin %2' sini kaybettiğini belirlemişlerdir [83].

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 sulardaki 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 [84].

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 [85].

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 enzim için sırasıyla optimum pH' yı 6,3 ve 6,6, optimum sıcaklığı ise sırasıyla 40 ^{0}C ve immobilize enzim için ise 35 ^{0}C olarak bulmuşlardır. Ayrıca immobilize lakkazın atık sulardaki farklı fenol türevlerini uzaklaştırması üzerine çalışmışlardır. [86].

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 kullanmış ve optimum pH' yı 5,0 olarak bulmuşlardır. 2 ay süresince immobilize lakkazın aktifliğini koruduğunu belirlemişlerdir [87].

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 ve immobilize lakkaz için 40 ^{0}C ve 55 ^{0}C aralığında olduğunu bulmuşlardır. İmmobilize lakkazı 4 ^{0}C de 4 ay depoladıklarında başlangıç aktifliğinin %98' ini koruduğunu tespit etmişlerdir [88].

2002 yılında Yinghui, D. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Panus conchatus'* den elde edilen lakkazı N-N hidroksi süksinimit'le aktifleştirilmiş çapraz bağlı karboksillenmiş PVA (Polivinil alkol) üzerine kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. Substrat olarak ABTS kullanmışlar, immobilize lakkaz için optimum pH' yı 3,2, sıcaklığı 40 ^{0}C ve 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 [89].

2003 yılında Zille, A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes villosa'* dan elde edilen lakkazı silanlanmış alümina üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile 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 enzimle boya atığının rengi % 80 giderilirken immobilize lakkazla % 93 renk giderildiğini bulmuşlardır. İmmobilize lakkazla adsorpsiyonla da renk giderildiğini belirtmişlerdir [90].

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 ve Reactive Red 251) renk giderimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Serbest lakkazın mediyatörsüz hiç renk gidermediğini, serbest ve immobilize lakkazın mediyatör (HBT) varlığında 30 dak sonunda boyaların renklerini sırasıyla % 5 ile % 35 aralığında ve % 10 ile % 52 aralığında renk giderdiğini bulmuşlardır [74].

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' yı 4,5 olarak belirlemişlerdir. Serbest ve immobilize lakkaz için optimum sıcaklıkların sırasıyla 40 ^{0}C ve 60 ^{0}C olduğunu bulmuşlardır. 4 ^{0}C' de 4 ay depolandığında serbest lakkazın başlangıç aktifliğinin %90' ını kaybettiğini, immobilize lakkazın 4 ^{0}C' de 90 gün depolanması sonucu ise başlangıç aktifliğinde bir kayıp olmadığını belirlemişlerdir. Ayrıca immobilize enzimle PAHs (polisiklik aromatik hidro karbonlar; piren, benzopiren, benzoantrasen gibi…) bileşiklerini uzaklaştırma çalışmaları yapmışlardır [91].

2005 yılında Araujo, J.H.B. ve arkadaşlarının yaptığı 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 lakkazı, beyaz şarapta istenilmeyen fenolik bileşiklerin giderilmesi için kullanmışlardır. [92].

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 [93].

2005 yılında Radha, K.V. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Phanerochaete chrysosporium'* dan elde edilen lakkazı Ca-aljinat boncuklara hapsetme yöntemi ile immobilize etmişlerdir. İmmobilize lakkaz yedi farklı sentetik boyanın (Acid Red, Methyl Orange, Methyl Violet, Acid Orange, Vat Magenta, Methylene Blue, Congo Red) renginin giderilmesinde kullanmışlardır. İmmobilize lakkazın Methyl Violet ve Acid Orange boyalarının renklerini %98 oranında, Vat Magenta, Methylene Blue, Congo Red ve Acid Red boyalarının (boya derişimi 20- 400 mg/L, pH 2-7, sıcaklık 20 ^{0}C- 45 ^{0}C) renklerini %88 – %92 oranında giderdiğini tespit etmişlerdir [94].

2006 yılında Yang, W.Y. ve arkadaşları yaptıkları çalışmlarında *Rhus vernicifera*' 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 sıcaklığını 45 ℃ ve optimum pH değerini 8 olarak bulmuşlardır. 4 ^{0}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 edilen 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 edilen lakkazın başlangıç aktifliğinin ise %85' ini koruduğunu tespit etmişlerdir [95].

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 ftalosiyanin) üzerine iki basamaklı tepkime üzerinden immobilize etmişlerdir. Birinci basamakta çapraz bağlanma koşullarını ikinci basamakta ise enzimin nanokompozitlere kovalent bağlanması koşullarını incelemişlerdir. Substrat olarak ABTS kullandıklarında 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 [96].

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. İmmobilize lakkazın sadece ABTS mediyatörü varlığında aktif olduğunu tespit etmişlerdir. İmmobilize lakkazın maksimum aktiflik gösterdiği pH' yı 4,2–5,2 aralığında, sıcaklığı ise 40^0C – 50^0C aralığında olduğunu bulmuşlardır [97].

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 incelmişlerdir. 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 [98].

2006 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 ^{0}C, nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 45 ^{0}C, kaolinit ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 45 ^{0}C olarak belirlemişlerdir. Kaolinit üzerine adsorpsiyon ile immobilize edilen lakkazın optimum pH' sını 5,5, nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen lakkazın pH' sını 6,0, kaolinit ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen lakkazın optimum pH' sını 6,0 olarak bulmuşlardır [99].

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 bulmuşlardır [100].

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 ^{0}C iken, immobilize lakkaz için optimum sıcaklığı 65 ^{0}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 rengini 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 [101].

2007 yılında Silva, C. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Trametes hirsuta'* dan elde edilen lakkazı örülmüş poliamit 6,6 (naylon) liflerinde glutaraldehit ile çapraz bağlayarak immobilize etmişlerdir. Optimum koşullarda (29 U/mL^{-1} lakkaz, %10' luk glutaraldehit ve pH 5,5) immobilize lakkkazın termal kararlılığının serbest lakkaza gore % 18 daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir [102].

2007 yılında Couto, R.S. 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. 3. tabakaya göre daha düşük olduğunu en iyi aktifliğin ise 3. tabaka olduğunu belirlemişlerdir. Bu nedenle renk giderimi için en uygun lakkaz kaplanmış tabakanın 3. tabaka olduğunu belirtmişler, Methyl Green' in rengini giderme hızının Remazol Brilliant B.' ye gore daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [103].

2007 yılında Bryjak, J. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında *Cerrena unicolor'* dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma yöntemi ile bütil akrilat – etilen glikol dimetakrilat kopolimeri üzerine immobilize etmişlerdir. Optimum sıcaklığı serbest lakkaz için 58 ^{0}C, immobilize lakkaz için ise 30 ^{0}C ve 40 ^{0}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 ^{0}C ve 60 ^{0}C' de termal inaktivasyonunu incelemişlerdir. Serbest lakkaz 30 ^{0}C' de 3 gün tampon içinde saklandığında başlangıç aktifliğinin %50' sini kaybettiğini ancak immobilize lakkazın aktifliğinde bir kayıp olmadığını gözlemlemişlerdir. Serbest lakkaz 60 $^{\circ}$C' de 21 saat tampon içinde saklandığında aktifliğinin tamamen kaybettiğini ancak immobilize lakkazın ise başlangıç aktifliğinin %60' ını koruduğu sonucuna ulaşmışlardır. Serbest ve immobilize lakkaz için K_m değerlerini sırasıyla 0,183 mM ve 0,059 mM olarak bulmuşlardır [104].

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 [105].

2008 yılında Kunamneni, A. ve arkadaşları *Myceliophthora thermophila'* dan elde edilen lakkazı kovalent bağlanma yöntemi ile epoksi grupları aktifleştirilmiş polimetakrilat bazlı polimerlere (Sepabeads EC-EP3 ve Dilbeads NK) immobilize etmişlerdir. İmmobilize lakkaz altı sentetik boyanın (Reactive Black 5, Acid Blue 25, Methyl Orange, Remazol Brillant Blue B., Methyl Green ve Acid Green 27) renklerinin giderilmesinde kullanılmıştır. Sepabeads EC-EP3 üzerine immobilize edilen lakkazı kapalı yatak reaktöründe 5 kullanım sonunda methyl green boya çözeltisinin (0,02 w/v) rengini %41 oranında giderdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca immobilize lakkazın, 6 saat inkübasyon sonunda HBT kullanılmadan methyl orange boyasının rengini % 61, HBT varlığında ise 6 saat sonunda %82 oranında renk giderdiğini bulmuşlardır [73].

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' yı 7,5, optimum sıcaklığı serbest ve immobilize lakkaz için sırasıyla 40 ^{0}C ve 50 ^{0}C olarak bulmuşlardır. Serbest ve immobilize lakkazı 60 ^{0}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 [106].

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

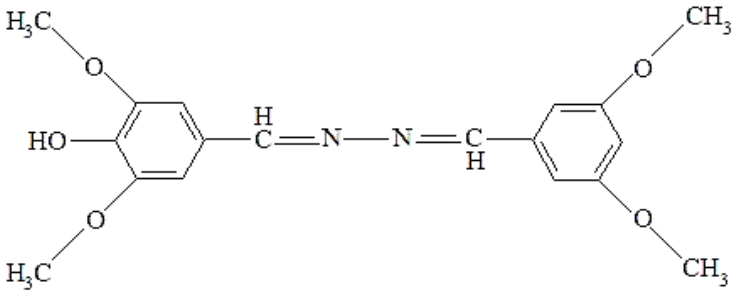
glutaraldehit ile aktifleştirdiklerinde 1 ay süreyle 4 ^{0}C' de depolandığında başlangıç aktifliğinin % 79' unu, divinilsülfonla aktifleştirdiklerinde başlangıç aktifliğinin % 81,8' ini koruduğunu bulmuşlardır [107].

3. DENEYSEL KISIM

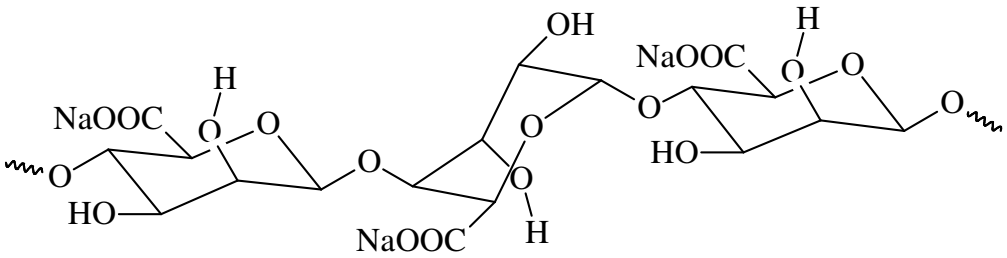
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler

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

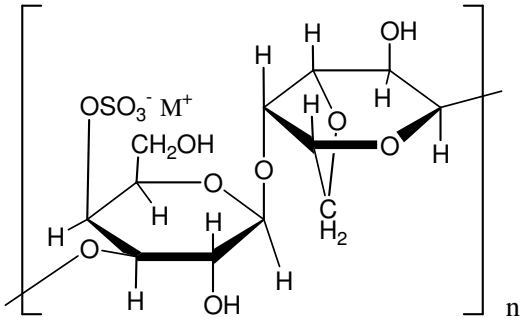
Siringaldazin (*4*-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin): ($C_{18}H_{20}N_2O_6$: 360,3 g/mol) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



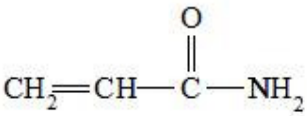
Sodyum aljinat : (Orta viskozitede ≥2,000 cP (% 2 (25 ℃)) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



K-karragenan : (5-25 m Pa.s (% 0,3 (25 ℃)) Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.



Akrilamit : (C_3H_5NO : 71,08 g/mol) Merck (Almanya,) firmasından temin edildi.



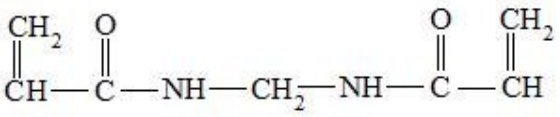
Krotonik asit : (trans-2-bütenoik asit $C_4H_6O_2$: 86,09) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.

CH_3 CH=CH CO_2H

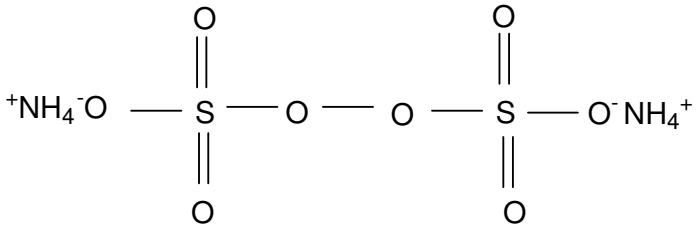
Sitrakonik asit : (2-metil-2-bütendioikasit $C_5H_6O_4$: 130,10) Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.

CH_3 C(CO_2H)=CH CO_2H

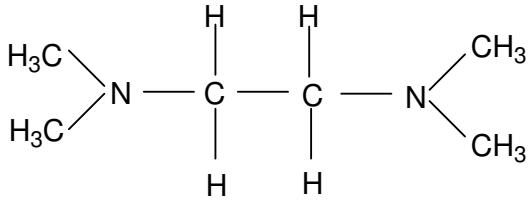
N,N'- Metilen bisakrilamit : ($C_7H_{10}O_2N_2$: 154,2 g/mol) Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.



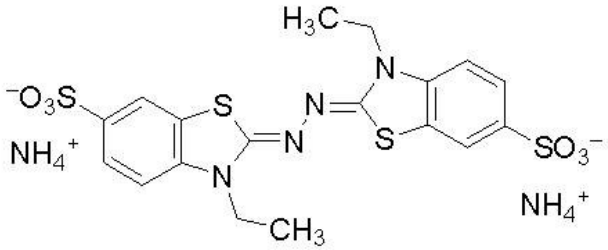
Amonyum persülfat : ($(NH_4)_2S_2O_8$: 228,2 g/mol) BDH (İngiltere) firmasından temin edildi.



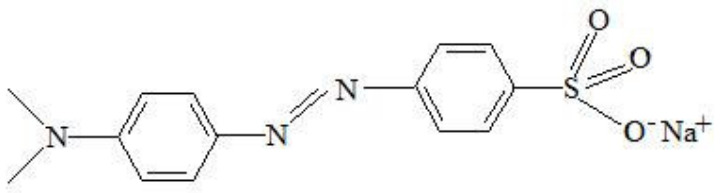
N,N,N',N'- Tetrametiletilendiamin (TEMED) : ($C_6H_{16}N_2$: 116,2 g/mol) Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.



2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS) ($C_{18}H_{24}N_4O_6S_4$: 548.68 g/mol) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



Metil oranj : (dimetilaminoazobenzen-4'-sülfonik asit sodyum tuzu $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$: 327.33 g/mol, C.I. : 13025) Fisher (Amerika) firmasından temin edildi.



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

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

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

Etil alkol (Mutlak) : (C_2H_5OH: 46,06 g/mol) Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edildi.

Sodyum asetat trihidrat : ($NaCH_3COO3.H_2O$: 136,08 g/mol) CarloErba Ragend (İtalya) firmasından temin edildi.

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

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

UV-görünür bölge spektrofotometresi : Shimadzu PharmaSpec 1700 (Tokyo, Japan).

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 (0,04 M pH: 5,3).

3.2.2. Sodyum hidroksit Çözeltisi

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

3.2.3. Fosfat tamponu

0,27 mL Fosforik asit deiyonize suda çözülerek hacmi 100 mL' ye tamamlandı. 2 M sodyum hidroksit kullanılarak 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 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. Sodyum asetat tamponu

4,8 g sodyum asetattrihidrat ve 3,6 mL asetik asit alınarak deiyonize suda çözülüp hacmi 1 L' ye tamamlandı. 2,0 M NaOH ile pH'sı 4,5 olarak ayarlandı (0,04 M, pH: 4,5).

3.2.7. Metil oranj çözeltisi

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

3.2.8. ABTS çözeltisi

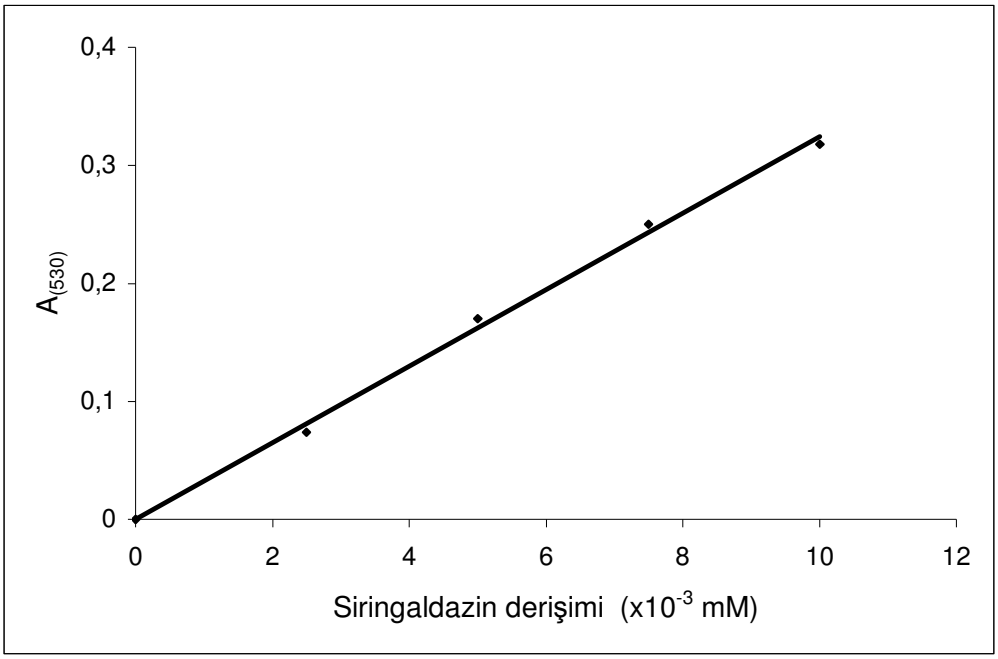
0,0014 g ABTS deiyonize su da çözülerek hacmi 25 mL' ye tamamlandı. 4 ^{0}C de buz içinde saklandı (0,1mM).

3.3. Siringaldazin Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Siringaldazin kalibrasyon eğrisini hazırlamak amacıyla farklı derişimlerde (0,100mM, 0,075mM, 0,050mM, 0,025mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, tepkime balonuna 9 mL sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5,3) ve farklı derişimlerde hazırlanan 1 mL siringaldazin çözeltisi eklendi. Çözeltilere 0,1 mL lakkaz enzimi (0,01mg/mL) ilave edilerek tepkime balonları 10 dakika 25 C^{0} daki çalkalamalı su banyosunda tutuldu ve 12. dakikada UV-görünür bölge spektrofotometresi (Shimadzu PharmaSpec 1700) kullanılarak 530 nm dalga boyunda absorbansları okundu. Siringaldazin çözeltilerinin derişimlerine karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 3.1'de grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği hazırlandı.

