ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Özlem ALPTEKİN

KATALAZIN EUPERGİT, FLORİSİL VE CAM DESTEKLERE KOVALENT OLARAK İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATALAZIN EUPERGİT, FLORİSİL VE CAM DESTEKLERE KOVALENT OLARAK İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

ÖZLEM ALPTEKİN

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez ….. / ….. / 2009 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

İmza ……..……	İmza ……	İmza ……..……
Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL	Prof. Dr. Mustafa CANLI	Prof. Dr. Nuray GÜZELER
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

İmza …….	İmza ……..……
Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU	Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2005D11 (Ç.Ü) ve 104T411 (TÜBİTAK)

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

ÖZ

DOKTORA TEZİ

KATALAZIN EUPERGİT, FLORİSİL VE CAM DESTEKLERE KOVALENT OLARAK İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Özlem ALPTEKİN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Yıl : 2009, Sayfa:219
Jüri : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Prof. Dr. Nuray GÜZELER
: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU
: Yrd.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN

Sığır karaciğer katalazının aktifleştirilmiş florisil, gözeneksiz cam boncuklar (NPG), gözenekleri kontrollü cam boncuklar (CPG) ve Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye kovalent olarak immobilizasyonu araştırılmıştır. Ayrıca katalazın florisile ve CPG'ye immobilizasyonunda 1,4 bütandiol diglisidil eter (1,4 BDDGE), polietilen glikoldiglisidil eter (PEGDGE), 5-aminopentanoik asit (5-APA) ve 6-amino hekzanoik asit (6-AHA) ara kollarının kullanımlarının immobilize katalazın aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Katalazın tüm desteklere immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon koşulları (pH, tampon derişimi, başlangıç katalaz derişimi, sıcaklık ve immobilizasyon süresi) ve immobilize katalaz örneklerinin en yüksek aktivite gösterdikleri koşullar (pH, tampon derişimi ve sıcaklık) belirlenerek kinetik parametreleri (K_m, V_{max}, k_{cat}/K_m, E_a) bulunmuştur. Ayrıca immobilize katalaz örneklerinin taramalı elektron mikroskobunda görüntüleri incelenmiştir. İmmobilize katalaz örneklerinin termal kararlılıkları, depolama kararlılıkları, kesikli ve sürekli reaktörlerde kullanımları araştırılmıştır.

Tüm immobilize katalaz örnekleri arasında en yüksek katalitik etkinlik (k_{cat}/K_m) $1,7x10^6$ $s^{-1}M^{-1}$ olarak gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örnekleri için bulunmuştur. 50ºC'de yarı ömrü ($t_{1/2}$) uzun ilk üç immobilize katalaz sırasıyla florisile doğrudan (6,2 sa.), CPG'ye doğrudan (5,2 sa.) ve Eupergit C'ye (4,8 sa.) immobilize edilen katalaz örnekleridir. CPG'ye ve Eupergit C'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin 5ºC'deki depolama kararlılıklarının diğerlerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örneklerinin başlangıç aktivitelerinin % 50'si kalıncaya kadarki koşullar için sürekli reaktördeki en yüksek aktivite toplamının ($69,7x10^5$ U/g immobilize katalaz) kesikli reaktördeki en yüksek aktivite toplamından ($6,2x10^5$ U/g immobilize katalaz) 11 kat daha fazla olduğu saptanmıştır.

Katalazın immobilizasyonu için kullanılan destekler arasından en uygun desteğin CPG, en uygun immobilizasyon yönteminin CPG'ye doğrudan immobilizasyon olduğu ve CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örneklerinin özellikle sürekli reaktörde kullanılmalarının daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Katalaz, Kovalent immobilizasyon, Eupergit, Florisil, Cam Boncuk

ABSTRACT

PhD THESIS

COVALENT IMMOBILIZATION OF CATALASE ONTO EUPERGIT, FLORISIL AND GLASS CARRIERS AND CHARACTERIZATION OF IMMOBILIZED CATALASES

Özlem ALPTEKİN

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Year : 2009, Pages:219
Jury : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Prof. Dr. Nuray GÜZELER
: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU
: Asist. Prof. Ramazan BİLGİN

Covalent immobilizations of bovine liver catalase onto activated florisil, nonporous glass beads (NPG), controlled pore glass beads (CPG) and Eupergit C and Eupergit C 250L were investigated. The immobilization of catalase onto florisil and CPG via spacer arms, 1,4 buthanediol diglycidyl ether (1,4 BDDGE), polyethylene glycol diglycidyl ether (PEGDGE), 5-aminopentanoic acid (5-APA) and 6-amino hexanoic acid (6-AHA), were also investigated. The optimum immobilization conditions (pH, buffer concentration, initial catalase concentration, temperature and immobilization time) and the conditions in which immobilized catalases showed their maximum activities (pH, buffer concentration, temperature) and the kinetic parameters (K_m, V_{max}, k_{cat}/K_m, E_a) were determined for all immobilized catalase preparations. The images of all immobilized catalase preparations were investigated at scanning electron microscope. The thermal stabilities, storage stabilities and usages in plug flow type and batch type reactors of all immobilized catalase preparations were determined.

Catalase directly immobilized onto CPG with pore diameter of 70 nm showed the highest catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) as 1.7×10^6 $s^{-1}M^{-1}$ among the others. Among all immobilized catalase preparations, the best three preparations which have the longer half lives ($t_{1/2}$) than the others were catalase directly immobilized onto florisil (6.2 h), onto CPG (5.2 h) and immobilized catalase onto Eupergit C (4.8 h) at 50ºC, respectively. Immobilized catalase onto CPG and onto Eupergit C showed higher storage stabilities than the other catalase preparations at 5ºC. The highest total productivity (69.7×10^5 U g immobilized catalase^{-1}) obtained in plug flow reactor was about 11 fold higher than the highest productivity (6.2×10^5 U g immobilized catalase^{-1}) obtained in batch type reactor when the remaining activity of catalase directly immobilized onto CPG was about 50 % of its original activity.

As a result of this study, the most suitable carrier for the catalase immobilization is CPG among all tested carriers; the best preparation is the catalase directly immobilized onto CPG and also the usage of the plug flow type reactor seems to be more suitable for the catalase directly immobilized onto CPG.

KeyWords: Catalase, Covalent immobilization, Eupergit, Florisil, Glass Bead.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, danışmanım sayın hocam Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda bana her zaman destek olan sayın hocalarım, Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e ve Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e, tez izleme komitesinde bulunan sayın hocam Prof. Dr. Mustafa CANLI'ya teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarım sırasında bana her zaman çok destek olan arkadaşlarım Deniz YILDIRIM'a ve Dilek ALAGÖZ'e çok teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım sırasında beni her zaman manevi olarak destekleyen arkadaşlarım Arş. Gör. Özlem ÖZCAN YILDIRIM'a, Arş. Gör. Pınar BASIM'a ve diğer arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen sevgili eşim Yaşar ALPTEKİN'e, annem Zekiye ALPTEKİN'e, babam Ogün ALPTEKİN'e ve kardeşim Cem ALPTEKİN' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca sevgili kızım Zehra'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmama maddi olarak destek sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ..... **I**

ABSTRACT..... **II**

TEŞEKKÜR..... **III**

İÇİNDEKİLER..... **IV**

SİMGE VE KISALTMALAR..... **IX**

ÇİZELGELER DİZİNİ..... **XI**

ŞEKİLLER DİZİNİ..... **XII**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri..... 2

1.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri..... 3

1.1.1.1. Bağlama..... 3

1.1.1.2. Tutuklama Yöntemleri..... 13

1.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon..... 15

1.1.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması..... 16

1.2. Katalaz..... 17

1.2.1. Genel Özellikleri..... 17

1.2.2. Katalazın Reaksiyon Mekanizması..... 19

1.2.3. Katalazın Kullanım Alanları..... 20

1.3. Florisil, Cam Boncuklar ve Eupergit..... 22

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR..... **24**

3. MATERYAL VE METOD..... **40**

3.1. Materyal..... 40

3.1.1. Kimyasallar 40

3.1.2. Araç ve Gereçler..... 40

3.2. Metod..... 41

3.2.1. Florisil ve Cam Desteklerin Hazırlanması..... 41

3.2.2. Florisil ve Cam Desteklerde Silanlama Sonrası ve Glutaraldehit ile Aktifleştirme Sonrasında Kalan Serbest Amino Gruplarının Tayini..... 42

3.2.3. Katalazın Glutaraldehit Üzerinden Florisile ve Cam Desteklere

Kovalent İmmobilizasyonu……..... 44
3.2.4. Katalazın 1,4 BDDGE ve PEGDGE Ara Kolları Üzerinden CPG'ye ve Florisile Kovalent İmmobilizasyonu…..... 45
3.2.5. Katalazın 5-APA ve 6-AHA Ara Kolları Üzerinden Florisile ve CPG'ye İmmobilizasyonu……..... 47
3.2.6. Katalazın Eupergit'e Kovalent immobilizasyonu..... 49
3.2.7. Protein Tayini..... 49
3.2.8. Katalaz Aktivitesinin Ölçülmesi..... 50
3.2.9. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu..... 51
3.2.9.1. İmmobilizasyon pH'sı ve Tampon Derişimi…….. 51
3.2.9.2. İmmobilizasyon Sıcaklığı……... 51
3.2.9.3. İmmobilizasyon Süresi ve Başlangıç Katalaz Derişimi…. 52
3.2.10. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Karakterizasyonu..... 52
3.2.10.1. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Optimum pH'larının Belirlenmesi……... 52
3.2.10.2. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Optimum Tampon Derişiminin Belirlenmesi……... 53
3.2.10.3. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi……... 53
3.2.10.4. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi……. 53
3.2.10.5. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi……. 54
3.2.10.6. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi……. 54
3.2.11. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Sürekli ve Kesikli Reaktörlerde Kullanımları……. 54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 57
4.1. Bulgular..... 57
4.1.1. Katalazın Florisile İmmobilizasyonu…..... 58

4.1.1.1. Katalazın Florisile Doğrudan İmmobilizasyonu……. 58
4.1.1.1.(1). Katalazın Florisil'e Doğrudan İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu……. 58
4.1.1.1.(2). Florisile Doğrudan İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi…….…….. 65
4.1.1.2. Katalazın Florisile 1,4 BDDGE ve PEGDGE Ara Kolları Üzerinden İmmobilizasyonu……... 69
4.1.1.3. Katalazın 5-APA Ara Kolu Üzerinden Florisile İmmobilizasyonu……. 74
4.1.1.3.(1). Katalazın 5-APA Ara Kolu Üzerinden Florisile İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu…….. 74
4.1.1.3.(2). Florisile 5-APA Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi…….. 80
4.1.1.4. Katalazın 6-AHA Ara Kolu Üzerinden Florisile İmmobilizasyonu……. 84
4.1.1.4.(1). Katalazın 6-AHA Ara Kolu Üzerinden Florisile İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu……. 84
4.1.1.4.(2). Florisile 6-AHA Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin

Belirlenmesi……..... 89
4.1.2. Katalazın NPG'ye İmmobilizasyonu…..……. 93
4.1.3. Katalazın CPG'ye İmmobilizasyonu……..…….. 94
4.1.3.1. Katalazın CPG'ye Doğrudan İmmobilizasyonu…….. 94
4.1.3.1.(1). Katalazın CPG'ye Doğrudan İmmobilizayonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu……. 94
4.1.3.1.(2). CPG'ye Doğrudan İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi……... 102
4.1.3.2. Katalazın CPG'ye 1,4 BDDGE ve PEGDGE Ara Kolları Üzerinden İmmobilizasyonu……... 106
4.1.3.3. Katalazın 5-APA Ara Kolu Üzerinden CPG'ye İmmobilizasyonu…….……..... 110
4.1.3.3.(1). Katalazın 5-APA Ara Kolu Üzerinden CPG'ye İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu…….……. 110
4.1.3.3.(2). CPG'ye 5-APA Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi……..…... 116
4.1.3.4. Katalazın 6-AHA Ara Kolları Üzerinden CPG'ye İmmobilizasyonu……. 120
4.1.3.4.(1). Katalazın 6-AHA Ara Kolları Üzerinden CPG'ye İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu……...……...…… 120
4.1.3.4.(2). CPG'ye 6-AHA Ara Kolu Üzerinden

İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi……..…. 126
4.1.4. Katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye İmmobilizasyonu. 130
4.1.4.1. Katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu…….…… 130
4.1.4.2. Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi..… 138
4.1.5. Desteklerin ve İmmobilize Katalaz Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) İncelenmesi……..…… 145
4.1.6. İmmobilize Katalaz Örnekleri İçin Maliyet Hesabı……...…….. 162
4.1.7. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Reaktörlerde Kullanımı…….. 163
4.1.7.1. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Sürekli Reaktörlerde Kullanımı……. 163
4.1.7.2. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Kesikli Reaktörlerde Kullanımı…….. 178
4.2. Tartışma…….. 186
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER……...….. 201
5.1. Sonuçlar…….. 201
5.2. Öneriler……..….. 203
KAYNAKLAR……. 205
ÖZGEÇMİŞ……. 219

SİMGE VE KISALTMALAR

1,4 BDDGE	:	1,4 Bütandioldiglisidil eter
3-APTES	:	3-aminopropil trietoksi silan
5-APA	:	5- amino pentanoik asit
6-AHA	:	6-amino hekzanoik asit
AH	:	Sürekli reaktörde substratın akış hızı
Bent	:	Bentonit
CDI	:	1-siklohekzil-3-(2-morfolinoetil)karbodiimid metho-p-toluen sülfonat
Ch	:	Kitosan
CLE	:	Çapraz bağlı çözünmüş enzim
CLEA	:	Çapraz bağlı enzim agregatları
CLEC	:	Çapraz bağlı enzim kristali
CNT	:	Karbon nanotüp
CoPP	:	Porfirin
CPG	:	Gözenekleri kontrollü cam
CSDE	:	Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim
DAP	:	Dialilftalat
EDC	:	N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid hidroklorür
GA	:	Glutaraldehit
ICP	:	İndüktif eşleşmiş plazma
İKM	:	Sürekli ve kesikli reaktörlerde kullanılan immobilize katalaz miktarı
İmm.	:	İmmobilizasyon
k_{cat}	:	Turnover sayısı
k_{cat} / K_m	:	Katalitik etkinlik
ki	:	İnaktivasyon hız sabiti
K_m	:	Michealis Menten hız sabiti
MWCNT	:	Çok katmanlı karbon nanotüp
NHS	:	N-hidroksisüksinimid
NPG	:	Gözeneksiz cam

PA	:	Poliamid
PAN	:	Poliakrilonitril
PANCA	:	Poli(akrilonitril-ko-akrilik asit)
PEGDGE	:	Polietilenglikol diglisidil eter
PET	:	Polietilenteraftalat
pHEMA	:	Poli(2-hidroksietilmetakrilat)
Prot.	:	Protein
SEM	:	Taramalı elektron mikroskobu
$t_{1/2}$	:	İmmobilize katalazın yarı ömrü
TEOS	:	Tetraetoksisilan
TG	:	Termogravimetri
V_{max}	:	Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği maksimum hız

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması…… 17

Çizelge 4.1. Arakollarla ve glutaraldehit ile aktifleştirilmiş florisildeki -NH_2 grubu miktarları..... 73

Çizelge 4.2. 3-APTES ile etkileştirilen NPG'deki –NH_2 miktarının silanlama süresine bağlı değişimi..... 94

Çizelge 4.3. Farklı gözenek çapına sahip aktifleştirilmiş CPG'lere immobilize edilmiş katalaz örneklerinin aktiviteleri..... 96

Çizelge 4.4. Florisil, CPG ve Eupergit desteklere immobilize edilen katalazın en uygun immobilizasyon koşulları, maksimum aktivite gösterdiği koşullar ve kinetik parametreleri…..……. 144

Çizelge 4.5. İmmobilizasyonda kullanılan enzim, destek ve reaktiflerin birim fiyatı……. 163

Çizelge 4.6. Bir gram immobilize katalaz örnekleri için maliyet ve birim maliyet başına immobilize katalaz örneklerinden elde edilen aktivite değerleri…… 163

Çizelge 4.7. Sürekli reaktörde farklı desteklere immobilize edilen katalaz örneklerinin başlangıçtaki aktivitelerinin ve yarı ömürlerinin akış hızına ve immobilize katalaz miktarına bağlı değişimi……. 177

Çizelge 4.8. CPG'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin sürekli reaktördeki aktivite toplamları……. 178

Çizelge 4.9. Kesikli reaktörde kullanılan immobilize katalazların miktarlarına bağlı olarak immobilize edilen katalaz örneklerinin başlangıçtaki aktiviteleri ve aktivitelerinin %50'sinin kaldığı tekrar kullanım sayılarının değişimi……..... 185

Çizelge 4.10. CPG'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin kesikli reaktördeki aktivite toplamları ……..……...…….…….. 185

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması……. 3

Şekil 1.2. Taşıyıcı olmadan yapılan enzim immobilizasyon yöntemleri…… 4

Şekil 1.3. İyonik bağlama, biyospesifik bağlama, adsorpsiyon ve şelat bağlama ile ilgili şematik gösterim……. 6

Şekil 1.4. Enzimin desteğe kovalent immobilizasyonu……..... 7

Şekil 1.5. Reaktif amino asit artıkları…….. 7

Şekil 1.6. Gözenekli desteğin iç yüzeyi ve dış yüzeyi…… 9

Şekil 1.7. İmmobilize enzim tarafından kullanılan etkin yüzey alanı ile gözenek büyüklüğü arasındaki ilişki……... 9

Şekil 1.8. İmmobilize glukoamilaz aktivitesinin ve desteğin yüzey alanının gözenek büyüklüğüne bağlı değişimi……..... 10

Şekil 1.9. Desteğin tanecik boyutu ve difüzyon yolunun uzunluğunun azalmasına bağlı olarak enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler…… 11

Şekil 1.10. CPG için tanecik boyutundaki dağılımın akış hızına ve basınç düşüşüne etkisini gösteren deneysel sonuçlar……. 11

Şekil 1.11. Enzimin desteğe doğrudan (a), doğrusal ara kol (b), dallanmış ara kol (c) ve yüklü ara kol (d) üzerinden immobilizasyonu…… 13

Şekil 1.12. Polimer matrikste enzim immobilizasyonu…… 14

Şekil 1.13. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu…… 14

Şekil 1.14. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu……..... 15

Şekil 1.15. Katalazın prostetik grubu olan *hem b* ve *hem d*'nin yapısı……. 19

Şekil 1.16. Katalazın etki mekanizması…… 20

Şekil 2.1. PANCA/MWCNTs boyunca hidrojenperoksitten immobilize katalaza elektron taşınmasının şematik gösterimi……... 33

Şekil 3.1. Florisil ve cam desteklerin 3-APTES ile silanlanması ve glutaraldehit muamelesi sırasında meydana gelen reaksiyonlar…. 42

Şekil 3.2. Ninhidrinin $-NH_2$ grubu ile verdiği reaksiyon…… 43

Şekil 3.3. Silanlanmış ve glutaraldehit ile muamele edilmiş florisile ve cam desteklere katalazın immobilizasyonunda, destekler ile enzim arasında meydana gelen reaksiyon…….…… 44

Şekil 3.4. Silanlanmış florisil ve CPG'ye 1,4 BDDGE ara kolunun bağlanması ve bu desteklere katalazın immobilizasyonu sırasında meydana gelen reaksiyonlar…… 46

Şekil 3.5. Silanlanmış florisil ve CPG'ye PEGDGE ara kolunun bağlanması ve bu desteklere katalazın immobilizasyonu sırasında meydana gelen reaksiyonlar…… 46

Şekil 3.6. Silanlanmış ve glutaraldehit ile muamele edilmiş florisile ve CPG'ye 5-APA ve 6-AHA ara kollarının bağlanması ve katalazın bu desteklere immobilizasyonu sırasında meydana gelen reaksiyonlar……. 48

Şekil 3.7. Katalazın Eupergit C veya Eupergit C 250L üzerine kovalent immobilizasyonu……. 49

Şekil 3.8. Sürekli reaktörün şematik gösterimi…..……..... 55

Şekil 4.1. Standart 3-APTES grafiği..... 58

Şekil 4.2. Standart glutaraldehit grafiği..... 59

Şekil 4.3. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler..... 60

Şekil 4.4. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler……..... 61

Şekil 4.5. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…… 62

Şekil 4.6. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler……... 63

Şekil 4.7. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve desteğe bağlanma miktarındaki değişimler…….. 64

Şekil 4.8. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile doğrudan immobilize edilen katalaz örnekleri için ölçülen spesifik aktivite ve aktivite değerleri……. 64

Şekil 4.9. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi……... 66

Şekil 4.10. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi……... 66

Şekil 4.11. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi……... 67

Şekil 4.12. Florisile doğrudan immobilize edilen katalaz için Lineweaver-Burk grafiği……..... 67

Şekil 4.13. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi…… 68

Şekil 4.14. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi……... 69

Şekil 4.15. 1,4 BDDGE miktarına bağlı olarak destekte kalan $-NH_2$ miktarındaki ve katalaz miktarındaki değişimler……... 70

Şekil 4.16. 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolu ile aktifleştirilmiş desteğe farklı pH'larda immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler..... 71

Şekil 4.17. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler……..... 75

Şekil 4.18. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler..... 75

Şekil 4.19. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak florsile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve

aktivitesindeki değişimler……..... 77
Şekil 4.20. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…….. 78
Şekil 4.21. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve miktarındaki değişimler……..... 79
Şekil 4.22. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz için ölçülen spesifik aktivite ve aktivite değerleri……. 79
Şekil 4.23. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi……..... 79
Şekil 4.24. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi…… 81
Şekil 4.25. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi……..... 81
Şekil 4.26. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz için Lineweaver-Burk grafiği……..... 82
Şekil 4.27. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi…… 83
Şekil 4.28. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi…….. 83
Şekil 4.29. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler……... 84
Şekil 4.30. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…… 85
Şekil 4.31. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler……..……..... 86

Şekil 4.32. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…….. 87

Şekil 4.33. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve miktarındaki değişimler…….. 88

Şekil 4.34. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın spesifik aktivitesindeki ve aktivitesindeki değişimler…….. 88

Şekil 4.35. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi…….. 89

Şekil 4.36. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi…….. 90

Şekil 4.37. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi……..... 90

Şekil 4.38. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz için Lineweaver-Burk grafiği……..... 91

Şekil 4.39. Florisile 6-AHA üzerinden immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi…… 92

Şekil 4.40. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi……. 93

Şekil 4.41. Silanlanmış CPG'lerde gözenek çapına göre $–NH_2$ grubunun sayısındaki ve glutaraldehit muamelesinden sonra destekte kalan $–NH_2$ grubunun sayısındaki değişimler……..... 95

Şekil 4.42. Farklı gözenek çapına sahip aktifleştirilmiş CPG'lere immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişim…….. 96

Şekil 4.43. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…….. 97

Şekil 4.44. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve

aktivitesindeki değişimler……... 98
Şekil 4.45. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler……... 99
Şekil 4.46. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler……... 100
Şekil 4.47. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve miktarındaki değişimler. …… 101
Şekil 4.48. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın spesifik aktivite ve aktivite değerleri……. 101
Şekil 4.49. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi……... 102
Şekil 4.50. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi……... 103
Şekil 4.51. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi……... 104
Şekil 4.52. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz için Lineweaver-Burk grafiği……..... 104
Şekil 4.53. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı aktivite değişimi……... 105
Şekil 4.54. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi…… 105
Şekil 4.55. 1,4 BDDGE ve PEGDGE miktarına bağlı olarak destekte bulunan serbest $-NH_2$ miktarındaki değişimler……. 106
Şekil 4.56. Farklı miktarda 1,4 BDDGE ile aktifleştirilen CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler……... 107

Şekil 4.57. Farklı miktarda PEGDGE ile aktifleştirilen CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…… 107

Şekil 4.58. 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları ile aktifleştirilmiş CPG'ye farklı pH'larda immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişim……. 108

Şekil 4.59. 1,4 BDDGE ara kolu ile aktifleştirilmiş CPG'ye farklı pH'larda immobilize edilen katalaz örneklerinin spesifik aktiviteleri ve bu örneklerin spesifik aktivitelerinin CPG'ye aynı pH'larda doğrudan immobilize edilen katalazın spesifik aktivitelerine oranları…… 109

Şekil 4.60. PEGDGE ara kolu ile aktifleştirilmiş CPG'ye farklı pH'larda immobilize edilen katalaz örneklerinin spesifik aktiviteleri ve bu örneklerin spesifik aktivitelerinin CPG'ye aynı pH'larda doğrudan immobilize edilen katalazın spesifik aktivitelerine oranları…… 109

Şekil 4.61. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…… 111

Şekil 4.62. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…… 112

Şekil 4.63. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…….. 113

Şekil 4.64. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…….. 114

Şekil 4.65. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve

miktarındaki değişimler……..... 115
Şekil 4.66. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz için ölçülen aktivite ve spesifik aktivite değerleri…… 115
Şekil 4.67. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi…….. 117
Şekil 4.68. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinen immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi…….. 117
Şekil 4.69. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi……..... 118
Şekil 4.70. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın için Lineweaver-Burk grafiği……..…….... 119
Şekil 4.71. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi……..... 119
Şekil 4.72. CPG'ye 5-APA arakolu üzerinden immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi……..…… 120
Şekil 4.73. Farklı pH'larda CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…… 121
Şekil 4.74. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler…… 122
Şekil 4.75. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler……..…….... 123
Şekil 4.76. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler……..……..… 124
Şekil 4.77. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve miktarındaki değişimler…….……. 125

Şekil 4.78. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde 6-AHA ara kolu üzerinden CPG'ye immobilize edilen katalaz için ölçülen aktivite ve spesifik aktivite değerleri……..…… 125
Şekil 4.79. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi……..…… 126
Şekil 4.80. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinen immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi……..…… 127
Şekil 4.81. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi……...……... 128
Şekil 4.82. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz için Lineweaver-Burk grafiği……...……... 128
Şekil 4.83. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi……..…….. 129
Şekil 4.84. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi……..…… 130
Şekil 4.85. Farklı pH'larda Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler……...…… 131
Şekil 4.86. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitelerindeki değişimler……..……. 131
Şekil 4.87. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler……..……... 132
Şekil 4.88. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitelerindeki değişimler……. 133
Şekil 4.89. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler…… 134
Şekil 4.90. Farklı sıcaklıklarda Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitelerindeki değişimler……... 135

Şekil 4.91. Farklı immobilizasyon sürelerinde Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın immobilizasyon süresine bağlı olarak bağlanma yüzdesindeki değişimler……..….. 135
Şekil 4.92. Farklı immobilizasyon sürelerinde Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitelerindeki değişimler. 136
Şekil 4.93. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdelerindeki ve miktarlarındaki değişimler…….. 137
Şekil 4.94. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın aktivite ve spesifik aktivite değerleri..... 137
Şekil 4.95. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivite ve spesifik aktivite değerleri 138
Şekil 4.96. Eupergit C ve Eupergit C 250 L'ye immobilize edilen katalazların aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi…….. 139
Şekil 4.97. Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi…….. 139
Şekil 4.98. Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi…….. 140
Şekil 4.99. Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazlar için Lineweaver-Burk grafiği…….. 141
Şekil 4.100. Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi…….. 142
Şekil 4.101. Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi. ……..... 142
Şekil 4.102. Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi…….……. 143
Şekil 4.103. Florisilin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 200x)……..…… 145
Şekil 4.104. Florisilin SEM fotğrafı (büyütme oranı 30000x)……..….. 146
Şekil 4.105. Katalazın florisile doğrudan immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)…….. 147
Şekil 4.106. Katalazın florisile 1,4 BDDGE ara kolu üzerinden immobilize

edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x) .....…..... 147
Şekil 4.107. Katalazın florisile PEGDGE ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)…….. 148
Şekil 4.108. Katalazın florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)……... 148
Şekil 4.109. Katalazın florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)……... 149
Şekil 4.110. Gözeneksiz cam boncukların SEM fotoğrafı (Büyütme oranı 200x)…….. 150
Şekil 4.111. Gözeneksiz cam boncukların SEM fotoğrafı (Büyütme oranı 30000x)……... 150
Şekil 4.112. Gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 200x)…….. 151
Şekil 4.113. Gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 300000x)…… 152
Şekil 4.114. Gözenek büyüklüğü 100 nm olan CPG'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)…….. 153
Şekil 4.115. Gözenek büyüklüğü 215 nm olan CPG'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)…….. 153
Şekil 4.116. Katalazın CPG'ye (gözenek büyüklüğü 70 nm) doğrudan immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x) ..…… 154
Şekil 4.117. Katalazın CPG'ye (gözenek büyüklüğü 100 nm) doğrudan immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)……... 155
Şekil 4.118. Katalazın CPG'ye (gözenek büyüklüğü 215 nm) doğrudan immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)……... 155
Şekil 4.119. Katalazın CPG'ye 1,4 BDDGE ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)…….. 156
Şekil 4.120. Katalazın CPG'ye PEGDGE ara kolu üzerinden immobilize

edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)…….. 157
Şekil 4.121. Katalazın CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)……... 157
Şekil 4.122. Katalazın CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)…….. 158
Şekil 4.123. Eupergit C'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 200x)……. 159
Şekil 4.124. Eupergit C'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)……. 159
Şekil 4.125. Katalazın Eupergit C'ye immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)…….. 160
Şekil 4.126. Eupergit C 250 L'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 200x)…..… 161
Şekil 4.127. Eupergit C 250 L'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)….. 161
Şekil 4.128. Katalazın Eupergit C 250 L'ye immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)…….. 162
Şekil 4.129. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim……... 164
Şekil 4.130. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim……... 165
Şekil 4.131. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim……..……. 166
Şekil 4.132. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 166
Şekil 4.133. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 167
Şekil 4.134. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 168

Şekil 4.135. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim…….. 168
Şekil 4.136. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim…….. 169
Şekil 4.137. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 170
Şekil 4.138. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 171
Şekil 4.139. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 172
Şekil 4.140. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 172
Şekil 4.141. Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim…….. 173
Şekil 4.142. Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim…….. 174
Şekil 4.143. Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim……. 175
Şekil 4.144. Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim……. 176
Şekil 4.145. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde

tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 179
Şekil 4.146. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 180
Şekil 4.147 Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 180
Şekil 4.148. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 181
Şekil 4.149. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 182
Şekil 4.150. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim……..……. 182
Şekil 4.151. Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim…… 183
Şekil 4.152. Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim… 184
Şekil 4.153. Jelatin ve glutaraldehit arasındaki reaksiyon…….. 189
Şekil 4.154. Eupergit destek ile protein arasındaki bağlanma mekanizması….. 192

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların ılımlı koşullarda (pH 7,0, vücut sıcaklığı) gerçekleşmesini sağlayan çoğu protein yapısında olan biyokatalizörlerdir. Yeterli koşulların sağlanması koşuluyla etkilerini doğal ortamlarının dışında da gösterebiliyor olmaları, enzimlerden pek çok alanda yararlanabilme imkânı vermektedir. Enzimler endüstriyel amaçlı, analitiksel amaçlı, tıpta teşhis, tedavi ve ilaç tasarım amaçlı geniş uygulama alanı bulmaktadırlar (Wiseman, 1986). Her bir alanda kullanılan enzimlerin fiyatları beklenen özelliklerine göre birkaç dolardan birkaç bin dolara kadar değişebilmektedir. 2007 yılında endüstriyel amaçlı kullanılan enzimlerin mali değeri yaklaşık 2,3 milyar $ iken 2012 yılında bu değerin 2,7 milyar $'a yükseleceği tahmin edilmektedir (BIO030E, 2008). Enzim üretiminde hammadde sorunu mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir.

Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması çok zordur. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için reaksiyon ortamına inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar.

Enzim saflaştırma işlemlerinin zahmetli ve pahalı olmasının yanı sıra endüstriyel uygulamalarda karşılaşılan bir takım zorlukların üstesinden gelmek için çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasıyla, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda

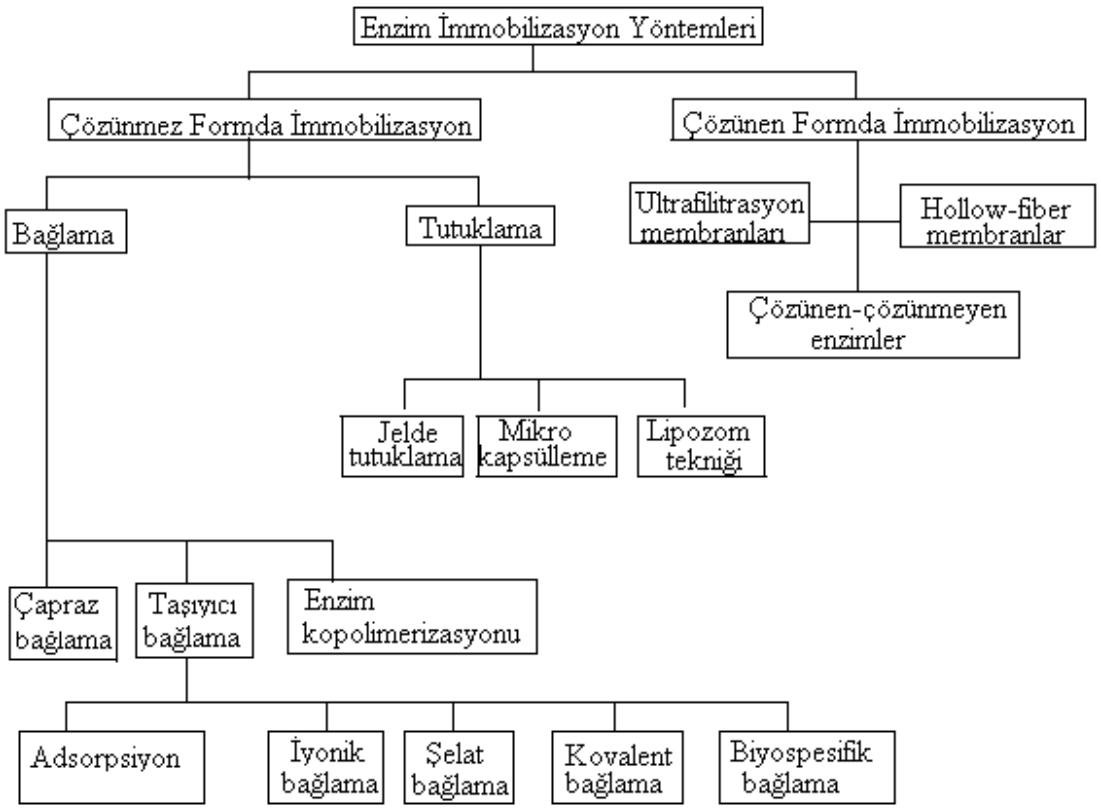
çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanmasıyla immobilize edilirler (Klibanov, 1983).

İmmobilize enzimin serbest enzime göre bazı üstünlükleri aşağıda verilmiştir.

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme ve santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı daha dayanaklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.

1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon yöntemleri çeşitli şekillerde sınıflandırılmakla beraber Şekil 1.1'de verildiği gibi sınıflandırmak mümkündür.



Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Telefoncu, 1997).

Buna göre immobilizasyon yöntemleri; çözünmez formda immobilizasyon ve çözünür formda immobilizasyon olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

1.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri, bağlama ve tutuklama olmak üzere ikiye ayrılır.

1.1.1.1. Bağlama

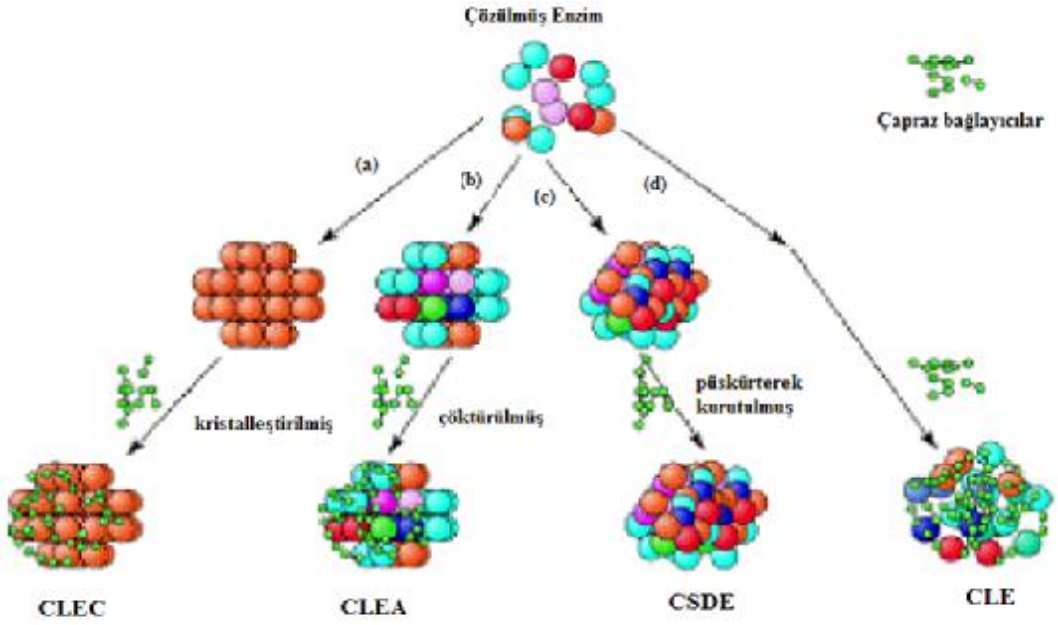
Bağlama yöntemi; çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu, taşıyıcıya bağlama olmak üzere üç gruba ayrılır.

Çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminde küçük moleküllü bi- veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda

çözünmeyen kompleksler oluşturmaktadır (Govardhan, 1999; Schoevaart ve ark., 2004; Sheldon ve ark., 2005; Shah ve ark., 2006). Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH'ya ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, kloroformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar ve epiklorohidrinlerdir. Genellikle pahalı olmadığı ve ticari olarak kolay bulunduğu için glutaraldehit çapraz bağlama reaktifi olarak kullanılmaktadır.

Çapraz bağlı immobilize enzimler,

- CLE; çapraz bağlı çözünmüş enzim (cross-linked dissolved enzyme),
- CLEC; çapraz bağlı enzim kristali (cross-linked enzyme crystal),
- CSDE; çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim (cross-linked spray-dried enzyme),
- CLEA; çapraz bağlı enzim agregatları (cross-linked aggregate enzyme) olmak üzere dört farklı şekilde hazırlanabilmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Taşıyıcı olmadan yapılan enzim immobilizasyon yöntemleri. (a) kristallendirme, (b) çöktürme, (c) püskürterek kurutma, (d) doğrudan çapraz bağlama (Twyman, 2005)

Enzim kopolimerizasyonunda enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmış olur. Bu yöntem polimer matrikse tutuklamaya benzemekle birlikte enzim kaçışını önlemesi gibi üstünlüğü de vardır.

Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanılır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler şunlardır:

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Mekanik kararlılık,
- Uygun tanecik şekli,
- Kimyasal ve termal kararlılık,
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik,
- Rejenere olabilme.

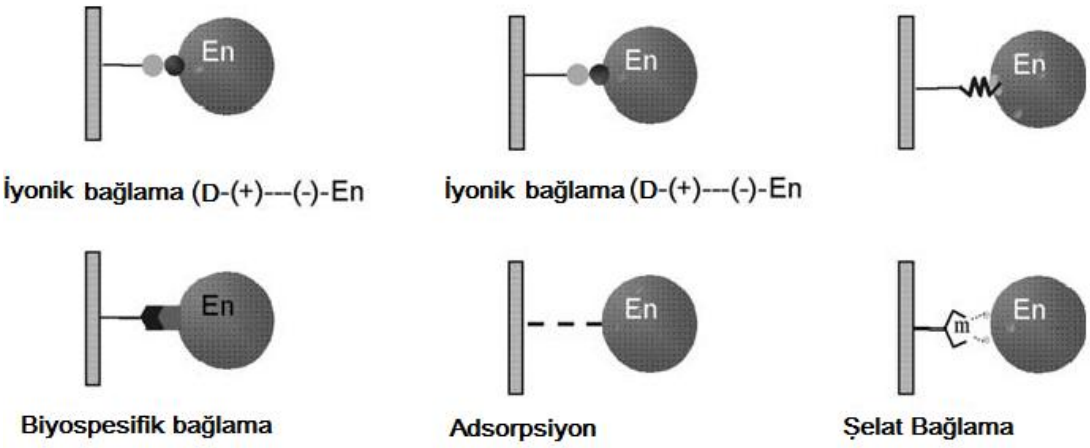
Taşıyıcıya bağlama yöntemleri; iyonik bağlama, biyospesifik bağlama, adsorpsiyon, şelat bağlama ve kovalent bağlama olmak üzere beş gruba ayrılır.

İyonik Bağlama: Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır (Solas ve ark., 1994). Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır (Şekil 1.3). İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur.

Biyospesifik Bağlama: Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzim immobilize edilebilir (Hermanson ve ark., 1992). Lektinler spesifik karbohidrat artıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar (Şekil 1.3).

Adsorpsiyon: Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Yöntem yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır (Klibanov, 1983). Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir (Şekil 1.3).

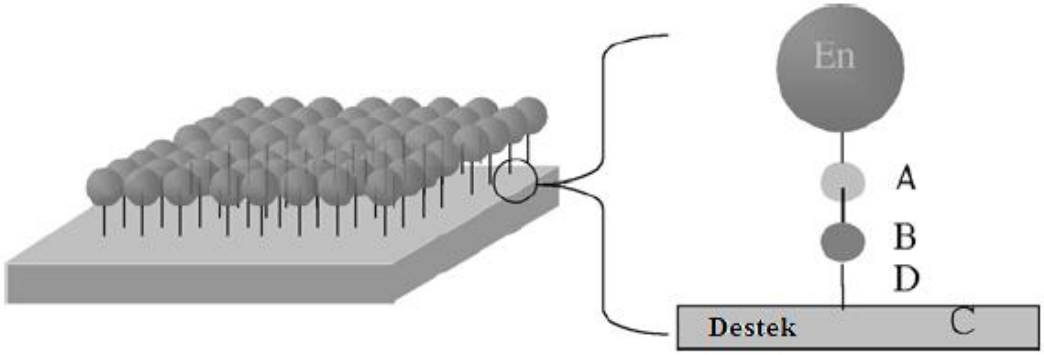
Şelat Bağlama: Bu yöntemde, destek katısının yüzeyini aktifleştirmek ve enzimi destek materyaline bağlamak için geçiş elementleri Titan(III), Titan(IV), Zirkonyum(IV) kullanılır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. İyonik bağlama, biyospesifik bağlama, adsorpsiyon ve şelat bağlama ile ilgili şematik gösterim (D: Destek, En: Enzim) (Cao, 2005).

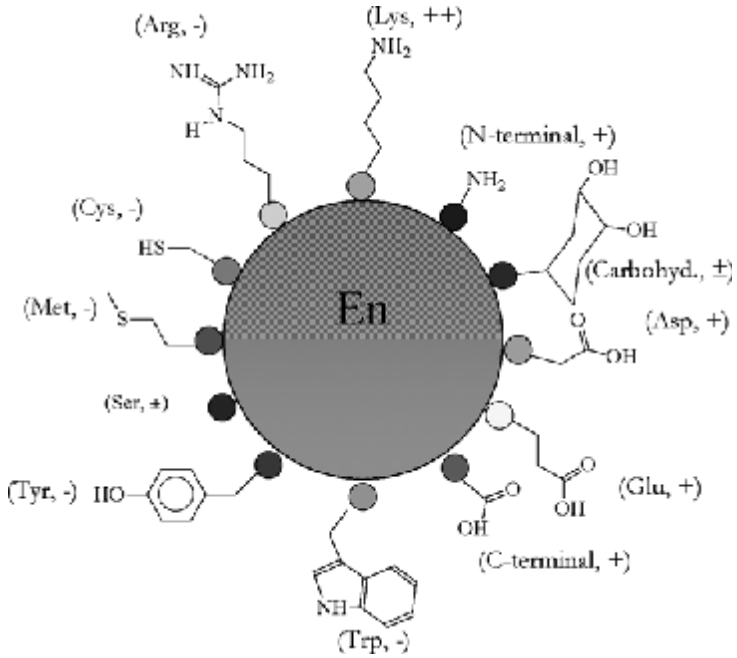
Kovalent Bağlama: İmmobilizasyon tekniklerinden kovalent immobilizasyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim desteğe kovalent olarak bağlandıktan sonra enzimin destekten ayrılması mümkün değildir. Kovalent immobilizasyonda, enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması protein kimyasında genelde bilinen yöntemlerle ve sulu ortamda gerçekleşmektedir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzimin aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler

nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Enzimin yüzeyinde yer alan amino asit artığı ile destek yüzeyinde yer alan fonksiyonel grup arasındaki kimyasal bağ Şekil 1.4'de gösterilmiştir (Cao, 2005).



Şekil 1.4. Enzimin desteğe kovalent immobilizasyonu: (A) Aktif amino asit artığı; (B) desteğin fonksiyonel bağ yapacak grubu; (C) Destek; (D) Ara kol (Cao, 2005).

Kovalent immobilizasyonda rol oynayan aminoasit artıkları Şekil 1.5'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Reaktif amino asit artıkları : immobilizasyonda çok sık kullanılır (++), sıklıkla kullanılanır (+), sık kullanılmaz (±), kullanılmaz (-) (Cao, 2005).

Destek suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik etkilere karşı dayanıklı olmalıdır. Bu

tür desteklerin seçiminde enzim ile destek arasındaki bağın aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında desteğin enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir (Telefoncu, 1997). Seçilen desteğin fiziksel ve kimyasal özellikleri immobilize enzimin performansını (örneğin, aktivitesini, seçiciliğini, kararlılığını) doğrudan etkilemektedir (Cao, 2005). Desteğe kovalent bağlı immobilize enzimin performansını etkileyebilecek özellikler:

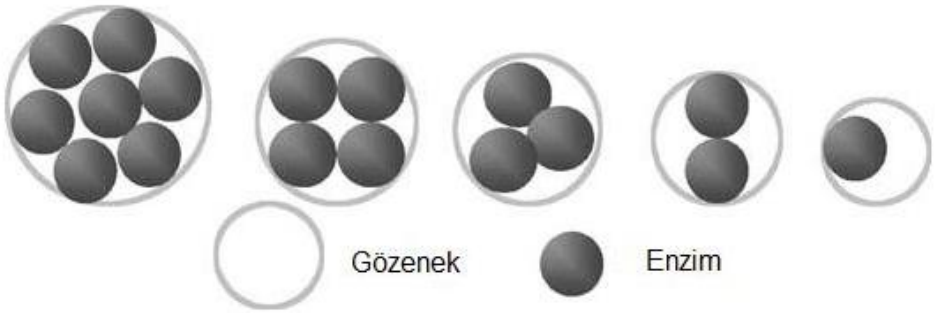
- Desteğin fiziksel özellikleri (gözenek büyüklüğü, partikül büyüklüğü, geçirgenliği, şekli vb.);
- Desteğin kimyasal yapısı (yapının kimyasal bileşimi, aktif fonksiyonel gruplar, aktif olmayan fonksiyonel gruplar);
- Kimyasal bağın yapısı;
- İmmobilizasyon sırasında ya da immobilizasyon sonrasında enzimin konformasyonu;
- Enzim yönlenmesi;
- Arakolun uzunluğu ve yapısı;
- Enzimin bağlanma ortamının özellikleri;
- Enzim ve destek arasında oluşan bağın sayısı;
- Desteğin yüzeyindeki ya da desteğin içindeki enzim dağılımı.

Destek yüzeyi, iç yüzeyi ve dış yüzeyi (gözeneksiz desteklerde iç yüzey sıfırken oldukça gözenekli desteklerde dış yüzey ihmal edilebilir) kapsamaktadır (Şekil 1.6). Bir makro-gözenekli destekte partikül çapına bağlı olarak iç yüzey genellikle dış yüzeyin 100-1000 katı kadardır.



Şekil 1.6. Gözenekli desteğin iç yüzeyi ve dış yüzeyi (Cao, 2005).

Genellikle bağlanan enzim miktarı (mg protein / g destek) ve immobilize enzimin aktivitesi desteğin yüzey alanından çok desteğin gözenek büyüklüğü ile ilişkilidir. Etkili bir immobilizasyon için gözenek büyüklüğü enzimin boyutunun 3-9 katı olması gerektiği bildirilmiştir (Cao, 2005). Gözenek büyüklüğü sadece yüzey alanı ile değil, difüzyon sınırlaması ve immobilize enzim molekülünün hareketliliği ile de ilişkilidir. Eğer enzim molekülünün büyüklüğü biliniyorsa teorik olarak gerekli olan gözenek büyüklüğü öngörülebilinir. Şekil 1.7'de görüldüğü gibi gözenek büyüklüğü azaldıkça enzimin yüzeyi kullanma etkinliği azalmaktadır.

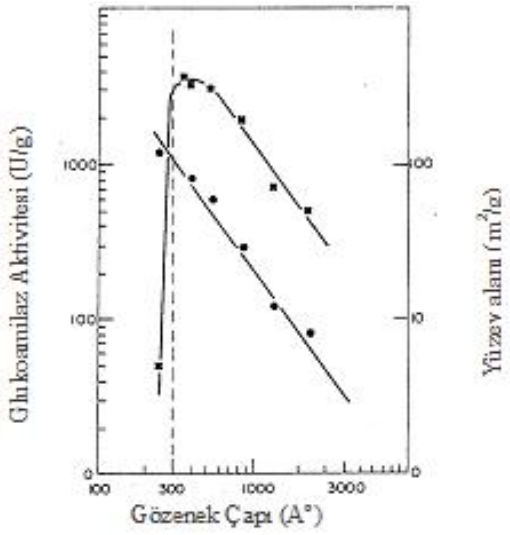


Şekil 1.7. İmmobilize enzim tarafından kullanılan etkin yüzey alanı ile gözenek büyüklüğü arasındaki ilişki (Cao, 2005).

Desteğin yüzey yapısına bağlı olarak enzimin bir takım özelliklerinde değişimler olabilir. Bunlar:

- Stabilite (kararlılık)
- Aktivite
- Seçicilik
- Enzim konformasyonu
- Yönlenmesi
- pH profili
- Sıcaklık profili

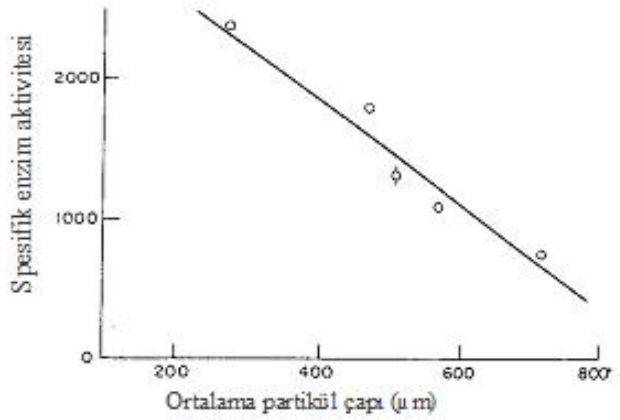
Kovalent immobilizasyonda seçilen inorganik desteğin yüzeyine fazla miktarda enzimin bağlanabilmesi için desteğin mümkün olan en küçük gözenek büyüklüğüne sahip olması gerektiği bildirilmiştir (Weethall, 1976). Farklı gözenek büyüklüğüne sahip gözenekli cam boncuklara immobilize edilen glukoamilaz (52x50x50 Å) için en uygun gözenek çapının 300 Å olduğu bildirilmiştir (Şekil 1.8).



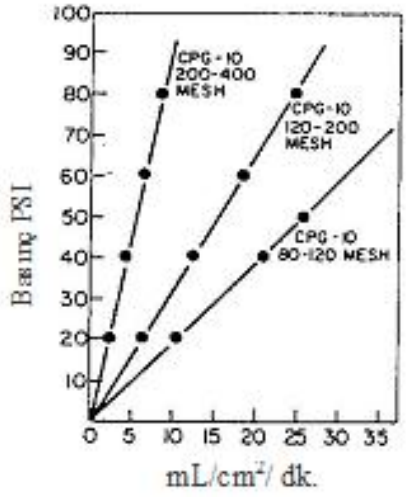
Şekil 1.8. İmmobilize glukoamilaz aktivitesinin ve desteğin yüzey alanının gözenek büyüklüğüne bağlı değişimi (Weetall, 1976).

Desteğin tanecik boyutu da immobilize enzimin aktivitesini etkileyen önemli bir faktördür. Tanecik boyutu arttıkça difüzyon kontrolünün etkisi artmaktadır (Şekil 1.9). Genel olarak veriler en küçük tanecik boyutunun en iyi seçim olduğunu gösterse de araştırmacının tanecik boyutunu ve kolon boyunca meydana gelen basınç

düşüşünü birlikte dikkate alması gerektiği bildirilmiştir. Tanecik boyutu arttıkça immobilize enzimin bulunduğu kolon boyunca basınç düşüşü azalmaktadır (Şekil 1.10).



Şekil 1.9. Desteğin tanecik boyutu ve difüzyon yolunun uzunluğunun azalmasına bağlı olarak enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler (Weethall, 1976).



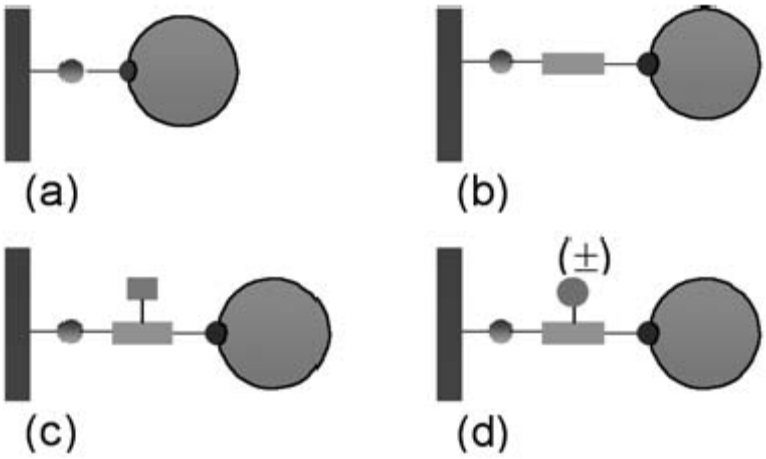
Şekil 1.10. CPG için tanecik boyutundaki dağılımın akış hızına ve basınç düşüşüne etkisini gösteren deneysel sonuçlar (Weethall, 1976).

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktifleştirilmesi gerekir. İmmobilizasyon çok yumuşak

koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Aktifleştirilmiş desteklere enzimlerin immobilizasyonunda düşük immobilizasyon etkinliği ve enzim kararlılığında artış veya azalış meydana gelebilmektedir. Buna neden olan faktörler;

- Sterik engeller,
- Desteğin çevresel etkileri (hidrofobik yüzeyler genellikle enzimin inaktivasyonuna neden olur),
- Matriksin özellikleri,
- Enzim molekülü ile destek arasında istenmeyen etkileşimler,
- Enzimin desteğe yanlış yönlenmesi (aktif bölgesinden bağlanması),
- Uygun olmayan mikro çevre,
- Aşırı çoklu noktadan bağlanma ve
- Enzim hareketliliğinin veya konformasyonel esnekliğin etkilenmesi.

Enzim immobilizasyonu çalışmalarında enzim ile destek arasına çeşitli ara kollar eklenerek enzim aktivitesinin artırılmasına yönelik teknikler araştırılmaktadır (Pernzol ve ark., 1998; Seo ve ark., 1998; Nouaimi ve ark., 2001; Maio ve ark., 2003; Önal ve ark., 2003; Manta ve ark., 2003; Bayramoğlu ve ark., 2003; Arıca ve ark., 2004; Cao, 2004; Wang ve ark., 2004). Enzimin desteğe doğrudan immobilizasyonunda enzim hareketi sınırlı iken ara kol üzerinden immobilizasyonunda enzim daha serbest hareket edebilmektedir. Ara kolun immobilize enzim aktivitesi üzerine etkisi karmaşıktır. Bunun nedeni ara kol varlığında mikroçevredeki, enzim yönlenmesindeki ve enzimin esnekliğindeki değişimlerdir. Uygun ara kol (uzunluk, hidrofiliklik, dallanmışlık veya doğrusallık v.b.) kullanımıyla immobilizasyon sonunda immobilize enzim aktivitesi yüksek olabilmektedir (Şekil 1.11).

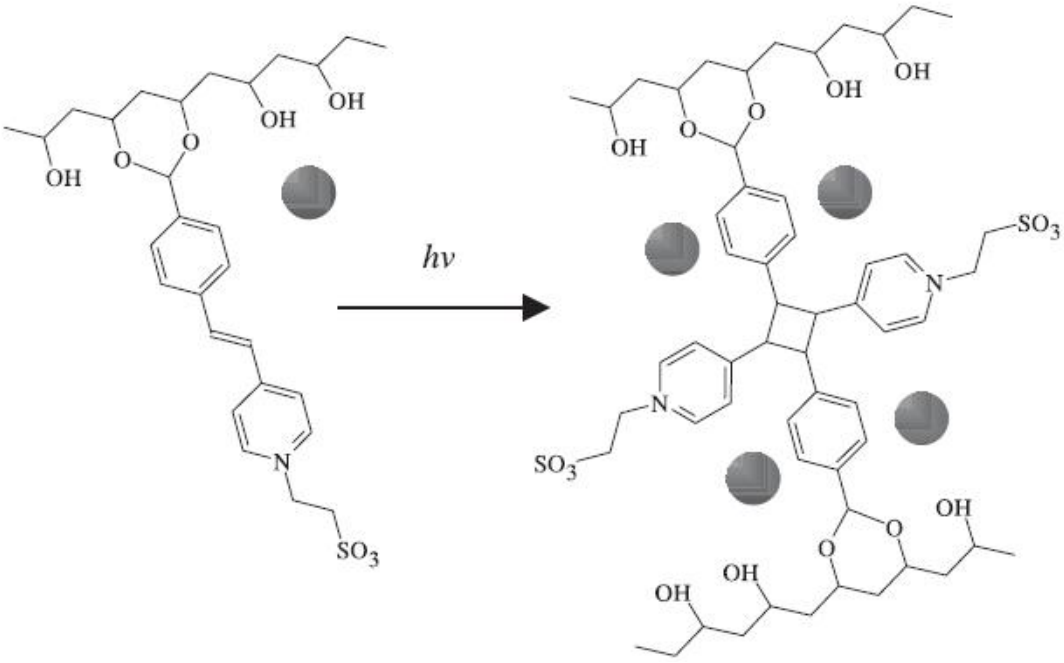


Şekil 1.11. Enzimin desteğe doğrudan (a), doğrusal ara kol (b), dallanmış ara kol (c) ve yüklü ara kol (d) üzerinden immobilizasyonu (Cao, 2005).