Çizelge 3.1 Siringaldazin derişimi ile absorbansın değişimi

Siringaldazin derişimi ($x10^{-3}$ mM)	Absorbans değişimi(ΔA_{530})
0,0	0,000
2,5	0,074
5,0	0,170
7,5	0,250
10,0	0,318



Şekil 3.1. Siringaldazin kalibrasyon eğrisi

3.4. Enzim İmmobilizasyonu

Lakkaz enzimi P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj P(AAm-CA)/K-kar, yarı içiçe geçmiş ağ yapılı hidrojellerinde hapsetme yöntemi ile immobilize edildi.

3.4.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde enzim immobilizasyonu

0,025 g sodyum aljinat 12 mL fosfat tamponunda (0,04 M, pH: 6,5) bir beher içinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözüldü. Tamamen çözünme sağlandıktan sonra 0,025 g lakkaz enzimi ilave edildi ve homojen olana kadar karıştırıldı. 0,75 g akrilamit ve 0,25 g krotonik asit ilave edilerek karıştırma işlemine devam edildi. Karışımın üzerine sırasıyla çapraz bağlayıcı olarak 0,0375g N,N'- metilen bisakrilamit, başaltıcı olarak ise 0,02 g amonyum persülfat ilave edildi ve çözünene kadar karıştırıldı. Homojen karışım elde edildiğinde 0,125 mL TEMED eklendi. Çözelti bir kaç saniye karıştırıldıktan sonra etanol ile yıkanmış pipetlere döküldü. 15 dakika içinde oda sıcaklığında jelleşen immobilize enzim eşit boyutlarda kesilerek 4 ^{0}C' da buzdolabında saklandı.

3.4.2. Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde enzim immobilizasyonu

0,025 g K-karragenan 12 mL fosfat tamponunuda (0,04 M, pH: 6,5,) bir beher içinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözüldü. Tamamen çözünme sağlandıktan sonra 0,025 g lakkaz enzimi ilave edildi ve homojen olana kadar karıştırıldı. 0,75 g akrilamit ve 0,25 g krotonik asit ilave edilerek karıştırma işlemine devam edildi. Karışım üzerine sırasıyla çapraz bağlayıcı olarak 0,0375 g N,N'- metilen bisakrilamit, başlatıcı olarak ise 0,02 g amonyum persülfat ilave edildi ve çözünene kadar karıştırıldı. Homojen karışım elde edildiğinde 0,125 mL TEMED eklendi. Çözelti birkaç saniye karıştırıldıktan

sonra etanol ile yıkanmış pipetlere döküldü. 15 dakika içinde jelleşen immobilize enzim eşit boyutlarda kesilerek 4 ^{0}C' da buzdolabında saklandı.

3.4.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde enzim immobilizasyonu

0,025 g sodyum aljinat 12 mL fosfat tamponunuda (0,04 M, pH: 6,5 M) bir beher içinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözüldü. Tamamen çözünme sağlandıktan sonra 0,025 g lakkaz enzimi ilave edildi ve homojen olana kadar karıştırıldı. 0,75 g akrilamit ve 0,25 g krotonik asit ilave edilerek karıştırma işlemine devam edildi. Karışım üzerine sırasıyla çapraz bağlayıcı olarak 0,0375 g N,N'- metilen bisakrilamit, başlatıcı olarak ise 0,02 g amonyum persülfat ilave edildi ve çözünene kadar karıştırıldı. Homojen karışım elde edildiğinde 0,240 mL TEMED eklendi. Çözelti birkaç saniye karıştırıldıktan sonra etanol ile yıkanmış pipetlere döküldü. 15 dakika içinde jelleşen immobilize enzim eşit boyutlarda kesilerek 4 ^{0}C' da buzdolabında saklandı.

3.4.4. Poli(akrilamit-sitrakonikasit)/K-karragenan hidrojelinde enzim immobilizasyonu

0,025 g K-karragenan 12 mL fosfat tamponunuda (0,04 M, pH: 6,5 M) bir beher içinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözüldü. Tamamen çözünme sağlandıktan sonra 0,025 g lakkaz enzimi ilave edildi ve homojen olana kadar karıştırıldı. 0,75 g akrilamit ve 0,25 g sitrakonik asit ilave edilerek karıştırma işlemine devam edildi. Karışım üzerine sırasıyla çapraz bağlayıcı olarak 0,0375 g N,N'- metilen bisakrilamit, başlatıcı olarak ise 0,02 g amonyum persülfat ilave edildi ve çözünene kadar karıştırıldı. Homojen karışım elde edildiğinde 0,220 mL TEMED eklendi. Çözelti birkaç saniye karıştırıldıktan sonra etanol ile yıkanmış pipetlere döküldü. 15 dakika içinde jelleşen immobilize enzim eşit boyutlarda kesilerek 4 ^{0}C' da buzdolabında saklandı.

3.5. Aktiflik Tayini

3.5.1. Serbest enzimin aktiflik tayini

Serbest lakkazın aktiflik tayini Leonowicz ve Grzywnowicz tarafından verilen yönteme göre yapıldı [108]. Aktiflik tayininde 9 mL sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5,3) üzerine 1 mL siringaldazin çözeltisi (0,1 mM) ve 0,1 mL lakkaz çözeltisi (0,01 mg/mL) eklenerek tepkime başlatıldı. Çözelti çalkalamalı su banyosunda 25 ^{0}C' da 10 dakika çalkalandı ve 12. dakikada 530 nm de absorbans değeri ölçüldü. Tepkime hızı, ölçülen absorbans değerleri ve siringaldazin kalibrasyon eğrisinin eğiminden ($\Delta A_{530}/\Delta c$) yararlanılarak aşağıdaki bağıntıya göre hesaplandı.

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

Bu eşitlikte ΔC, mM olarak siringaldazin derişimindeki değişimi ΔA_{530} (A_0-A_t) absorbanstaki, Δt zamandaki değişimi gösterir. Bir ünite lakkaz 25 ^{0}C' da ve pH 5,3' de 1 mM benzendiolü (siringaldazin) kinona çeviren enzim miktarıdır. Bütün aktiflik tayinlerinde deneyler iki kere yapılarak ölçümler iki kere okundu ve ortalamaları alındı.

3.5.2. İmmobilize enzimin aktiflik tayini

İmmobilize lakkazın aktiflik tayini için 0,05 g (P(AAm-CrA)/Alj), (P(AAm-CrA)/K-kar) hidrojellerinde immobilize edilen lakkaz enzimi üzerine 9 mL sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5,3), 1 mL siringaldazin çözeltisi (0,1 mM) eklendi. Karışım çalkalamalı su banyosunda 25 ^{0}C' da 10 dakika çalkalandı ve 12. dakikada absorbans değerleri ölçüldü. P(AAm-CA)/Alj), P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkaz enzimi üzerine aynı

işlemler yapılarak tam olarak renklenmenin gözlenebilmesi için 30 dakika çalkalandı 32. dakikada absorbans değerleri ölçüldü. Ölçülen absorbans değerlerinden aktiflikler Bölüm 3.5.1' de anlatıldığı gibi hesaplandı.

3.6. Enzim Aktifliğine pH Etkisi

3.6.1. Serbest enzim aktifliğine pH etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla farklı pH' larda (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0) fosfat tamponları hazırlandı. Her bir pH' da aktiflik Bölüm 3.5.1 ' de anlatılan yönteme göre tayin edildi. Tepkime süresince, sıcaklık (25 ^{0}C) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

3.6.2. İmmobilize enzim aktifliğine pH etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla 0,05 g P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CA)/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) fosfat tamponları hazırlanarak, her bir pH' da aktiflik tayini Bölüm 3.5.2 'de anlatılan yönteme göre yapıldı. Tepkime süresince, sıcaklık (25 ^{0}C) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

3.7. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Serbest enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi farklı sıcaklıklarda (25 ^{0}C, 30 ^{0}C, 35 ^{0}C, 40 ^{0}C, 45 ^{0}C, 50 ^{0}C, 55 ^{0}C, 60 ^{0}C, 65 ^{0}C, 70 ^{0}C) araştırıldı. Her bir sıcaklık için aktiflik tayini Bölüm 3.5.1' de anlatılan yönteme göre yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3) ve siringaldazin derişimi (0,1 mM) sabit tutuldu.

3.7.2. İmmobilize enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi

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

3.8. Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

3.8.1. Serbest enzimin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 4 farklı derişimde (0,0250 mM, 0,0500 mM, 0,0750 mM, 0,1000 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 3.5.1.'de anlatılan yönteme göre yapıldı. Tepkime süresince pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25 ^{0}C) sabit tutuldu.

3.8.2. İmmobilize enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 0,05 g P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerinde immobilize lakkaz enzimleri ve 5 farklı derişimde (0,0125, 0,025 mM, 0,050 mM, 0,075 mM, 0,100 mM) siringaldazin çözeltisi hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 3.5.2' de anlatılan yönteme göre yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3) ve sıcaklık (25 ^{0}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 0,04 M, pH: 6,5 fosfat tamponunda, 0,01 mg/mL derişiminde lakkaz çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti buzdolabında 4 ^{0}C da saklandı ve bu çözeltiden belirli aralıklarla (0.,3., 9., 15., 20., 28., 35., 39., 42., 52., 58., 65., 70. gün) 0,1 mL örnek alınarak Bölüm 3.5.1' de anlatılan yönteme göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25 ^{0}C) sabit tutuldu.

3.9.2. İmmobilize enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla hazırlanan P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerinde immobilize lakkazlar buzdolabında 4 ^{0}C da saklandı. Bu hidrojellerden belirli aralıklarla (0.,7., 14., 21., 28., 35., 42., 49., 56., 63, 70. gün) 0,05 g örnek alınarak Bölüm 3.5.2'de anlatılan yönteme göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25 ^{0}C) sabit tutuldu.

3.10. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı İle Değişimi

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

3.11. Hidrojellerin Şişme Değerlerinin Zamanla Değişiminin İncelenmesi

P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerinin şişme değerlerinin zamanla değişimi 25 ^{0}C' da pH 5,3' de sitrat tamponunda 24 saat süreyle incelendi. Belirli zaman aralıklarında ortamdan alınan hidrojeller, yüzeyleri hafif bir şekilde kâğıtla kurulanarak tartıldı (W_w) ve tekrar şişme ortamına koyuldu. Bu işleme hidrojeller denge şişme değerine ulaşıncaya kadar devam edildi ve hidrojellerin kütlelerindeki değişimler kaydedildi. Her bir hidrojelin % şişme değeri Eşitlik 3.2 yardımıyla hesaplandı.

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

W_w : Şişirilmiş hidrojel kütlesi
W_0 : Kuru hidrojel kütlesi

3.12. İmmobilize Lakkazın Termal İnaktivasyonu

0,05 g P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla, iki farklı sıcaklıkta (30 ^{0}C ve 50 ^{0}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 aşağıdaki eşitlikler yardımıyla hesaplandı.

$$-\frac{dA}{d_t} = k_I \times A \qquad (3.3)$$

$$\ln A_t = \ln A_0 - k_I \times t \qquad (3.4)$$

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

3. 13. Enzimatik Renk Giderme

3.13.1. 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 ^{0}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 oranjın renginin giderilmesinde ABTS mediyatörünün (0,1mM) 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 ^{0}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 absorbans değeri ölçüldü.

Serbest lakkazın metil oranjın renk giderme yüzdeleri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplandı.

$$\% \text{ Renk Giderme} = [\,(A_0 - A_t) / A_0\,] \times 100 \qquad (3.5)$$

A_0 : t= 0 anındaki absorbans değeri
A_t: t = t anındaki absorbans değeri

Kontrol deneyleri için denatüre lakkaz, DSL, kullanıldı. Lakkaz denatürasyonu için 10 mL lakkaz çözeltisi bir balona alınarak 100 ^{0}C' da su banyosunda 30 dak boyunca denatüre edildi. Denatüre lakkaz için de renk giderme deneyi yapıldı.

3.13.2. İmmobilize lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi

54 ml metil oranj çözeltisine (3,0x10^{-5} M) 0,6 g immobilize poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat, P(AAm-CrA)/Alj-L, immobilize poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan, P(AAm-CrA)/K-kar manyetik karıştırıcıda düşük hızda 30 ^{0}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 oranjın renginin giderilmesinde ABTS mediyatörünün (0,1 mM) etkisini incelemek amacıyla, 51 mL metil oranj çözeltisine (3,2x10^{-5} M), 0,6 g immobilize lakkaz ve 3 mL ABTS çözeltisi eklenerek manyetik karıştırıcıda düşük hızda 30 ^{0}C' da inkübe edildi. 0., 15., 30., 45., 60. dakikalarda ve sonra birer saat aralıklarla 6 saat boyunca tepkime ortamından P(AAm-CrA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-CrA)/K-kar-L+ABTS örnekler alınarak UV-görünür bölge spektrofotometresinde 466 nm de absorbans değeri ölçüldü.

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

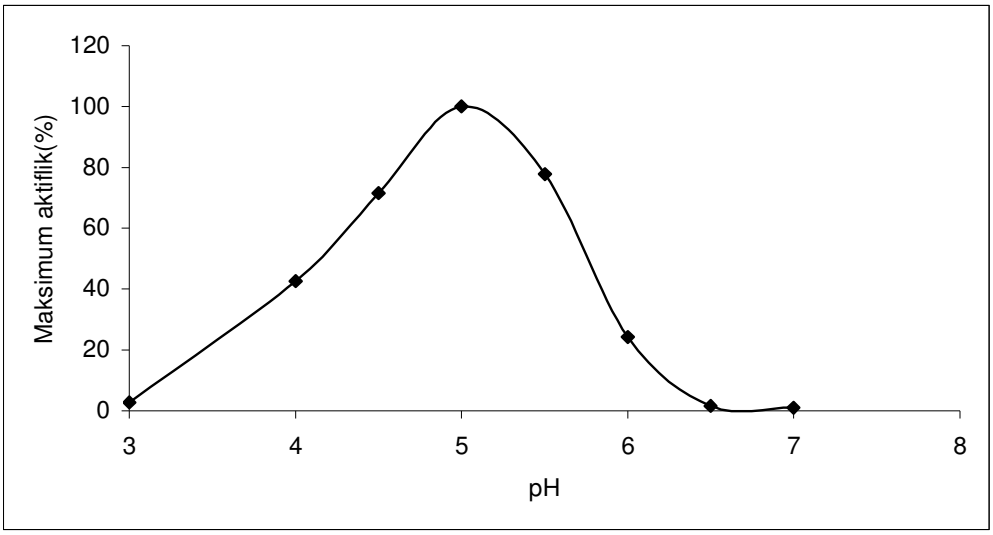
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Serbest Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine pH' nın 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 pH 5,0 olarak bulundu ve maksimum aktifliğin pH ile değişimi Şekil 4.1 ' de gösterildi.

Çizelge 4.1. Serbest lakkaz enzimi aktifliğine pH' nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,015	0,38	3
4,0	0,239	6,13	43
4,5	0,401	10,28	71
5,0	0,561	14,39	100
5,5	0,436	11,18	78
6,0	0,136	3,48	24
6,5	0,007	0,23	2
7,0	0,002	0,15	1



Şekil 4.1. Serbest lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

Literatürde menşei farklı olan lakkaz ve farklı substratlar kullanıldığında optimum pH' nın 5,0-6,3 arasında değiştiği belirtilmiştir [86,88]. Literatürde, *Pycnoporus sanguineus'* dan elde edilen lakkazın optimum pH' sı substrat olarak ABTS kullanıldığında 3,0, siringaldazin kullanıldığında 5,0 olarak bulunmuştur [77] .

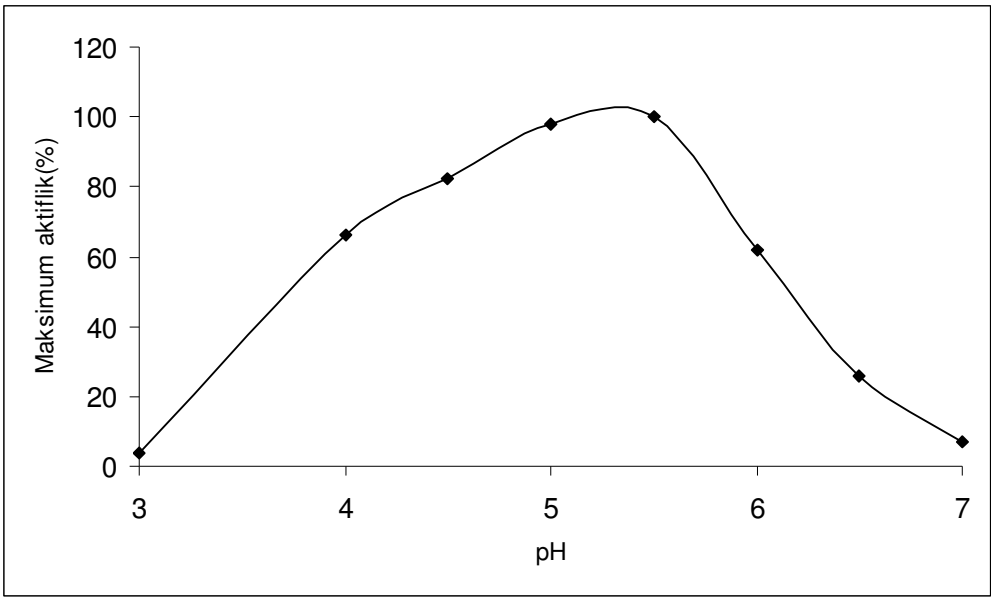
4.2. İmmobilize Enzim Aktifliğine pH' nın Etkisi

4.2.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.2 ' de verildi. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,5 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.2 ' de gösterildi**.**

Çizelge 4.2. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,037	0,94	4
4,0	0,656	16,83	66
4,5	0,815	20,91	82
5,0	0,970	24,88	98
5,5	0,988	25,33	100
6,0	0,613	15,72	62
6,5	0,255	6,54	25
7,0	0,069	1,77	7



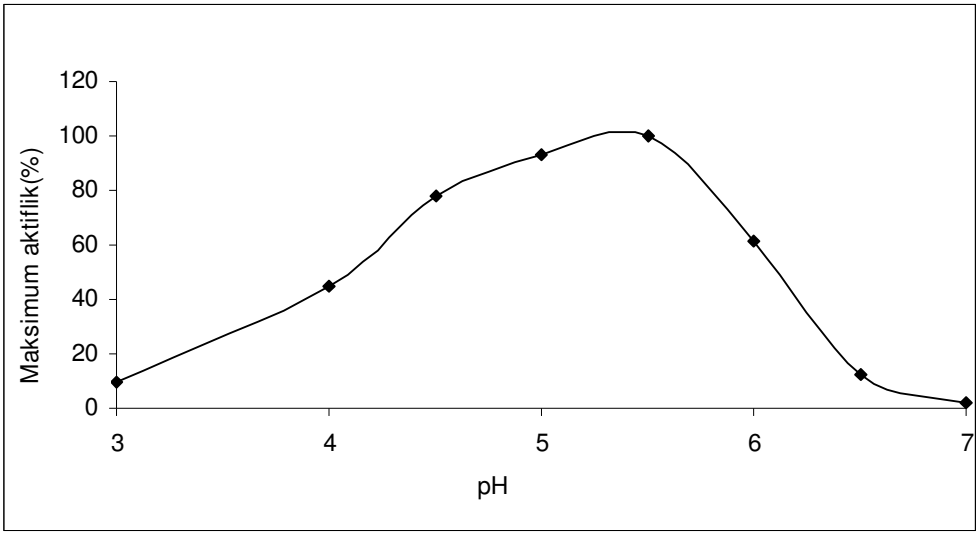
Şekil 4.2. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

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

P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.3 ' de verildi. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,5 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.3 ' de gösterildi.