1.1.1.2. Tutuklama Yöntemleri

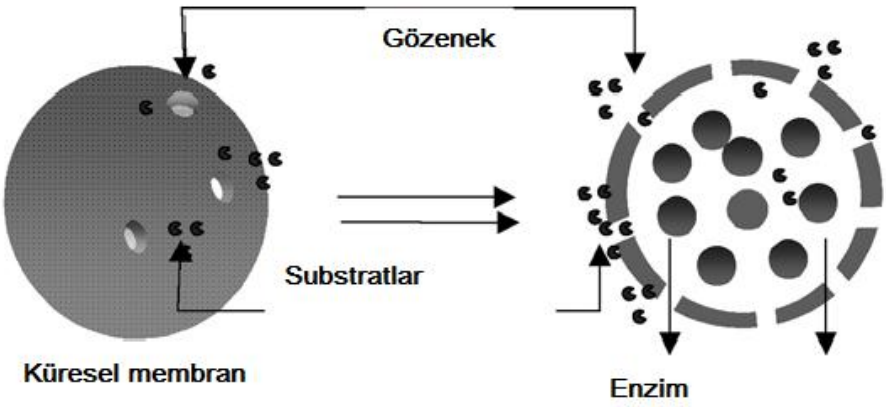
Tutuklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir mekânda durmaya zorlanmaktadır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamamaktadır. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olmak üzere üçe ayrılmaktadır.

Polimer matrikste tutuklama yöntemi, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanmaktadır (Şekil 1.12). Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir (Sperinde ve ark., 1997). Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.



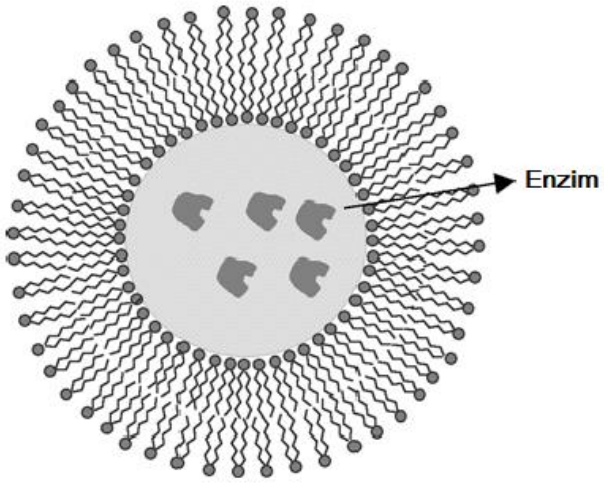
Şekil 1.12. Polimer matrikste enzim immobilizasyonu (Cao, 2005).

Mikrokapsülleme yöntemi enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanır (Şekil 1.13). Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μm arasında değişmektedir. Yarıgeçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır.



Şekil 1.13. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu (Cao, 2005).

Lipozom tekniği, sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır (Şekil 1.14), (Regen ve ark., 1984). Çapı 1-100 μm arasında değişen enzim çözeltisi damlacıklarını içeren hidrokarbon çözücünün; çeşitli katkı maddeleri ve yüzey yapıcılarla enzim çözeltisi damlacıkları çevresinde oluşturduğu suda çözünmeyen faza sıvı yüzey yapıcı membranlar adı verilmektedir. Yöntemin en önemli üstünlüğü; süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel oluşudur. Aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlar ve oldukça büyük bir temas yüzeyine sahiptir. Önemli sakıncaları ise; substrat ve ürünün membranda geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin inaktif olması ve sıvı olan membrandan enzimin kaçma olasılığıdır.



Şekil 1.14. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu (Cao, 2005).

1.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin herhangi bir destekle fiziksel veya kimyasal etkileşime girmesinden çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir tekniktir (Weethall, 1976). Yarı geçirgen özellik gösteren oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden

biridir. Bu immobilizasyon yöntemi hiçbir kimyasal bileşiğin veya tekniğin kullanılmasının gerekmediği son derece kolay bir yöntemdir. Oyuk elyaf membranlar ile ultrafiltrasyon membranları enzimi geçirmezken substrat ve ürünün geçişine izin verir. Ayrıca mikropların enzime ulaşmasını engelleyerek koruyucu etki gösterirler. Enzim desteğe herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmez, ancak substratın membrandan geçip enzime ulaşmasındaki kısıtlamalar bu yöntemin en önemli dezavantajlarından birini oluşturur. Substrat molekülü ne kadar küçükse membrandan geçişi o denli kolay olacağından enzimin etkinliği de o oranda artacaktır.

Kullanılan immobilizasyon tekniği ne olursa olsun immobilize edilen enzimden beklenilen özellikler şunlardır:

- Yüksek kararlılık,
- Tekrar kullanılabilirlik,
- Sürekli üretime olanak vermesi,
- Reaksiyon kontrolüne olanak vermesi,
- Yüksek saflık,
- Yüksek ürün yüzdesi,
- Ekonomik olması.

1.1.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Enzimlerin çoğuna uygulanabilen çok sayıda immobilizasyon teknikleri geliştirilmesine karşın, enzimlerin bileşenlerinin ve kimyasal özelliklerinin oldukça geniş, ürünlerin ve substratların farklı özelliklerde olmaları nedeniyle bütün enzimler veya uygulamalar için geçerli tek bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen her farklı enzim için ve her farklı durumda bir veya birkaç değişik yöntem önerilebilir. Çizelge1.1'de immobilizasyon yöntemlerinin karşı kıyaslanmaları gösterilmiştir.

Çizelge 1.1 İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (Wiseman, A. 1986)

Karakteristik	Karşı Bağlama	Fiziki Adsorpsiyon	İyonik Bağlanma	Şelat veya Metale Bağlama	Kovalent Bağlanma	İçinde Tutma
Hazırlama	Orta	Kolay	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Bağlanma Gücü	Güçlü	Zayıf	Orta	Orta	Güçlü	Orta
Enzim Aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	İmkansız	Mümkün	Mümkün	Mümkün	Nadiren	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Orta	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
Enzimin Mikrobiyal Ataklara Karşı Korunabilmesi	Mümkün	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet

1.2. Katalaz

1.2.1. Genel Özellikleri

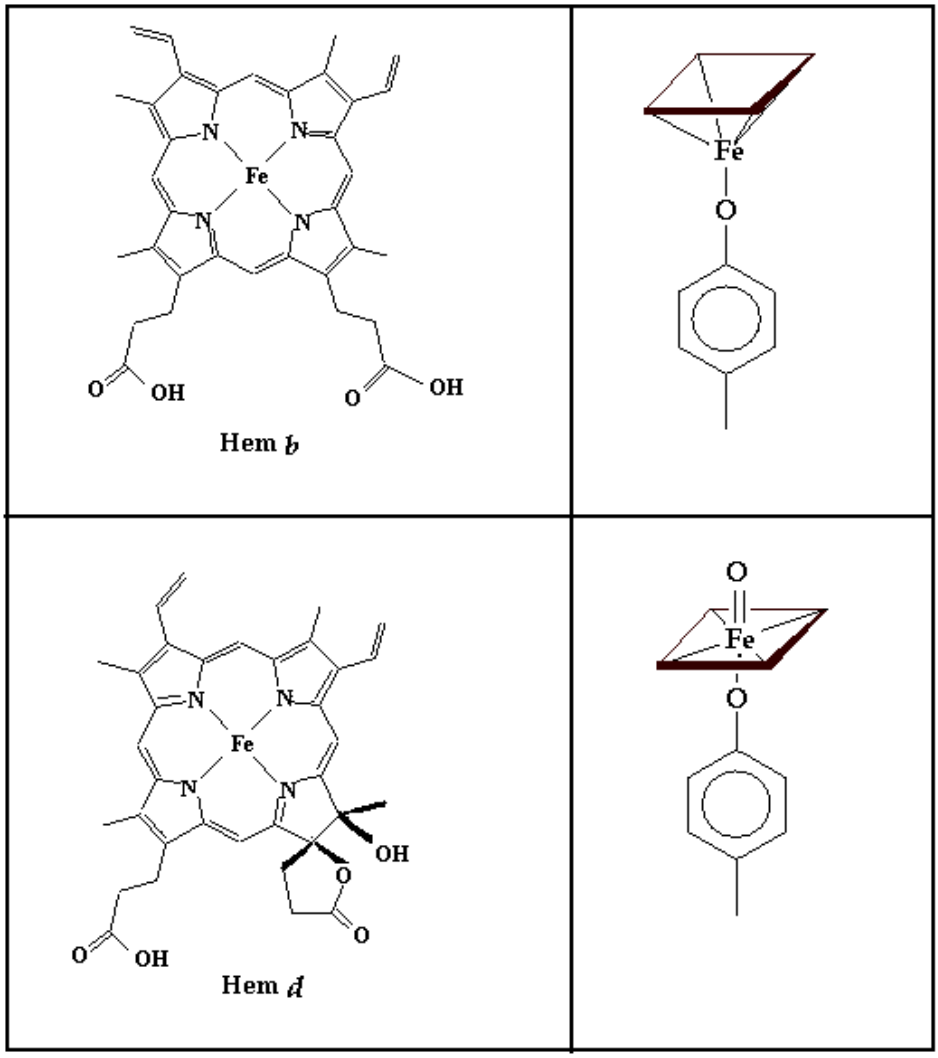
Katalaz (H_2O_2: H_2O_2 oksidoredüktaz EC 1.11.1.6), hidrojenperoksiti su ve oksijene parçalayan bir enzimdir. Katalaz hemen hemen tüm hayvan hücrelerinde, bitkilerde ve bakterilerde bulunur.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalaz}} 2H_2O + O_2$$

19. yüzyılın başlarından itibaren katalaz ile ilgili araştırmalar başlamıştır. Thenard 1811'de H_2O_2'i keşfetmiş ve canlıda kendi kendine parçalandığını belirtmiştir (Zamocky ve Koller, 1999). Schönbein ise 1863'de H_2O_2'i bir maya ürünü olarak tanımlamıştır. İlk olarak Loew 1901 yılında H_2O_2'in katalaz ile kendi

kendine parçalandığını bulmuşsa da katalazın aktif merkezinde demir bulunduğu ve siyanür ile karakteristik olarak inhibisyona uğradığı ancak 22 yıl sonra Warburg tarafından ortaya çıkarılmıştır. Wieland 1927'de katalazın oksidasyon mekanizmasını ortaya çıkararak H_2O_2'in elektron vericisi olduğunu belirtmiştir. Stern 1936'da katalazın aktif bölgesinde protoporfirin IX aktif grubunun bulunduğunu gösterirken 1 yıl sonra Summer ve Dounca ilk sığır karaciğeri katalazını (BLC) kristal olarak elde etmeyi başarmışlardır. 1947 yılında Chance katalaz ve hidrojen peroksit arasında oluşan birinci kompleksi (Bileşik I) keşfetmiştir. İlk prokaryotik katalaz Herbert ve Pinsent tarafından *Micrococcus luteus*'dan saflaştırılmıştır. 1976 yılında sığır karaciğer katalazı Eventof ve ark. tarafından saflaştırılmış ve 1981 yılında Murthy ve ark. tarafından 2.5 Å çözünürlükte X ışını analizi yapılmıştır. Kirkman and Gaetani 1984 yılında BLC'ye NADPH'ın sıkıca bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Katalaz turnover sayısı oldukça yüksek olan bir enzimdir. Örneğin, *Pichia pastoris* kaynaklı katalazın turnover sayısı $8{,}5x10^6$ s^{-1}, *Escherichia coli* kaynaklı katalazın 1,63x104 s^{-1}, keçi akciğeri kaynaklı katalazın $2{,}17x10^5$ s^{-1} sığır karaciğer ve eritrosit katalazının turnover sayıları aynı olup 2.25×10^7 s^{-1} olarak bildirilmiştir (Potapovich ve ark., 2001; Claiborne ve Fridovich, 1979; Chatterjee ve Sanwal 1993; Ogura ve Yamazaki, 1983).

Katalaz aktif bölgesinde ***hem*** grubu (Protoporfirin IX halkası) içerir. Farklı kaynaklara ait katalaz moleküllerinin çoğu ***hem b*** prostetik grubunu içerirken, az sayıda mantar ve bakteriyel katalaz ***hem d*** grubunu içermektedir (Şekil 1.15). Katalaz enziminin ***hem*** molekülü ve enzime tirozin amino asit artığı üzerinden bağlanışı Şekil 1.15'de gösterilmektedir. Sığır karaciğer katalazının molekül kütlesi 240 kDa olup, dört tane alt ünitesi vardır. İzoelektrik noktası (pI) ise 5,4'tür (Vasudevan ve Weiland, 1994).



Şekil 1.15. Katalazın prostetik grubu olan *hem b* ve *hem d*'nin yapısı.

1.2.2. Katalazın Reaksiyon Mekanizması

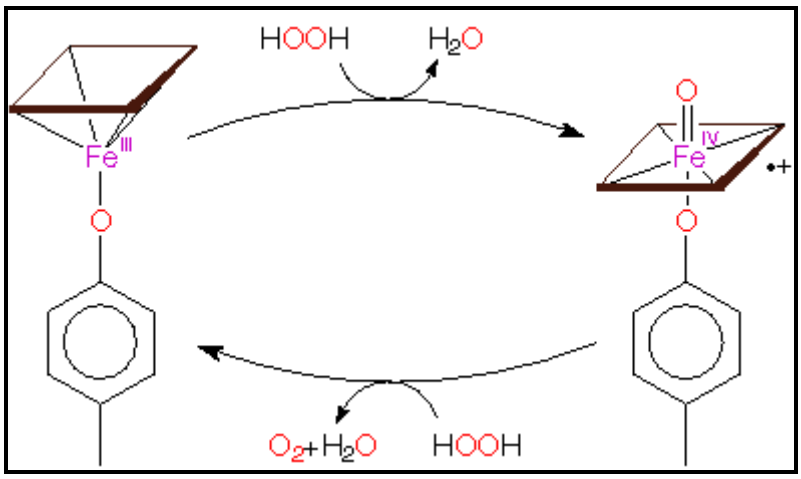
Katalazın reaksiyon mekanizması aşağıda kısaca verilmiştir. Reaksiyon önce bir molekül H_2O_2'in indirgendiği, ardından da ikinci bir H_2O_2 molekülünün yükseltgendiği 2 basamak üzerinden yürür.

H_2O_2 + Fe(III)-E ⟶ H_2O + $O=Fe^{\bullet+}$ (IV)-E

Porfirin katyon radikali (Bileşik I)

H_2O_2 + $O=Fe^{+\bullet}$ (IV)-E ⟶ O_2 + H_2O + Fe(III)-E

Görüldüğü gibi reaksiyonda katalitik aktiviteyi Fe(III) göstermektedir. Anderson ve Dawson 1991 yılında katalaz enziminin reaksiyon mekanizmasının Şekil 1.16'daki gibi olduğunu öne sürmüşlerdir.



Şekil 1.16. Katalazın etki mekanizması.

1.2.3. Katalazın Kullanım Alanları

Katalazın, oksitleyici, ağartıcı veya sterilize edici olarak kullanılan H_2O_2'nin fazlasının uzaklaştırılması için endüstride, glukoz veya H_2O_2 biosensorlerinin bileşeni olarak analitik uygulamalarda kullanımı mümkündür. Katalazın H_2O_2'nin uzaklaştırılması, çeşitli bileşiklerin sentezinde farklı enzimlerle birlikte kullanımı ve analitik amaçlı kullanımı ile ilgili bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

1- H_2O_2'nin uzaklaştırılması amacıyla kullanımı

Özellikle sıcak bölgelerde sütün sağılmasından sonra işlenmesine kadar geçen sürede veya peynir altı suyunun işlenmek üzere taşınması sırasında mikrobiyal kirleticilerin çoğalmasının engellenmesi için özel soğutma ünitelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Soğutma zincirinin kurulamaması veya soğutma işleminin maliyetinin yüksek olması nedeniyle soğutmaya alternatif olarak Dünya Gıda ve Tarım Örgütü ve Birleşmiş Milletler Tarım Örgütünün izin verdiği miktarlardaki H_2O_2 (% 0,05-% 0,25) süte eklenmektedir. Ancak, sütün işlenmesinden hemen önce sütteki (veya peynir altı suyundaki) H_2O_2'nin toksik etkisinin önlenmesi için katalaz kullanımı önerilmektedir (Tarhan 1995, Uhlig 1998).

Pamuklu kumaşın H_2O_2 ile ağartılmasından sonra boyama işleminden (özellikle O_2'ye duyarlı boyaların kullanımı) hemen önce H_2O_2'nin uzaklaştırılmasında yaygın olarak kullanılan yöntem su ile yıkamaktır. Bu amaçla 1 kg dokumanın işlenmesi sırasında yaklaşık 100 L su tüketilmektedir Klasik yöntemde H_2O_2'nin uzaklaştırılması amacıyla $Na_2S_2O_3$ ve $Na_2S_2O_4$ kullanılmakta, ancak bu bileşiklerin kullanımı da suda istenmeyen yüksek tuz derişimine neden olmaktadır. Bu yönteme alternatif olarak H_2O_2 içeren yıkama suyundaki H_2O_2'nin parçalanması ve yıkama suyunun tekrar sisteme kazandırılması için katalaz aktivitesinden faydalanılabilir (Paar, 2001). Katalazın kullanımı ile enerji tüketiminde % 48, kimyasal tüketiminde % 83, su tüketiminde % 50 ve işlem süresinde % 33 azalma sağlamaktadır (Eberhardth, 2004).

PET şişelerin ve plastik kapların düşük sıcaklıklarda sterilizasyonu amacıyla kullanılan H_2O_2'nin işlem sonrasında uzaklaştırılması amacıyla katalaz kullanılabilmektedir (Lida ve ark., 2000).

Kağıt sanayinde kağıdın ağartılmasından sonra kalan H_2O_2'nin, reçine ve plastik üretiminde oksitleyici ve köpükleştirici olarak kullanılan H_2O_2'nin uzaklaştırılmasında katalaz kullanılabilir (Wiseman,1986).

2- Katalazın çeşitli enzimler ile birlikte kullanımı

- Glikolat oksidaz enzimi ile birlikte glikolik asitten glioksilik asit üretiminde (Seip ve ark., 1994),

- D-amino asit oksidazlarla birlikte D-amino asitlerin ∝-keto asitlere dönüştürülmesinde (Lafuente ve ark.,1998),
- L-α gliserofosfat oksidaz ile birlikte dihidroksi aseton fosfat sentezinde (Kramer ve ark.,1997; Streitenberger ve ark., 2002),
- Glukoz oksidaz (GOD) enzimi ile birlikte glukonik asit üretiminde ve glukoz veya oksijenin gıdalardan uzaklaştırılmasında (Godjevargova ve ark., 2004),
- Piranoz 2-oksidaz ile birlikte 2-ketoaldoz üretiminde (Sukyai ve ark., 2008) kullanılmaktadır.

3-Katalazın analitik amaçlı kullanımı

- H_2O_2'nin miktarının belirlenmesi amacıyla biyosensörlerde (Campanella ve ark., 1998; Ertaş ve ark., 2000; Varma ve ark., 2005; Salimi ve ark., 2005; Jiang ve ark, 2008; O'Brien ve ark., 2008; Modrzejewska ve ark. 2007; Prakash ve ark., 2009),
- GOD ile birlikte kan, serum vb. çeşitli örneklerde glukozun belirlenmesi için biyosensörlerde (Santoni ve ark., 1997: Ramanathan ve ark., 2001; Gao ve ark., 2007),
- Yaban turpu peroksidazı (HRP) ile nitrit miktarının belirlenmesi için biyosensörlerde (Chen ve ark., 2008),
- Meyve suları gibi çeşitli örneklerde azid miktarının belirlenmesi için biosensörlerde (Sezgintürk ve ark., 2005; Cui ve ark., 2006),
- L-glutamat oksidaz ile birlikte γ-amino butirik asitin belirlenmesi için biosensorlerde (Liang ve ark., 2000) kullanılmaktadır.

1.3. Florisil, Cam Boncuklar ve Eupergit

Florisil % 15 MgO ve % 85 SiO_2 içeren bazik karakterli bir inorganik destektir. Florisil termal kararlılığı yüksek, organik çözücülere, asidik ve bazik koşullara dayanıklı, kolay bulunabilen ucuz bir destek materyalidir.

Gözenekleri kontrollü cam boncuklar (CPG) % 96 SiO_2, % 3 B_2O_3, % 1 Na_2O ve eser miktarda Al_2O_3 ve diğer metal oksitlerini içermektedir. CPG mekanik etkilere ve yüksek basınca karşı çok dayanıklı, termal kararlılığı yüksek, organik

çözücülere, asidik ve bazik koşullara karşı dayanıklı, farklı gözenek büyüklüklerinde bulunabilen inorganik bir destek materyalidir.

Eupergit, N-N'-metilenbis(metakrilamid), glisidil metakrilat, alilglisidil eter ve metakrilatın kopolimerizasyonu ile oluşan organik bir polimer olup endüstriyel uygulamalarda kullanılan bir destektir. Eupergit'in kimyasallara, mekanik etkilere dayanıklı olduğu, pH 0-14 aralığında kararlı olup bu pH'larda şişmediği, karıştırmalı reaktör tanklarında 650 döngü sonunda partikül boyutunda ve yapısında önemli bir değişim göstermediği bu nedenle reaktörlerde kullanıma uygun bir destek materyali olduğu bildirilmektedir (Katzir ve Kraemar, 2000). Eupergit C yüksek yoğunlukta oksiran grupları (800 μmol / g kuru Eupergit C) içermesi nedeniyle proteinlerin yapısında bulunan amino, tiyol ve fenolik grupları ile kovalent bağ yapabilir. Eupergit C 250 L, Eupergit C ile aynı kimyasal yapıya sahip olup gözenekleri büyük, oksiran gruplarının (200 μmol / g kuru Eupergit C 250 L) daha az olduğu organik destektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Chaterjee ve ark., (1990), keçi karaciğer katalazını aluminyumoksit (P1), jelatin (P2), poliakriamid (P3) ve tavuk yumurtasının kabuğuna (P4) immobilize etmişlerdir. P1, P2, P3 ve P4'e immobilize edilen katalaz örnekleri için immobilizasyon sonunda sırasıyla başlangıç aktivitelerinin % 29,2, % 65,7, % 56,7, ve % 17,2'sını koruduğunu, bu katalaz örnekleri için K_m değerlerinin sırasıyla 110, 200, 140 ve 200 mM olduğunu bildirmişlerdir. Katalaz örnekleri 4-6ºC'de saklandığında serbest katalazın 15 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 80'ini kaybettiği, P1, P2, P3 ve P4 örneklerinin ise sırasıyla başlangıç aktivitelerinin % 55, % 80, % 27 ve % 55'ini kaybettiklerini bildirmişlerdir. 5 U aktiviteye sahip P1, P2, P3 ve P4 örneklerini 5 ml'lik cam şırıngalara doldurarak 10 ml 34 mM H_2O_2 çözeltisini sırasıyla 10, 20, 24 ve 3 ml/saat akış hızlarında kolona göndermişlerdir. Pı ve P2'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin 15 gün boyunca, P3'e ve P4'e immobilize edilen katalaz örneklerinin ise 21 gün boyunca H_2O_2'nin tamamını parçaladığını bildirmişlerdir.

Solas ve ark., (1994), sığır karaciğer katalazını iyonik adsorpsiyon ile bioskin adı verilen *Acetobacterxylium* tarafından üretilen doğal bir polimer üzerine immobilize etmişlerdir. Sebest ve immobilize katalaz için K_m değerlerini sırasıyla 13 mM, 7 mM ve 0,53 mM, aktivasyon enerjisini 17,68 kcal/mol K ve 4,06 kcal/mol K, optimum pH'yı 7,5 ve 7,0, optimum sıcaklığı 40ºC ve 25ºC olarak bildirmişlerdir. Serbest katalazın oda sıcaklığında 3 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybettiğini, immobilize katalazın ise 16 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 70'ini koruduğunu bildirmişlerdir.

Akertek ve Tarhan, (1995), *Aspergillus niger* kaynaklı katalazı 3- APTES ve glutaraldehit ile modifiye edilmiş gözenekli SiO_2'ye kovalent olarak, alginat ve γ-karragenan jele hapsetme yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Farklı miktarlarda katalaz (0,2-1,5 mg) kullanarak 20 mg modifiye edilmiş SiO_2 için en uygun katalaz miktarını 0,55 mg olarak belirlemişlerdir. Modifiye SiO_2'ye immobilize edilmiş katalaz (P1) ve alginata immobilize edilmiş katalaz (P2) örneklerinin desteğe bağlanma miktarlarını sırasıyla 3,50 ve 16,82 mg/ g destek olarak, aktivitelerini ise

sırasıyla 2086 ve 765 µmol/dk. g olarak bildirmişlerdir. P1 ve P2 için immobilizasyon işleminden sonra kalan aktiviteleri sırasıyla % 20,17 ve % 1,54 olarak bildirmişlerdir. Kesikli tip reaktörde 10,5 mM ve 52,5 mM H_2O_2 derişiminde P1 için yarı ömür sırasıyla 13,4 saat ve 5,6 saat olarak; P2 için 10,5 mM H_2O_2 derişiminde yarı ömür 4,2 saat olarak bildirmişlerdir.

Arıca ve ark., (1999), sığır karaciğer katalazını poli(izopropilakrilamid-ko-hidroksietilmetakrilat) (PNIPAM/HEMA) kopolimer hidrojele hapsetme yöntemi ile immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyonda 1 ml jele yüklenen katalaz miktarı 0,33 mg'dan 3,3 mg'a artırıldığında kalan aktivite oranının % 47'den % 17'e düştüğünü ve jelin 1 ml'si başına hesaplanan aktivitenin $33,6x10^3$ U'den $110,7x10^3$ U'ye arttığını bildirmişlerdir. Kalan aktivite oranına ve desteğin 1 ml'si başına hesaplanan aktivite değerlerini dikkate aldıklarında en uygun miktarın 1,3 mg/ml jel olduğunu belirlemişlerdir. Sebest katalaz için K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 16,5 mM ve $236x10^3$ U/mg enzim, immobilize katalaz için ise sırasıyla 28,6 mM ve $65x10^3$ U/mg enzim olarak bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz için optimum pH her ikisinde 7,0, optimum sıcaklık ise sırasıyla 25ºC ve 40ºC olarak bildirilmiştir. Serbest ve immobilize katalaz örneklerini 55ºC'de 4 saat beklettiklerinde serbest katalazın aktivitesini tamamen kaybettiğini immobilize katalazın ise başlangıç aktivitesinin % 38'inin kaldığını, 65ºC'de serbest katalazın 2 saat sonunda, immobilize katalazın ise 3,5 saat sonunda aktivitesini tamamen kaybettiğini bildirmişlerdir. 5 ºC'de serbest ve immobilize katalaz örneklerini sakladıklarında 20 gün sonunda serbest katalaz aktivitesini tamamen kaybederken immobilize katalazın başlangıç aktivitesinin % 17'sini kaybettiğini, 70 gün sonunda ise % 78'ini kaybettiğini bildirmişlerdir. Kesikli tip reaktörde, 20 kullanım sonunda immobilize katalazın başlangıç aktivitesinin % 42'sini kaybettiğini bildirmişlerdir.

Lida ve ark., (2000), *Micrococcus lyzodeikticus* kaynaklı katalazı fotonla çapraz bağlanmış reçine kullanarak immobilize etmişler ve düşük derişimlerde (100 ppm) H_2O_2 içeren atık sularda çalışmalar yapmışlardır. Fotonla çapraz bağlanmış reçine jelin uzun süreli hidrojen peroksit varlığında bile kararlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bazı prepolimerler (ENT-2000 polietilen glikol molekül ağırlığı 2000, ENTG-3800 polietilenglikol molekül ağırlığı 3800 ve polipropilenglikol (PPG)

molekül ağırlığı 4000 kombinasyonu, ENTP-4000 PPG molekül ağırlığı 4000, ENTV-500 polivinil alkol molekül ağırlığı 20000) ve fonksiyonel monomerler (vinilpirolidonakrilolmorfolin, methakriloloksietilisosiyanik glukozid MOI-glukoz) ile taşıyıcı jelin modifiye edilmesi veya modifikasyon yapmadan stabilizör (Tween 80, polioksietilen, sorbitan monooleat, Triton X-100, polioksietilen, oktilfenileter) maddelerin eklenmesiyle immobilize edilmiş katalazın kararlılığını incelemişlerdir. Enzim hidrofilik fotonla çapraz bağlanmış reçineye immobilize edilirken, Tween 80, polioksietilen ve sorbitan monooleatın katalaza eklenmesiyle önceki aktivitesinin % 80'nini göstermiştir. Serbest katalazın K_m'si 19 mM, V_{max}'ı 52 mM $mg^{-1}.dk.^{-1}$, ENTG-800 immobilize edilmiş katalazın K_m'si 17 mM, V_{max}'ı 4,6 mM $mg^{-1}.dk.^{-1}$, ENTG-3800/ENTV-50 immobilize edilen katalaz için aktivite gözlenmemiş, ENTG 3800/ Tween 80 immobilize edilen katalaz için K_m 25 mM V_{max} 5,2 mM $mg^{-1}.dk.^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. ENTG-3800'e immobilize edilmiş katalaz için Tween 80 varlığında yarışmasız inhibisyon gözlemlemişlerdir.

Çetinus ve Öztop, (2000), sığır karaciğer katalazını doğal bir polimer olan kitosana kovalent immobilize etmişlerdir. Çeşitli derişimlerde glutaraldehit (GA) kullanarak yapılan immobilizasyon çalışmalarında en uygun GA derişimini % 0,02 olarak belirlemişlerdir. Katalazın immobilizasyondan sonra optimum pH'sının (7,0) ve sıcaklığının (25ºC) değişmediğini bildirmişlerdir. Serbest katalazı 40ºC'de 2 ve 5 saat beklettiklerinde başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 50 ve % 35'inin kaldığını, aynı koşullarda immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 70 ve % 60'ının kaldığını bildirmişlerdir. Serbest katalaz için K_m 25,16 mM, V_{max} 24042 μmol $dk.^{-1}$ mg $prot.^{-1}$ ve immobilize katalaz için K_m 27,67 mM, V_{max} 1022 μmol $dk.^{-1}$ mg $prot.^{-1}$ olarak belirlemişlerdir. İmmobilize katalazın sürekli proseste 40 dk. sonunda aktivitesinin % 50'sini kaybettiğini bildirmişlerdir.

Costa ve ark., (2001), *Bacillus sp.*'den saflaştırılan katalazı glutaraldehit kullanılarak aluminyumoksit üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Katalazı farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) immobilize ettiklerinde en yüksek immobilizasyon yüzdesini 48 saat immobilizasyonda elde etmişlerdir. Farklı katalaz derişimlerinde (0,5-10,0 mg/ml) yapılan imobilizasyon çalışmalarında enzim derişimi artıkça desteğe bağlanan katalaz miktarının yaklaşık 0,5 mg/g destek'ten

16,6 mg enzim/g destek'e arttığını, aktivitenin ise yaklaşık 65 U/g destek'ten 170 U/g destek'e yükseldiğini bildirmişlerdir. Katalaz miktarı arttıkça desteğe bağlanan enzim miktarının arttığını, 10 mg/ml katalaz derişiminde desteğin enzim tarafından doyurulduğunu bildirmişlerdir. İmmobilizasyon için en uygun başlangıç katalaz derişiminin 10 mg/ml olduğunu, serbest ve immobilize katalaz için optimum pH'nın 8,0 optimum sıcaklığın 30°C olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize edilen enzimin serbest enzime göre yüksek pH'larda daha kararlı olduğunu belirlemişlerdir. Substrat çözeltisi olan hidrojen peroksid çözeltisine surfaktanlar ve anyonik stabilizörler eklediklerinde immobilize enzimin inhibe olduğunu rapor etmişlerdir.

Akgöl ve ark., (2001), poli(2-hidroksietilmetakrilat) pHEMA membranı hazırlayarak, farklı pH'larda farklı miktarlarda sığır karaciğer katalazı içeren çözeltilerde immobilize etmişlerdir. Desteğe adsorbe olan katalaz miktarı artıkça immobilize katalazın % kalan aktivitesinin azaldığını, membrana maksimum bağlanan katalaz miktarının 86 $\mu g\ cm^{-2}$ olduğunu rapor etmişlerdir. Serbest katalazın ve pHEMA membrana adsorbe olan katalazın K_m ve V_{max} değerleri sırası ile 16,5 mM, 25,8 mM ve $236x10^3$ U mg prot.$^{-1}$, $111x10^3$ U mg prot.$^{-1}$ olarak belirlemişlerdir. Enzim derişimini 0,5 mg ml^{-1}'den 4 mg ml^{-1}'ye çıkardıklarında desteğe bağlanan katalaz miktarının 5 $\mu g\ cm^{-2}$'den 86 $\mu g\ cm^{-2}$' ye yükseldiğini belirlemişlerdir. Katalazın desteğe adsorpsiyonu için en uygun pH'nın 7,0 olduğunu, serbest ve immobilize katalazın pH 7,0'de maksimum aktivite gösterdiklerini, optimum sıcaklığın serbest katalaz için 40°C, immobilize katalaz için 45°C olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize katalazı kesikli reaktörde 25°C'de 60 dakika 10 kez kullandıklarında aktivitesinin % 58'nin, 16 kez kullanıldığında % 36'sının kaldığını rapor etmişlerdir.

Costa ve ark., (2002), bu çalışmada katalaz enzimini, aluminyumoksit üzerine glutaraldehit ile kovalent immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz için optimum pH'yı 7,0 olarak belirlemişlerdir. 50ºC'nin üstündeki sıcaklıklarda (60, 70 ve 80ºC) immobilize katalazın termal kararlılığının serbest katalazdan daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize katalazın 30ºC'de pH 12,0'de yarı ömürlerini sırasıyla 8 sa ve 35 sa olarak bildirmişlerdir.

Varma ve Mitra, (2002), sığır karaciğer katalazını cam karbon yüzeyine kovalent olarak immobilize ederek bir biyosensör geliştirtmişlerdir. Cam karbonun yüzeyini öncelikle H_2SO_4/H_2O_2 karışımında 24 saat bekleterek yüzeyde –OH grupları oluşturarak destek yüzeyinin hidrofilik karakterde olmasını sağlamışlardır. Daha sonra desteği kloroasetik asit ile muamele ederek destek yüzeyinde serbest –COOH grupları oluşturmuşlardır. Desteği önce 1,6 diaminohekzan ara kolu ile ve daha sonra da glutaraldehit ile muamele etmişlerdir. Bu işlemler sonunda elde edilen desteğe katalazı kovalent bağlamışladır. İmmobilizasyon sonucunda 1,0 g desteğe 3,0 mg katalaz bağlandığını ve aktivitesini 100 U/g destek olarak bildirmişledir. Geliştirilen biosensorun artan H_2O_2 derişimlerine (0,1-1 mM) karşı akım değerlerinde doğrusal bir artışın olduğunu bildirmişlerdir.

Çetinus ve Öztop, (2003), sığır karaciğer katalazını çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile kitosan boncuklara kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz için optimum pH'yı 7,0 ve sıcaklıklığı 25°C olarak bulmuşlardır. Farklı glutaraldehit derişimlerinde yapılan immobilizasyon çalışmalarında en uygun derişimi % 0,05 (v/v) glutaraldehit olarak belirlemişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz için K_m değerlerini sırası ile 35 mM, 77,5 mM, V_{max} değerlerini ise 32000 μmol dk.$^{-1}$ mg prot.$^{-1}$, 122 μmol dk.$^{-1}$ mg prot.$^{-1}$ olarak belirlemişlerdir. Serbest ve immobilize katalazın termal kararlılıkları incelendiğinde 50°C'de 2 saat sonunda serbest enzim aktivitesinin % 50'sini immobilize katalaz ise % 40'nı, 45°C'de 5 saat sonunda serbest enzimin aktivitesinin % 50'sini immobilize katalazın ise % 30'nu kaybettiğini belirlemişlerdir. Serbest ve immobilize katalazın depolama kararlılığını incelediklerinde 25°C'de serbest enzimin 15 gün sonunda aktivitesinin % 50'sini, immobilize katalazın ise 70 gün sonunda aktivitesinin % 70'ni kaybettiğini 5°C'de serbest enzimin 15 gün sonunda aktivitesinin % 50'sini, immobilize katalazın ise 70 gün sonunda aktivitesinin % 40'nı koruduğunu rapor etmişlerdir.

Shioji ve ark., (2003), gözenek büyüklüğü 12 nm olan silica jel 60'a sığır karaciğer katalazını immobilize etmişlerdir. Öncelikle desteği etanolamin ile muamele ederek yüzeyindeki –OH gruplarını modifiye etmişler ve yüzeyde serbest –NH_2 grupları oluşturmuşlardır. Daha sonra bu desteği glioksal (CHOCHO) ile

muamele ederek destek yüzeyinde aldehit grupları oluşturmuşlardır. Termogravimetri (TG) cihazını kullanarak yapılan ölçümlerde etanolamin ile muameleden sonra yüzeydeki –OH gruplarının % 30'unun modifiye olduğunu ve yüzeydeki $–NH_2$ grubunu sayısını 1,21 nm^{-2} olduğunu, desteğin glioksal ile muamelesinden sonra $–NH_2$ gruplarının yarısının aldehit grubuna dönüştüğünü bildirmişlerdir. Serbest katalaz için K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 55 mM ve 7000 U/mg, immobilize katalaz için ise 171 mM ve 350 U/mg olarak bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz örneklerini 5ºC'de sakladıklarında yarı ömürlerini sırasıyla 110 saat ve 140 saat olarak bildirmişlerdir.

Choi ve Yiu, (2004), bu çalışmada düşük maliyetli H_2O_2 biosensor tasarımı için sığır karaciğer katalazını yumurta kabuğunun zarına kovalent immobilize etmişlerdir. Katalaz immobilize edilmiş zar ile oksijen elektrodun yüzeyini kaplayarak oksijen seviyesindeki artışı H_2O_2 derişimi ile ilişkilendirmişlerdir. Sığır karaciğer ekstraktı 11 kat seyreltildiğinde ve immobilizasyon süresi 5 dk. olduğunda en uygun sonuçları elde etmişlerdir. Biosensor pH 5-10 aralığında güvenilir sonuçlar ve 0-500 μM tampon derişimi aralığında sabit sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Biosensörün en uygun çalışma sıcaklığını 25°C olarak rapor etmişlerdir. İmmobilize katalazın raf ömrünü incelediklerinde 4°C de 3 ay bekletilen biosensorün başlangıç aktivitesinin % 95'ini gösterirken 7 ay bekletilenin % 85'ini gösterdiğini, 23°C de bekletilen biosensorün 3 ay sonunda başlangıç aktivitesinin % 80'ini, 7 ay sonunda % 70'ini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Costa ve Reis, (2004), *Scytalidium* mikroorganizmasından elde edilen katalazı mısır nişastasının selüloz asetatla karıştırılması ile hazırlanan polimere (SCA) ve polikrapolaktonla karıştırılması ile hazırlanan polimere (SPCL) kovalent ve adsorpsiyon olmak üzere iki şekilde immobilize etmişlerdir. Kovalent immobilizasyon çalışmalarında destekler epiklorohidrin (ECH) ile aktifleştirmişler ve polietilenamin arakolunu kullanmışlardır. Siyanojen bromür ve 3-APTES ile aktifleştirilmiş desteğe pH 3-12 aralığında 19 saat immobilizasyon yapılmıştır. Adsorpsiyon ile immobilizasyonda ise destekleri aktifleştirmeden doğrudan kullanmışlardır. ECH ile aktifleştirilmiş polietilenamin ara kolu üzerinden SCA ve SPCL'ye kovalent immobilize edilen katalazın % kalan aktivitesini pH 10,0'da %

30,4 ve % 28,1 olarak belirlemişlerdir. CNBr ile aktifleştirilmiş desteğe immobilize edilen katalazın % kalan aktivitesi pH 9,0'da SCA için % 3,60 SPCL için % 20,6 olarak bulmuşlardır. 3-APTES ile aktifleştirilmiş desteğe immobilize edilen katalazın aktivitesini pH 8,0'de SCA için % 28,2, SPCL için % 16,6 olarak belirlemişlerdir. Adsorpsiyon ile immobilizasyonda aktiviteyi pH 9,0'da SCA için % 18,6, pH 10,0'da SPCL için % 16,6 olarak hesaplamışlardır. ECH ile aktifleştirilen polietilenamin ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın pH 7,4'te 50,0 mM fosfat tamponunda 37°C'de bekletildiğinde yarı ömrünün SCA'da 1162 saat, SPCL'de 870 saat; 3-aminopropiltrietoksisilan ile aktifleştirilmiş desteğe immobilize edilen katalazın yarı ömrünün SCA'da 730 saat, SPCL'de 605 saat; CNBr ile aktifleştirilmiş desteğe immobilize edilen katalazın yarı ömrünün SCA'da 620 saat, SPCL'de 540 saat; adsorpisyon ile immobilize edilen katalazın yarı ömrünün ise SCA'da 72 saat, SPCL'de 24 saat ve serbest katalazın yarı ömrünün 480 saat olduğunu belirlemişlerdir.

Kubal ve D'Souza, (2004), maya hücresini yumurta akına glutaraldehit kullanarak immobilize etmişlerdir. 4°C ve 27°C'de yapılan immobilizasyon çalışmalarında 4°C'deki katalaz aktivitesinin daha yüksek olduğunu ve en uygun immobilizasyon süresinin 2 saat olduğunu belirlemişlerdir. 300 ml süte 500 ppm H_2O_2 katıldığında 8 g immobilize katalaz varlığında H_2O_2'nin 45 dakikada tükendiğini ve immobilize katalazın 5 günde 10 kez kullanıldığında aktivite kaybetmediğini bildirmişlerdir.

Eberhardt ve ark., (2004), *Aspergillus niger* kaynaklı katalazı γ-Al_2O_3, $FeCl_2$ muamele edilmiş γ-Al_2O_3'e adsorpsiyon yöntemi ile, glutaraldehit kullanarak kitosan ve selüloz desteklere kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Katalaz/γ-Al_2O_3 sisteminde enzimin inaktif olduğunu, $FeCl_2$ uygulanmış destekte ise aktif olduğunu belirlemişlerdir. γ-Al_2O_3–katalaz etkileşiminin güçlü olduğunu bu nedenle bu desteğin enzimin denatürasyonuna neden olduğunu rapor etmişlerdir. Aluminyumoksit $FeCl_2$ ile muamele edildiğinde Fe-Cl türleri aluminyumoksitte yeni bağlanma bölgelerinin oluşabileceğini bildirmişlerdir. γ-Al_2O_3, $FeCl_2$-γ-Al_2O_3, glutaraldehit-selüloz, glutaraldehit-kitosan desteklere bağlanan katalaz miktarını

sırası ile 3,4, 17,3, 2,0 ve 1,8 mg enzim / g destek olarak bulmuşlardır. 13,2 mM H_2O_2 derişiminde yapılan aktivite ölçümünde selüloza immobilize edilen katalaz 445 U/mg enzim aktivite gösterirken 6 ay 5°C'de saklandıktan sonra aktivitesini 1279 U/mg enzim olarak bildirmişlerdir. Selüloza immobilize edilen katalazın saklama süresi sonunda aktivitesinin artmasının zamanla enzimle destek arasında çoklu bağlanmaların olabileceğine ve enzimin karmaşık yapısının açılması sonucunda enzimde meydana gelen şekilsel değişimine bağlı olabileceğini rapor etmişlerdir. Kitosana immobilize edilen katalazın 6 ay sonunda aktivitesini tamamen kaybettiğini bildirmişlerdir. Kitosana immobilize edilen enzimin zamanla destek yüzeyinde bulunan $-NH_2$ grupları ile uygun olmayan etkileşimler yapması sonucu aktivitesini kaybedebileceğini bildirmişlerdir. Serbest katalaz için K_m değerini 0,02664±0,00674 M, V_{max} değerini 35120±6762 μmol dk.$^{-1}$ mg enzim^{-1}, glutaraldehit-selüloz desteğe immobilize edilen katalazın 5°C'de pH 7,0'de 6 ay depolanmasından sonra ölçülen K_m değerini 0,115±0,0116 M, V_{max} değerini 3135±203,8 μmol dk.$^{-1}$ mg enzim^{-1}olarak bildirmişlerdir.

Tükel ve Alptekin, (2004), sığır karaciğer katalazını florisil'e (magnezyum silikat) glutaraldehit veya glutaraldehit+3-aminopropiyonik asit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Serbest enzim için optimum pH 7,5, tampon derişimini 50 mM, sıcaklığı 25ºC; glutaraldehit üzerinden immobilize enzim için optimum pH 6,5, tampon derişimini 50 mM, sıcaklığı 35ºC ve glutaraldehit+ara kol üzerinden immobilize enzim için optimum pH 7,5, tampon derişimi 50 mM ve sıcaklığı 25ºC olarak belirlemişlerdir. Serbest katalaz, glutaraldehit üzerinden immobilize katalaz ve glutaraldehit+ara kol üzerinden immobilize katalaz için K_m değerlerini sırasıyla 28,6±3,6 mM, 285,7±32,6 mM ve 40,0±4,1 mM; V_{max} değerlerini sırasıyla 142,8(±15,1)×10^3 μmol H_2O_2/mg prot. dk., 1,4(±0,1)×10^3 μmol H_2O_2/mg prot. dk. ve 0,4(±0,04)×10^{3}μmol H_2O_2/mg prot. dk. olarak bulmuşlardır. Serbest katalaz ve glutaraldehit üzerinden immobilize edilen katalaz ve glutaraldehit+ara kol üzerinden immobilize edilen katalaz için oda sıcaklığında yarı ömrü sırasıyla 2 gün, 55 gün ve 10 gün; 5ºC de ise yarı ömrü sırasıyla 4 gün, 85 gün ve 107 gün olarak belirlemişlerdir. Glutaraldehit üzerinden immobilize edilen katalazın 20 kez kullanıldığında başlangıç aktivitesinin % 90'nını koruduğunu;

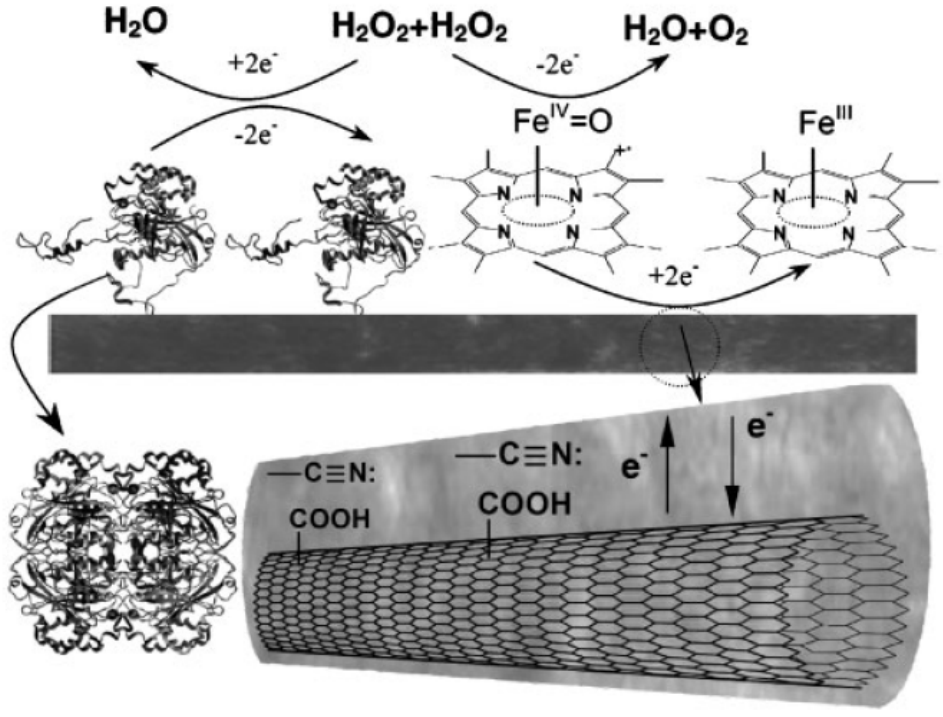
glutaraldehit+arakol üzerinden immobilize edilen katalazın ise başlangıç aktivitesinin % 30'nu koruduğunu bildirmişlerdir.

Avila ve ark., (2004), sığır karaciğer katalazını tetraetoksisilan (TEOS), su ve 0,04 M HCl çözeltisinden oluşan karışımını kullanarak silika cama enkapsülasyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon için en uygun TEOS-su-HCl oranının 2,5:0,4:0,1 (v/v/v) olduğunu bildirmişlerdir. Serbest katalaz için V_{max} ve K_m değerlerinin sırasıyla 238,3 µmol O_2/mg prot. dk. ve 27,9 µM olduğunu, immobilize katalaz için ise bu değerlerin sırasıyla 85,8 µmol O_2/ mg prot. dk. ve 38,8 µM olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize katalazın doldurulduğu kolona 5 ml 14 mM H_2O_2 çözeltisini 0,5 ml/dk. akış hızında göndermişler ve H_2O_2'nin parçalanma yüzdesini incelemişlerdir. İmmobilize enzim 3 defa aynı şekilde kullanıldığında H_2O_2'nin başlangıç miktarının yaklaşık % 50'sinin parçalandığını bildirmişlerdir.

Alkan ve ark., (2005), sığır karaciğer katalazını bentonite adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Serbest katalaz için optimum pH 7,0 iken immobilize katalaz için optimum pH'yı 8,0 olarak bulmuşlardır. Serbest ve immobilize katalazın her ikisininde 250 mM fosfat tamponunda en fazla aktivite gösterdiğini bununla birlikte immobilize katalazın aktivitesinin tampon derişiminden daha fazla etkilendiğini bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize katalazın her ikisininde maksimum aktivitelerini 30ºC de gösterdiğini bildirmişlerdir. Serbest katalaz için K_m değerini 13,90 mM, V_{max} değerini 65,78 µM/dk., immobilize katalaz için ise K_m değerini 13,22 mM ve V_{max} değerini 55,86µM/dk. olarak bildirmişlerdir.

Wang ve ark., (2007), Sığır karaciğer katalazını poli(akrilonitril-ko-akrilik asit) (PANCAA) ile kaplanmış iletken özellikteki nanofibere ve çok katmanlı karbon nanotüp (MWCNTs) içeren PANCAA nanofibere kovalent olarak immobilize etmişlerdir. PANCA/MWCNTs boyunca H_2O_2'den immobilize katalaza elektron aktarımının şematik gösterimi Şekil 2.1'de verilmiştir. Farklı immobilizasyon sürelerinde (0-8 saat) yaptıkları immobilizasyon çalışmalarında desteğe bağlanan miktar ve immobilize katalazın aktivitesini dikkate aldıklarında 3 saatin en uygun süre olduğuna karar vermişlerdir. Desteğe bağlanan katalaz miktarı 2 saatten sonra çok fazla artmazken en yüksek aktiviteyi 3 saat immobilize edilen katalaz örneklerinde bulmuşlardır. Serbest katalaz için K_m 34,07 mM, V_{max} 12124,68 U mg

prot.$^{-1}$, PANCAA'ya immobilize edilmiş katalaz için K_m 77,9 mM, V_{max} 9243,00 U mg prot.$^{-1}$ ve PANCAA/MWCNTs'ye immobilize katalaz için K_m 58,14 mM, V_{max} değeri 10179,21 U mg prot.$^{-1}$ olarak rapor edilmiştir. Serbest ve immobilize katalaz örneklerinin optimum pH'larını 7,5, serbest katalazın optimum sıcaklığını 25ºC, immobilize katalaz örneklerinin her ikisi içinde 35ºC olarak bildirmişlerdir. Serbest katalaz 50ºC'de 2 saat bekletildiğinde başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 55'ini, immobilize katalaz örneklerinin ise başlangıç aktivitelerinin % 40'nı kaybettiğini bildirmişlerdir. Kesikli tip reaktörde immobilize katalaz örnekleri 9 kullanım sonunda başlangıç aktivitelerinin yaklaşık % 60'ını kaybettiğini bildirmişlerdir. PANCAA/MWCNTs desteğe immobilize edilen katalazın aktivitesinin PANCAA nanofibere immobilize edilen katalaza göre daha yüksek olmasının nedenini karbon nanotüpün π sistemi ve yük-transfer kompleksi aracılığıyla elektron transferini geliştirmek veya karbon nanotüpün modifikasyonu ile biyo-uyumun sağlanması olabileceğini rapor etmişlerdir.



Şekil 2.1. PANCA/MWCNTs boyunca H_2O_2'den immobilize katalaza elektron taşınmasının şematik gösterimi.

Yoon ve ark., (2007), *Aspergillus* kaynaklı katalazı kitosana hapsetme yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Katalazın % 61'inin immobilize olduğunu ve immobilizasyondan sonra katalazın başlangıç aktivitesinin % 7,9'unu gösterdiğini bildirmişlerdir. Sürekli reaktörde 3 ml/dk. akış hızında çeşitli pH'larda (4,0, 7,2 ve 10,0), sıcaklıklarda (20, 40, 60 ve 70ºC) ve H_2O_2 derişimlerinde (10, 30 ve 50 mM) immobilize katalazın kullanımını incelemişlerdir. Denenen tüm koşullar için 24 saat sonunda başlangıçtaki H_2O_2'nin % 98'inin parçalandığını bildirmişlerdir. Kitosana tutuklanmış katalazı silikat ile kapladıklarında immobilize katalazın başlangıç aktivitesinin % 3,7'sini gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu immobilize katalazı sürekli reaktörde kullandıklarında pH 7,2'de 20ºC'de 100 mM H_2O_2'nin yaklaşık % 90'ını parçaladığını, silikat ile kaplanmamış immobilize katalazın ise ancak H_2O_2'in yaklaşık % 35'ini parçaladığını bildirmişlerdir. Ayrıca kitosana tutuklanmış katalazın silikat ile kaplanması sonucunda pH 2,0 ve 90ºC gibi sert koşullarda performansının arttığını bildirmişlerdir.

Çetinus ve ark., (2007), sığır karaciğer katalazını kitosan ve cibacron blue F3GA bağlı kitosan boncuklara adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Kitosan boncuklarının katalaz adsorplama kapasitesinin (0,74 mg/g destek) boya bağlı kitosan boncuklardan (0,39 mg/g destek) daha yüksek olmasına rağmen boya bağlı kitosan boncuklara adsorbe edilen katalazın aktivitesininin kitosan boncuklara adsorbe edilenlerden daha yüksek bulmuşlardır. Serbest katalaz, kitosan ve cibacron blue F3GA bağlı kitosan boncuklara immobilize edilen katalazlar için K_m değerini sırasıyla 35, 18 ve 41 mM, V_{max} değerini ise 32000, 4800 ve 14250 µmol mg prot.$^{-1}$ dk.$^{-1}$ olarak bildirmişlerdir. Her iki immobilize katalaz için optimum sıcaklığı 35ºC ve optimum pH'yı 7,0 olarak belirlemişlerdir. 25-65ºC aralığında serbest ve immobilize katalaz örneklerinin termal kararlılığını incelemişler ve 35-45ºC aralığında immobilize katalaz örneklerinin termal kararlılığının daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. 100 gün boyunca 4ºC'de serbest ve immobilize katalaz örneklerinin depolama kararlılıklarını incelemişler ve serbest katalazın 20-25 gün, kitosan boncuğa immobilize edilen katalazın 60 gün, boya bağlı kitosan boncuğu immobilize edilen katalazın 70 gün sonunda başlangıç aktivitelerinin % 50'sinin kaldığını bildirmişlerdir. İmmobilize katalaz örneklerinin kesikli reaktörde 7-8 kez

kullanılmasından sonra başlangıç aktivitelerinin % 50'sinin kaldığını bildirmişlerdir. Desteklerden katalaz desorbe edilip tekrar desteklere katalaz immobilize ederek desteğin tekrar kullanımını incelemişler ve desteklerin kullanım sayısının 4 olduğunu bildirmişlerdir.

Opwis ve ark., (2007), sığır karaciğer katalazını polietilentereftalata (PET) kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Öncelikle katalazı alilglisidil eter kullanarak modifiye etmişler daha sonra PET ile UV ışığı (222nm) altında fotokimyasal olarak bağlamışlardır. 1,0 g desteğe yaklaşık 60 mg enzim bağladıklarını bildirmişlerdir. İmmobilizasyon işleminden sonra immobilize katalazın, serbest katalazın aktivitesinin % 5'ini gösterdiğini bildirmişlerdir. İmmobilize katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanımını incelemişler ve 30 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 60'nı gösterdiğini bildirmişlerdir.

Wan ve ark., (2007), sığır karaciğer katalazını, karbon nanotüp (CNT) ile karıştırılmış yada karıştırılmamış porfirin (CoPP) halkası takılmış poliakrilonitril (PAN) bazlı polimere kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Karbon nanotüpler genelde elektron alıcı, porfirinler ise elektron verici olarak görev almaktadırlar. Katalaz destek yüzeyinde bulunan karboksil gruplarının N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid hidroklorür ve N-hidroksisüksinimid (EDC/NHS) ile aktifleştirilmesinden sonra bağlanmıştır. Porfirin ve karbon nanotüplerin katalazın kararlılığının ve aktivitesinin artmasını sağladığını bildirmişlerdir. PAN, PANCNT, PANCoPP, PANCoNT/CNT desteklerine immobilize edilen katalaz örneklerinin aktivitelerinin serbest katalazın aktivitesinin yaklaşık % 32, % 45, % 39 ve % 48'i olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilizasyondan sonra enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH (7,0) değişmezken, immobilize enzimin pH değişimine serbest enzime göre daha az duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Serbest katalaz maktimum aktivitesini 25ºC'de gösterirken immobilize katalaz örneklerinin 35ºC'de maksimum aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. İmmobilize enzimlerin 4ºC'deki depolama kararlılığının serbest enzimden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Wan ve ark., (2008), sığır karaciğer katalazını, çok katmanlı karbon nanotüp (MWCNT) ile karıştırılmış yada karıştırılmamış poli(akrilonitril-ko-N-vinil-2-pirolidon) (PANCNVP) ve poliakrilonitrile (PAN) kovalent olarak immobilize

etmişlerdir. Serbest katalaz, PAN, PAN/MWCNTs, PANCNVP ve PANCNVP/MWCNTs üzerine immobilize edilen katalaz örnekleri için K_m değerlerini ise sırasıyla 34,2±1,3, 82,3±3,5, 65,1±3,0, 80,4±3,4 ve 66,8±2,5 mM olarak, V_{max} değerlerini sırasıyla 12124,7±101,3, 9077,4±90,1, 10063,9±107,2, 9550,7±88,4 ve 11044,8±98,3 U mg prot.$^{-1}$ olarak bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz örnekleri en yüksek aktiviteyi pH 7,5'de gösterirken serbest katalazın en yüksek aktiviteyi 25ºC'de, immobilize katalaz örneklerinin ise 35ºC'de gösterdiklerini bildirmişlerdir. 10 kullanımdan sonra immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri başlangıç aktivitelerinin yaklaşık % 50-60'ı aralığında olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize katalaz örneklerinin 4ºC'deki depolama kararlılıklarının serbest katalazdan daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Alptekin ve ark., (2008), sığır karaciğer katalazını yumurta kabuğuna glutaraldehit kullanarak immobilize etmişlerdir. Farklı miktarlarda katalaz kullanılarak yapılan immobilizasyon çalışmalarında 1,0 g destek için 85 mg katalaz miktarının immobilizasyon için en uygun değer olduğunu bildirmişleridir. Desteğe bağlanan katalazın miktarını belirlemek için katalazın yapısında bulunan demirin indüktif eşleşmiş plazma (ICP) kullanarak belirlenmesinden yararlanmışlardır. İmmobilize enzimin en uygun çalışma ortamının 30ºC'de pH'sı 6,0 olan 75 mM sitrat tamponunda gösterdiğini bildirmişlerdir. İmmobilize katalazın katalitik etkinliğinin serbest enziminkinin % 0,2'si kadar olduğunu bildirmişlerdir. 30ºC'de 15 saat bekletilen immobilize katalazın başlangıç aktivitesinin % 88'ini gösterdiğini, oda sıcaklığında saklanan immobilize katalazın 36 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 65'ini gösterirken 5 ºC'de bu değerin % 96 olduğunu bildirmişlerdir. 1,0 g immobilize katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanımını incelediklerinde 80 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 73'ünün kaldığını bildirmişlerdir.