Çizelge 4.3. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,085	2,18	10
4,0	0,386	9,90	44
4,5	0,676	17,34	78
5,0	0,806	20,68	93
5,5	0,865	22,19	100
6,0	0,530	13,60	61
6,5	0,105	2,69	12
7,0	0,015	0,38	2



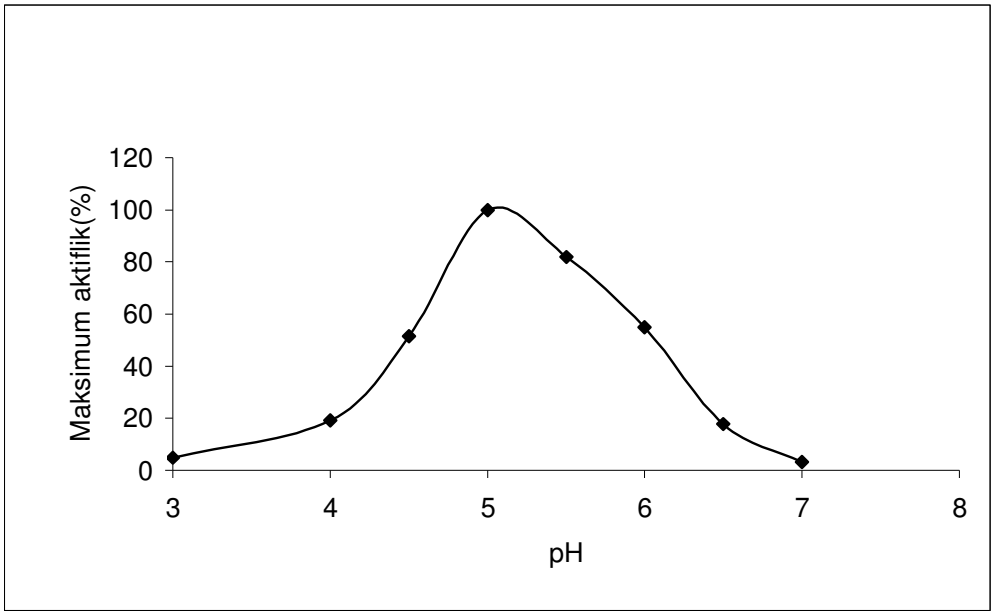
Şekil 4.3. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazenziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

4.2.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.4 ' de verildi. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,0 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.4 ' de gösterildi.

Çizelge 4.4. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,030	0,28	5
4,0	0,116	1,11	19
4,5	0,312	3,00	51
5,0	0,607	5,84	100
5,5	0,497	4,78	81
6,0	0,333	3,20	55
6,5	0,108	1,03	17
7,0	0,020	0,20	3



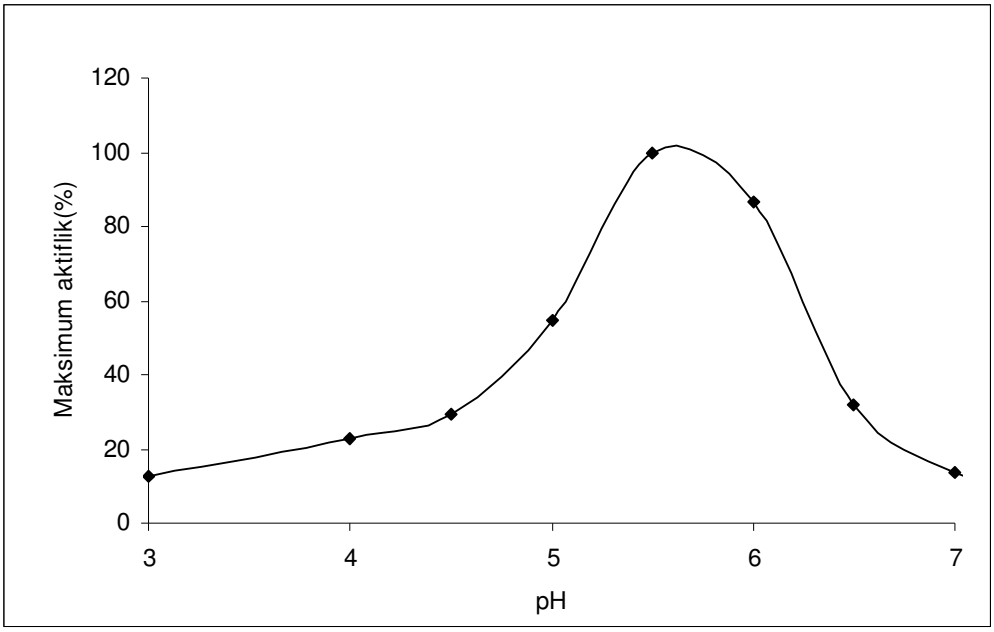
Şekil 4.4. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

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

P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.5' de verildi. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,5 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 4.5' de gösterildi.

Çizelge 4.5. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi

pH	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{1})	Maksimum aktiflik (%)
3,0	0,057	0,54	13
4,0	0,101	0,97	22
4,5	0,130	1,25	29
5,0	0,242	2,33	55
5,5	0,444	4,27	100
6,0	0,385	3,70	86
6,5	0,111	1,35	31
7,0	0,060	0,57	13
7,5	0,030	0,28	7



Şekil 4.5. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkazın optimum pH' sının 5,0 ile 6,0 aralığında değiştiği bulundu.

Literatürde kaynağı *Cerrena unicolor* olan lakkaz, adsorpsiyon yöntemi ile gözenekli cam boncuklar üzerine immobilize edilmiş optimum pH 5,7 olarak tespit edilmiştir [80]. *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 [87]. *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 yöntemiyle immobilize edilmiş enzimin optimum pH' sı 5,5, nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiş enzimin pH' sı 6,0, kaolinit ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilmiş enzimin optimum pH' sı 6,0 olarak bulunmuştur [91]. Trametes versicolor'dan elde edilen lakkaz, veratril alkol ve bakır sülfat

indükleyicisi ile birlikte kalsiyum aljinat boncuklara hapsetme yöntemi ile immobilize edilmiş, substrat olarak DMP, ABTS, promazin kullanıldığında optimum pH' nın 5, siringaldazin kullanıldığında ise 5,5 olduğu belirlenmiştir [100]. *Myceliophthora thermophila'* dan elde edilen lakkaz kovalent bağlanma yöntemi ile epoksi grupları aktifleştirilmiş polimetakrilat bazlı polimerlere (Sepabeads EC-EP3 ve Dilbeads NK) immobilize edilmiştir. Serbest enzim ve immobilize enzim için optimum pH 3 olarak bulunmuştur [73]. *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 [109]. Çalışmamızda bulunan sonuçlar ile literatürde bulunan sonuçlar birbirine yakındır.

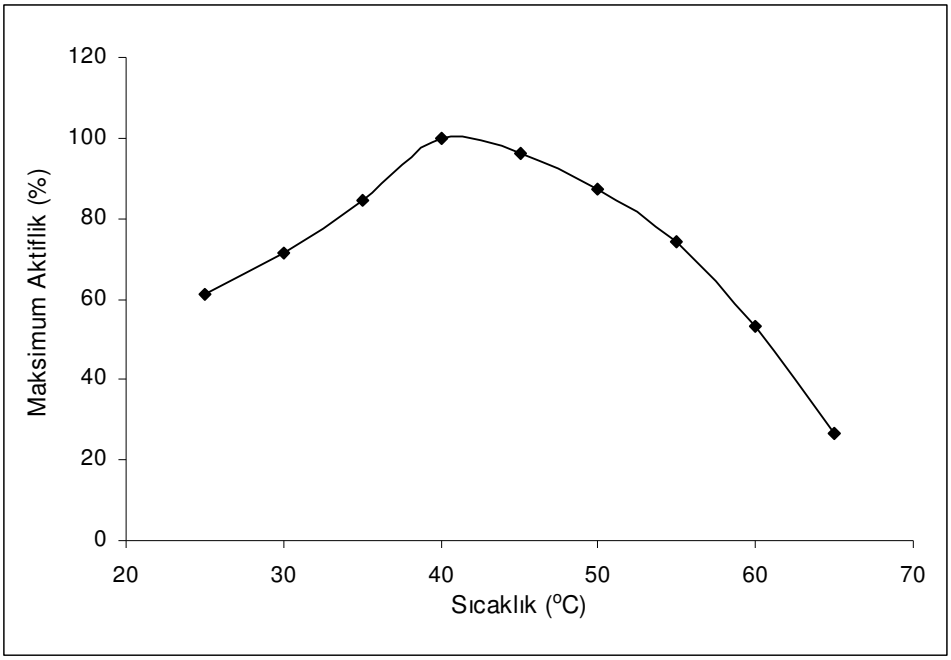
4.3.1. Serbest Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Serbest enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5.1 'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 4.6' da verildi. Serbest enzim için optimum sıcaklık 40 ^{0}C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.6' da gösterildi.

Serbest lakkaz için optimum sıcaklık 40 ^{0}C bulundu, bu sıcaklığın altındaki ve üstündeki sıcaklıklarda enzim aktifliğinde azalmalar gözlendi. Bütün kimyasal tepkimelerde olduğu gibi enzimatik tepkimelerde de tepkime hızı sıcaklıkla artar. Ancak yüksek sıcaklıklara çıkıldığında enzim yapısında meydana gelen denatürasyon nedeni ile aktiflikte düşüş gözlenir [15]. 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 [34].

Çizelge 4.6. Serbest lakkazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,420	6,07	61
30	0,490	7,08	71
35	0,581	8,39	84
40	0,688	9,94	100
45	0,663	9,58	96
50	0,612	8,70	87
55	0,510	7,37	74
60	0,365	5,27	53
65	0,182	2,63	26



Şekil 4.6. Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi incelendiğinde 35 ^{0}C - 50 ^{0}C oldukça geniş aralıkda başlangıç aktifliğinin % 80 ile % 83' ini koruduğu gözlendi.

Literatürde, *Cerrena unicolor*'dan elde edilen lakkazın optimum sıcaklığı 40°C, *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazın optimum sıcaklığının 40 ^{0}C olduğu bulunmuştur [88,91].

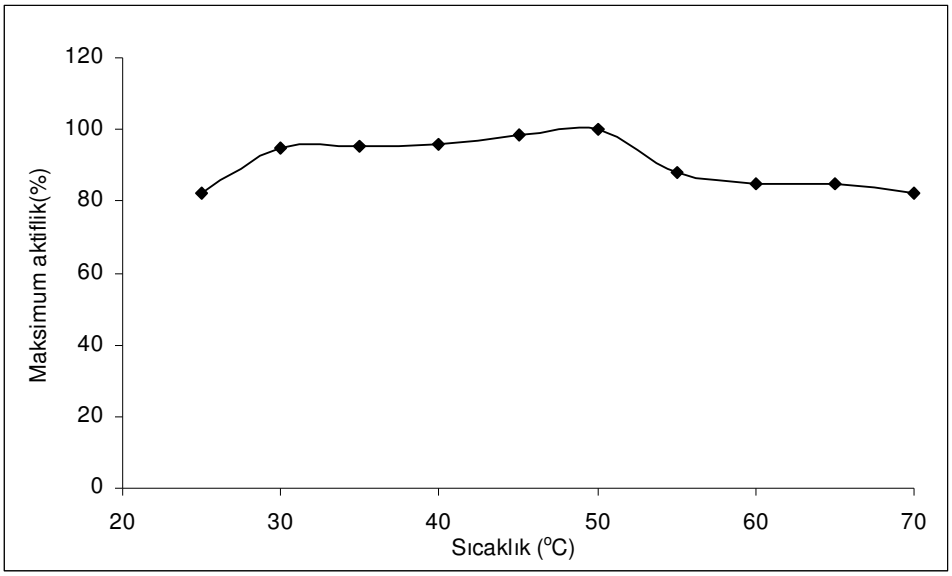
4.4. İmmobilize Lakkazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

4.4.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

P(AAm-CrA)/Alj 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 4.7' de verildi. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 50 ^{o}C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.7' de gösterildi.

Çizelge 4.7. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
25	1,040	26,68	82
30	1,200	30,79	95
35	1,209	31,02	95
40	1,215	31,17	96
45	1,248	32,02	99
50	1,266	32,48	100
55	1,115	28,61	88
60	1,076	27,61	85
65	1,073	27,53	85
70	1,040	26,68	82



Şekil 4.7. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi incelendiğinde 30^0C - 55^0C arasında oldukça geniş bir

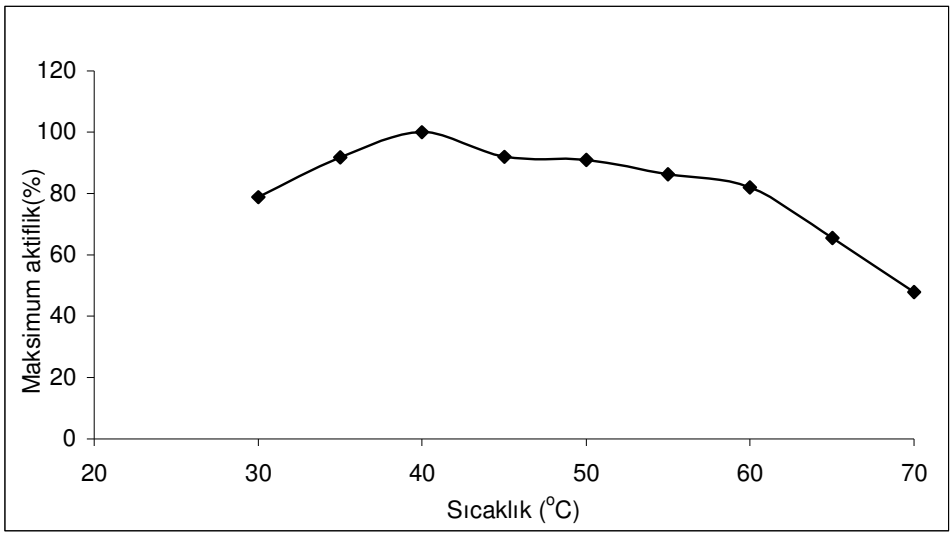
sıcaklık aralığında başlangıç aktifliğinin % 94 -% 88 aralığında koruduğu gözlendi.

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

P(AAm-CrA)/K-kar 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 4.9' da verildi. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 40 ^{o}C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.9' da gösterildi.

Çizelge 4.8. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
25	0,658	16,88	67
30	0,780	20,01	79
35	0,908	23,30	92
40	0,989	25,37	100
45	0,910	23,35	92
50	0,900	23,09	91
55	0,854	21,91	86
60	0,810	20,78	82
65	0,648	16,63	65
70	0,474	12,16	48



Şekil 4.8. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

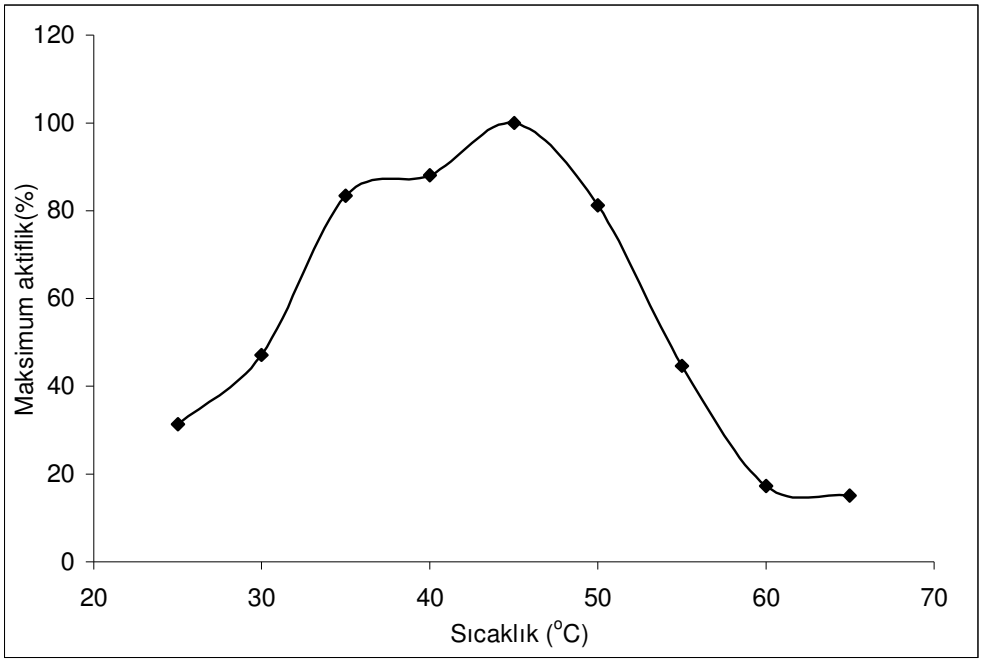
P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi incelendiğinde 35 ^{0}C -55 ^{0}C arasında oldukça geniş bir sıcaklık aralığında başlangıç aktifliğinin % 91 - % 86 aralığında koruduğu gözlendi.

4.4.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

P(AAm-CA)/Alj 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 4.9' da verildi. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 45 ^{0}C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.9' da gösterildi.