Öztürk ve ark., (2008), at dalağından saflaştırılan katalazı bentonite (Bent) ve sisteinin kovalent olarak bağlandığı bentonite (Bent-Cys) adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Destek ile ilgili yaptıkları karakterizasyon çalışmalarında Bent ve Bent-Cys için yüzey alanını sırasıyla 33,00±0,30 ve 22,80±0,30 m^2/g olarak bildirmişlerdir. Farklı pH'larda (4,0-8,0) yapılan immobilizasyon çalışmalarında Bent-Cys desteğe katalazın izoelektrik noktasına (6,4) yakın pH'larda desteğe

oldukça fazla adsorbe olduğunu (pH 6,0'da 172,4 mg/g destek) hâlbuki Bent desteğe adsorbe olan katalazın miktarının ortam pH'sından etkilenmediğini tüm pH'larda benzer miktarda bağlandığını (5 mg/g'dan daha düşük) bildirmişlerdir. Farklı katalaz derişimlerinde (0,1-2,0 mg/ml) yaptıkları immobilizasyon çalışmalarında Bent-Cys desteğe bağlanan katalaz miktarının 1,0 mg/ml katalaz derişimine kadar arttığını (175 mg/g destek) bu derişimin üstünde değişmediğini, Bent desteğe immobilize edilen katalazın miktarının başlangıç katalaz derişimi ile fazla değişmediğini 1,0 mg/ ml katalaz derişiminde desteğe bağlanan katalaz miktarının 2,7 mg/g olduğunu bildirmişlerdir. Serbest katalaz için K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 21,6 mM ve $244{,}7x10^3$ U/mg, Bent-Cys desteğe immobilize edilmiş katalaz örneği için ise sırasıyla 29,8 mM ve $128x10^3$ U/mg olarak bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz için optimum sıcaklığı 25 ve 35ºC olarak, optimum pH'yı her ikisi için de 7,0 olarak bildirmişlerdir. Kesikli tip reaktörde immobilize katalazın tekrar kullanımını incelediklerinde 12 kullanım sonunda immobilize katalazın başlangıç aktivitesinin % 45'ini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Wang ve ark., (2008), keten kumaşı $NaIO_4$ ile oksitleyerek 2,3-dialdehit selüloz oluşturmuşlar ve bu materyale katalazı kovalent immobilize etmişlerdir. Desteğin modifikasyonu sırasında bazı optimizasyon çalışmaları yapmışlardır. En uygun $NaIO_4$ derişimini 0,2 mol/L, en uygun oksidasyon süresini 8 saat, oksidasyon pH'sını 6,0 ve oksidasyon sıcaklığını ise 40ºC olarak bildirmişlerdir. Aktiviteleri farklı katalaz çözeltileri (5-150 U/ml) kullanarak yapılan immobilizasyon çalışmalarında 120 U/ml katalaz derişimine kadar aktivitenin arttığını bu derişimin üstünde fazla değişmediğini bu nedenle immobilizasyon için en uygun katalaz miktarının 120 U/ml olduğunu bildirmişlerdir. Farklı sürelerde yapılan immobilizasyon çalışmalarında (2-28 saat) 24 saatin yeterli olduğunu, bu sürenin üstünde enzim aktivitesinin değişmediğini bildirmişlerdir. Başlangıçta ortama eklenen katalazın ünitesinden immobilizasyon işleminden sonra yapılan yıkamada süzüntüde ölçülen aktivite değerini çıkartarak başlangıçtaki aktiviteye oranlamışlar (% protein kazanım) ve bu değeri % 30,26 olarak belirlemişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz için optimum sıcaklığı sırasıyla 30 ve 40ºC olarak, optimum pH'yı ise her ikisi için 7,0 olarak belirlemişlerdir. Kesikli tip reaktörde immobilize

enzimin tekrar kullanımını incelemişler ve 3 kullanımdan sonra immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin % 40'ını gösterebildiğini bildirmişlerdir.

Çetinus ve ark., (2009), sığır karaciğer katalazını glutaraldehit ile modifiye edilmiş kitosana (Ch) ve Cu^{2+} iyonunun adsorbe edildiği kitosana (Ch-Cu) immobilize etmişlerdir. Ch ve Ch-Cu desteklere immobilize edilen katalazın miktarını sırasıyla 0,074 mg/g destek (% 51,7) ve 0,115 mg/g destek (% 79,3) olarak bildirmişlerdir. Serbest katalaz, Ch-katalaz ve Ch-Cu-katalaz örnekleri için V_{max} değerlerini sırasıyla 32000 U/mg prot. 4800 U/mg prot. ve 18450 U/mg prot. olarak, K_m değerlerini sırasıyla 35 mM, 18 mM ve 53 mM olarak bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz örnekleri en yüksek aktivitelerini 35 ºC'de göstermişler ve Ch-Cu-katalaz örneğinin 25-35 ºC'de termal kararlılığının diğer örneklerden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize katalaz örneklerinin kesikli tip reaktörde tekrar kullanımlarını incelediklerinde Ch-katalaz örneğinin yaklaşık 7 kullanımdan sonra Ch-Cu-katalaz örneğinin ise yaklaşık 13 kullanımdan sonra başlangıçtaki aktivitelerinin % 50'sinin koruduğunu rapor etmişlerdir.

Itoh ve ark., (2009), sığır karaciğer katalazını yaklaşık 7 nm (FSM-7) ve 2,6 nm (FSM-16) çapında hekzagonal yapıda düzenli kanalları bulunan gözenekli silikalara adsorbe ederek immobilize etmişlerdir. Gözeneklerdeki katalazı görüntülemek için katalaza amin-reaktif floresan boyayı bağlayarak floresan mikroskobu kullanmışlardır. Floresan işaretleme işleminin enzime zarar vermesini engellemek için bir katalaz molekülü başına 2 boya molekülü olacak şekilde işaretleme işlemini gerçekleştirmişlerdir. FSM-7'ye adsorplanan katalaz miktarı 0,24 mg/m^2 iken bu değerin FSM-16'ya adsorplanan katalaz için yaklaşık 0,04 mg/m^2 olduğunu, bu farklılığın ise FSM-7'nin gözenek büyüklüğünün FSM-16'dan daha büyük olması ve katalazın gözeneklerin içine daha kolay girebilmesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Katalazın molekül büyüklüğünün (yaklaşık 7 nm×8 nm×10 nm) FSM-7'nin gözenek büyüklüğünden (7 nm) biraz büyük olmasına rağmen gözeneklerden içeri girebilmesini enzimin yapısal esnekliğinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Serbest katalaz, FSM-16-katalaz ve FSM-7-katalaz örnekleri için H_2O_2 parçalama hızları sırasıyla 62 mmol/mg dk., 52 mmol/ mg dk. ve 23 mmol/mg dk. olarak bildirmişlerdir. FSM-7'ye adsorbe olan katalazın FSM-16'ya

adsorbe olandan aktivitesinin daha düşük olmasını FSM-16'da katalazın yüzeyde adsorbe olmasına ve FSM-7'ye adsorbe olan katalazın gözenek içinde bulunmasından dolayı substratın difüzyon hızının azalmasına bağlamışlardır. FSM-7'ye adsorbe edilmiş katalazın serbest katalaza göre tripsine karşı daha dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca FSM-7-katalaz örneğinin etanol fazında H_2O_2'yi parçalarken serbest katalazın parçalamadığını rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Sigma firması tarafından sağlanmıştır.

3.1.1. Kimyasallar

Bu çalışmada sığır karaciğer katalazı (C–100, 44500 U/mg protein), aseton, glutaraldehit (GA), 3-aminopropil trietoksisilan (3-APTES), 5-aminopentanoik asit (5-APA), 6-amino hekzanoik asit (6-AHA), 1,4 bütandiol diglisidil eter (1,4 BDDGE), polietilenglikol diglisidil eter (PEGDGE), 1-siklohekzil-3-(2-morfolinoetil) karbodiimid metho-p-toluen sülfonat (CDI), % 2'lik (w/v) ninhidrin çözeltisi, hidrojen peroksit, nitrik asit, aseton, sodyum karbonat, sodyum hidroksit, bakır (II) sülfat, potasyum sitrat, folin-ciocalteu çözelisi, sığır serum albumini, potasyum monohidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat kullanılmıştır.

Katalazın immobilizasyonunda destek materyali olarak florisil (partikül büyüklüğü 150-250 µm, gözenek büyüklüğü 6-8 nm ve yüzey alanı 170-300 m^2/g), gözeneksiz cam boncuk (NPG, partikül büyüklüğü 150-212 µm), gözenekleri kontrollü cam boncuk (CPG, partikül büyüklüğü 37-74 µm; gözenek büyüklükleri 70, 100 nm ve 215 nm ve yüzey alanları sırasıyla 39,4, 21,8 ve 7,4 m^2/ g), Eupergit C ve Eupergit C 250L kullanılmıştır.

3.1.2. Araç ve Gereçler

Bu çalışmada UV-Vis spektrofotometre (ATI UNICAM), pH metre (HANNA 8424), magnetik karıştırıcı, soğutmalı inkübatör (BINDER), deriştirici (CHRIST RVC2-18), pompa sistemi (BIO RAD), soğutmalı santrifüj (HETTICH), elektrikli terazi, otomatik pipet, girdap karıştırıcı kullanılmıştır. Ayrıca immobilizasyonda

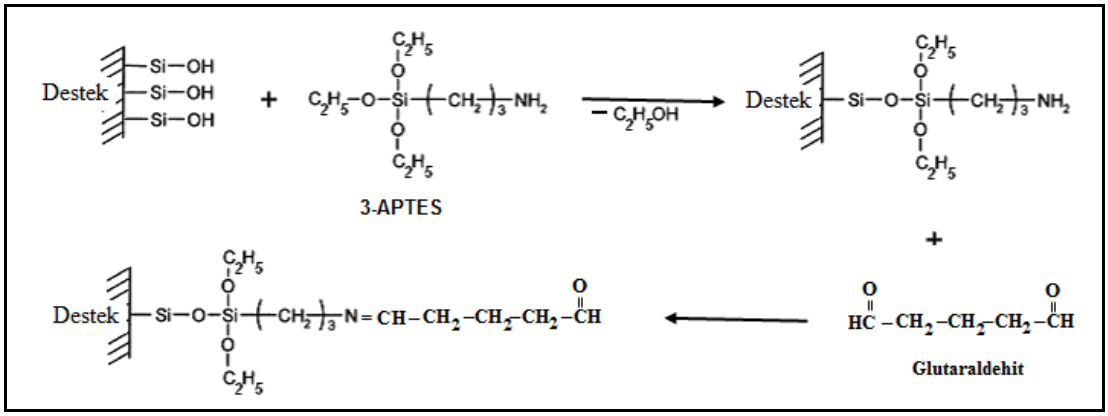
kullanılan desteklerin ve immobilize katalaz örneklerinin görüntülerinin incelenmesi için Erciyes Üniversitesinde bulunan Leo-440 taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Florisil ve Cam Desteklerin Hazırlanması

Katalazın immobilizasyonunda kullanılacak olan florisil ve cam desteklerin katalaz immobilizasyonundan önce yüzeylerinin aktifleştirilmesi ve daha sonra glutaraldehit ile muamele edilmesi gerekmektedir. Bu desteklerin aktifleştirilmesinde Weethall (1976) tarafından bildirilen yöntem esas alınarak, 3-APTES ile desteğin alkilamin türevi (silanlama) oluşturulmuştur. 10 g destek materyali 50 ml % 5 (v/v)'lik nitrik asit ile 80-90ºC'de 1 saat muamele edildikten sonra su ile yıkanmış ve 120ºC'de 1 gece kurutulmuştur. Kurutulmuş desteğin 1,0 gramı % 4'lük (v/v) 3-APTES'in aseton içerisindeki çözeltisine eklenerek 45°C'de 24 saat bekletilmiştir. Saf su ile yıkanarak 115°C'de etüvde 1 gece kurutulmuştur (Şekil 3.1). Alkilamin türevine glutaraldehitin bağlanmasında Cho ve Rhee (1993) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 1 g alkilamin türevine 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda % 2,5 (w/v) olacak şekilde hazırlanmış glutaraldehit çözeltisinden 25 ml eklenerek oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Destek saf su ile süzüntüde glutaraldehit gözlenmeyinceye kadar iyice yıkanmıştır (Şekil 3.1). Süzüntüde glutaraldehit olup olmadığını kontrol etmek için literatürde Boratynski ve Zal'ın (1990) önerdiği yöntem kullanılmıştır. Bu yönteme göre önce $10x10^{-4}$ M GA çözeltisi hazırlanmış, bu çözeltiden 10 farklı derişimde ($8,0x10^{-6}$- $25x10^{-5}$ M) seyreltilerek hazırlanan GA çözeltilerinden 500 µL'lik porsiyonlar deney tüplerine konulmuştur. Tüplerin üzerlerine 2,5 ml fenol ayıracı (40 µL % 5 (w/v)'lik fenol çözeltisi, 10 ml % 70 (w/w)'lik $HClO_4$ ile karıştırılmış) eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiş daha sonra 479 nm'de köre karşı absorbansları okunmuştur. Elde edilen absorbans değerlerinden bir standart grafik çizilmiştir. Yıkama süzüntüsünden alınan 500

µL'lik örnekler aynı işlemlerden geçirilerek örneğin 479 nm'de absorbansının olup olmadığı kontrol edilmiştir.



Şekil 3.1. Florisil ve cam desteklerin 3-APTES ile silanlanması ve glutaraldehit muamelesi sırasında meydana gelen reaksiyonlar.

3.2.2. Florisil ve Cam Desteklerde Silanlama Sonrası ve Glutaraldehit ile Aktifleştirme Sonrasında Kalan Serbest Amino Gruplarının Tayini

Florisil ve cam destekler silanlandıktan sonra destek yüzeyinde bulunan amino grubunun miktarı belirlenmiştir. Literatürde 3-APTES ile silanlanan florisil ve cam desteklerde amino grubunun miktarının tayini ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle literatürde amino grubu miktarının tayini için Hermanson ve ark. (1992) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem esas alınmıştır. Aynı yöntem silanlanan desteklerin glutaraldehit ile etkileştirilmesinden sonra glutaraldehit bağlanmadan kalan serbest $–NH_2$ grubu tayini içinde kullanılmıştır. Yöntemin esası, $–NH_2$ grubunun ninhidrinle verdiği reaksiyon sonucunda oluşan kompleksin (Şekil 3.2) etanol fazına alınarak spektrofotometrik olarak 570 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. Bunun için,

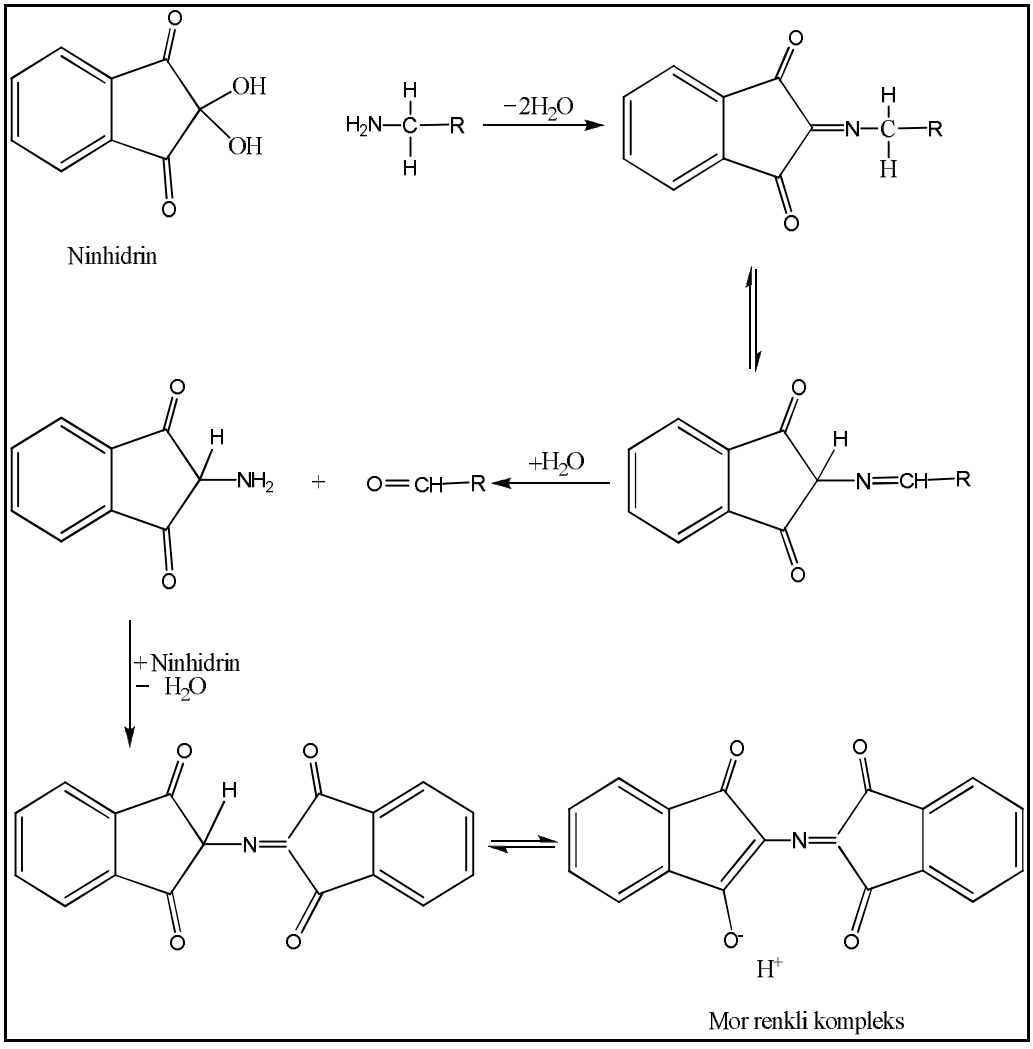
1. Derişimi $6x10^{-4}$, $9x10^{-4}$, $12x10^{-4}$, $15x10^{-4}$, $18x10^{-4}$, $21x10^{-4}$M olan 3-APTES çözeltileri hazırlanmıştır.
2. Hazırlanan çözeltilerden 100 µL tüplere alınarak ve üzerine 200 µL ninhidrin (% 2 (w/v)) çözeltisi eklenmiştir. Kör tüp için 100 µL su alınarak üzerine 200 µL ninhidrin çözeltisi eklenmiştir.

3. Tüpler 15 dakika kaynayan su banyosunda bekletildikten sonra buz banyosunda soğutulması için bekletilmiştir.

4. Her bir tüpe 50:50 etanol:su karışımından 5 ml eklenerek girdap karıştırıcıda karıştırılmıştır.

5. Çözeltilerin absorbansı köre karşı 570 nm'de okunmuştur.

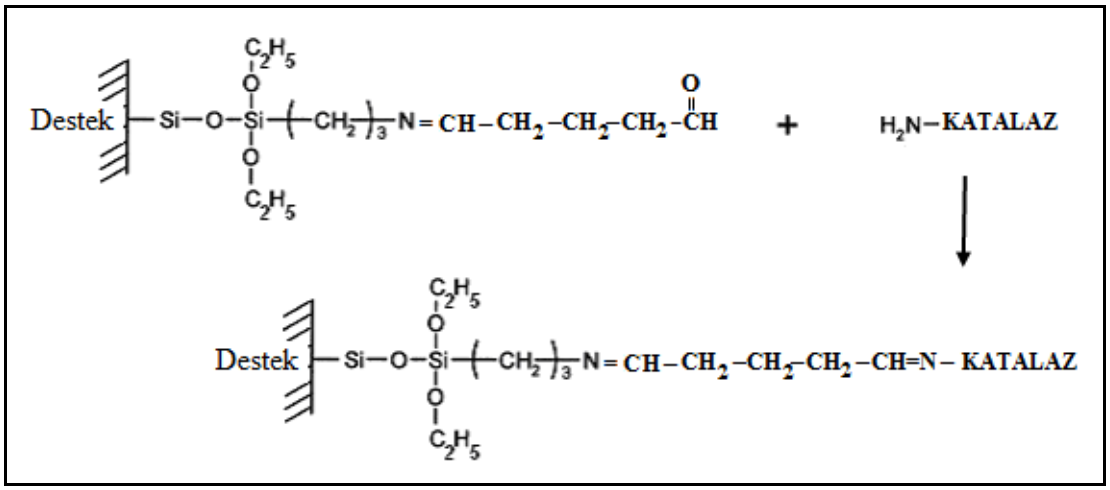
Amino grubu belirlenecek destek materyalinden 10 mg tartılarak üzerine 100 µL su eklendikten sonra standart çalışmasındaki basamaklar aynen uygulanmıştır. Örnekler 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra oluşan kompleks etanol-su fazına alınarak absorbansı 570 nm'de okunmuştur. Örneğin absorbansı standart grafik kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. Ninhidrinin $–NH_2$ grubu ile verdiği reaksiyon.

3.2.3. Katalazın Glutaraldehit Üzerinden Florisile ve Cam Desteklere Kovalent İmmobilizasyonu

Katalazın florisile ve cam desteklere glutaraldehit üzerinden kovalent immobilizasyonunda, literatürde katalazın aluminyum oksit üzerine kovalent immobilizasyonu için bildirilen yöntem esas alınmıştır (Costa ve ark., 2001). Katalazın florisile ve NPG'ye immobilizasyonunda 1,0 g desteğe derişimi 1,0 mg/ml olacak şekilde pH 7,0, 50 mM fosfat tamponu ile hazırlanan katalaz çözeltisinin 4,0 ml'si eklenerek oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır (Şekil 3.3). Katalazın CPG'ye immobilizasyonunda 1,0 g destek için 4,0 ml katalaz çözeltisi yetersiz gelmiş ve kullanılan enzim çözeltisi ancak desteğin ıslanmasını sağlamıştır. Bu nedenle CPG'ye yapılan immobilizasyon çalışmalarında yine aynı koşullarda 1 g destek için 8,0 ml katalaz çözeltisi kullanılmıştır.



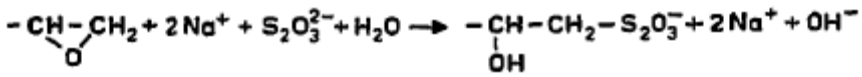
Şekil 3.3. Silanlanmış ve glutaraldehit ile muamele edilmiş florisile ve cam desteklere katalazın immobilizasyonunda, destekler ile enzim arasında meydana gelen reaksiyon.

İmmobilizasyon sonunda immobilize katalaz örneği tampon ile iyice yıkanarak serbest katalaz ortamdan uzaklaştırılmıştır. Serbest katalazın tamamen uzaklaştığı süzüntünün 280 nm'deki absorbansının takip edilmesiyle belirlenmiştir. Daha sonra süzüntülerde protein miktarı tayini Lowry ve ark. (1951) önerdiği yönteme göre yapılmıştır. Süzüntüdeki protein miktarından immobilizasyonun

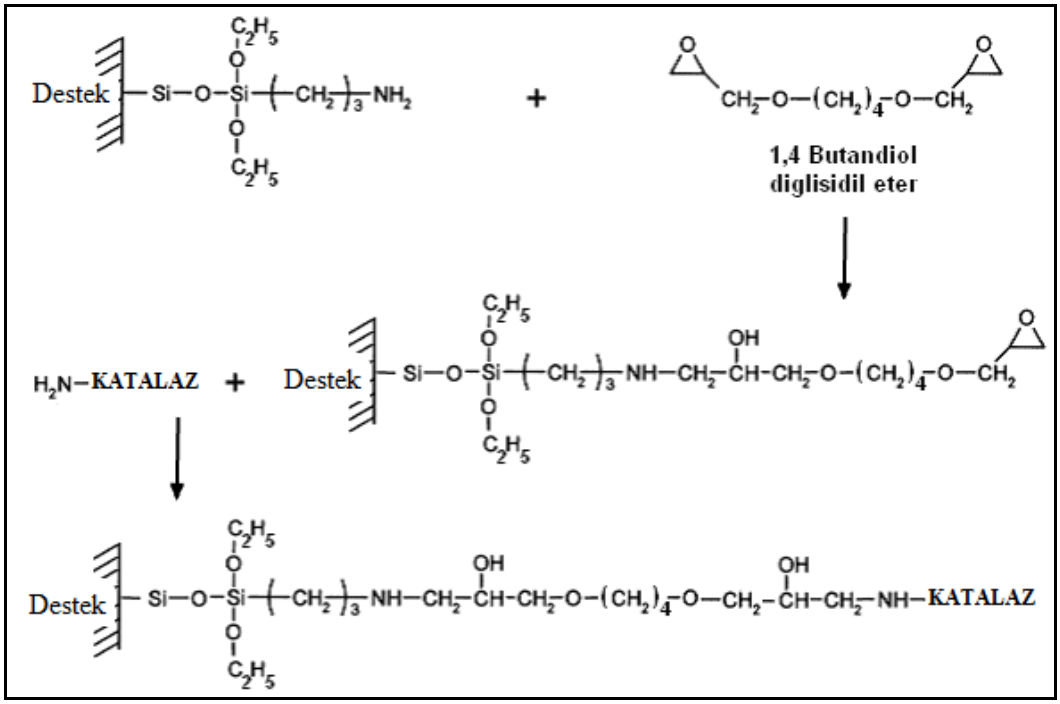
başlangıcında ortama konulan katalaz miktarı çıkartılarak 1,0 g destek başına bağlanan enzim miktarı hesaplanmıştır. Katalazın immobilizasyonunda her bir destek için immobilizasyon koşulları optimize edilmiştir.

3.2.4. Katalazın 1,4 BDDGE ve PEGDGE Ara Kolları Üzerinden CPG'ye ve Florisile Kovalent İmmobilizasyonu

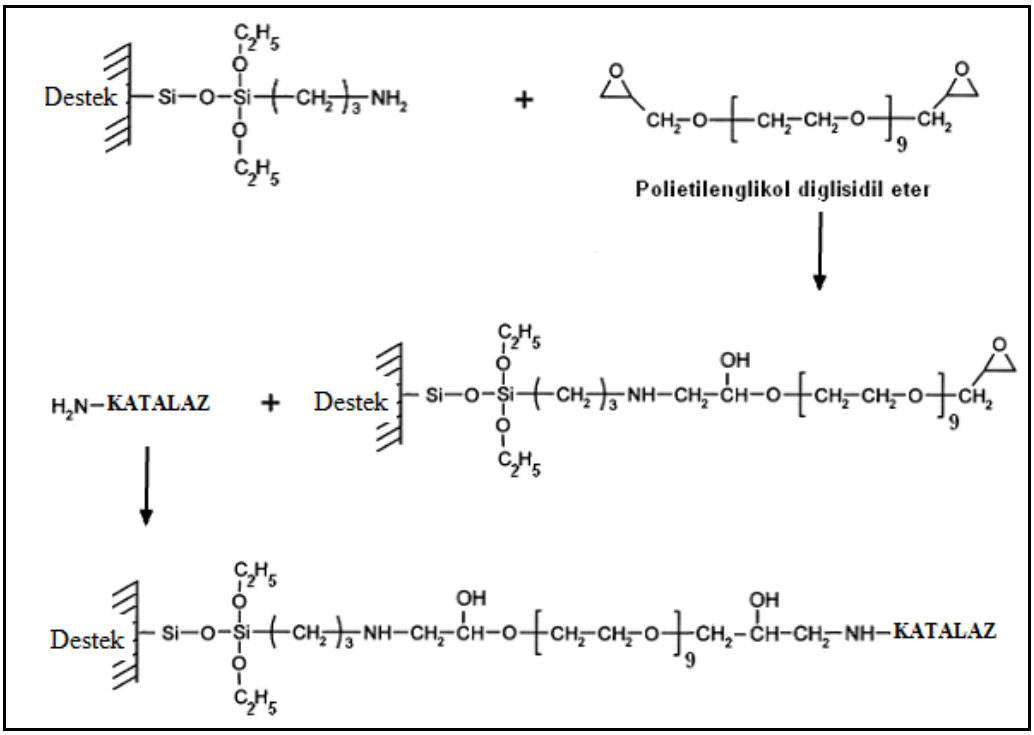
Katalazın florisile ve CPG'ye 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları üzerinden immobilizasyonunda El-Zahab ve ark. (2004) önerdiği yöntem esas alınmıştır. 1,0 g silanlanmış destek 8,0 ml 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 1,0 g 1,4 BDDGE veya 1,0 g PEGDGE içerecek şekilde hazırlanan çözelti ile oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmıştır. Destek saf su ile yıkanarak ve oda sıcaklığında 1 gece bekletilmiştir. Destekte bulunan oksiran grubunun miktarının belirlenmesi için literatürde Sundberg ve Porath (1974) tarafından önerilen yöntemden faydalanılmıştır. 1,4 BDDGE veya PEGDGE ara kolları ile aktifleştirilmiş CPG'den 0,5 g alınarak üzerine derişimi 1,3 M olan $Na_2S_2O_3$ çözeltisinden 2,6 ml eklenmiştir.. Aşağıda gösterilen reaksiyon sonucunda açığa çıkan OH^-, ayarlı 0,1 M HCl çözeltisi ile pH 7,0 oluncaya kadar titre edilmiştir. Stokiyometrik olarak harcanan HCl çözeltisinin hacminden oksiran grubunun miktarı g destek başına hesaplanmıştır.



Ara kollar ile aktifleştirilmiş florisilden veya CPG'den 1,0 g alınarak üzerine 4,0 ml (CPG için 8,0 ml) pH 7,0, 50 mM fosfat tamponunda 1,0 mg/ml derişiminde hazırlanmış katalaz çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmıştır (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5). Daha sonra immobilize katalaz örnekleri aynı tampon ile yıkanarak, süzüntülerde protein tayini yapılmış ve inkübatörde 5ºC'de 1 gece bekletilerek kullanılmıştır.



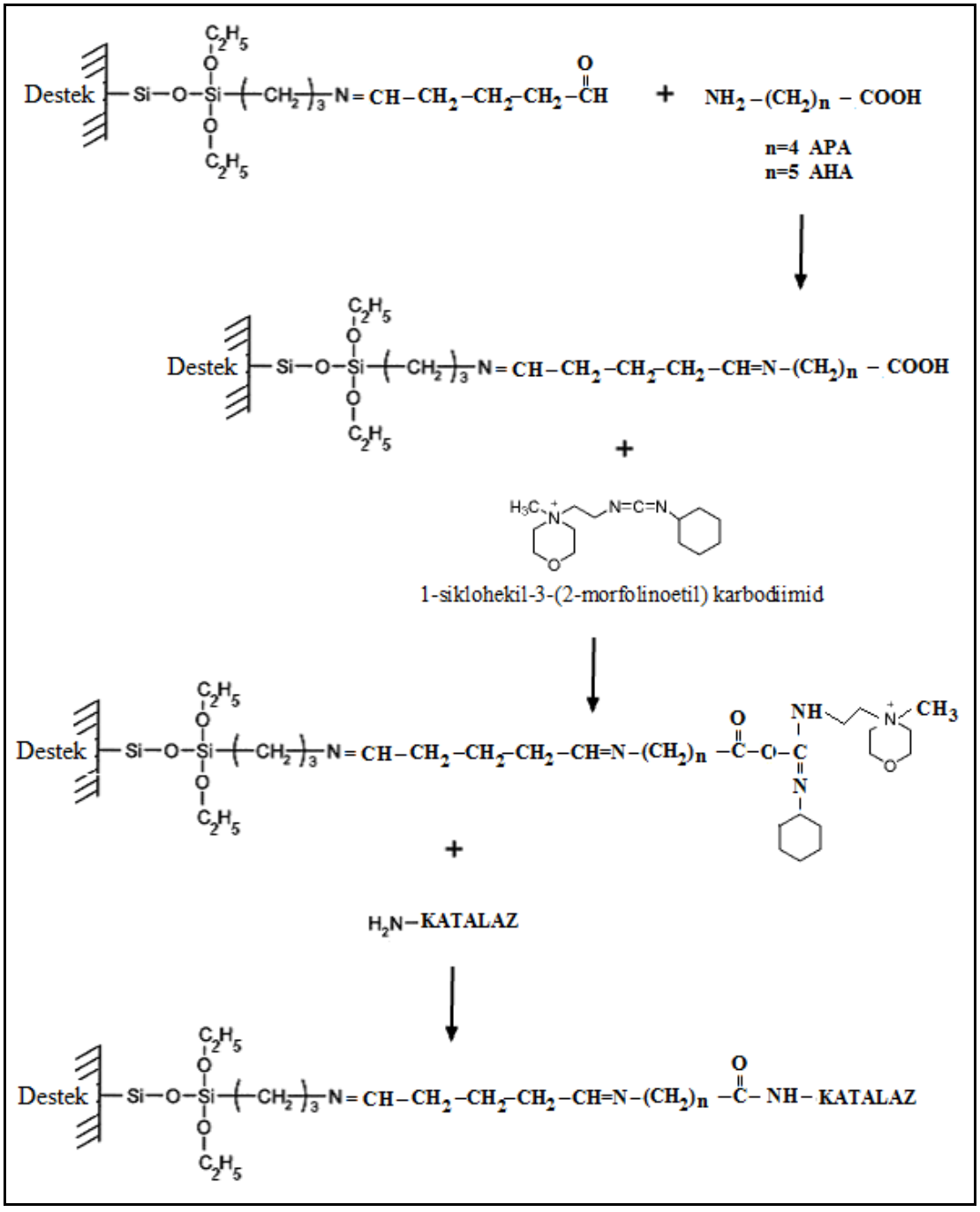
Şekil 3.4. Silanlanmış florisil ve CPG'ye 1,4 BDDGE ara kolunun bağlanması ve bu desteklere katalazın immobilizasyonu sırasında meydana gelen reaksiyonlar.



Şekil 3.5. Silanlanmış florisil ve CPG'ye PEGDGE ara kolunun bağlanması ve bu desteklere katalazın immobilizasyonu sırasında meydana gelen reaksiyonlar.

3.2.5. Katalazın 5-APA ve 6-AHA Ara Kolları Üzerinden Florisile ve CPG'ye İmmobilizasyonu

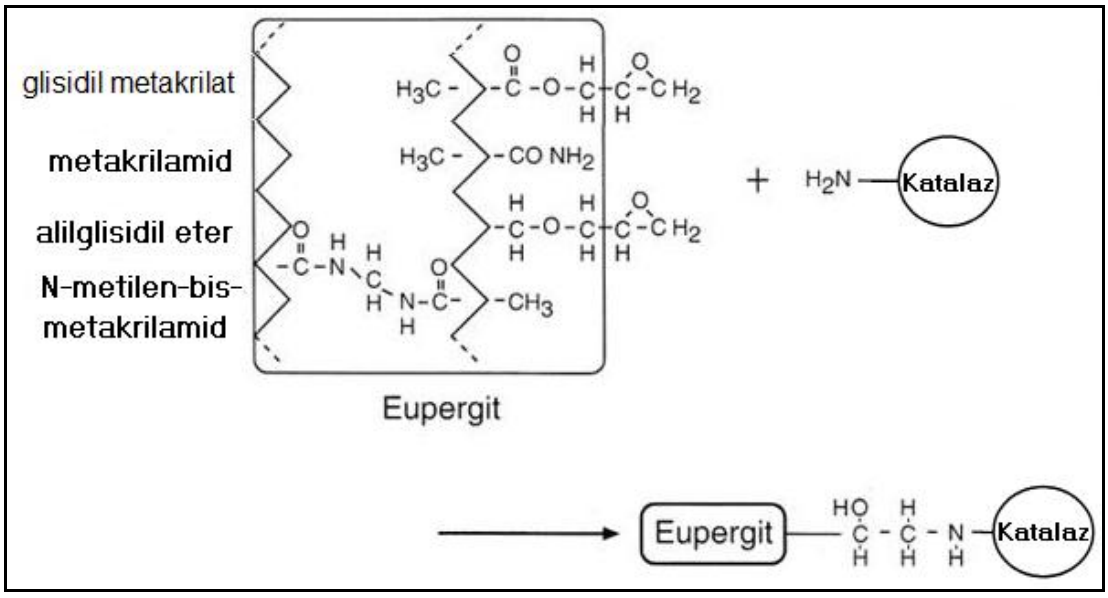
Katalazın florisile ve CPG'ye 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilizasyonunda literatürde Cho ve Rhee (1993) tarafından belirtilen yöntem kullanılmıştır (Şekil 3.6). Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş florisilden veya CPG'den 4,0 g alınarak üzerine 5-APA veya 6-AHA'nın 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanan % 1'lik (w/v) çözeltisinden 40 ml eklenmiş, oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra destek serbest 5-APA veya 6-AHA kalmayıncaya kadar saf su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. 1,0 g destek üzerine 10 ml pH 4,0 50 mM asetat tamponu ve 50 mg CDI eklenerek 2 saat karıştırılmıştır. Bu süre sonunda yine reaksiyona girmemiş CDI saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan desteğe 4,0 ml 1,0 mg/ml derişimindeki katalaz çözeltisi (pH 5,5 50 mM asetat tamponunda hazırlanmış) eklenerek oda sıcaklığında 2 saat çalkalayıcılı su banyosunda karıştırılmıştır. İmmobilize katalaz örnekleri aynı tampon ile yıkanarak, süzüntülerde protein tayini yapılmış ve inkübatörde 5ºC'de 1 gece bekletilerek kullanılmıştır.



Şekil 3.6. Silanlanmış ve glutaraldehit ile muamele edilmiş florisile ve CPG'ye 5-APA ve 6-AHA ara kollarının bağlanması ve katalazın bu desteklere immobilizasyonu sırasında meydana gelen reaksiyonlar (Cho ve Rhee, 1993).

3.2.6. Katalazın Eupergit'e Kovalent İmmobilizasyonu

Katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilizasyonu Mateo ve ark. (2000) önerdiği yöntem esas alınmıştır. 1,0 g destek 9,0 ml derişimi 1,0 mg/ml olan enzim çözeltisi (50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış) ile oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmıştır (Şekil 3.7). İmmobilize katalaz örnekleri aynı tampon ile yıkanarak, süzüntülerde protein tayini yapılmış ve inkübatörde 5ºC'de 1 gece bekletilerek kullanılmıştır. Katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edildiği koşullar optimize edilmiştir.



Şekil 3.7. Katalazın Eupergit C veya Eupergit C 250L üzerine kovalent immobilizasyonu (Katzir ve Kraemer, 2000).

3.2.7. Protein Tayini

Protein tayini için Lowry ve ark.(1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1) Çözelti A: Bu çözelti 20,0 g Na_2CO_3, 4,0 g NaOH saf suda birlikte çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

2) Çözelti B: 0,5 g $CuSO_4.5H_2O$, % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3) Çözelti C: 50 ml A çözeltisi ile 1,0 ml B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. (Kullanılacağı zaman hazırlanmasına dikkat edilmelidir.)

4) Folin-Ciocalteu çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

5) Standart protein çözeltisi: 100 ml'de 3,95 mg sığır albümini olacak şekilde % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile hazırlanmıştır.

6) Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0,0 50,0, 100,0, 125,0, 250,0, 500,0, 750,0 ve 1000,0 µL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi serum fizyolojik ile 1,0 ml'ye tamamlanarak, her tüpe 5 ml C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 ml eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuş, bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.8. Katalaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Katalaz aktivitesi Bergmeyer (1974) tarafından önerilen Lartillot ve ark. (1988) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. Enzimatik aktivite tayinin esası H_2O_2'nin 240 nm'deki absorbansının enzim ile etkileşmesinden sonra zamanla azalmasına dayanmaktadır. H_2O_2 için molar ekstinksiyon katsayısı $0.0392 cm^2/\mu mol$'dır. İmmobilize katalaz içeren 10 mg destek alınarak üzerine 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 10 mM H_2O_2 çözeltisinden 5,0 ml eklenir, 2 dk. sonunda reaksiyon 1,0 ml 1,0 M HCl çözeltisi ile durdurulmuştur. 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz alınarak 240 nm'de absorbansı ölçülmüştür (Ar). Başlagıçta H_2O_2 absorbansını (As) belirlemek için; 5,0 ml substrat ve 1,0 ml 1,0 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Proteinin neden olacağı absorbansı belirlemek için (At); immobilize katalaz içeren 10 mg destek, 5,0 ml tampon ve 1,0 ml 1 M HCl içeren karışım 4000 rpm'de 4 dk. santrifüj edilmiş ve üst faz alınarak 240 nm'de absorbansı ölçümüştür.

Enzimatik aktivitenin neden olacağı absorbans (A) değişimi;

A=(As+At)-Ar dır.

İmmobilize edilmiş katalaz için aktivite μmol H_2O_2/mg protein dk. (U/mg protein) ve μmol H_2O_2/g immobilize katalaz (U/g immobilize katalaz) şeklinde hesaplanmıştır.

3.2.9. Katalazın İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

3.2.9.1. İmmobilizasyon pH'sı ve Tampon Derişimi

1,0 mg/ml derişimindeki katalaz çözeltisi 50 mM ve farklı pH'larda (5,0, 5,5 asetat; 6,0 sitrat; 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 fosfat) tampon içinde hazırlanmıştır. Her bir desteğin 1,0 gramına daha önce belirtilen hacimlerdeki katalaz çözeltisinden (florisil ve florisil+arakol için 4,0 ml, CPG ve CPG+arakol için 8,0 ml ve Eupergit C ve Eupergit C 250 L için 9,0 ml) eklenerek 25ºC'de 2 saat süreyle etkileştirilmiştir. Daha sonra immobilizasyon tamponuyla 280 nm'de süzüntüde absorbans görülmeyinceye kadar yıkanmış, böylece bağlanmayan enzim uzaklaştırılmıştır. İmmobilizasyon işleminin başında ortamda bulunan protein miktarından süzüntüdeki protein miktarı çıkartılarak gram destek başına bağlanan mg enzim miktarı hesaplanmıştır.

Katalazın desteğe immobilizasyonunda tampon derişiminin etkisinin belirlenmesi için immobilizasyon için belirlenen en uygun pH'daki tamponun çeşitli derişimlerdeki (25–100 mM) çözeltileri kullanılarak immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilizasyon işlemi sonunda desteğe bağlan enzim miktarı ve immobilize enzimin aktivitesi ölçülmüştür.

3.2.9.2. İmmobilizasyon Sıcaklığı

İmmobilizasyon için en uygun sıcaklığın saptanması amacıyla belirlenen en uygun pH ve tampon derişiminde farklı sıcaklıklarda (5, 15 ve 25ºC) 2 saat süreyle

immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilizasyon sonunda tüm örnekleri için gram destek başına bağlanan enzim miktarı ve aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.9.3. İmmobilizasyon Süresi ve Başlangıç Katalaz Derişimi

Katalazın desteklere immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla farklı sürelerde (1, 2, 3, 7, 12 ve 24 saat) immobilizasyon yapılmıştır. Eupergit C ve Eupergit C 250 L'ye yapılan immobilizasyon çalışmalarında bu süre 96 saat kadar uzatılmıştır. İmmobilizasyon işlemi sonunda desteğe bağlan enzim miktarı ve immobilize enzimin aktivitesi ölçülmüştür.

Başlangıç katalaz derişiminin desteğe bağlanan katalaz miktarına ve immobilize katalazın aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 1,0 gram destek başına toplam katalaz miktarı 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 ve 8,0 mg olacak şekilde en uygun pH'da ve tampon derişiminde hazırlanan katalaz çözeltisi destekle belirlenen en uygun sıcaklıkta ve sürede etkileştirilmiştir. Her bir gram destek başına bağlanan enzim miktarı ve immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri (U/g immobilize katalaz) ve spesifik aktiviteleri (U/mg prot.) belirlenmiştir.

3.2.10. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Karakterizasyonu

3.2.10.1. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Optimum pH'larının Belirlenmesi

İmmobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri farklı pH'larda (5,0, 5,5 asetat; 6,0 sitrat; 6,5, 7,0, 7,5 8,0 fosfat ve 9,0 borat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 10 mM H_2O_2 çözeltisi kullanılarak 25ºC'de belirlenmiştir. Sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.2.10.2. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Optimum Tampon Derişiminin Belirlenmesi

İmmobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri daha önce belirlenmiş olan optimum pH'larda ve farklı tampon derişimlerinde (25, 50, 75 ve 100 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.10.3. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

İmmobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri daha önce belirlenmiş olan optimum pH ve tampon derişimi için farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60ºC) belirlenmiştir. Arrhenius bağıntısına göre reaksiyon hızı (V) ile aktivasyon enerjisi (E_a) arasında matematiksel ifade aşağıda verilmiştir.

$$V=k.e^{-Ea/RT}$$

R gaz sabiti, k bir katsayısıdır. Bu denklem;

$$\ln V= \ln k-E_a/RT$$

şeklinde yazılırsa, InV ile 1/T arasında çizilen grafikten aktivasyon enerjisi bulunmuştur. Aktivitenin sıcaklıkla arttığı bölge için elde edilen grafiğin eğiminden immobilize katalazın aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır.

3.2.10.4. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

İmmobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri belirlenen optimum koşullarda farklı H_2O_2 derişimlerinde (2,5-20,0 mM) ölçülerek ve Lineweaver-Burk grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Ayrıca bu veriler kullanılarak immobilize katalazın turnover sayısı (k_{cat}) ve katalitik etkinliği (k_{cat}/K_m) hesaplanmıştır.

$$k_{cat}=V_{max}/[E]_T$$

$[E]_T$, reaksiyon ortamındaki toplam enzim miktarıdır.

3.2.10.5. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

İmmobilize katalaz örneklerinin maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklıklarda ve 50ºC'de 15 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 3, 7 ve 15 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir. İmmobilize katalaz örneklerinin yarı ömrü ($t_{1/2}$, başlangıç aktivitesinin % 50'sini kaybettiği süre) aşağıdaki matematiksel ifade kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\ln V = \ln V_0 - k_i t$$

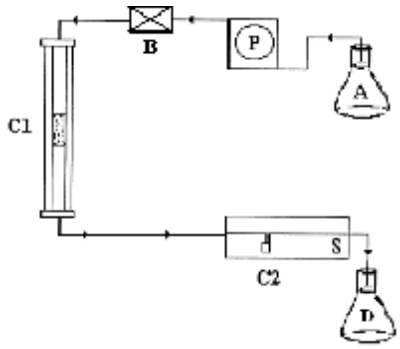
V_0 : Başlangıçtaki enzim aktivitesi
V: t süre sonunda ölçülen aktivite
ki: 1. dereceden inaktivasyon sabiti.

3.2.10.6. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

İmmobilize katalaz örneklerinin başlangıç aktiviteleri belirlenerek sonra 5ºC ve oda sıcaklığında ağzı kapalı cam tüplerde bekletilmiş ve belirli aralıklarla kalan aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.11. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Sürekli ve Kesikli Reaktörlerde Kullanımları

Florisil, CPG, Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilmiş katalaz örneklerinin sürekli reaktörde kullanımı ile ilgili Şekil 3.8'de gösterilen düzenek kurulmuştur. Reaktör olarak 2,0 mm çapında ve 15,0 cm uzunluğunda hazırlanmış cam kolonlar kullanılmıştır. Peristaltik pompa ile belirli akış hızında (2,3 ml/dk ve 5,6 ml/dk.) 10 mM H_2O_2 çözeltisi immobilize katalaz (10, 20 ve 40 mg) içeren kolona gönderilir ve kolondan çıkan çözeltinin özel olarak hazırlanmış küvette (flow cell) 240 nm'de 30 sn. aralıklarla absorbansı ölçülmüştür. Ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.



A : H_2O_2 çözeltisi
P : Peristaltik pompa
B : Valf
C1:Kolon
C2: Küvet
S : Spektrofotometre
D : Atık

Şekil 3.8. Sürekli reaktörün şematik gösterimi.

İmmobilize katalazın kesikli reaktörde kullanımının araştırılmasında ise çapı 1,0 cm, uzunluğu 7,0 cm olan cam kolonlar kullanılmıştır. İmmobilize katalaz örneklerinden 10, 20 ve 40 mg tartılarak üzerine 10 mM H_2O_2 çözeltisinden 5,0 ml eklenir ve 2 dk. sonunda çözelti kolondan hızla uzaklaştırılarak çözeltinin 240 nm'deki absorbansı ölçülmüştür. Bu işlemlere immobilize katalaz örneklerinin başlangıçtaki aktivitesinin yaklaşık % 10'u kalıncaya kadar devam edilmiştir.

Michaelis-Menten kinetiği gösteren bir enzim için inhibisyonun olmadığı, geri dönüşümsüz reaksiyonlarda, izotermal koşullarda toplam enzimin maksimum aktivitesi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır (Viseman, 1986).

$$X\text{S-}K_m\text{''}.\ln(1\text{-}X)=KE\pi/V$$

KE: Reaktördeki toplam enzimin maksimum aktivitesi (mmol/dk.)
Km'': İmmobilize enzimin Michealis-Menten hız sabiti (mM)
V: Reaktörün çalışma hacmi (L)
π: İşlem süresi (dk.)
X: Dönüşüm oranı, $(S\text{-}S_t)/S$, S substratın başlangıç derişimi, S_t ise t zaman sonundaki kalan substrat derişimi

Sürekli reaktörlerde (plug-flow) ise denklem aşağıdaki gibidir. Substrat çözeltisinin kolono giriş ve çıkış hızlarınının aynı olduğu kabul edilmiştir.

$$X\text{S-}K_m\text{''}.\ln(1\text{-}X)=KE/q=KE\pi/V$$

q: substratın akış hızı (L/dk.)

π: Substratın reaktörde kaldığı süre (dk.)

İmmobilize katalaz örnekleri arasında en yüksek aktiviteye sahip olan CPG'ye immobilize edilmiş katalaz örneklerinin kesikli ve sürekli reaktör sistemlerinde model bir çalışma olarak maksimum aktivitei toplamları (verim) hesaplanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

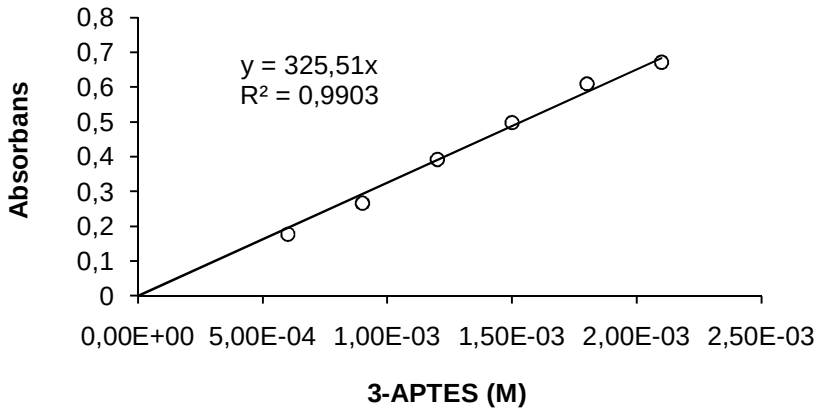
Çalışmada katalazın inorganik destekler olan florisil, NPG ve CPG, organik destekler olan Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilizasyonu araştırılmıştır. Katalazın florisil ve CPG'ye doğrudan immobilizasyonunun yanı sıra çeşitli ara kollar 1,4 BDDGE, PEGDGE, 5-APA ve 6-AHA üzerinden immobilizasyonu ile ilgili araştırmalar yapılmıştır. İmmobilizasyon çalışmaları 2 aşamada geçekleştirilmiştir. Birinci aşamada immobilizasyon koşullarının optimizasyonu yapılmıştır. Bu aşamada enzimin desteğe immobilizasyonunda en uygun koşullar (pH, tampon derişimi, sıcaklık, immobilizasyon süresi ve enzim derişimi) belirlenmiştir. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonunda immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri tüm çalışmalarda pH'sı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM H_2O_2 derişiminde 25ºC'de ölçülmüştür. İkinci aşamada ise en uygun immobilizasyon koşullarında desteğe immobilize edilen katalazın karakterizasyonu yapılmıştır. Karakterizasyon işlemleri başlıca immobilize enzimin en yüksek aktivite gösterdiği koşulların (pH, tampon derişimi, sıcaklık), kinetik parametrelerinin (V_{max}, K_m, k_{cat}, k_{cat}/K_m ve E_a) belirlenmesi, termal ve depolama kararlılıklarının belirlenmesini kapsamaktadır. İmmobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri belirlenen optimum koşullarda ölçülmüştür. İmmobilizasyonda kullanılan desteklerin ve immobilize katalaz örneklerinin taramalı elektron mikroskobunda görüntüleri incelenmiştir. İmmobilize katalaz örneklerinin kesikli ve sürekli reaktör sistemlerindeki uygulamaları araştırılmıştır. Bu araştırma sonuçları aşağıda verilen alt başlıklarda detaylı bir şekilde verilmiştir.

4.1.1. Katalazın Florisile İmmobilizasyonu

4.1.1.1. Katalazın Florisile Doğrudan İmmobilizasyonu

4.1.1.1.(1). Katalazın Florisil'e Doğrudan İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

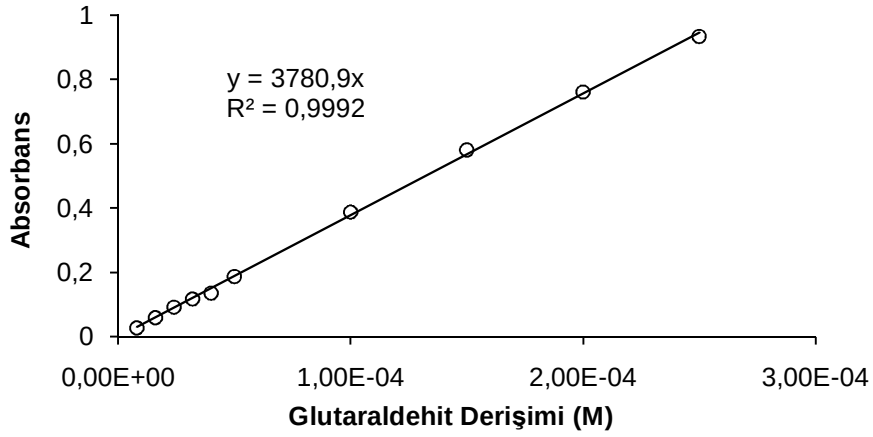
Katalazın florisile doğrudan immobilizasyonunda florisil önce HNO_3 ile yıkanmış ardından 3-APTES ile silanlanmıştır. Silanlama işlemi sonunda destek yüzeyindeki –OH gruplarına bağlanan 3-aminopropil dietoksisilil gruplarının miktarını (dolayısıyla $–NH_2$ gruplarının miktarı) spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bunun için öncelikle $–NH_2$ gruplarının belirlenmesi için farklı derişimlerde 3-APTES kullanılarak standart bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.1). Silanlanmış florisil yüzeyindeki $–NH_2$ grubu miktarı standart 3-APTES grafiği kullanılarak 270 µmol/ g destek olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. Standart 3-APTES grafiği.

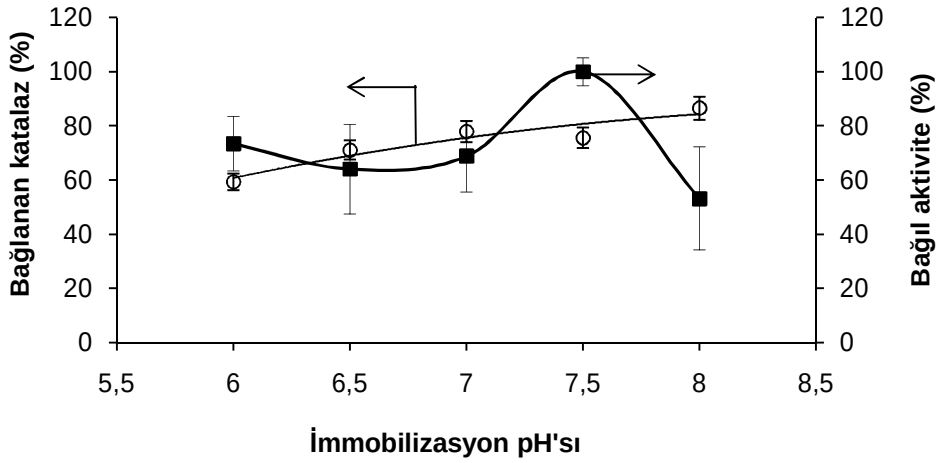
Silanlanan florisil glutaraldehit ile muamele edilmiştir. Glutaraldehit muamelesinden sonra destek, yıkama çözeltisinde glutaraldehit gelmeyinceye kadar yıkanmıştır. Destekle etkileşmeden ortamda kalan glutaraldehitin tamamen uzaklaşıp uzaklaşmadığının kontrolü için glutaraldehitin spektrofotometrik olarak

belirlenebildiği bir yöntem kullanılmıştır. Farklı derişimlerde glutaraldehit çözeltisi hazırlanarak oluşturulan standart grafik (Şekil 4.2) bu yöntemin glutaraldehitin yıkama çözeltisinde tespiti için oldukça duyarlı bir yöntem olduğunu açıkça göstermektedir. Glutaraldehit tamamen uzaklaştırıldıktan sonra destek kurutulmuştur. Glutaraldehit muamelesinden sonra destekte bulunan serbest $–NH_2$ miktarı ölçülmüştür. Bir gram destekte 24 µmol $-NH_2$ grubunun bulunduğu, böylece silanlanan destekteki $–NH_2$'nin % 91'ine glutaraldehitin bağlandığı saptanmıştır.



Şekil 4.2. Standart glutaraldehit grafiği.

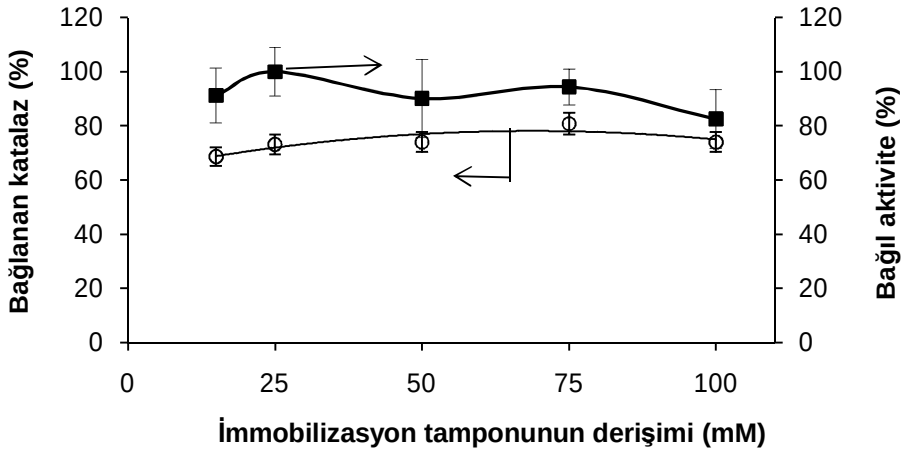
Katalazın florisile doğrudan immobilizasyonunda en uygun bağlanma pH'sının belirlenmesi için farklı pH'larda (6,0 sitrat; 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 fosfat) derişimi 50 mM olan tamponlar kullanılarak immobilizasyonlar yapılmıştır. 1,0 g destek başına derişimi 1,0 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış 4,0 ml katalaz çözeltisi kullanılarak 25ºC'de 2 saat süreyle immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri ise 25ºC'de, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 10 mM H_2O_2 varlığında ölçülmüştür. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Şekil 4.3.'den görüldüğü gibi pH 6,0–8,0 aralığında desteğe bağlanan katalaz miktarı artmakta ancak aktivitelerde paralel bir artış görülmemektedir. En yüksek aktivite pH 7,5'te immobilize edilmiş katalaz için ölçülmüştür. pH 8,0'de immobilize edilen katalaz için aktivite değeri pH 7,5'tekinin % 54'ü kadar bulunmuştur. Katalazın aktifleştirilmiş florisile doğrudan immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon pH'sı 7,5 olarak belirlenmiştir.