Çizelge 4.9. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
25	0,187	1,79	31
30	0,281	2,70	47
35	0,497	4,78	83
40	0,525	5,05	88
45	0,596	5,73	100
50	0,484	4,65	81
55	0,266	2,56	44
60	0,103	0,99	17
65	0,090	0,86	15
70	0,060	0,57	10



Şekil 4.9. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

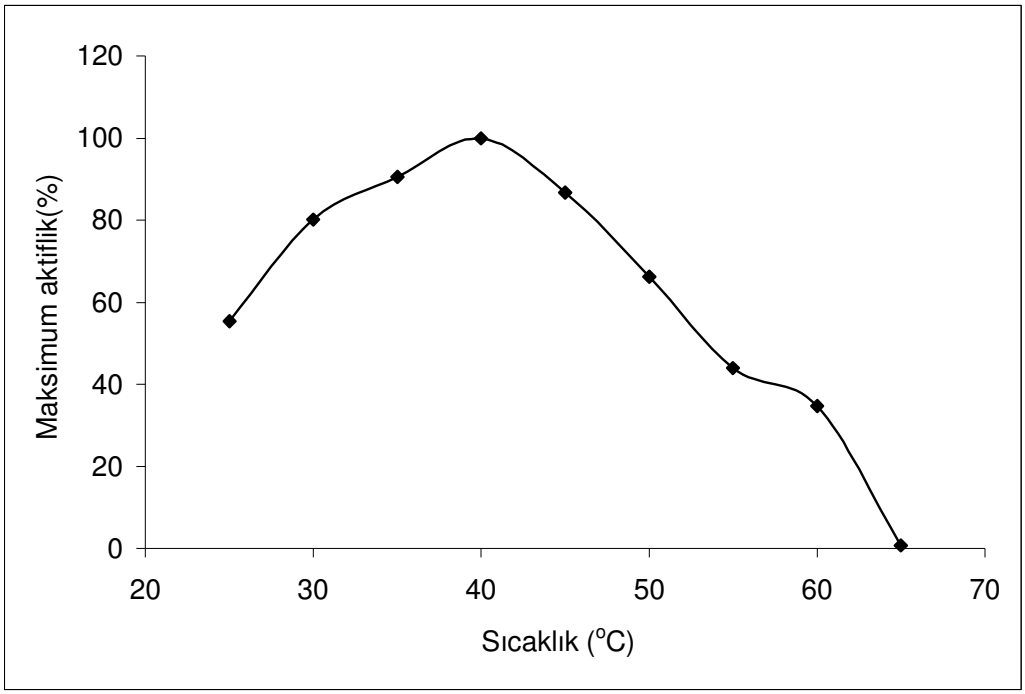
P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi incelendiğinde 35 ^{0}C -50 ^{0}C arasında oldukça geniş bir sıcaklık aralığında başlangıç aktifliğinin % 83 - % 81 aralığında koruduğu gözlendi.

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

P(AAm-CA)/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 4.10' da verildi. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 40 ^{o}C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.10' de gösterildi.

Çizelge 4.10. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
25	0,332	3,19	55
30	0,480	4,62	80
35	0,542	5,21	90
40	0,599	5,76	100
45	0,520	5,00	87
50	0,397	3,82	66
55	0,263	2,53	44
60	0,208	2,00	35
65	0,043	0,04	0,72
70	0,023	0,02	0,38



Şekil 4.10. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi incelendiğinde 30 ^{0}C -45 ^{0}C arasında oldukça geniş bir sıcaklık aralığında başlangıç aktifliğinin %80 - %86 aralığında koruduğu gözlendi. Literatürde, *Plerotus ostreatus'* dan elde edilen lakkaz kovalent bağlanma yöntemi ile Eupergit üzerine immobilize edildiğinde optimum sıcaklık 50 ^{0}C olarak bulunmuştur [83]. *Rhus vernicifera*' dan elde edilen lakkaz Glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünebilen kitosan, kitosan mikroküreler ve Fe^{+3} geçiş metali kelatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde optimum sıcaklık 45 ^{0}C olarak belirlenmiştir [95]. *Trametes versicolor'* dan elde edilen lakkaz kaolinit üzerine adsorpsiyon ile immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 50 ^{0}C, nanopartikül üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edildiğinde optimum sıcaklığı 45 ^{0}C ve kaolinit ve nanopartikül üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı 45 ^{0}C olarak belirlenmiştir [99]. *Lentinula edodes*' den elde edilen lakkaz adsorpsiyonla kitosan üzerine

immobilize edildiğinde optimum sıcaklık 60 ^{0}C bulunmuştur [55]. *Trametes hirsuta*' dan elde edilen lakkaz alümina üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edildiğinde optimum sıcaklık 60 ^{0}C bulunmuştur [109].

4.5. Serbest Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

Enzim – substrat tepkimesi aşağıda verildiği gibi gösterilir.

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + Ü$$

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

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

Bu mekanizmaya göre Michaelis-Menten sabiti aşağıda verilmiştir.

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

V_0: Başlangıç hızı
V_{mak}: Maksimum hız
K_m: Michaelis-Menten sabiti
S: Substrat derişimi

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

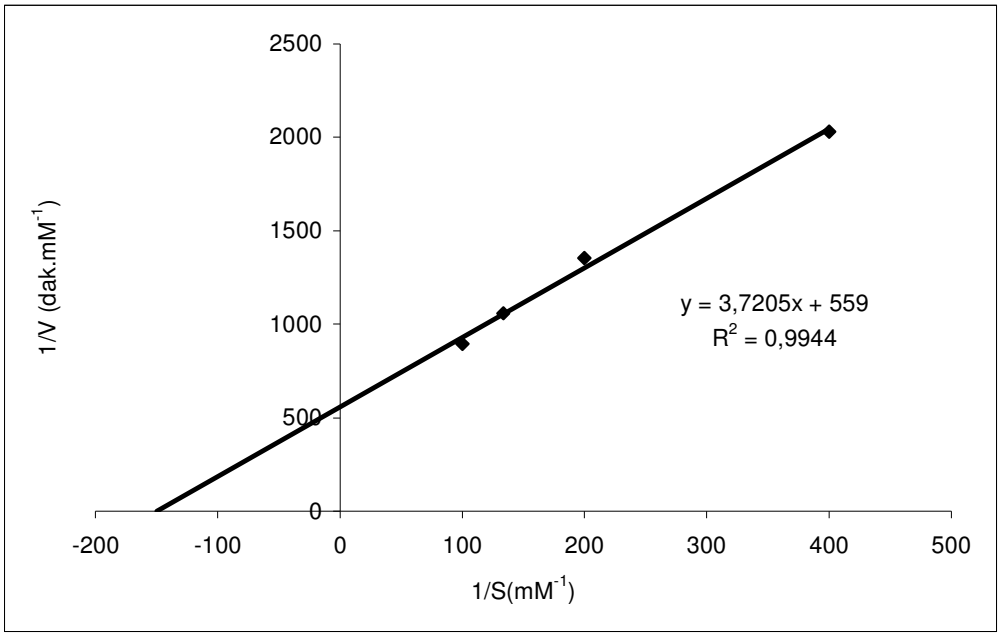
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{mak}} x \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{mak}} \qquad (4.3)$$

Lineweaver-Burk Eşitliğine göre, 1/S nin 1/V ye karşı çizilen grafiği bir doğru verir. Bu doğrunun y-kayması $1/V_{mak}$ değerini verir ve maksimum hız hesaplanır. Maksimum hız bulunduktan sonra eğimden (eğim=K_m/V_{mak}) veya x-kaymasından K_m hesaplanır. Enzimin substratına ilgisi ne kadar fazla ise K_m değeri o kadar küçüktür.

Serbest lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için 4 farklı derişimde (0,100mM - 0,025 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 3.5.1' de anlatılan yönteme göre yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25 ^{0}C) sabit tutuldu. Çizelge 4.11' de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil, 4.11.). Serbest enzimin K_m değeri 6,7x10^{-3} mM ve V_{mak} değeri 1,8x10^{-3} mM.dak^{-1} olarak bulundu.

Çizelge 4.11. Serbest enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($x10^{-3}$ mM)	1/S ($x10^{2}$ mM^{-1})	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	1/V ($x10^{2}$ dak.mM^{-1})
10	1,0	0,436	11,12	8,94
7,5	1,3	0,368	9,44	10,60
5	2,0	0,288	7,39	13,50
2,5	4,0	0,192	4,93	20,30



Şekil 4.11.Serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği

Literatürde, *Lentinula edodes*' ten elde edilmiş serbest lakkazın K_m değerini 0,07mM ve *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkaz için K_m $77x10^{-3}$ µM olarak bulunmuştur [110,84]. *Rhus vernicifera'dan* elde edilen lakkaz için K_m ve V_{mak} değerleri sırası ile 0,20 mM ve $0,37x10^{-3}$ mM.dak^{-1} olarak bulunmuştur [106].

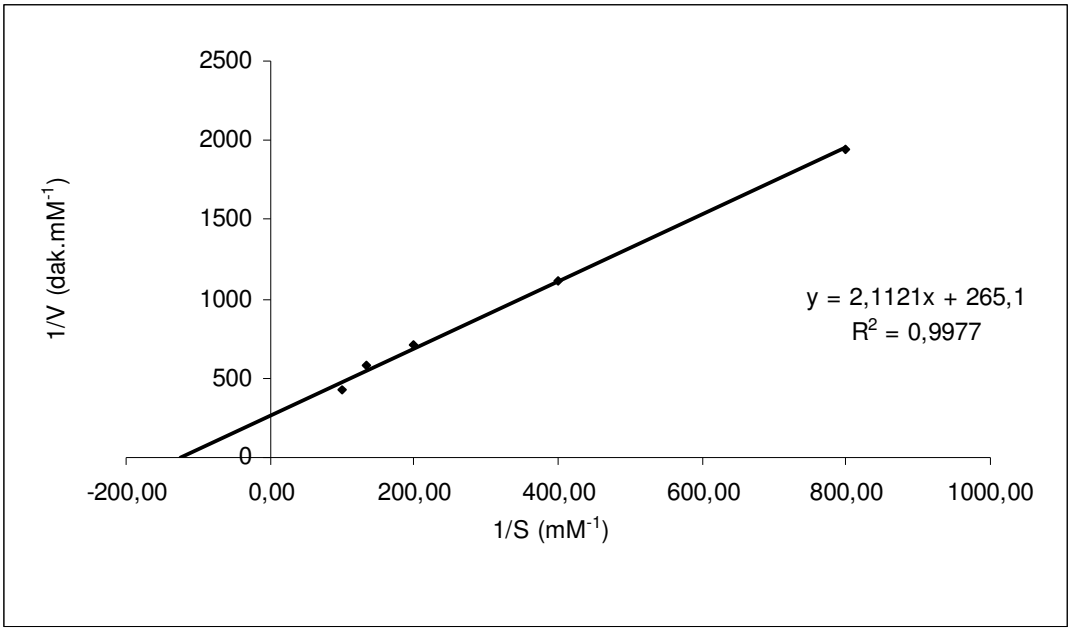
4.6. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

4.6.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

P(AAm-CrA)/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-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.12.). P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için K_m değeri 7,9 x 10^{-3} mM ve V_{mak} değeri 3,7x10^{-3} mM.dak^{-1} olarak bulundu .

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

S (x10^{-3} mM)	1/S (x10^{2} mM^{-1})	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) (x10^{-4} mM.dak^{-1})	1/V (x10^{2} dak.mM^{-1})
10,00	1,0	0,908	23,30	4,29
7,50	1,3	0,678	17,40	5,74
5,00	2,0	0,550	14,11	7,08
2,50	4,0	0,350	9,00	11,13
1,25	8,0	0,200	5,13	19,49



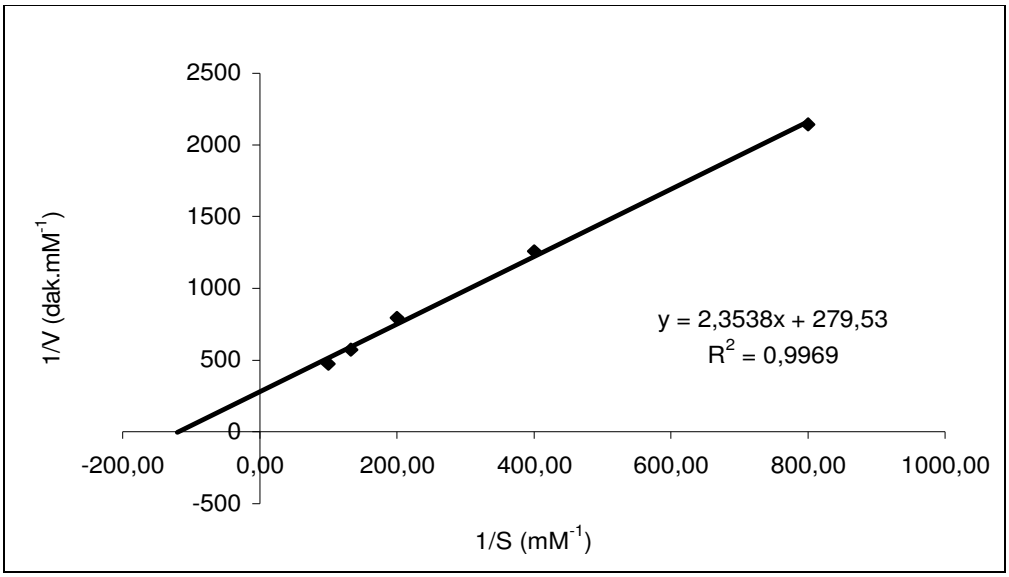
Şekil 4.12. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

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

P(AAm-CrA)/K-kar 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-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.13). P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için K_m değeri 8,4x 10^{-3} mM ve V_{mak} değeri 3,5x10^{-3} mM.dak^{-1} olarak bulundu.

Çizelge 4.13. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S ($x10^{-3}$ mM)	1/S ($x10^{2}$ mM^{-1})	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	1/V ($x10^{2}$ dak.mM^{-1})
10,00	1,0	0,821	21,06	4,74
7,50	1,3	0,680	17,45	5,73
5,00	2,0	0,490	12,57	7,95
2,50	4,0	0,310	7,95	12,57
1,250	8,0	0,182	4,67	21,41



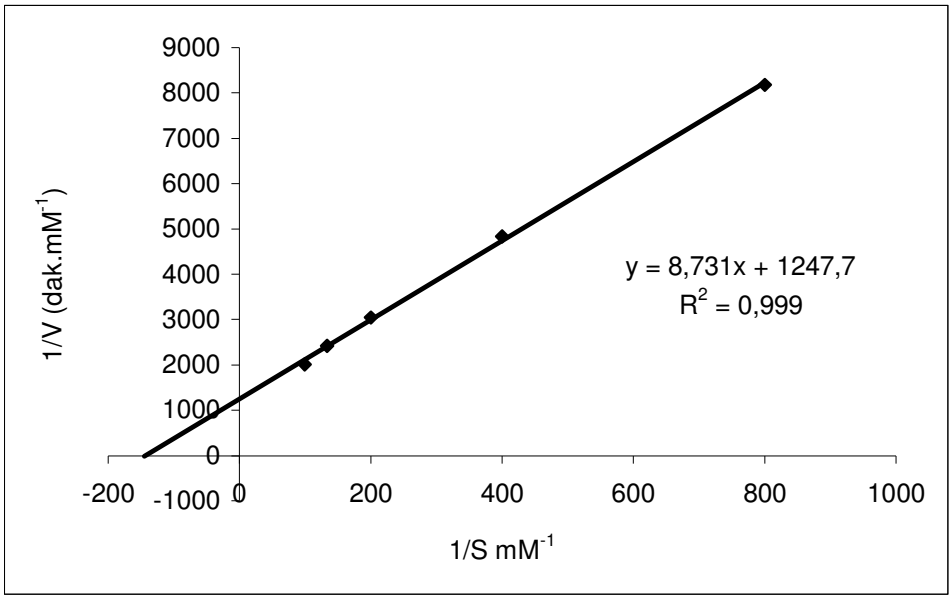
Şekil 4.13. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

4.6.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

P(AAm-CA)/Alj 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-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.14). P(AAmCA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için K_m değeri 7,00 x 10^{-3} mM ve V_{mak} değeri 8,01x10^{-4} mM.dak^{-1} olarak bulundu.

Çizelge 4.14. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi

S (x10^{-3} mM)	1/S (x10^{2} mM^{-1})	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) (x10^{-4} mM.dak^{-1})	1/V (x10^{2} dak.mM^{-1})
10,00	1,0	0,517	5,00	20,10
7,50	1,3	0,429	4,13	24,22
5,00	2,0	0,341	3,28	30,47
2,50	4,0	0,215	2,07	48,34
1,25	8,0	0,127	1,22	81,8



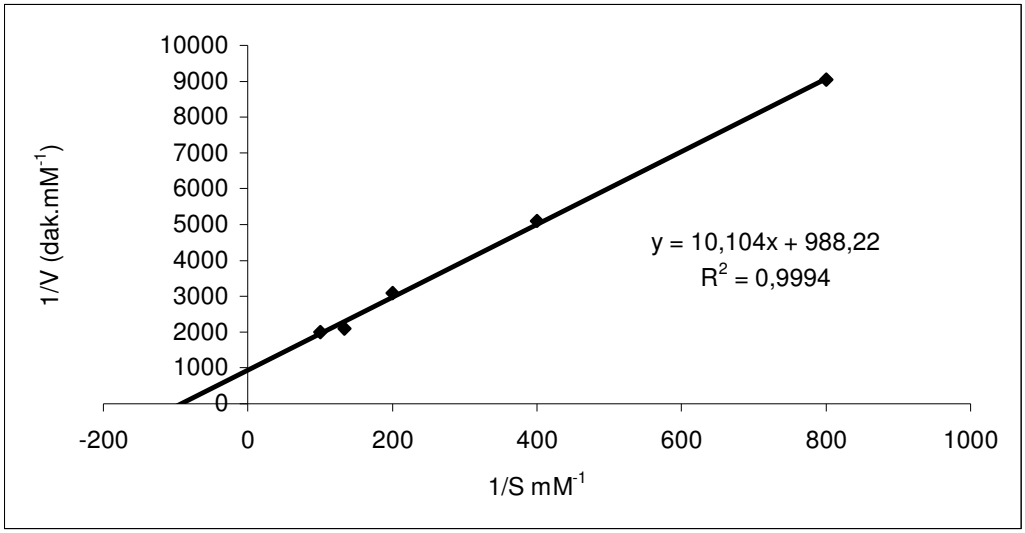
Şekil 4.14. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

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

P(AAm-CA)/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-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.15). P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için K_m değeri 1,02x 10^{-2} mM ve V_{mak} değeri 1,01x10^{-3} mM.dak^{-1} olarak bulundu.

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

S ($x10^{-3}$ mM)	1/S ($x10^{2}$ mM^{-1})	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	1/V ($x10^{2}$ dak.mM^{-1})
10,00	1,0	0,521	5,01	19,94
7,50	1,3	0,465	4,44	22,32
5,00	2,0	0,204	3,24	30,84
2,50	4,0	0,293	1,96	50,01
1,25	8,0	0,115	1,11	90,37



Şekil 4.15. P(AAm-CA)/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, diffüzyonel 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 µM, kitosana immobilize edildiğinde 256 µM olarak bulunmuştur [81]. *Lentinula edodes*' den elde edilen lakkaz eupergite üzerine immobilize edildiğinde K_m nin 0,150 mM olduğu tespit edilmiştir. [84]. *Trametes versicolor'* dan elde edilen lakkaz kaolinit üzerine immobilize edildiğinde ve substrat olarak ABTS kullanıldığında K_m değeri 0,165 mM olarak bulunmuştur[91].