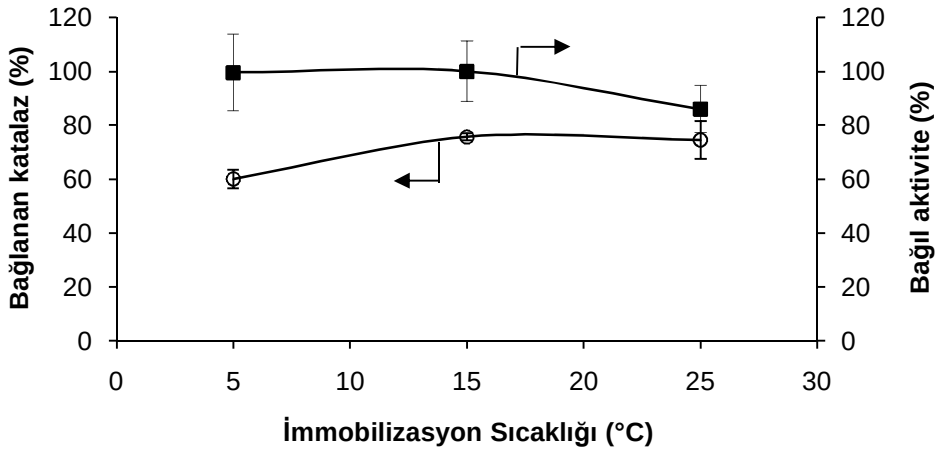
İmmobilizasyonda tampon derişiminin etkisinin belirlenmesi için çeşitli derişimlerdeki (15–100 mM) pH 7,5 fosfat tamponunda immobilizasyonlar yapılmıştır. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

İmmobilizasyon tamponunun derişimi 15–100 mM arasında değiştirildiğinde bağlanan katalaz oranında büyük bir farklılık görülmemektedir (Şekil 4.4). İmmobilize edilen katalaz örnekleri için aktiviteler incelendiğinde en yüksek aktivite 25 mM'da, en düşük aktivite ise 100 mM'da saptanmıştır. Bu nedenle immobilizasyonda en uygun tampon derişimi 25 mM olarak belirlenmiştir.

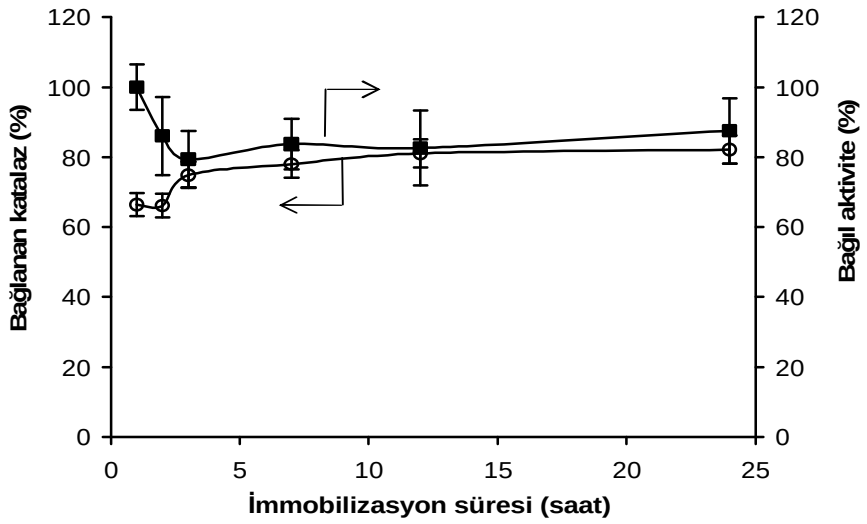
Katalazın florisile doğrudan immobilizasyonuna sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 5, 15 ve 25ºC'de immobilizasyonlar yapılmıştır. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

5ºC'de bağlanan katalaz miktarı 15ºC ve 25ºC'de bağlanan katalaz miktarından düşük iken, 15ºC ve 25ºC'de bağlanan miktarlar birbirine çok yakındır (Şekil 4.5). 5-15ºC'de yapılan immobilizasyon sonucunda immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri hemen hemen aynı olup, 25ºC'de immobilize edilen katalazın aktivitesinde hafif bir düşmenin olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda en uygun immobilizasyon sıcaklığı 15ºC olarak seçilmiştir.

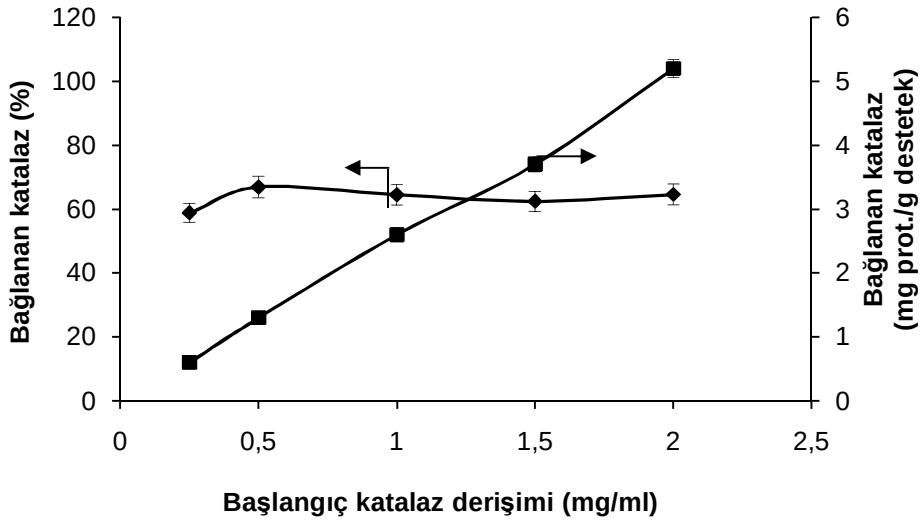
Katalazın desteğe doğrudan immobilizasyonunda immobilizasyon süresinin aktiviteye etkisi incelenmiştir. Bunun için immobilizasyon süresi 1–24 saat aralığında değiştirilerek yukarıdaki aşamalarda belirlenmiş koşullarda (pH 7,5, 25 mM fosfat tamponunda, 15ºC'de) immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

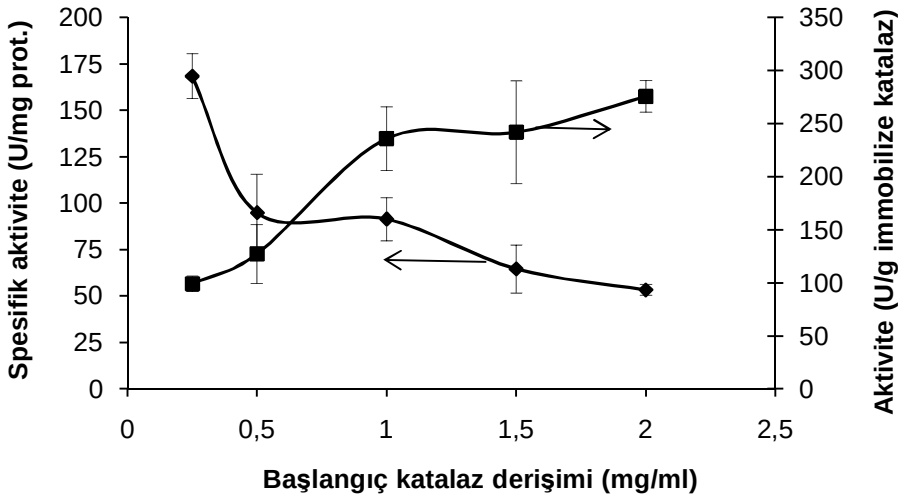
Farklı sürelerde (1–24 saat) yapılan immobilizasyon çalışmalarında en yüksek aktivite immobilizayon süresi 1 saat olan örneklerde olduğundan 1 saat immobilizasyon süresinin yeterli olduğu saptanmıştır.

Katalazın immobilizasyonunda belirlenmiş olan en uygun koşullarda (pH 7,5 25 mM fosfat tamponu, 15ºC de 1 saat immobilizasyon) 1,0 g destek başına 4,0 ml hacimdeki farklı katalaz derişimlerinde (0,25, 0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 mg/ml) immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı başlangıç katalaz derişimleri için florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve desteğe bağlanma miktarındaki değişimler Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (♦) ve desteğe bağlanma miktarındaki (■) değişimler.

Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile doğrudan yapılan immobilizasyon sonucunda katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülmüş, aktiviteleri (U/g immobilize katalaz) ve spesifik aktiviteleri (U/ mg prot.) Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

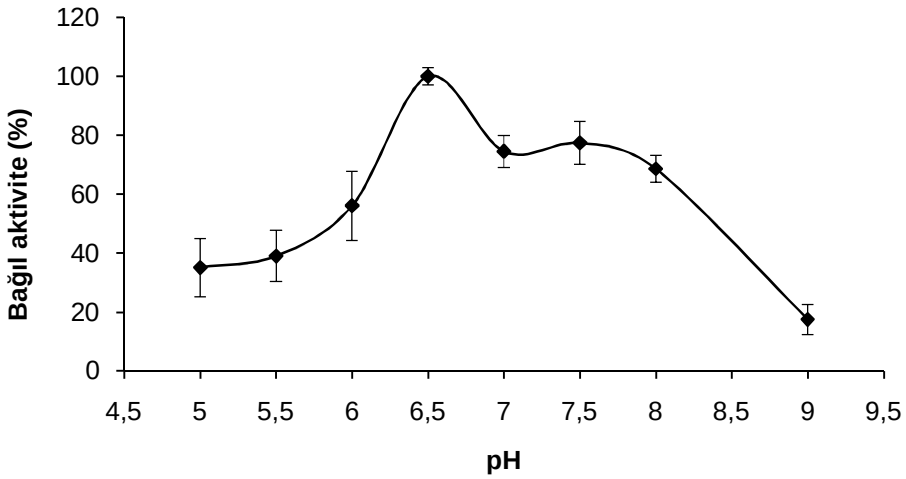


Şekil 4.8. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile doğrudan immobilize edilen katalaz örnekleri için ölçülen spesifik aktivite (♦) ve aktivite (■) değerleri.

Katalazın florisile doğrudan immobilizasyonunda katalaz miktarı arttıkça desteğe bağlanan katalaz miktarı artmış, 0,25 mg/ml katalaz derişiminin üstünde bağlanma yüzdesi açısından önemli bir değişim olmamıştır (Şekil 4.7). Aktiviteler incelendiğinde enzimin spesifik aktivitesi azalırken, gram immobilize katalaz başına hesaplanan aktivite artmıştır. 1,0 mg/ml katalaz derişimine kadar immobilize katalazın 1 gramı başına hesaplanan aktivite artarken bu derişimin üzerinde aktivitede çok önemli bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.8). Bu nedenle 1,0 mg/ml katalaz derişimi katalazın florisile doğrudan immobilizasyonunda en uygun derişim olarak belirlenmiştir.

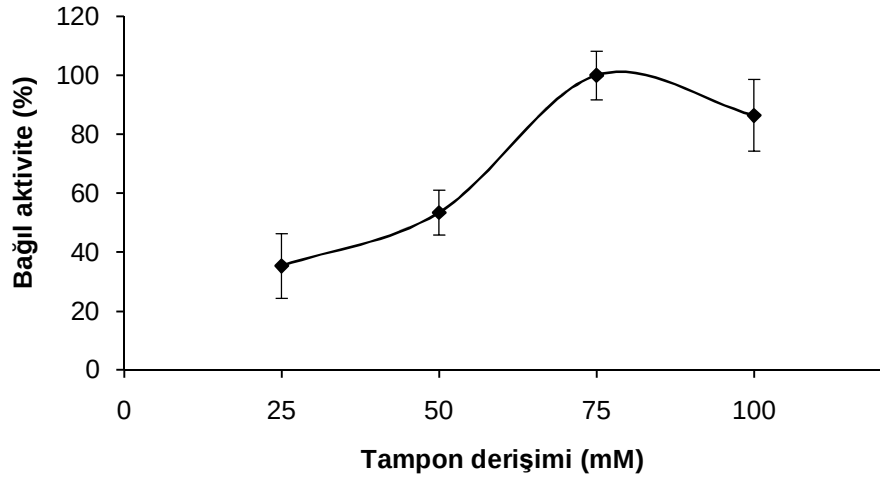
4.1.1.1.(2). Florisile Doğrudan İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Katalazın florisile doğrudan immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon koşulları belirlendikten sonra immobilize katalazın en fazla aktivite gösterdiği pH belirlenmiştir. Bunun için 50 mM pH 5,0, 5,5 asetat tamponu, 6,0 sitrat tamponu, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat tamponu ve 9,0 borat tamponunda immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülerek immobilize katalaz için optimum pH 6,5 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

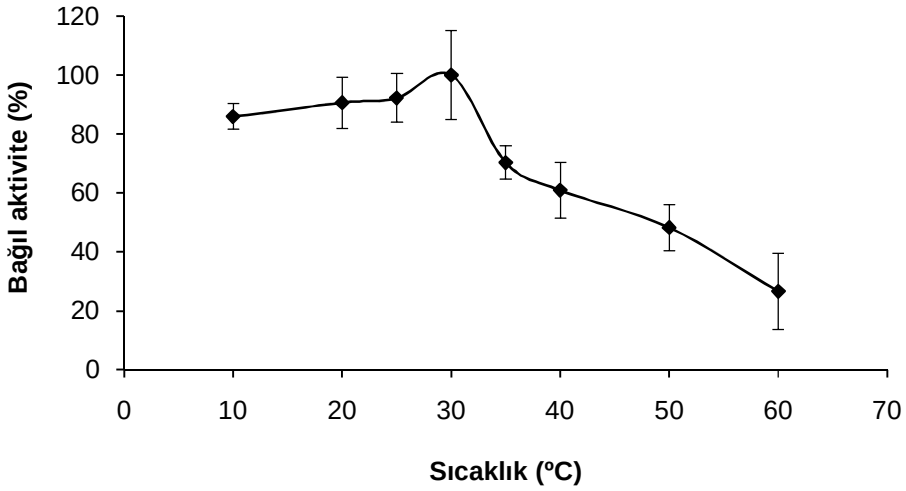
İmmobilize katalaz örneklerinin farklı derişimlerdeki (25, 50, 75 ve 100 mM) pH 6,5 fosfat tamponunda aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmiş, immobilize katalaz için optimum tampon derişimi 75 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi.

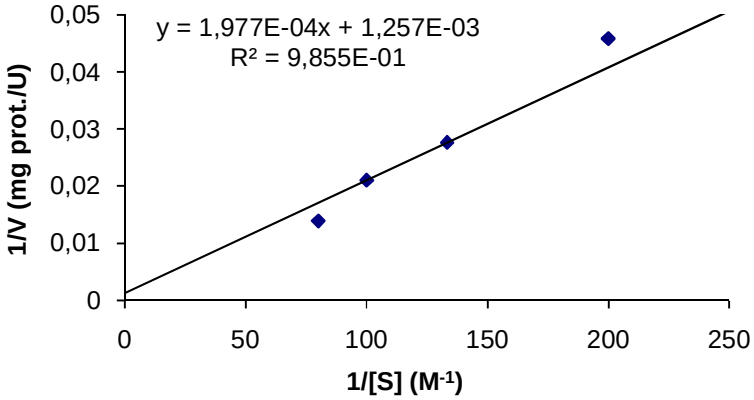
İmmobilize katalaz örneklerinin farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60ºC) aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.11'de gösterilmiş, immobilize katalaz

için optimum sıcaklık 30ºC olarak belirlenmiş, Arrhenius denkleminden aktivasyon enerjisi 3,3 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.



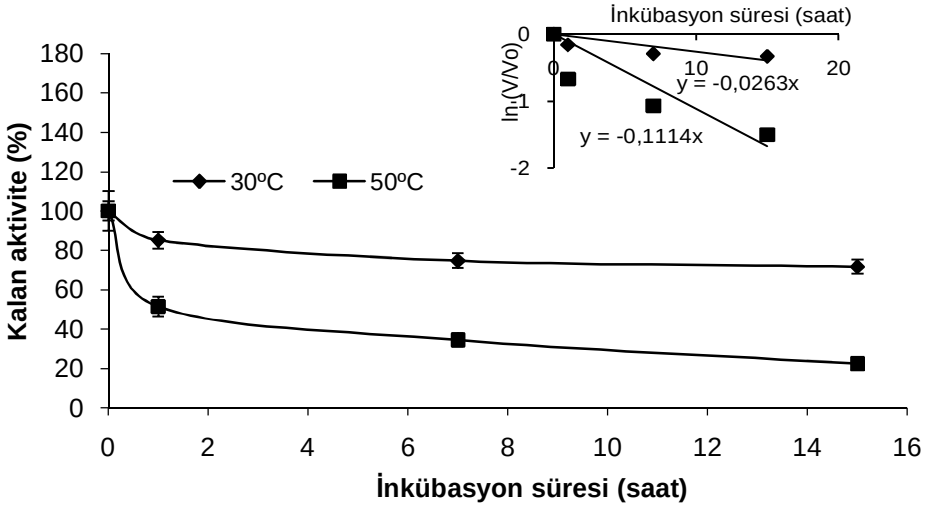
Şekil 4.11. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

Belirlenmiş olan optimum koşullarda farklı H_2O_2 derişimlerinde immobilize katalazın aktivitesi ölçülerek Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir (Şekil 4.12). İmmobilize katalaz için V_{max}=7,95x10^2 U/mg prot., K_m= 157,3 mM H_2O_2, turnover sayısı k_{cat}= 3,3x10^3 s^{-1} ve katalitik etkinliği k_{cat}/K_m=2,1x10^4 s^{-1}M^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 4.12. Florisile doğrudan immobilize edilen katalaz için Lineweaver-Burk grafiği.

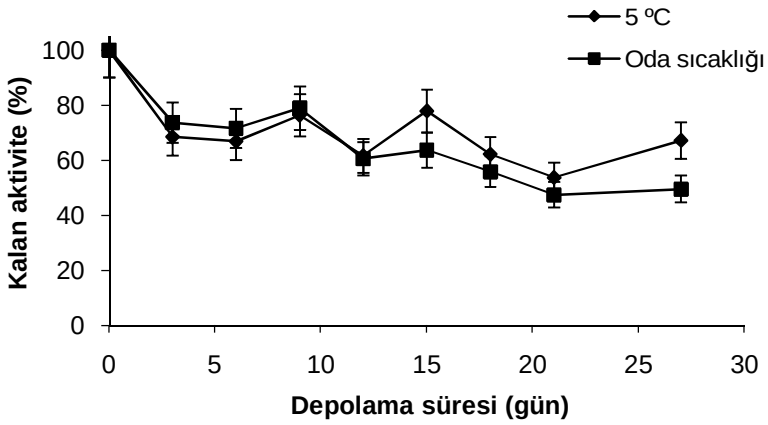
İmmobilize katalaz örnekleri 30ºC ve 50ºC sıcaklıklarda 1, 7 ve 15 saat bekletilerek belirlenmiş olan optimum koşullarda kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi. (V_0 başlangıçtaki katalaz aktivitesi, V herhangi bir zamanda ölçülen aktivite)

İmmobilize katalaz 30ºC'de 15 saat inkübe edildikten sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 72'sini korurken 50ºC'de ancak % 22'sini koruyabilmiştir. 30ºC'de bekletilen immobilize katalaz için yarı ömür 26,3 saat, 50ºC'de ise 6,2 saat olarak bulunmuştur.

İmmobilize katalaz örnekleri oda sıcaklığında ve 5ºC'de bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



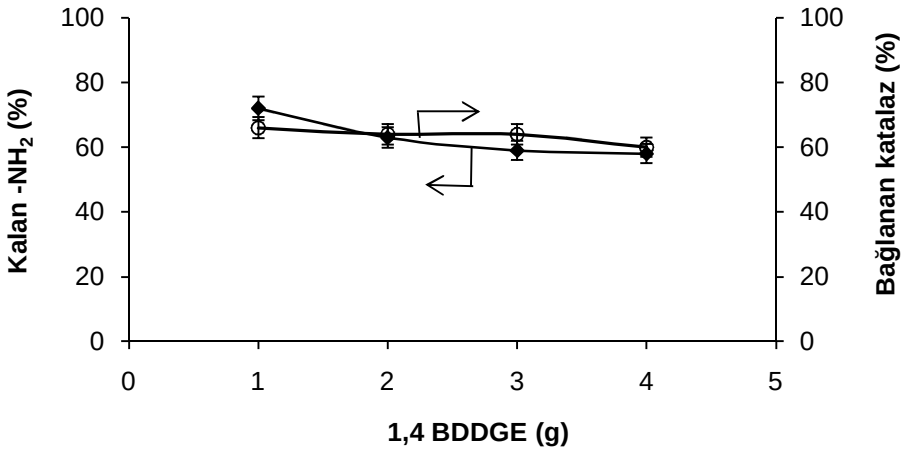
Şekil 4.14. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi.

Oda sıcaklığında saklanan immobilize katalaz 27 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 50'sini korurken, 5ºC'de saklanan immobilize katalaz aktivitesinin % 67'sini korumuştur.

4.1.1.2. Katalazın Florisile 1,4 BDDGE ve PEGDGE Ara Kolları Üzerinden İmmobilizasyonu

Katalazın silanlanmış florisile 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolu üzerinden immobilizasyonu için literatürde El-Zahab ve ark. (2004) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bir gram silanlanmış florisil 1,0 g 1,4 BDDGE içeren 8,0 ml 1,4 BDDGE veya PEGDGE çözeltisi kullanılarak destek aktifleştirilmiştir. Ara kollar ile aktifleştirilen desteğe daha sonra pH'sı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmış ve derişimi 1,0 mg/ml olan katalaz çözeltisinden 4,0 ml eklenerek oda sıcaklığında 24 saat süreyle immobilizasyon yapılmıştır. Yapılan bu çalışma sonunda immobilize katalaz örneklerinde herhangi bir aktivite tespit edilememiştir. Bunun üzerine birim destek başına kullanılan ara kol miktarının değiştirilmesi düşünülmüştür. 1,0 g silanlanmış florisil için kullanılan 1,4 BDDGE'nin reaksiyon ortamındaki toplam miktarı 1, 2, 3 ve 4 g olacak şekilde destek aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilmiş bu desteklerdeki kalan $–NH_2$ gruplarının miktarı tayin edilmiştir. Bu

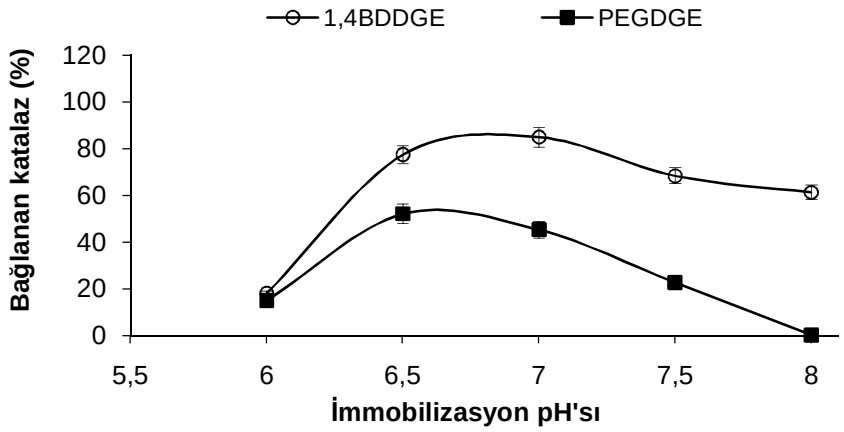
desteklere daha sonra katalaz immobilize edilmiştir. Bir gram destek için kullanılan 1,4 BDDGE'nin toplam miktarına bağlı olarak destekte kalan $-NH_2$ gruplarının ve katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler Şekil 4.15'de gösterilmiştir. Desteğin aktifleştirilmesinde kullanılan 1,4 BDDGE miktarı 1,0 g'dan 3,0 g'a arttırıldığında, destekte bulunan $-NH_2$ grubununun miktarındaki azalma % 72'den % 59'a düşerken 4,0 g kullanıldığında fazla değişmediği (% 58) bulunmuştur. Desteğe bağlanan katalazın yüzdesinde ise fazla bir değişim olmamıştır. Bu immobilize katalaz örnekleri için de aktivite saptanamamıştır.



Şekil 4.15. 1,4 BDDGE miktarına bağlı olarak destekte kalan $-NH_2$ miktarındaki (♦) ve katalaz miktarındaki (■) değişimler.

Silanlanmış florisilin farklı miktarlardaki 1,4 BDDGE'nin kullanılarak aktifleştirilmesinin immobilize katalazın aktivitesine anlamlı bir etkisi olmamıştır. Bu nedenle literatürün verdiği yöntem esas alınarak, 1,0 g silanlanmış florisil 1,0 g 1,4 BDDGE içeren 8,0 ml 1,4 BDDGE veya PEGDGE çözeltisi kullanılarak aktifleştirilmiş ve farklı pH'larda (6,0-8,0) katalazın immobilizasyonu yapılmıştır. 1,4 BDDGE veya PEGDGE ile aktifleştirilmiş desteğe bağlanan katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Her iki ara kol içinde katalazın bağlanma yüzdesi pH 6,5-7,0 dolaylarında yüksek olmakla birlikte genel olarak 1,4 BDDGE ile aktifleştirilmiş desteğe bağlanan katalaz miktarı PEGDGE ile

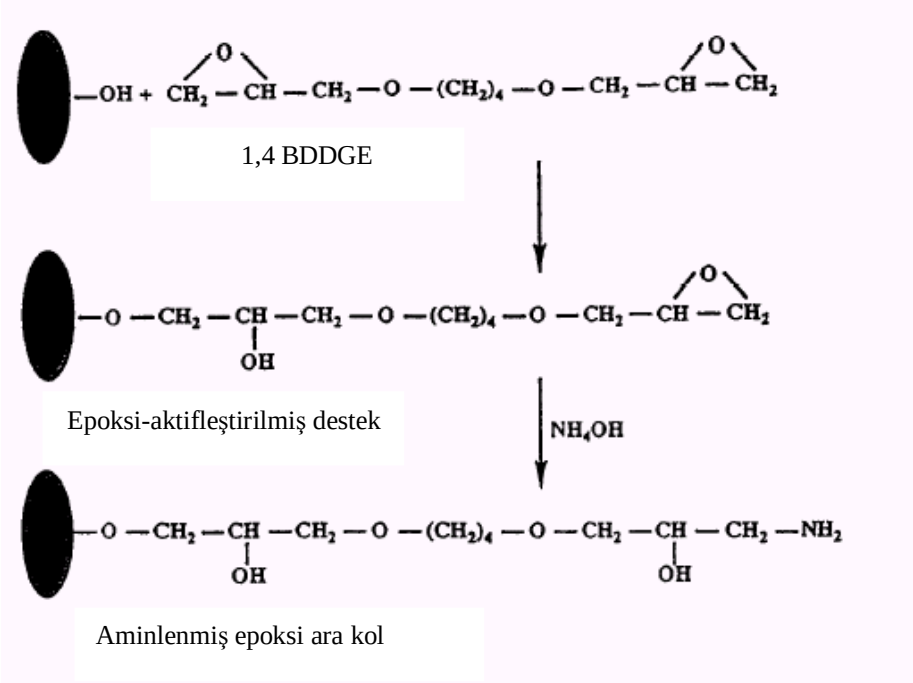
aktifleştirilenden daha fazladır. Bu immobilize katalaz örneklerinde aktiviteler incelenmiş ancak bu örneklerde de katalaz aktivitesi saptanamamıştır.



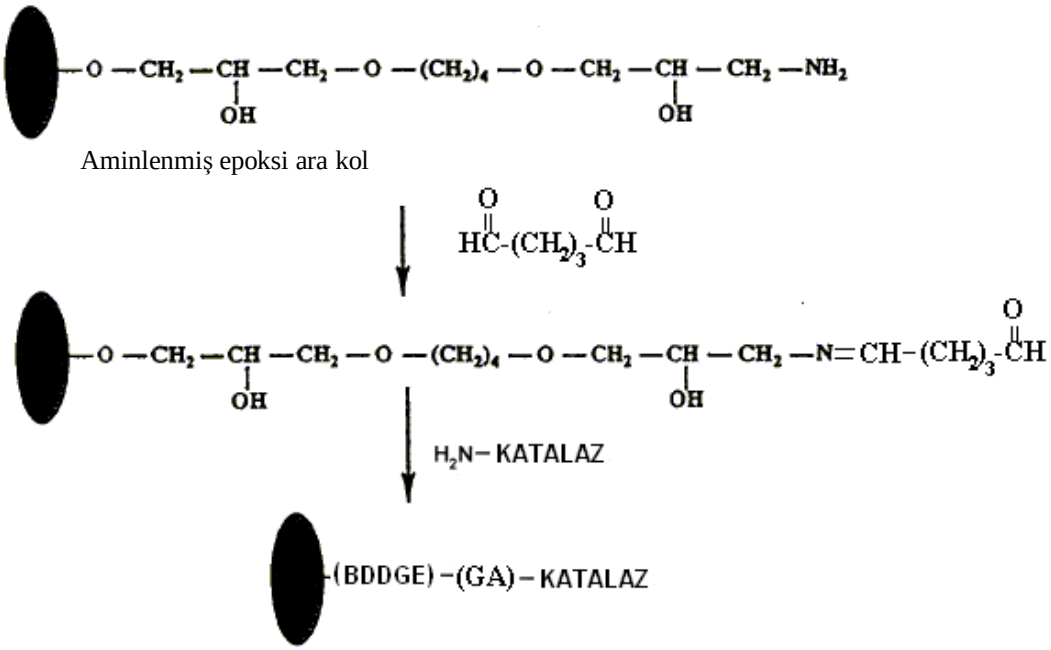
Şekil 4.16. 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolu ile aktifleştirilmiş desteğe farklı pH'larda immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler.