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

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

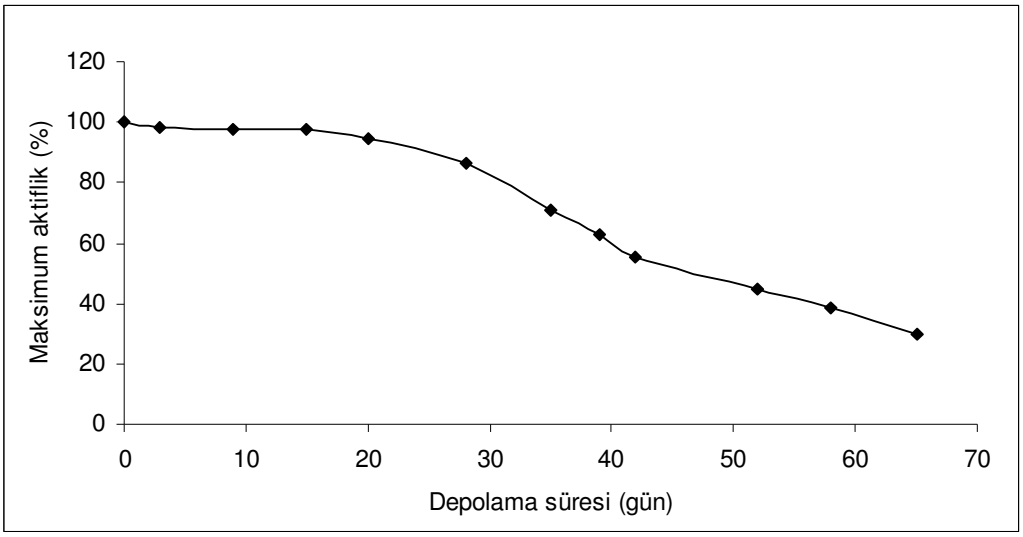
Serbest ve immobilize lakkaz	K_m (x10^{-3}mM)	V_{mak} (x 10^{-3} mM.dak^{-1})
Serbest Lakkaz	6,7	1,8
P(AAm-CrA)/Alj-L	7,9	3,7
P(AAm-CrA)/K-kar-L	8,4	3,5
P(AAm-CA)/Alj-L	7,0	0,8
P(AAm-CA)/K-kar-L	10,2	1,0

4.7. Serbest Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için 4 ^{0}C de saklanan serbest enzimin belirli aralıklarla 70 gün boyunca Bölüm 3.5.1' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. Serbest enzimin maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.17 ve Şekil 4.16' da gösterildi.

Çizelge 4.17. Serbest enzim aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
0	0,586	15,03	100
3	0,574	14,73	98
9	0,573	14,70	98
15	0,571	14,65	97
20	0,553	14,19	94
28	0,505	12,96	86
35	0,416	10,67	71
39	0,368	9,44	63
42	0,325	8,34	55
52	0,261	6,70	45
58	0,226	5,80	39
65	0,176	4,52	30
70	0,170	4,36	29



Şekil 4.16. Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Serbest enzimin 4 ^{0}C' de depolamada 70. günde başlangıç aktifliğinin % 29' unu koruduğu gözlendi.

Literatürde, *Trametes versicolor'* dan elde edilen lakkaz 4 ^{0}C' da 4 ay boyunca depolandığında başlangıç aktifliğinin %90' ını kaybettiği verilmiştir [91].

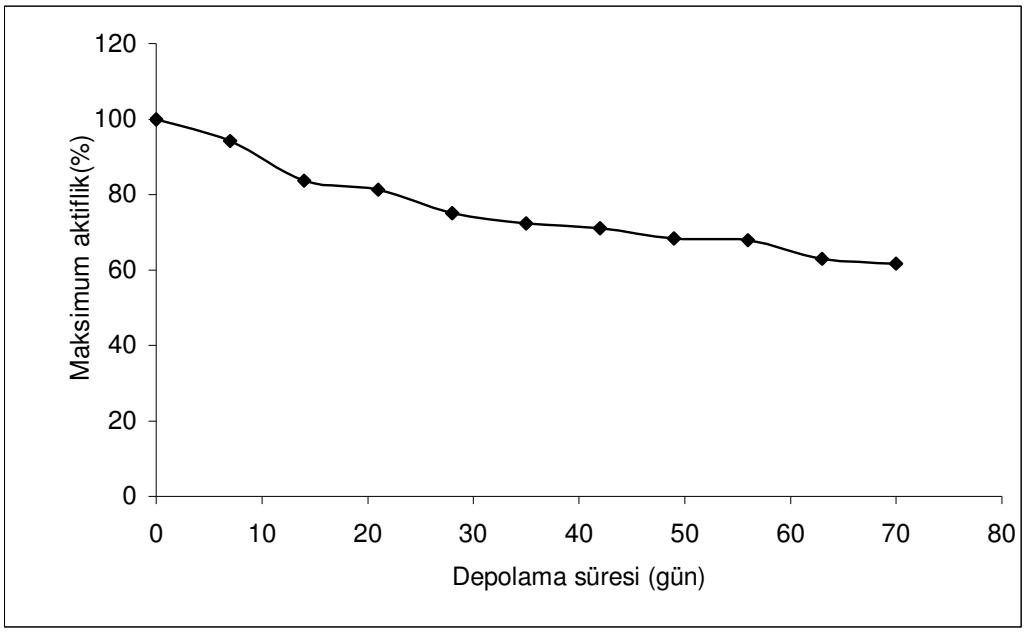
4.8. İmmobilize Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

4.8.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4 ^{0}C' de saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 70 gün boyunca Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. P(AAm-CrA)/Alj hidrojeline immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.18 ve Şekil 4.17' de gösterildi.

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

Zaman (gün)	Absorbans Değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,940	24,12	100
7	0,885	22,71	94
14	0,787	20,19	84
21	0,764	19,60	81
28	0,705	18,09	75
35	0,680	17,45	72
42	0,668	17,14	71
49	0,643	16,50	68
56	0,638	16,37	68
63	0,592	15,19	63
70	0,579	14,86	62



Şekil 4.17. P(AAm-CrA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

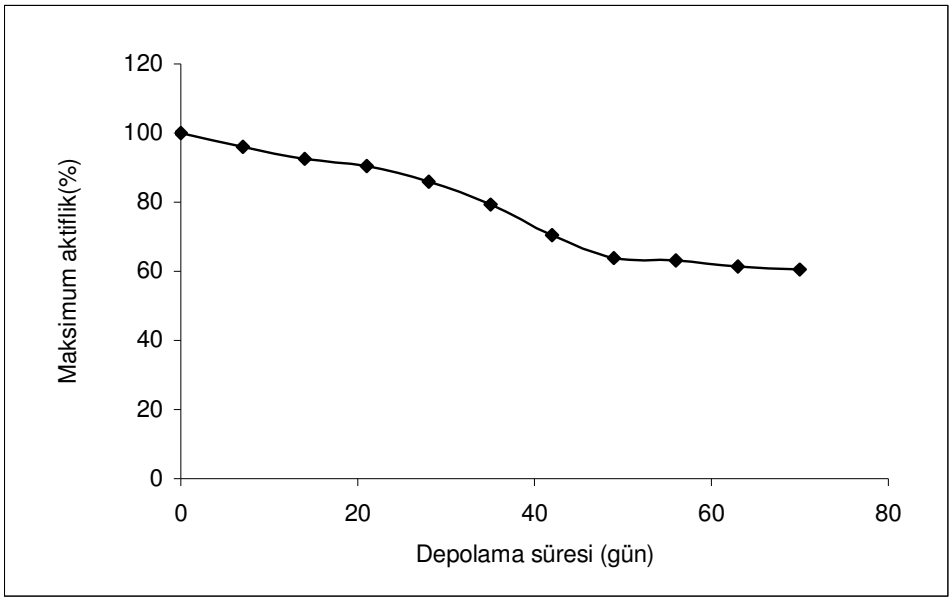
İmmobilize enzimin 4 ^{0}C' da depolamada 70. günde başlangıç aktifliğinin % 62'sini koruduğu gözlendi.

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

P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4 ^{0}C' da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 70 gün boyunca Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.19 ve Şekil 4.18' de gösterildi.

Çizelge 4.19. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,908	23,30	100
7	0,872	22,37	96
14	0,840	21,55	92
21	0,821	21,06	90
28	0,780	20,01	86
35	0,720	18,47	79
42	0,640	16,42	70
49	0,580	14,88	64
56	0,574	14,73	63
63	0,557	14,29	61
70	0,55	14,11	60



Şekil 4.18. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

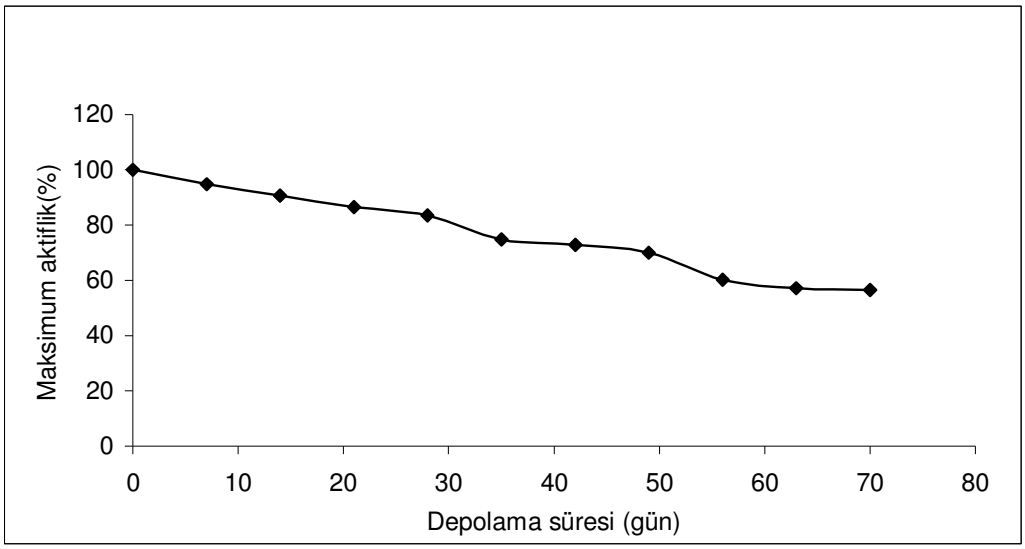
İmmobilize enzimin 4 ^{0}C' da depolamada 70. günde başlangıç aktifliğinin % 60' ını koruduğu gözlendi.

4.8.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4 ^{0}C da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 70 gün boyunca Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.20 ve Şekil 4.19' da gösterildi.

Çizelge 4.20. P(AAm-CA)/Alj hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,659	6,34	100
7	0,625	6,01	95
14	0,597	5,74	90
21	0,570	5,48	86
28	0,550	5,29	83
35	0,493	4,74	75
42	0,480	4,62	73
49	0,462	4,45	70
56	0,397	3,82	60
63	0,377	3,63	57
70	0,372	3,58	56



Şekil 4.19. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

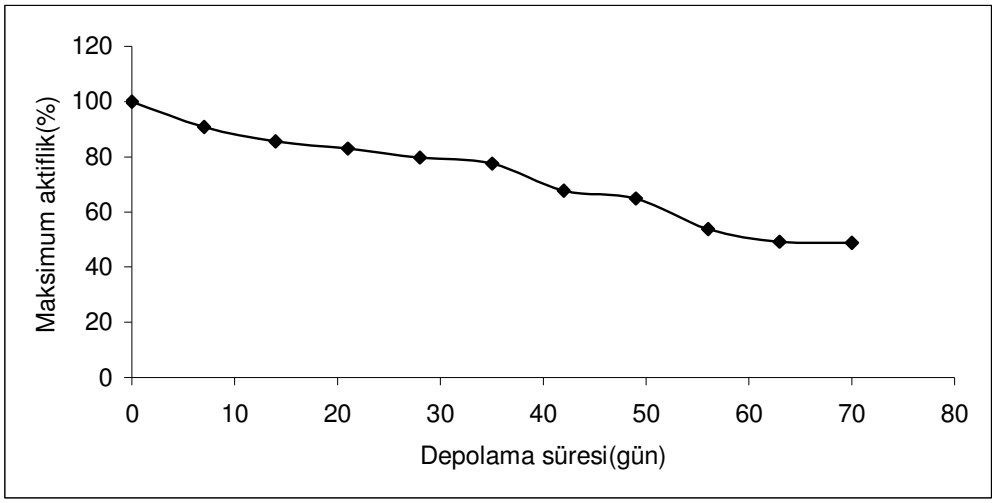
İmmobilize enzimin 4 ^{o}C de depolamada 70. günde başlangıç aktifliğinin % 56'sını koruduğu gözlendi.

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

P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için, 4 ^{0}C da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 70 gün boyunca Bölüm 3.5.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 4.21 ve Şekil 4.20' de gösterildi.

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

Zaman (gün)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,629	6,05	100
7	0,571	5,49	91
14	0,539	5,19	86
21	0,522	5,02	83
28	0,501	4,82	80
35	0,487	4,69	77
42	0,426	4,10	68
49	0,408	3,93	65
56	0,338	3,25	53
63	0,310	2,98	49
70	0,307	2,95	49



Şekil 4.20. P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

İmmobilize enzimin 4 ^{o}C de depolamada 70. günde başlangıç aktifliğinin % 49' unu koruduğu gözlendi**.**

Serbest lakkaz, P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj P(AAm-CA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz 42 gün +4 ^{0}C' da depolandığında başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %55, %71, %70, %73, %68' sini koruduğu belirlendi.

Literatürde, *Cerrena unicolor'* dan elde edilen lakkaz DEAE-Granocel 500 üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edildiğinde, 4 ^{0}C de 4 ay depolandığında başlangıç aktifliğinin %98' ini koruduğu belirtilmiştir [88]. *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 ^{0}C de 3 ay sonunda kelat üzerine immobilize edilmiş enzim ve suda çözünebilen kitosan üzerine immobilize edilmiş enzimin aktifliğinin %10' unu kaybettiğini , mikro küreler üzerine immobilize edilen enzimin ise aktifliğinin %15' ini kaybettiği verilmiştir [95]. Kaynağı *Trametes versicolor* olan lakkaz kaolinit üzerine immobilize edilmiş 4 ^{0}C da 90 gün depolama sonunda aktifliğinde kayıp

olmadığı belirlenmiştir [91]. *Pleurotus ostreatus'* dan elde edilen lakkazın, 25 ^{0}C' da 10 gün boyunca depolanması sonucu aktifliğini kaybettiği, kovalent bağlamayla eupergit üzerine immobilize edildiğinde, aynı şartlarda depolanması sonucu başlangıç aktifliğinin yaklaşık % 2' sini kaybettiği gözlenmiştir [83]. Bizim bulgularımız da bu sonuçla uyum göstermektedir.

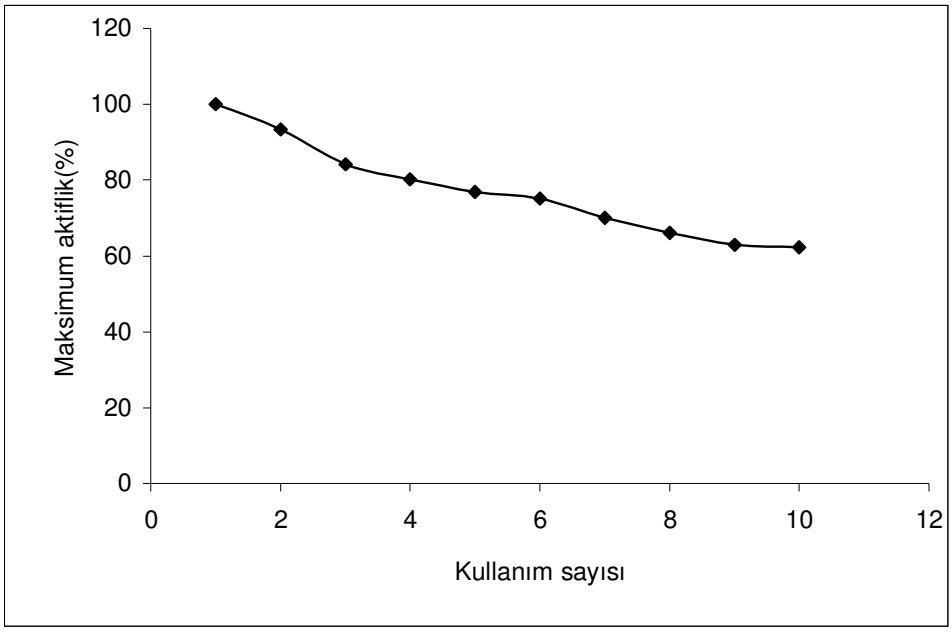
4.9. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

4.9.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

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

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

Kullanım sayısı	Absorbans Değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
1	0,820	21,04	100
2	0,765	19,63	93
3	0,690	17,70	84
4	0,658	16,88	80
5	0,630	16,16	77
6	0,616	15,80	75
7	0,574	14,73	70
8	0,542	13,90	66
9	0,516	13,24	63
10	0,511	13,11	62



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

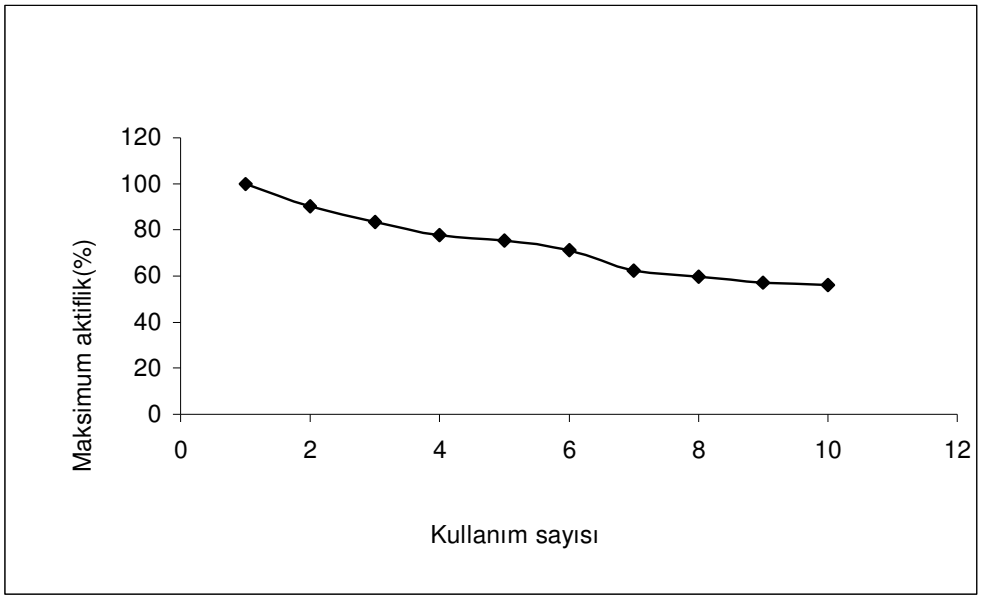
İmmobilize enzimin 10 defa kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin %62'sini koruduğu gözlendi.

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

P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz 1 gün boyunca 10 kez kullanılarak Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi aktifliği tayin edildi. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 4.23 ve Şekil 4.22' de gösterildi.

Çizelge 4.23. P(AAm-CrA)/K-kar hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans Değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
1	0,821	21,06	100
2	0,742	19,04	90
3	0,685	17,57	83
4	0,638	16,37	78
5	0,620	15,91	75
6	0,585	15,01	71
7	0,512	13,14	62
8	0,490	12,57	60
9	0,470	12,06	57
10	0,460	11,80	56



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

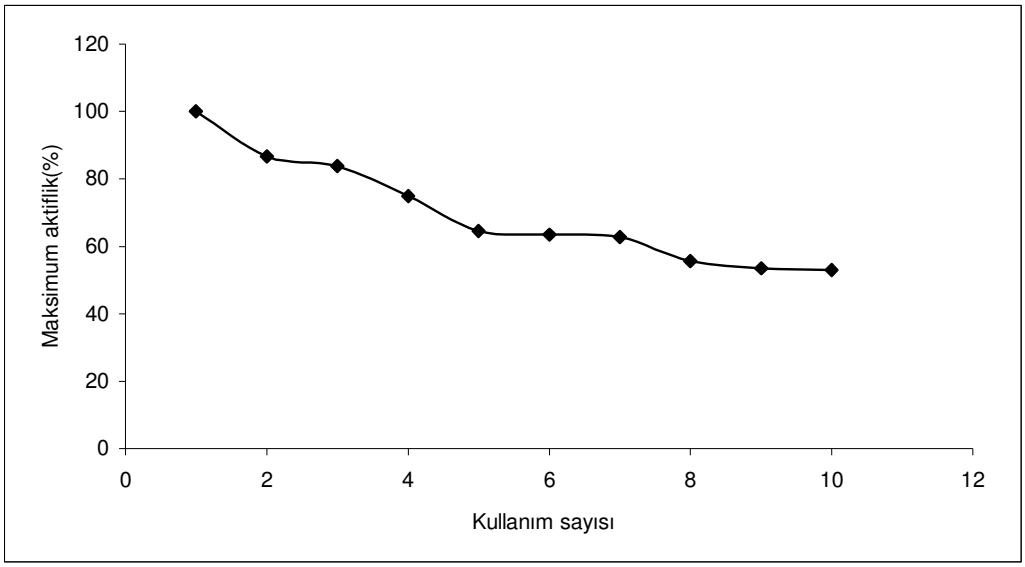
İmmobilize enzimin 10 defa kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin %56'sını korunduğu gözlendi.

4.9.3. Poli(akrilamit-sitrakonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

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

Çizelge 4.24. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
1	0,557	5,36	100
2	0,483	4,65	87
3	0,467	4,49	84
4	0,417	4,01	75
5	0,360	3,46	65
6	0,354	3,41	63
7	0,350	3,37	63
8	0,310	2,98	56
9	0,298	2,87	53
10	0,295	2,84	53



Şekil 4.23. P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

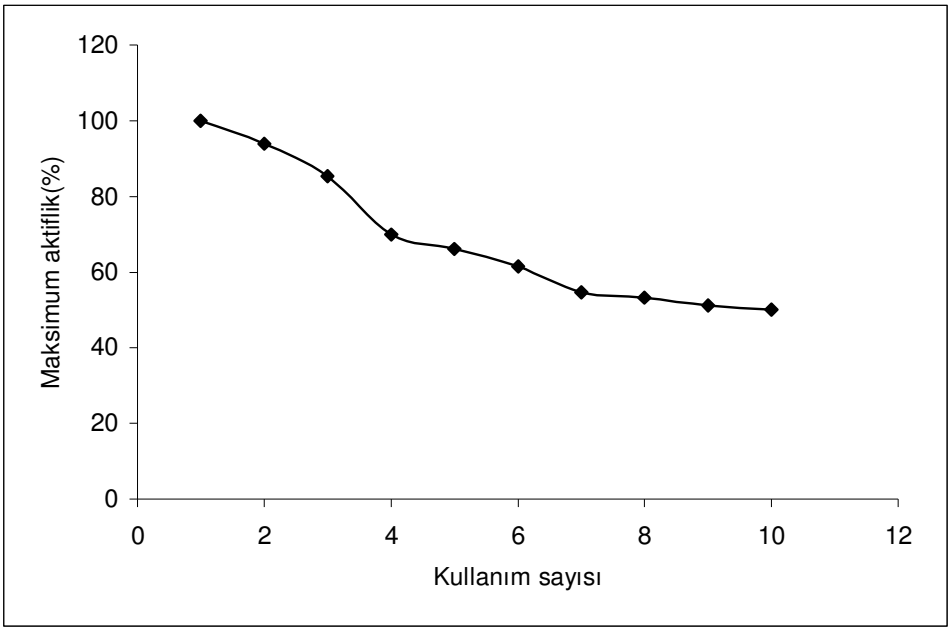
İmmobilize enzimin 10 defa kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin %53'ünü koruduğu gözlendi.

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

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

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

Kullanım sayısı	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik ($x10^{-4}$ mM.dak^{-1})	Maksimum aktiflik (%)
1	0,572	5,55	100
2	0,537	5,17	94
3	0,488	4,70	85
4	0,400	3,85	69
5	0,378	3,64	66
6	0,352	3,39	61
7	0,313	3,01	55
8	0,305	2,93	53
9	0,293	2,82	51
10	0,286	2,75	50



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

İmmobilize enzimin 10 defa kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 50 'sini koruduğu gözlendi.

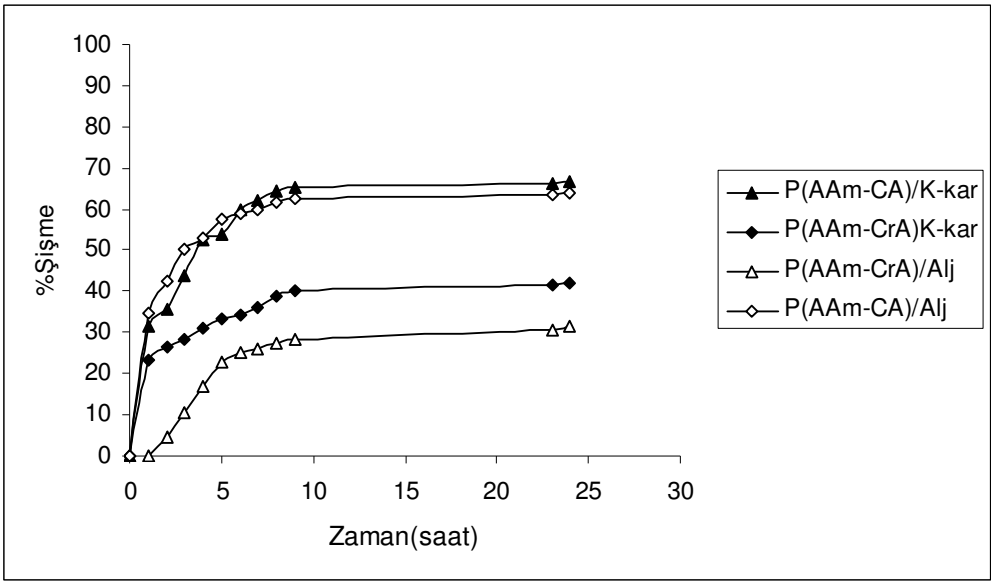
Literatürde, *Panus conchatus*'den elde edilen lakkaz aktive edilmiş karboksillenmiş PVA üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edildiğinde immobilize enzimin 10 kullanımdan sonra başlangıç aktifliğinin %60' ını koruduğu belirtilmiştir [89]. *Pcynoporus sanguineus'* dan elde edilen lakkaz gulutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile amin sonlu nanokompozitler (Cu TPAc)-Fe_3O_4 (bakır tetraamin ftalosiyanin) üzerine iki basamaklı tepkime üzerinden immobilize edildiğinde, 5 kez ard arda kullanımından sonra başlangıç aktifliğinin % 80' ini koruduğu belirtilmiştir [96]. Kaynağı *Rhus vernicifera* olan lakkaz glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile suda çözünebilen kitosan mikroküreler ve Fe^{+3} geçiş metali kelatları üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmiş 15 kez ard arda kullanımdan sonra suda çözünebilen kitosan üzerine immobilize edilmiş enzimin başlangıç aktifliğinin % 80' ini , kelat üzerine immobillize edilmiş enzimin başlangıç aktifliğinin ise % 85' ini koruduğu tespit edilmiştir [95].

4.10. Hidrojellerin Şişme Değerlerinin Zamanla Değişimi

P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerinin şişme yüzdelerinin zamanla değişimi 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(AAmCrA)/ Alj	%Şişme P(AAmCA)/ Alj	%Şişme P(AAm-CrA)/ K-kar	%Şişme P(AAm-CA)/ K-kar
0	0	0	0	0
1	4,72	34,62	23,12	31,43
2	10,61	42,57	26,53	35,83
3	17,04	50,15	28,33	44,36
4	22,87	53,01	31,26	52,67
5	25,03	57,51	33,45	54,07
6	25,83	58,87	34,48	60,04
7	27,27	59,68	36,00	62,04
8	28,08	61,77	38,77	64,53
9	28,55	62,57	40,35	65,30
23	30,83	63,33	41,54	66,48
24	31,32	63,93	42,04	66,86

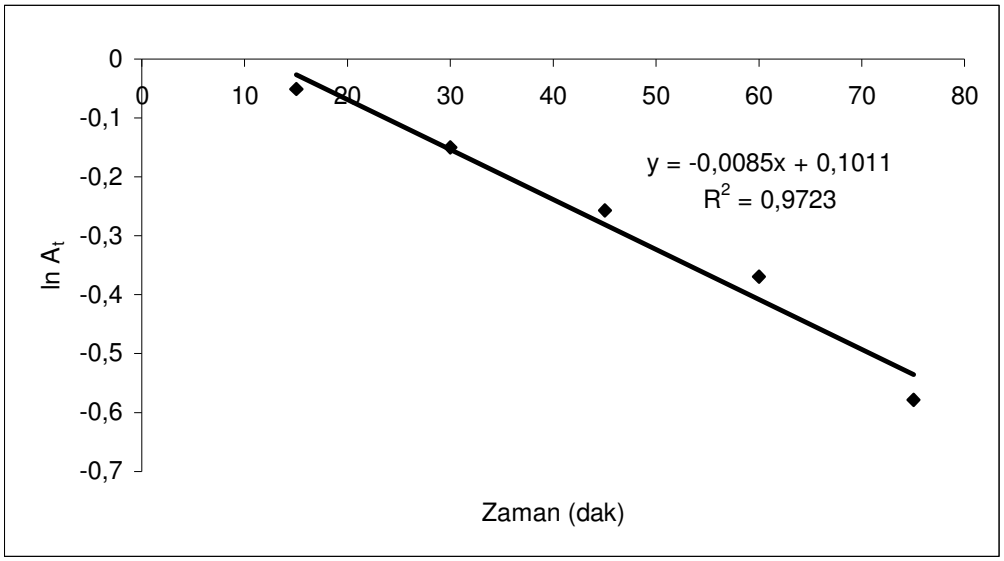


Şekil 4.25. Hidrojellerin % şişmelerinin zamanla değişimi

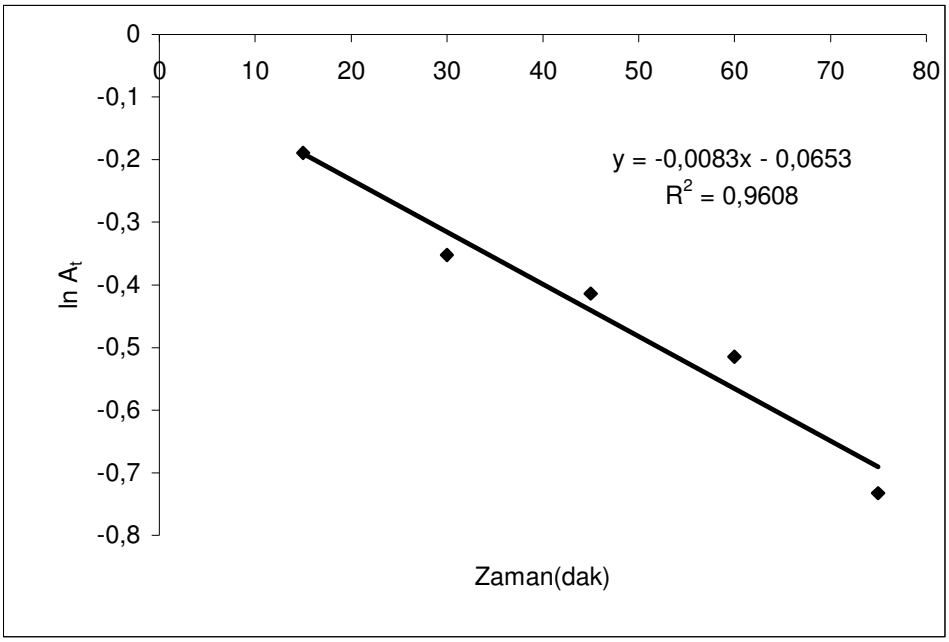
Hidrojellerin % şişme değerlerinin zamanla önce arttığı ve 24 saat civarında sabit bir değere ulaştığı gözlendi. P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/K-kar, hidrojelleri için denge şişme yüzdeleri sırasıyla yapıdaki hidrofilik gruplara bağlı olarak; %31, %64, %42, %66, olarak bulundu.

4.11. İmmobilize Lakkazın Termal İnaktivasyonu

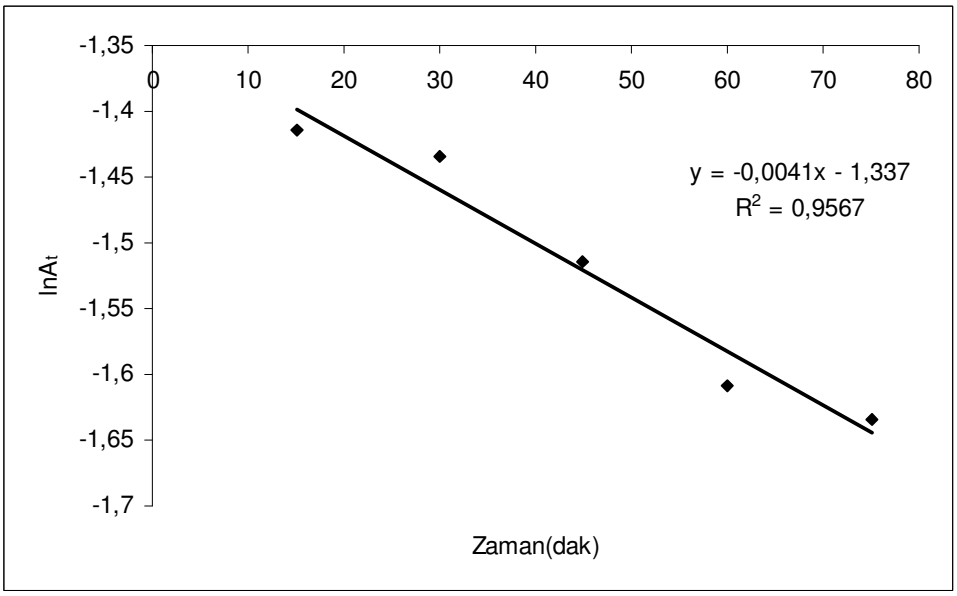
P(AAm-CrA)/Alj-L, P(AAm-CA)/Alj-L, P(AAm-CrA)/K-kar-L, P(AAm-CA)/K-kar-L immobilize lakkazların 30 ^{0}C ve 50 ^{0}C' da termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla Bölüm 3.12.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Birinci dereceden termal inaktivasyon sabitleri $\ln A_t$ – t grafiklerinin eğimlerinden hesaplandı. 30 ^{0}C da P(AAm-CrA)/Alj-L, P(AAm-CA)/Alj-L, P(AAm-CrA)/K-kar-L, P(AAm-CA)/K-kar-L immobilize lakkazların, k_i değerlerini hesaplamak üzere $\ln A_t$' nin t ile değişimi sırasıyla Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29' da gösterildi.



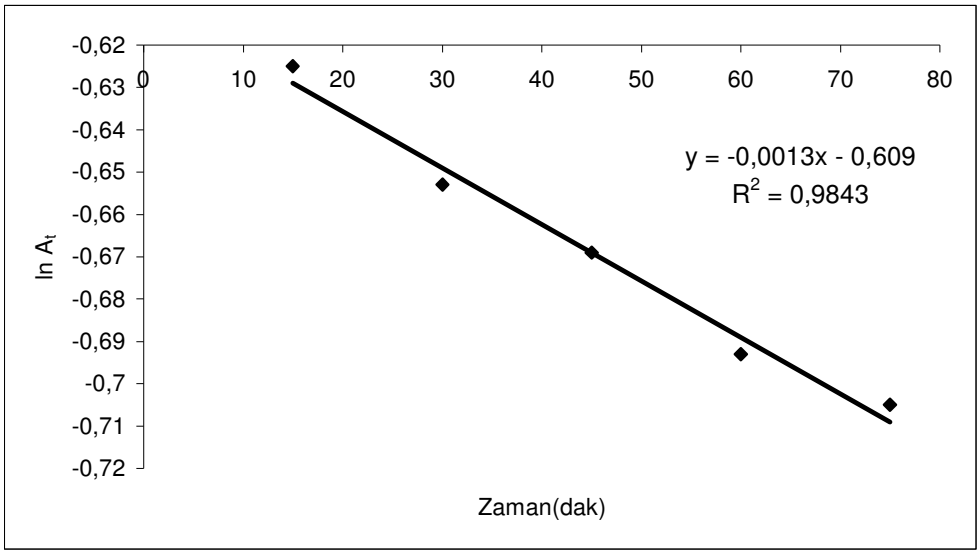
Şekil 4.26. 30 ^{0}C' da P(AAm-CrA)/Alj-L için $\ln A_t$ – t grafiği



Şekil 4.27. 30 ^{0}C' da P(AAm-CrA)/K-kar-L için lnA_t – t grafiği

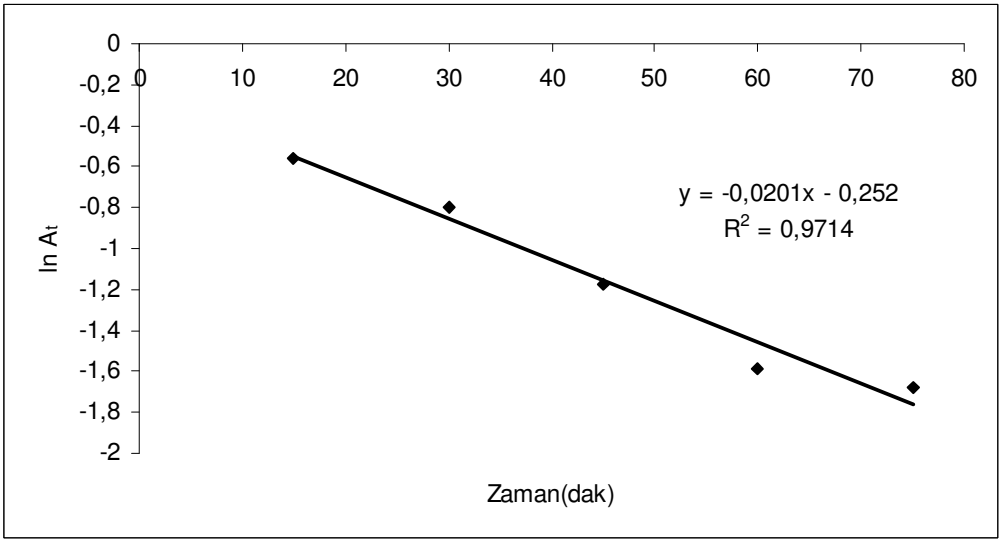


Şekil 4.28. 30 ^{0}C' da P(AAm-CA)/Alj-L için lnA_t – t grafiği

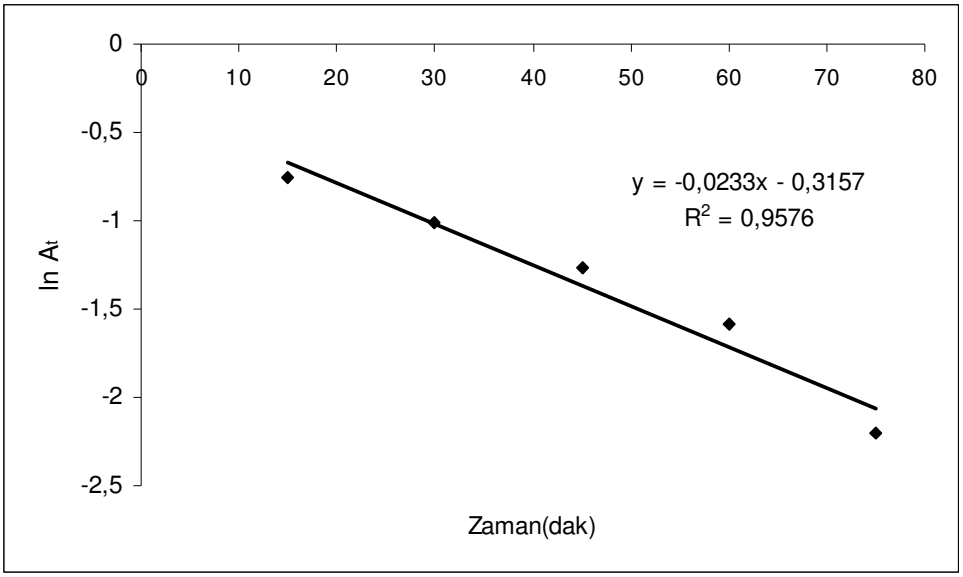


Şekil 4.29. 30 ^{0}C' da P(AAm-CA)/K-kar-L için lnA_t – t grafiği

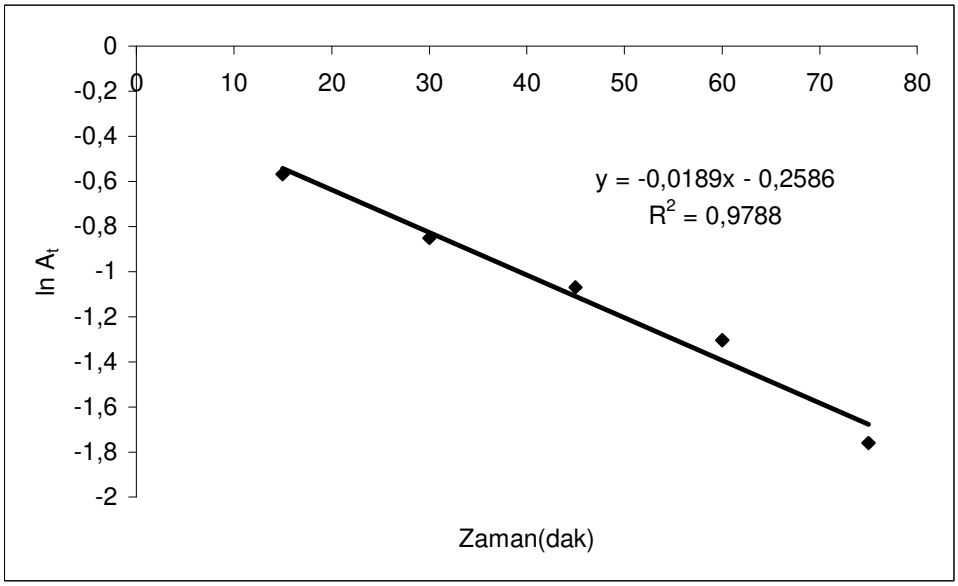
50 ^{0}C' da P(AAm-CrA)/Alj-L, P(AAm-CA)/Alj-L, P(AAm-CrA)/K-kar-L, P(AAm-CA)/K-kar-L immobilize lakkazların, k_i değerlerini hesaplamak üzere lnA_t' nin t ile değişimi sırasıyla Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33' de gösterildi.



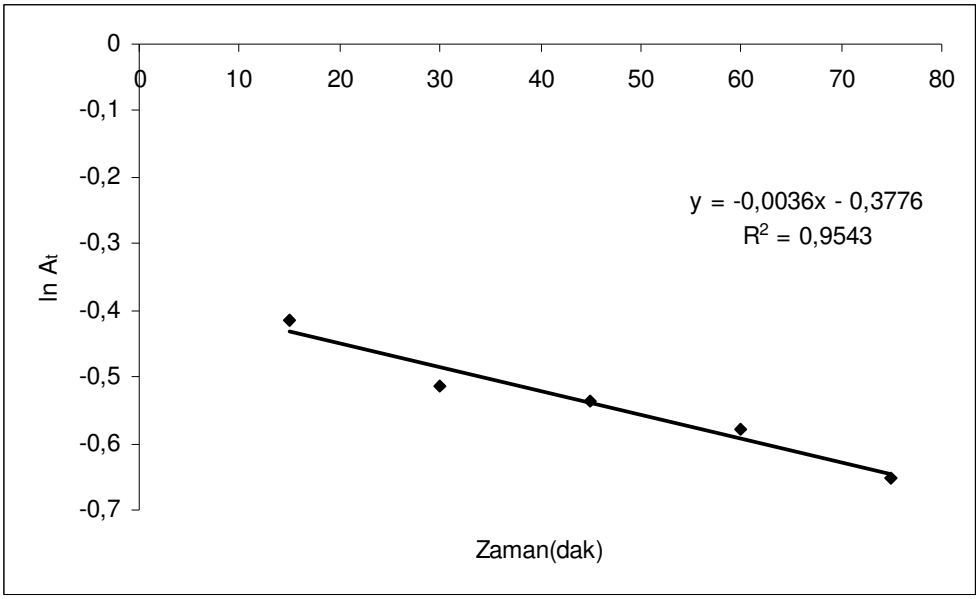
Şekil 4.30. 50 ^{0}C' da P(AAm-CrA)/Alj-L için lnA_t – t grafiği



Şekil 4.31. 50 ^{0}C' da P(AAm-CrA)/K-kar-L için $\ln A_t$ – t grafiği



Şekil 4.32. 50 ^{0}C' da P(AAm-CA)/Alj-L için $\ln A_t$ – t grafiği



Şekil 4.33. 50 ^{0}C' da P(AAm-CA)/K-kar-L için $\ln A_t$ – t grafiği

İmmobilize lakkazlar için 30 ^{0}C ve 50 ^{0}C' da hesaplanan k_i değerleri Çizelge 4.27 de verildi.

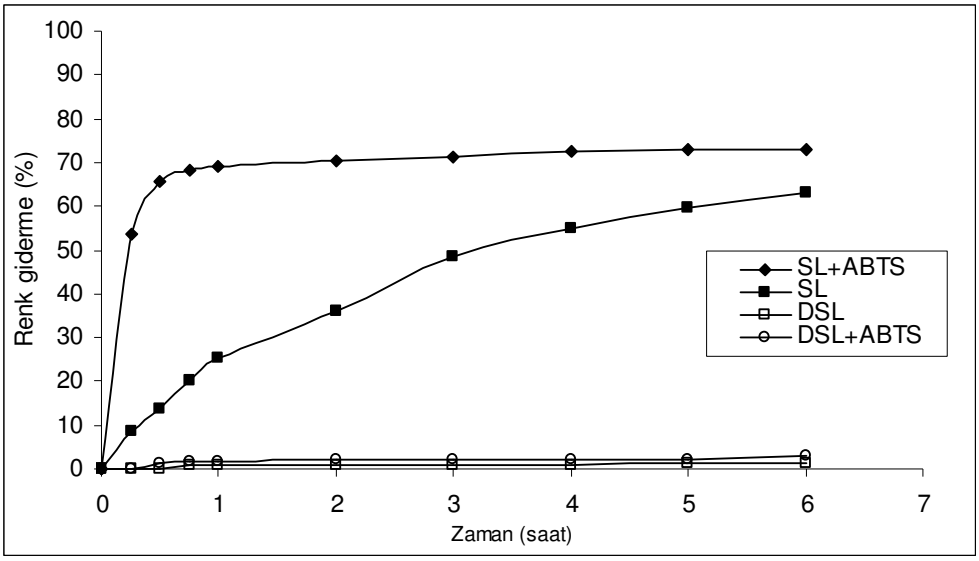
Çizelge 4.27. 30 ^{0}C ve 50 ^{0}C' da immobilize lakkazların k_i sabitleri

İmmobilize lakkaz	k_i (dak^{-1})	
	30 °C	50 °C
P(AAm-CrA)/Alj-L	0,0085	0,0201
P(AAm-CA)/Alj-L	0,0041	0,0201
P(AAm-CrA)/K-kar-L	0,0083	0,0233
P(AAm-CA)/ K-kar-L	0,0013	0,0036

İmmobilize lakkazların 50 ^{0}C' daki k_i değerlerinin 30 ^{0}C' daki k_i değerlerinden daha yüksek, yaklaşık 2 – 5 kat kadar büyük olduğu görüldü. Literatürde termal inaktivasyon için benzer değişimler gözlenmiştir [98,111].

4.12. Serbest Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilmesi

SL, SL+ABTS, DSL, DSL+ABTS kullanılarak metil oranjın renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi Şekil 4. 34' de grafiğe geçirildi.



Şekil 4.34. SL, DSL, SL+ABTS, DSL+ABTS ile metil oranjın renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi

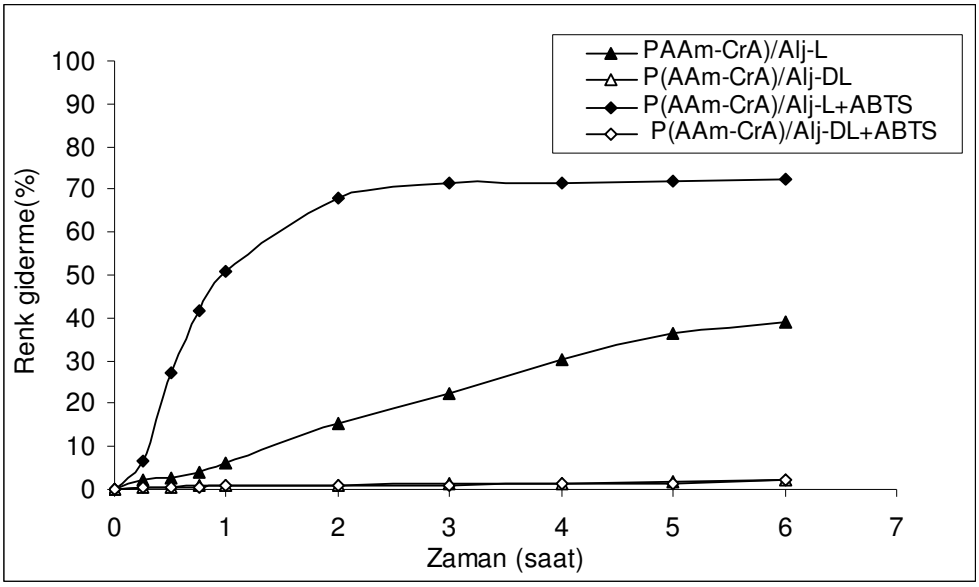
Şekil 4.34' de görüldüğü gibi 6 saat sonunda serbest lakkaz metil oranjın renginin %63' ünü giderirken, tepkime ortamına ABTS mediyatörü eklendiğinde bu değerin %73' e çıktığı görüldü. Kontrol deneyleri için DSL, DSL+ABTS'nin metil oranjın rengini gidermediği gözlendi.

Literatürde, *Coriolopis rigida'* dan elde dilen lakkaz ile mediyatör kullanmadan metil oranjın rengi bir gün sonunda %80-%90 oranında giderilmiştir [112]. Kaynağı *Trametes hirsuta* olan lakkaz ile metil oranjın renk giderime deneyinde 24 saat sonunda % 65 oranında renk giderme sağlanmıştır [113].

4.13. İmmobilize Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilmesi

4.13.1. Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi

P(AAm-CrA)/Alj-L, P(AAm-CrA)/Alj-DL, P(AAm-CrA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-CrA)/Alj-DL+ABTS kullanılarak metil oranj için hesaplanan renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi Şekil 4.35' de grafiğe geçirildi.

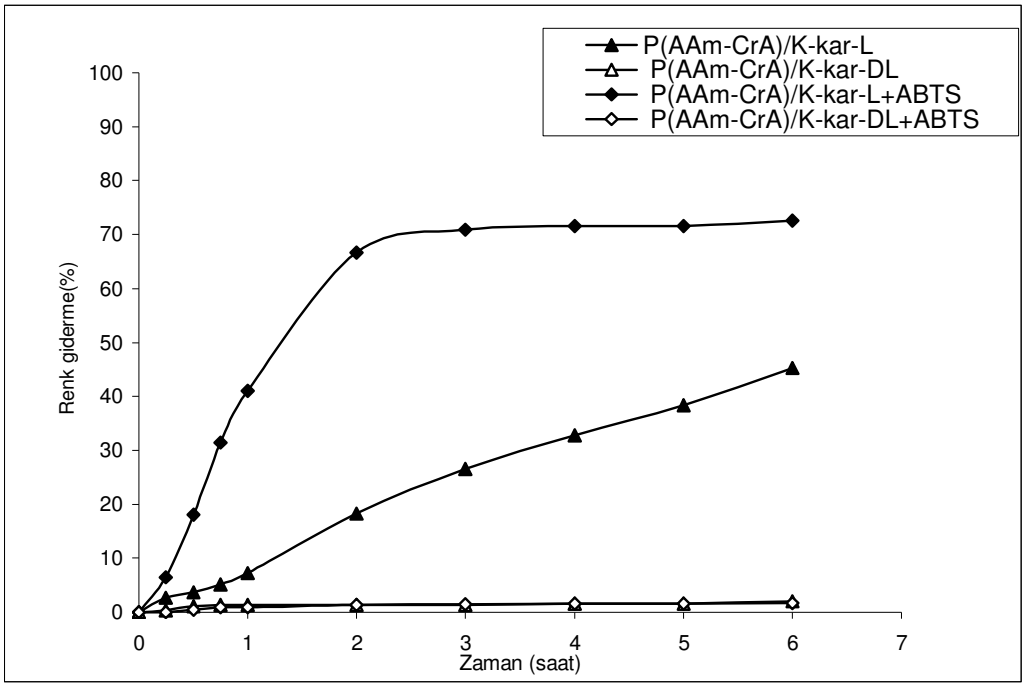


Şekil 4.35. P(AAm-CrA)/Alj-L, P(AAm-CrA)/Alj-DL, P(AAm-CrA)/Alj-L+ABTS, P(AAm-CrA)/Alj-DL+ABTS ile metil oranjın renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi

Şekil 4.35' de görüldüğü gibi 6 saat sonunda P(AAm-CrA)/Alj-L metil oranjın rengini %38,83 oranında giderirken, tepkime ortamına ABTS mediyatörü eklendiğinde bu değerin %72,54' e çıktığı görüldü. P(AAm-CrA)/Alj-DL, P(AAm-CrA)/Alj-DL+ABTS hidrojelleri için %2-%3 arasında renk giderme gözlendi. Bu sonuçlar hidrojellerle boya molekülleri arasında kayda değer bir etkileşim olmadığını gösteren literatürle uygunluktadır [101].

4.13.2. Poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan hidrojelinde immobilize edilen lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi

P(AAm-CrA)/K-kar-L, P(AAm-CrA)/K-kar -DL, P(AAm-CrA)/K-kar -L+ABTS, P(AAm-CrA)/K-kar-DL+ABTS kullanılarak metil oranjın renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi Şekil 4.36' da grafiğe geçirildi.



Şekil 4.36. P(AAm-CrA)/K-kar-L, P(AAm-CrA)/K-kar -DL, P(AAm-CrA)/ K-kar -L+ABTS, P(AAm-CrA)/ K-kar -DL+ABTS metil oranjın renk giderme yüzdelerinin zamanla değişimi

Şekil 4.36' da görüldüğü gibi 6 saat sonunda P(AAm-CrA)/K-kar-L metil oranjın rengini %45,22 oranında giderirken, tepkime ortamına ABTS mediyatörü eklendiğinde bu değerin %72,62' ye çıktığı görüldü. P(AAm-CrA)/K-kar-DL, P(AAm-CrA)/K-kar-DL+ABTS jelleri için %2 oranında renk giderme gözlendi. Bu sonuçlar hidrojellerle boya molekülleri arasında kayda değer bir etkileşim olmadığını gösteren literatür verilerini desteklemektedir [101].

Literatürde, *Myceliophthora thermophila*' dan elde edilen lakkaz, kovalent bağlanma yöntemi ile epoksi grupları ile aktive edilmiş polimetakrilat bazlı polimerlere (Sepabeads EC-EP3 ve Dilbeads NK) immobilize edildiğinde, 6 saat inkübasyon sonunda HBT kullanılmadan metil oranjın rengini % 61 oranında giderirken, HBT varlığında ise 6 saat sonunda %82 oranında giderdiği bulunmuştur [73].

5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Serbest lakkaz ve P(AAm-CA)/Alj immobilize lakkaz için optimum pH 5,0, P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/K-kar immobilize lakkaz enzimleri için ise 5,5 olarak bulundu.

2. Serbest lakkaz ve P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/K-kar immobilize lakkaz için optimum sıcaklık 40 ^{0}C, P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CA)/Alj immobilize lakkaz enzimi için optimum sıcaklık sırasıyla 50 ^{0}C, 45 ^{0}C olarak bulundu.

3. Serbest lakkaz için K_m değeri 6,7x10^{-2} mM, V_{mak} değeri 1,8x10^{-2} mM. dak^{-1}, P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj ve P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enzimi için K_m değerleri sırasıyla 7,9x10^{-3} mM 8,4x10^{-3} mM, 7,0x10^{-3} mM ve 1,02x10^{-2} mM V_{mak} değerleri sırasıyla 3,7x10^{-3} mM.dak^{-1}, 3,5x10^{-3} mM.dak$^{-1,}$ 8,01x10^{-4} mM.dak^{-1} ve 1,01x10^{-2} mM.dak^{-1} olarak bulundu.

4. Serbest lakkazın, 4 ^{0}C de depolamada 42. günde başlangıç aktifliğinin % 55' ini koruduğu gözlendi. P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj ve P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enziminin, 4 ^{o}C de depolamada 42. günde başlangıç aktifliğinin sırasıyla % 71, % 70, % 73, ve % 68' sini koruduğu gözlendi. Bu deneyler için en iyi sonuç P(AAm-CA)/Alj hidrojelinde immobilize edilen lakkaz enzimi için bulundu.

5. P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enziminin, 10 kez kullanımı sonunda başlangıç aktifliğinin sırasıyla % 62, % 56 % 53 ve %50' sini koruduğu bulundu, 10 kez kullanımları sonucunda P(AAm-CrA)/Alj

hidrojelinde immobilize edilen lakkazın en iyi sonuç vermesinden dolayı diğerlerine göre tekrar kullanabilirliğinin fazla olduğunu söyleyebiliriz.

6. P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/K-kar , hidrojelleri için % şişme oranları sırasıyla; 31, 64, 42, 66, olarak bulundu.

7. P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj ve P(AAm-CA)/K-kar 30 ^{0}C da inaktivasyon sabitleri sırasıyla 0,0085 dak^{-1}, 0,0083 dak^{-1}, 0,0041 dak^{-1}, 0,0013 dak^{-1} 50 ^{0}C da ise 0,0201 dak^{-1}, 0,0233 dak^{-1}, 0,0189 dak^{-1}, 0,0036 dak^{-1} olarak bulundu. İmmobilize lakkazların 50 ^{0}C' daki k_i değerlerinin 30 ^{0}C' daki k_i değerlerinden daha yüksek, yaklaşık 2 – 5 kat kadar büyük olduğu bulundu.

8. Serbest ve immobilize lakkaz ile metil oranjın renginin giderilmesi incelendiğinde mediyatör kullanmadan yapılan deneylerde, serbest lakkaz, P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkaz için renk giderme yüzdeleri sırasıyla %63, %38, %45 olarak bulundu. Mediyatör kullanılarak yapılan deneylerde ise serbest lakkaz için renk giderme yüzdesi % 73 P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkaz için renk giderme yüzdeleri %72 olarak bulundu.

Bu sonuçlara göre P(AAm-CrA)/Alj, P(AAm-CrA)/K-kar, P(AAm-CA)/Alj ve P(AAm-CA)/K-kar hidrojellerinde immobilize edilen lakkaz 4^{0}C' da depolamada ve geniş bir sıcaklık aralığında serbest enzime göre oldukça yüksek aktiflik göstermektedir. İmmobilize lakkazın tekrar kullanılabilirliği sonuçlarından, immobilize lakkazın besin, 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. Qui, Y., Park, K.,"Environment-sensitive hydrogels for drug delivery", ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 53: 321-339 (2001).

2. İnternet : TUBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi "Yeni ufuklara Biomalzemeler",7-8 http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/biyomalzemeler.pdf (2002).

3. Park, K., Shalably, S.W.W., Park, H., "Biodegradable hydrogels for drug delivery", ***Technomic Publishing Company***, 1-12, 35-66 (1993)

4. Duran, S., Şolpan, D., Güven, O., "Synthesis and characterization of acrylamide-acrylic acid hydrogels and adsorption of some textile dyes" , A Thesis of Master of Science, ***The Institute For Graduated Studies In Pure And Applied Sciences of Hacettepe University***, Ankara, 25-30 (2000).

5. Şen, M., "Çapraz bağlı poli(vinil pirolidon) hidrojellerinin hazırlanması ve enzimatik tutuklanmasında kullanılması", Yüksek Lisans Tezi, ***Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 8-28 (1988).

6. Swami, S.N., "Radiation synthesis of polymeric hydrogels for swelling controlled drug released studies", ***Doctor of Philosophy, University of Western Sydney***, New South Wales, Australia 120-149 (2004).

7. Hoffman, A.S., "Hydrogels for biomedical applications", ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 54: 3-12 (2002).

8. Uysal, İ., "Poli(vinil eter) bazlı ampifilik hidrojellerin sentezi ve kontrollü ilaç salım uygulamaları" Yüksek Mühendislik Tezi, ***Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 5-7 (2001).

9. Am Ende, M.T., Hariharan, D., .A., "Factors influencing drug and protein transport and released from ionic hydrogels", ***Reactive Polymer***, 25: 127-137 (1995).

10. Onat T., Emerk K., Sözmen, E.Y., "İnsan Biyokimyası", ***Palme Yayıncılık***, Ankara, 197-202 (2002).

11. İnternet: Anadolu Üniversitesi Açık öğretim Fakültesi GÖZÜKARA, Engin M., http://www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM/1214/unite09.pdf (1990).

12. Tekman, Ş., Öner, N., “Genel Biyokimya”, ***İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi***, İstanbul, 47-49 (1994).

13. Tüzün, C., “Biyokimya”, ***Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi***, Ankara, 131-133 (1997).

14. Telefoncu, A., ”İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri”, ***Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu,*** İzmir, 1-16, 193-249 (1986).

15. İnce, E., “Ksilanaz üreten ekstrem termofil anaerobik bakterilerin izolasyonları ve enzimlerinin özelliklerinin belirlenmesi”, Yüksek lisans Tezi, ***Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı***, Ankara 1-5 (2006).

16. Aksoy, C., Yanardağ, R., “Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu” Yüksek Lisans Tezi, ***İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, İstanbul, 1-2, 26-28 (2003).

17. Öztan, Ö., “Tirosinaz enziminin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve fenollerin gideriminde kullanımı” Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği***, Ankara, 6-8 (2007).

18. Telefoncu, A., “Enzimoloji”, ***Ege Üniversitesi Fen Fakültesi***, İzmir, 1-305 (1997).

19. Chıbata, I., Immobilized Enzymes, Research and Development, ***The Quarterly Review of Biology***, 54: 321-321 (1979).

20. Howard, H., Weetall., “Storage stability of water-insoluble enzymes covalently coupled to organic and inorganic carries”, ***Biochemical Biophysics Acta***, 212:1-7 (1970).

21. Tahran, L. and Uslan, A., “Characterization and operational stability of immobilised catalase”, ***Process Biochemistry***,14:345-373 (1990).

22. Dumitriu, S., Popa, M. and Dumitriu, M., “Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers”, ***Journal of Bioactive and Compatible Polymers***, 3: 243-312 (1988).

23. Carr, P. W. and Bowers, L. D., “Support considerations in chemical analysis”, Enzymes, ***Academic Press***, New York, 56: 167-170 (1980).

24. Chen, S., Liu, Y. and Yu, P., “Study on column reactor of chitosan immobilized”**,** ***Chemical Abstracts***, 127 (4): 127-129 (1996).

25. 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).

26. Cabral, J. M. S., Kennedy, J. F. and Kalogerakis, B. “Covalent and coordination immobilization of proteins”, ***Bioprocess Technology***, 14:73-138. (1991).

27. Kennedy, J. F. and Cabral, J. M. S., “Immobilized enzymes cells”, Immobilization of enzyme, (Woodward, 2nd ed.), ***Oxford University Press***, U.K., 19-37 (1985).

28. Kaetsu, I., Kamura, M. and Yoshida, M., “Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low temperature”, ***Biotechnology and Bioengineering***, 21: 847-849 (1979).

29. Rempp, P., Merril, E.W., “Polymers”, Polymer Synthesis 2nd ed., ***Hutting&Wepf***, USA, 331-320 (1991).

30. Yamak,Ö. “Poli(akrilamit)-sodyum aljinat, poli(akrilamit- N-İzopropilakrilamit)-sodyum aljinat, Poli(akrilamit - N-izopropilakrilamit) hidrojellerine lakkaz immobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi*** **Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı**, Ankara 33-34 (2007).

31. Çelebi, S., Çaglar, A., “Niçin İmmobilize Enzimler”, ***Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu***, İzmir, 145-216 (1986).

32. Shan, Y., Shan, D., “Immobilized enzymes;industirial biocatalysts”,***The Industrial Journal of Hospital Pharmacy***, 29 (2) :51-58 (1992).

33. Trevon, M.D., “Tecniques Of İmmobilization İmmobilized Enzyme”, ***John Wiley and Sons***, New York, 1-11 (1985).

34. Mosbach, K., “Methods in Enzmology” ***Academic Press***, New York, 4 (1976).

35. Wiseman, A., “Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd ed.”, ***John Wiley&Sons Chicester***, England, 12 (1986).

36. Chase, H., A. and Yang, Y., “Immobilization of α-amilase on poly(vinylalchol)-coated perluoro polymer supports for use in enzyme reactors”, ***Biotechnology and Biochemistry***, 28:145-154 (1998).

37. Saburo, F. and Atsuo, T., “Application of biocatalyst immobilized by polymer methods”, Enzyme Engineering, ***Plenum Press***, New York, 201-203 (1985).

38. Kaetsu, I., Kamura, M. and Yoshida, M., “Enzyme immobilization by radiation ınduced polymerization of HEMA at low temperature”, ***Biotechnology and Bioengineering***, 21: 847-849 (1979).

39. Glick, D., “Methods of Biochemical Analysis”, Enzyme Immobilization, ***Academic Press***, New York, 25: 135-201 (1979).

40. Srere, P. A. and Uyeda, K., “Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices”, Methods in Enzymology, (Edited by Mosbach, K.), ***Academic Pres Inc***, New York, 44: 11-19 (1976).

41. Gürsel, A., Alkan, S., Toppare, L. and Yağcı, Y., “Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers”, ***Reactive and Functional Polymers***, 57: 57-65 (2003).

42. 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).

43. Zaborsky, O., “Adsorption immobilized enzyme”, Ed. by Weast, R. C., ***CRC Press***, Ohio, 75-78 (1973).

44. Arıca, Y. M. and Hasırcı, V. N., “Immobilization for the production of membranes”, ***Biomaterials***, 8: 489-495 (1987).

45. Michael, D. T., “Immobilized enzyme” Methods in Enzymology, ***John Wiley and Sons***, New York, 80-85 (1980).

46. 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).

47. Cinderalla, M., Canteralla, L. and Alfani, F., “Entrapping of acid phosphatase in HEMA: Preparation and kinetic properties”, ***British Polymer Journal***, 20: 477-485 (1988).

48. D’Souza, S. F. and Godbole, S. S., “Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine”, ***Journal Of Biochemıcal And Biophysical Methods***, 52: 59-62 (2002).

49. Kahn, K., " Theoretical study of intermediates in the urate oxidase reaction" , ***Bioorganic Chemistry***, 27: 351-362 (1999).

50. 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).

51. 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).

52. Birhanlı, E., "Mikroorganizmaların lakkaz üretimine çeşitli faktörlerin etkisi", Yüksek Lisans Tezi, ***İnönü Üniversitesi***, Malatya, 37-44 (2003).

53. Shleev,S., Persson,P. Shumakovich,G. Mazhugob,Y. Yaropolov,A. Ruzgas,T. Gorton,L. "Laccase-based biosensors for monitoring lignin", ***Enzyme and Microbial*** **Technology**, 39 : 835–840 (2006).

54. Baybalı, M., "Resorsinol'ün enzimatik polimerizasyon kinetiğinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, ***Hacettepe Üniversitesi,*** Ankara, 37-44 (2003).

55. 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).

56. Quan, D. and Shin, W., "Modification of electrode surface for covalent immobilization of laccase", ***Material Science and Engineering***, 24: 113-115 (2004).

57. 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).

58. 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).

59. Gürdal, İ.H., "Endüstriyel atık ve sentetik kültür ortamlarında üretilen beyaz çürükçül fungusların lakkaz aktivitesinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, ***İnönü Üniversitesi Fen Bilmleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı***, Malatya, 2-4 (2000).

60. Sağ, Y., "Atık sulardaki ağır metal iyonlarının giderilmesi ve geri kazanılması için en ygun biyosorpent türünün seçilmesi", Doktora Tezi, ***H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, (1993).

61. 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).

62. Chen, H., Tendeyong, F., Yiacoumi, S., "Equilibrium and studies of copper ion uptake by calcium alginate". ***Environmental Science Technology***, 31: 1433-1439 (1997).

63. Nickerson, M.T. and Paulson, A.T. "Rhelogical properties of gellan, κ-carrageenan and alginate polysaccharides: effect of potasium and calcium ions on macrostructure assemblages" ***Carbonhydrate Polymers***, 58: 15-24 (2004).

64. Nickerson, M.T., Paulson, A.T. and Hallent, F.R. "Dilute solution properties of κ-carrageenan polysaccharides: effect of potasium and calcium ions on chain comformation" ***Carbonhydrate Polymers***, 58: 25-33 (2004).

65. Şolpan, D. and Torun, M., "Synthesis and characterization of sodium alginate/acrylamide semi-interpenetrating polymer networks", ***Journal of Applied Polymer Science***, 100: 335-342 (2006).

66. Kusuktham, B., "Preparation of interpenetrating polymer network gel beads for dye absorption", ***Journal of Applied Polymer Science***, 102: 1585-1591 (2006).

67. Ma, J., Xu, Y., Zhang, Q., Zha, L. and Liang, B., "Preparation and characterization of pH- and temperature-responsive semi-IPN hydrogels of carboxymethyl chitosan with poly (*N*-isopropyl acrylamide) crosslinked by clay", ***Colloid & Polymer Science***, 285: 479-484 (2007).

68. Arda, M. "Boyalar ve Boyama Metotları" Temel Mikrobiyoloji, ***Medisan Yayın Serisi***, 44 - 48, Ankara (2000).

69. 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).

70. 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).

71. Neta, P., Huie, R.E., Maruthamuthu, P., Steenken, S., “Solvent effects in the reactions of peroxyl radicals with organic reductants. Evidence for proton-transfer-mediated electron transfers”, ***Journal of Physical Chemistry***, 93 7654–7659 (1989).

72. Lee,C., 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).

73. Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F. Alcade, M. “Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers”, ***Process Biochemistry****,* 43: 169-178 (2008).

74. Peralta-Zamora, P., Pereira, C.M., Tiburtius, E.R.L., Moraes, G.S., Rosa, A.M., Minussi,R.C., Duran,N.,“ Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase*”,* ***Applied Catalysis B:Environmental****,* 42: 131-144 (2003).

75. Zille, A. “Laccase Reactions for Textile Applications” Doktora Tezi, ***Universidade do Minho Escola de Engenharia***, 33-40, (2005).

76. Zille, A., Gornacka, B., Rehorek, A. and Cavaco-Paulo, A. “Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions” ***Applied and Environmetal Microbiology***, 71 : 6711–6718 (2005).

77. 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).

78. Leonowicz, A., Sarkar, J.M., Bollag J.M. “Improvement in stability of an immobilized fungal laccase”, ***Applied Microbiology Biotechnology***, 29: 129–135 (1988).

79. Rogalski, J., Jozwik, E., Hatakka, A., Leonowicz, A., “Immobilization of laccase from *Phlebia radiata* on controlled porosity glass”, ***Journal of Molecular Catalaysis A: Chemical***, 95: 99–108 (1995).

80. Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Rogalski ,J., Jaszek, H., “Activity of free and immobilized extracellular *Cerrena unicolor* laccase in water miscible organic solvents”, ***Holzforschung***, 52: 589–595 (1998).

81. 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).

82. Jolivalt, C., Brenon, S., Caminade, E., Mougin, 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).

83. 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).

84. 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).

85. 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).

86. Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A., Spettoli, P., "Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor", ***Process Biochemistry*** , 36:51–58 (2000).

87. 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).

88. Al-Adhami, A.J.H., Bryjak, J., Greb-Markiewiez,B., Penczynska-Czoch ,W., "İmmobilization of wood-rotting fungi laccase on modified cellulose and acrylic carriers", ***Process Biochemistry***, 37: 1387-1394 (2002).

89. Yinghui, D., Qiuling, W. and Shiyu,F., "Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier", ***Letters in Applied Microbiology***, 35: 451–456 (2002).

90. Zille, A., Tzanov,T., Gübitz, G.M. and Cavaco-Paulo, A., "Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent", ***Biotechnology Letters****,* 25: 1473-1477 (2003).

91. Dodor, D.E., Hwang, H., Ekunwe, S.I.N, "Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized la ccase from *Trametes versicolor,*" ***Enzyme and Microbial Technology,*** 35: 210-217, (2004).

92. Arauojo, J.H.B, Uemura, V.O., Moraes, F.F., "A comparative study on fungal laccase immobilized on chitosan", ***Brazillian Archives of Biology and Technology,*** 48: 1-6, (2005).

93. Jiang, D., Long, S., Huang, J., Xiao, H., Zhou, J., "Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres", ***Bıochemical Engineering Journal,*** 25: 15–23 (2005).

94. 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).

95. Yang, Y.W., 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).

96. Xiao, H. Huang, J., Lıu, C., Jiang, D., "Immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutaraldehyde crosslinking method", ***Tranactions Nonferrous Metals Society of China***, 16: 414-418 (2006).

97. Zawisza, I., Rogalski ,J., Opallo, M., "Electrocatalytic reduction of dioxygen by redox mediator and laccase immobilized in silicate thin film", ***Journal of Electroanal Chemistry***, 588: 244-252 (2006).

98. Roy,J.J. and Abraham, T.E., "Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase", ***Journal of Molecular Catalalysis B: Enzymatic***, 38: 31-36 (2006).

99. Hu, X., Zhao,X., Hwang, H., "Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite", ***Chemosphere***, 66: 1618–1626 (2006).

100. 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).

101. 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).

102. Silva, C. Silva, C.J. Zille, A., Guebitz, G.M., Cavaco-Pulo,A., "Laccase immobilization on enzimatically functionalized polyamide 6,6 fibres" ***Enzyme and Microbial Technology***, 41: 867-875 (2007).

103. Couto, R.S., Osma, J.F., Saravia, V. Gübitz,G.M., Herrera, T.J.L., "Coating of immobilised laccase for stability enhancement A novel aproach", ***Applied Catalysis A: General***, 329: 156-160 (2007).

104. Bryjak, J., Kruczkiewicz, P., Rekuc, A., Peczynska-Czoch,W. " Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate", ***Biochemical Engineering Journal***, 35: 325-332 (2007).

105. 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).

106. 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).

107. Rekuc, A., Kruczkiewicz, P., Jastrzembska, 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).

108. 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).

109. 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).

110. Rogalski, J., Dawidowicz, A., Józwik, E., Leonowicz, A. "Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass." ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 6:29–39 (1999).

111. Selvia, K., and Nicell, J.A., “Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol”, ***Enzyme and Microbial Technology***, 41: 353-361 (2007).

112. Gomez, J., Pazos, M., Couto,R., Sanroman, M., “Chestnut shell and barley bran as potential substrates for lacasse production by *Corilopsis rigida* under solid-state conditions”, ***Journal of Food Engineering***, 68: 315-319 (2005).

113. Moldes, D., Gallego, P., Couto, R. and 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	: KÖKLÜKAYA, Selva Zeynep
Uyruğu	: T.C.
Doğum tarihi ve yeri	: 27.06.1982 Sakarya
Medeni hali:	: Bekar
Telefon	: 0 (505) 308 28 48
e-mail	: selze2004@hotmail.com

Eğitim

Derece	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet tarihi**
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2008
Lisans	Kırıkkale Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2005

Yabancı Dil

İngilizce