Yukarıda bahsedilen işlemler sonucunda immobilize katalaz örneklerinin aktivite göstermemesi üzerine desteğin farklı bir yöntemle aktifleştirelerek katalazın immobilizasyonu planlanmıştır. Bunun için literatürde Hermanson ve ark. (1992) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 3-APTES ile silanlanmış florisil'den 1,0 g alınarak 4,0 mg $NaBH_4$ içeren 8,0 ml 0,6 M NaOH çözeltisine eklenmiş, üzerine 0,75 ml 1,4 BDDGE eklenerek oda sıcaklığında bir gece karıştırılmıştır. Bu süre sonunda destek saf su ile iyice yıkanarak takiben 40 ml aseton ile yıkanır ardından saf su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Silanlanmış florisilde $-NH_2$ miktarı 270 µmol $-NH_2$/ g destek iken 1,4 BDDGE ile aktifleştirilmiş destekte 14 µmol $-NH_2$ / g destek olarak saptanmıştır. Aktifleştirme işleminden sonra destekteki serbest $-NH_2$ grubunun başlangıçtakinin % 5,2'si olduğu belirlenmiştir. Bu desteğe katalaz immobilize edildiğinde anlamlı bir aktivite saptanmamıştır. Alternatif olarak florisil'in 1,4 BDDGE ile aktifleştirilmesinde literatürde Bircakova ve ark. (1996) tarafından önerilen yöntem denenmiştir. 1,0 g florisil üzerine 8,0 ml 2,5 M NaOH çözeltisi ve 12 mg $NaBH_4$ eklenerek üzerine 1,0 ml 1,4 BDDGE veya PEGDGE yavaşça eklenerek bir gece oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra destek saf su

ile süzüntü nötr oluncaya kadar yıkanmıştır. Destek 20 ml aseton ile ve takiben saf su ile iyice yıkanıp oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulmuş desteğin üzerine 1,0 ml 1,0 M NH_3 çözeltisi eklenerek 3 sa 40ºC'de inkübe edilmiştir. Daha sonra destek saf su ile yıkanarak 25ºC'de 1 gece inkübatörde bekletilmiştir. Bu işlemler sırasında meydana gelen reaksiyonlar aşağıda şematik olarak özetlenmiştir.



Aktifleştirilmiş destekteki $-NH_2$ grupları glutaraldehit ile muamele edilerek desteğin ucunda serbest aldehit grubu oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu işlemlerde florisilin silanlandıktan sonra glutaraldehit ile aktifleştirilmesinde kullanılan oranlar aynen kullanılmıştır. 1,0 g destek 25 ml 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) hazırlanmış % 2,5 (w/v) glutaraldehit ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra destek serbest kalan glutaraldehitin uzaklaştırılması için saf su ile iyice yıkanmış ve örnekler 60ºC'deki etüvde 2 saat kurutulmuştur. Destek daha sonra katalazın immobilizasyonunda kullanılmıştır.



İmmobilizasyon işleminden önce, amonyak çözeltisi ile muameleden sonra ve glutaraldehit ile muamele edildikten sonra destekte $–NH_2$ grubu tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Arakollarla ve glutaraldehit ile aktifleştirilmiş florisildeki serbest $–NH_2$ grubu miktarları

Destek	$-NH_2$ µmol/ g destek
1,4 BDDGE	2,89
PEGDGE	3,27
1,4 BDDGE+ GA	1,35
PEGDGE + GA	1,28

1,4 BDDGE ve PEGDGE ile aktifleştirilmiş destekler glutaraldehit ile muamele edildikten sonra $-NH_2$ gruplarının sayısında azalma olmuştur. 1,4 BDDGE ile aktifleştirilen destek glutaraldehit ile muamele edildiğinde $–NH_2$ grubunun % 46,7'si, PEGDGE ile aktifleştirilmiş destek glutaraldehit ile muamele edildiğinde $–NH_2$ grubunun % 49,1'i kalmıştır.

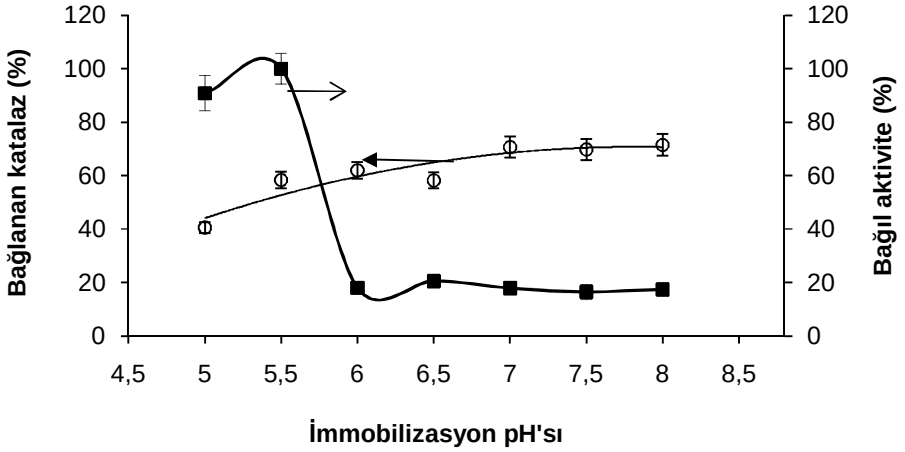
Ara kollar ve glutaraldehit ile aktifleştirilen florisile katalazın immobilizasyonunda pH 7,0, 50 mM fosfat tamponunda derişimi 1,0 mg/ml olan

katalaz çözeltisi kullanılmıştır. 1,0 g destek için 4 ml katalaz çözeltisi kullanılarak 25ºC'de 2 saat çalkalayıcılı su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra immobilize enzim tamponla yıkanmıştır. 1,4 BDDGE ve glutaraldehit ile aktifleştirilmiş florisile katalazın % 65,5'i bağlanmış (2,6 mg prot./g destek), PEGDGE ve glutaraldehit ile aktifleştirilmiş florisile katalazın % 77,4'ü bağlanmıştır (3,1 mg prot./g destek). Ancak bu örneklerde enzim aktivitesi belirlenememiştir. Bu nedenle katalazın florisile 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları üzerinden immobilizasyonu ile ilgili daha ileri çalışmalar yapılmamıştır.

4.1.1.3. Katalazın 5-APA Ara Kolu Üzerinden Florisile İmmobilizasyonu

4.1.1.3.(1). Katalazın 5-APA Ara Kolu Üzerinden Florisile İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

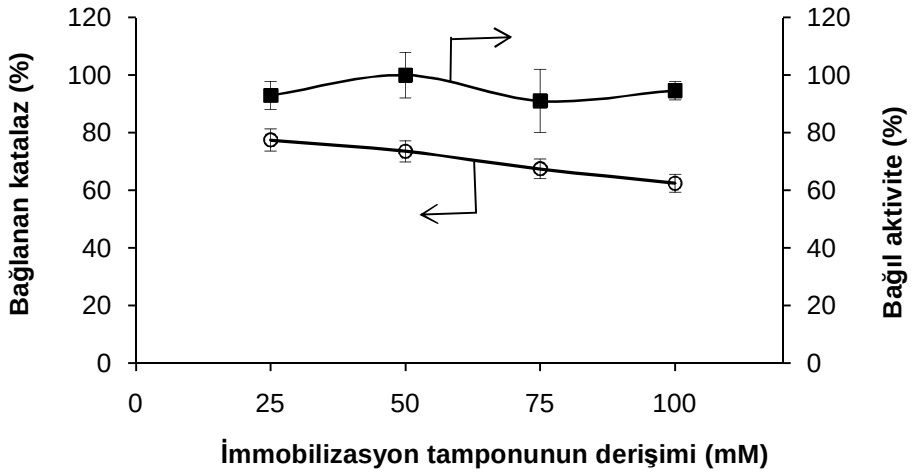
Katalazın florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda en uygun bağlanma pH'sının belirlenmesi için farklı pH'larda (5,0, 5,5 asetat; 6,0 sitrat; 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 fosfat) immobilizasyonlar yapılmıştır. 1,0 g destek başına derişimi 1,0 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış 4,0 ml katalaz çözeltisi kullanılmış ve sıcaklık 25ºC, tampon derişimi 50 mM, immobilizasyon süresi 2 saat olarak seçilmiştir. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak 5-APA ara kolu üzerinden florisile immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Şekil 4.17'den görüldüğü gibi genel olarak ortam pH'sı arttıkça (pH 7,0'ye kadar) desteğe bağlanan katalaz miktarı da artmaktadır. Ancak, en yüksek aktivite pH 5,5'te immobilize edilmiş katalaz için ölçülmüştür. Bu bulgulara göre daha sonraki çalışmalarda katalazın florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda immobilizasyon pH'sı 5,5 olarak seçilmiştir.

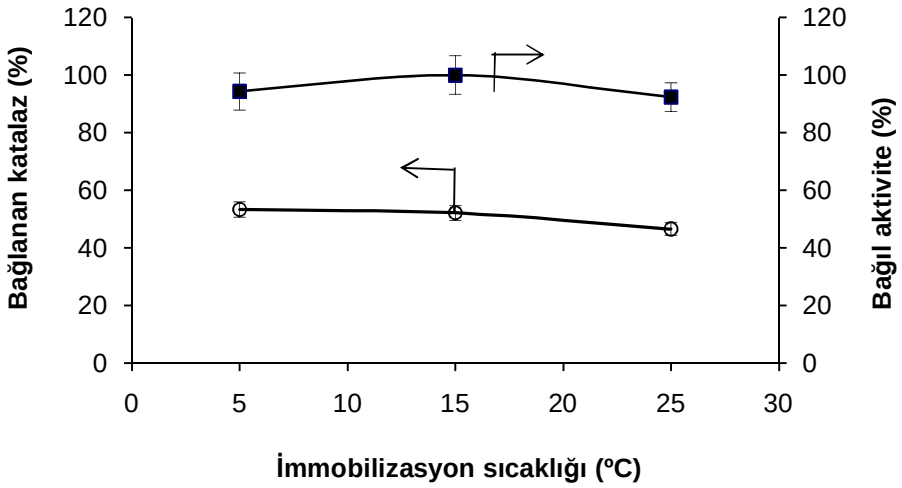
İmmobilizasyonda tampon derişiminin etkisinin belirlenmesi için çeşitli derişimlerdeki (25–100 mM) pH 5,5 asetat tamponunda immobilizasyonlar yapılmış, immobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak 5-APA ara kolu üzerinden florisile immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

İmmobilizasyon tamponunun derişimi 25–100 mM arasında değiştirildiğinde bağlanan katalaz oranında hafif bir azalma görülmektedir (Şekil 4.18). Aktiviteler incelendiğinde ise en yüksek aktivite 50 mM tampon derişiminde immobilize edilen katalaz örnekleri için saptanmıştır. Katalazın florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda en uygun tampon derişimi olarak 50 mM seçilmiştir.

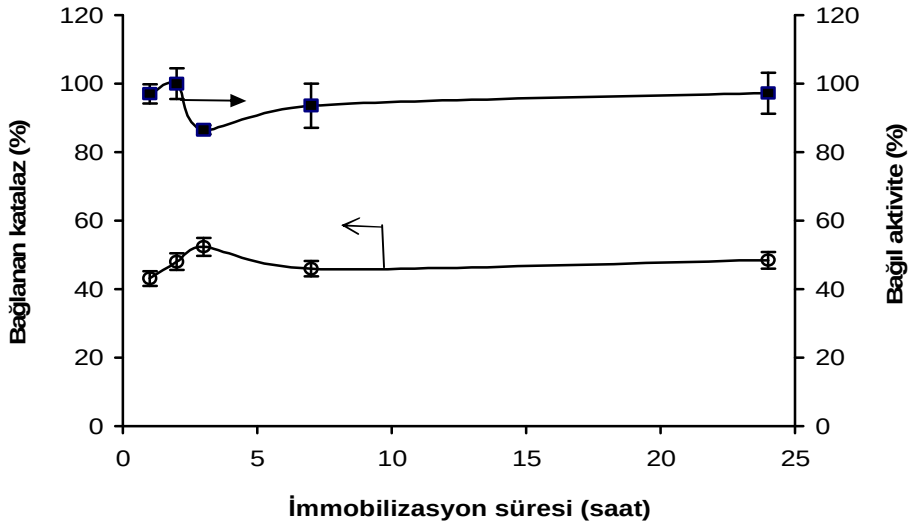
Katalazın florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilizasyonuna sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 5, 15 ve 25ºC'de immobilizasyon yapılmış, immobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak 5-APA ara kolu üzerinden florisile immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.19. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Katalazın 5-APA ara kolu üzerinden florisile immobilizasyonunda, immobilizasyon sıcaklığı 5ºC'den 25ºC'ye arttırıldığında bağlanan katalaz miktarında hafif bir azalma olurken, immobilize katalaz örneklerinin aktivitelerinde büyük bir değişim olmamıştır (Şekil 4.19). En uygun immobilizasyon sıcaklığı olarak 15 ºC seçilmiştir.

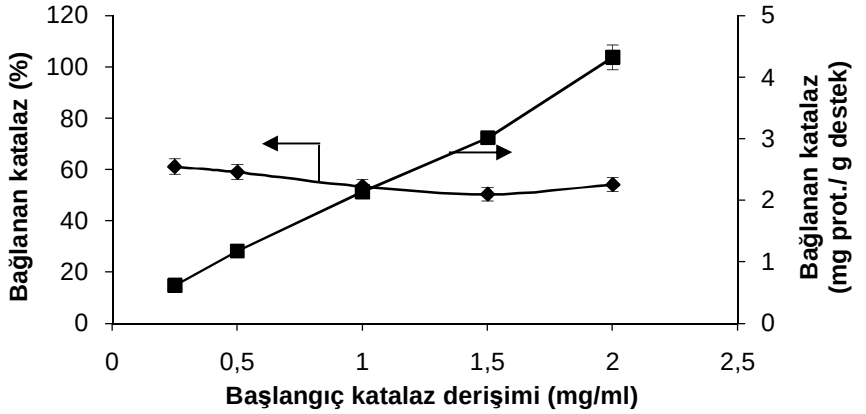
Katalazın florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda immobilizasyon süresinin katalazın desteğe bağlanma miktarına ve aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bunun için immobilizasyon süresi 1–24 saat aralığında değiştirilerek yukarıdaki aşamalarda belirlenmiş koşullarda immobilizasyon yapılmış ve immobilizasyon süresine bağlı olarak florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişim Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

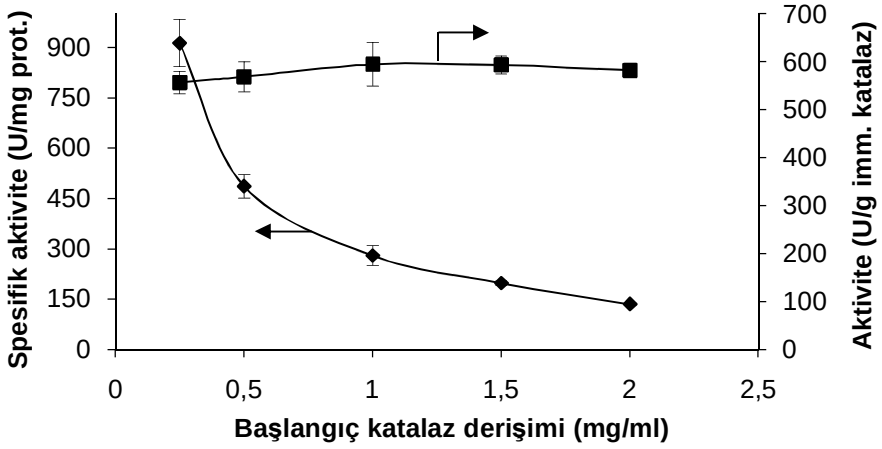
Bu verilere göre farklı sürelerde (1–24 saat) yapılan immobilizasyon çalışmalarında katalazın bağlanma miktarının immobilizasyon süresinden fazla etkilenmediği ve en yüksek aktivite 2 saat immobilize edilen katalaz örneklerinde bulunduğu için 2 saat immobilizasyon süresinin yeterli olduğu saptanmıştır.

Belirlenmiş olan en uygun koşullarda (pH 5,5 50 mM asetat tamponunda 15ºC'de 2 saat immobilizasyon) birim destek başına sabit hacimde (4,0 ml) farklı katalaz derişimlerinde 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 mg/ml immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı katalaz derişimlerinde florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve miktarındaki değişimler Şekil 4.21'de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (♦) ve miktarındaki (■) değişimler.

Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile 5-APA üzerinden yapılan immobilizasyon sonucunda katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülmüş, aktiviteleri (U/g immobilize katalaz) ve spesifik aktivitelerinin başlangıç katalaz derişimine bağlı olarak değişimi (U/ mg prot.) Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

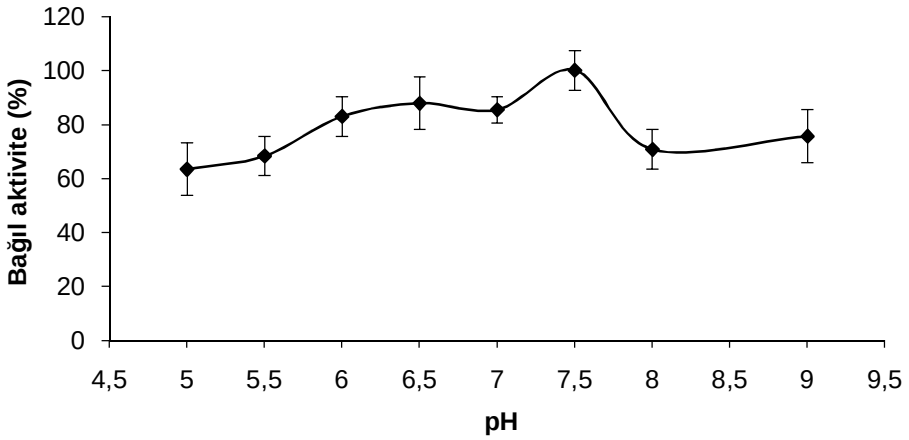


Şekil 4.22. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz için ölçülen spesifik aktivite (♦) ve aktivite (■) değerleri.

Katalazın florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda katalaz miktarı arttıkça desteğe bağlanan katalaz miktarı artarken katalazın bağlanma yüzdesinde hafif bir azalma saptanmıştır (Şekil 4.21). Aktiviteler incelendiğinde enzimin spesifik aktivitesi azalırken, immobilize katalazın 1,0 gramı başına hesaplanan aktivitede büyük bir değişim olmamıştır (Şekil 4.22). Bu nedenle en uygun katalaz derişimi en yüksek spesifik aktivitenin saptandığı 0,25 mg/ml olarak belirlenmiştir.

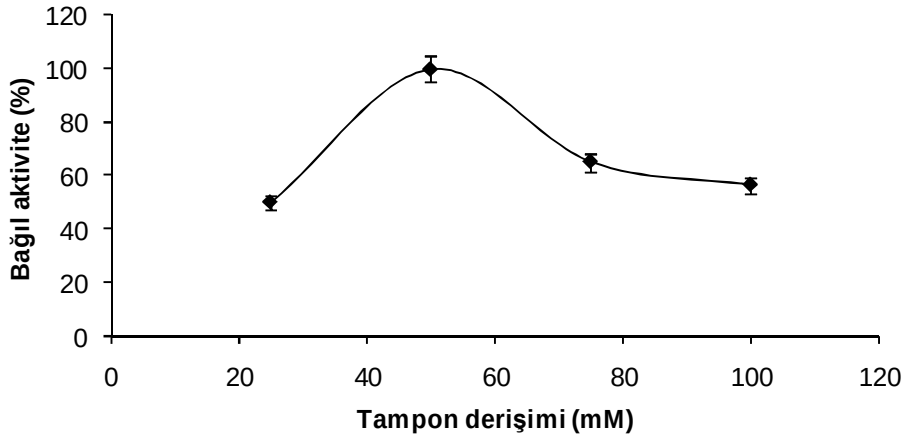
4.1.1.3.(2). Florisile 5-APA Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

İmmobilizasyon için en uygun koşullar belirlendikten sonra immobilize katalazın en fazla aktivite gösterdiği pH değeri saptanmıştır. Bunun için 50 mM pH 5,0, 5,5 asetat tamponu, 6,0 sitrat tamponu, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat tamponu ve 9,0 borat tamponunda immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.23'de gösterilmiş, immobilize katalaz için optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir.



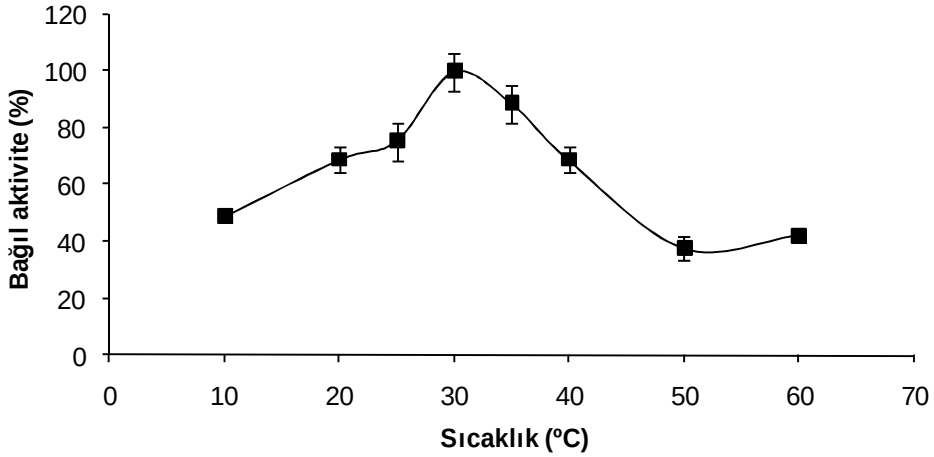
Şekil 4.23. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

İmmobilize katalaz örneklerinin farklı derişimlerdeki (25, 50, 75 ve 100 mM) pH 7,5 fosfat tamponunda aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.24'de verilmiş, immobilize katalaz için optimum tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.24. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi.

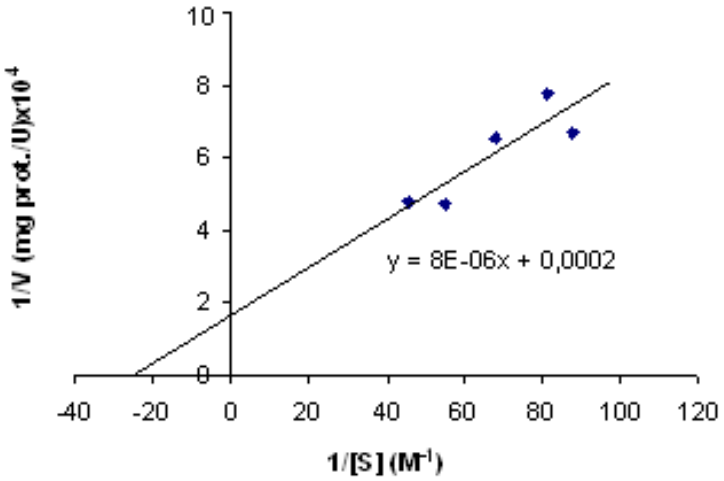
İmmobilize katalaz örneklerinin farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40 50 ve 60ºC) aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.25'de gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

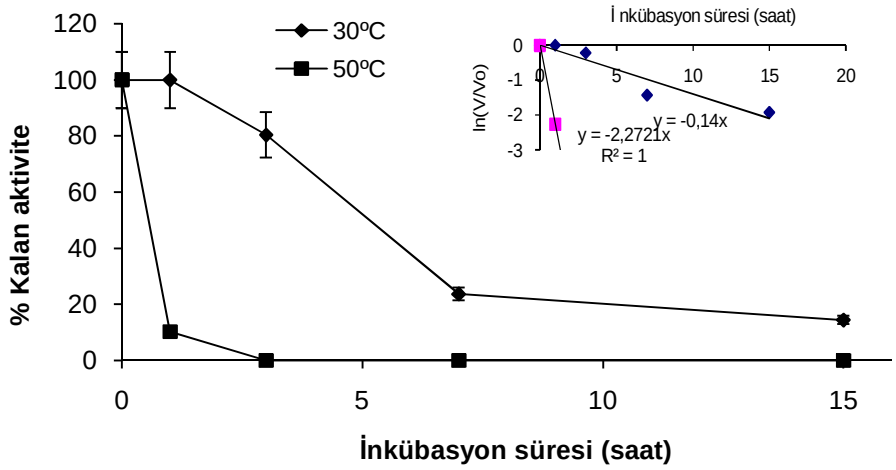
İmmobilize katalaz için optimum sıcaklık 30ºC olarak belirlenmiş ve Arrhenius denkleminden aktivasyon enerjisi 24,2 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

Belirlenmiş olan optimum koşullarda farklı H_2O_2 derişimlerinde immobilize katalazın aktivitesi ölçülerek Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş sonuçlar Şekil 4.26'de verilmiştir. İmmobilize katalaz için V_{max}= 1,0x10^4 U/mg prot., K_m= 100 mM H_2O_2, turnover sayısı k_{cat}= 4,2x10^4 s^{-1} ve katalitik etkinliği k_{cat}/ K_m = 4,2x10^5 s^{-1}M^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 4.26. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz için Lineweaver-Burk grafiği.

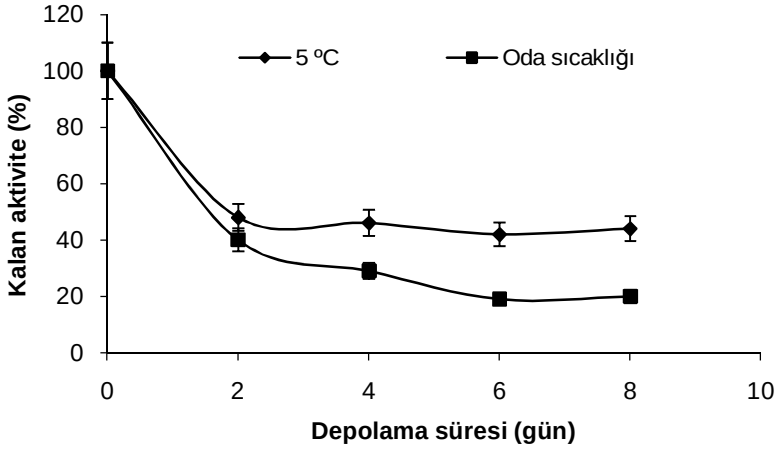
İmmobilize katalaz örnekleri 30ºC ve 50ºC sıcaklıklarda 1, 3, 7 ve 15 sa bekletilerek belirlenmiş olan optimum koşullarda kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Şekil 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi.(V_0 başlangıçtaki katalaz aktivitesi, V herhangi bir zamanda ölçülen aktivite)

İmmobilize katalaz 30ºC'de 15 saat inkübe edildikten sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 42'sini korurken 50ºC'de aktivitesini tamamen kaybetmiştir. 30ºC'de bekletilen immobilize katalaz için yarı ömür 5 saat, 50ºC'de ise 0,3 saat olarak bulunmuştur.

İmmobilize katalaz örnekleri oda sıcaklığında ve 5ºC'de bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüş, sonuçlar Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



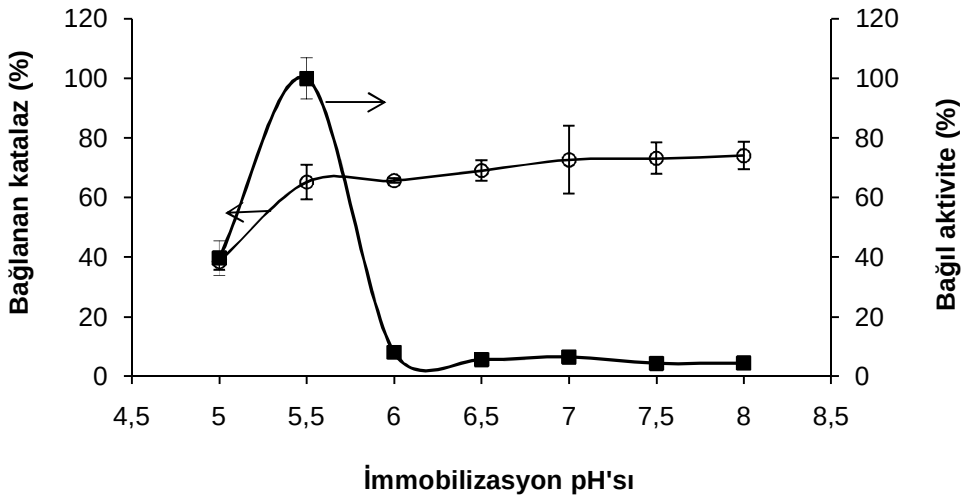
Şekil 4.28. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi.

Oda sıcaklığında saklanan immobilize katalaz 8 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 20'sini korurken, 5ºC'de saklanan immobilize katalaz aktivitesinin % 44'ünü korumuştur.

4.1.1.4. Katalazın 6-AHA Ara Kolu Üzerinden Florisile İmmobilizasyonu

4.1.1.4.(1). Katalazın 6-AHA Ara Kolu Üzerinden Florisile İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Katalazın 6-AHA ara kolu üzerinden florisile immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon pH'sının belirlenmesi için farklı pH'larda (5,0, 5,5 asetat; 6,0 sitrat; 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 fosfat) immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.29'da gösterilmiştir.

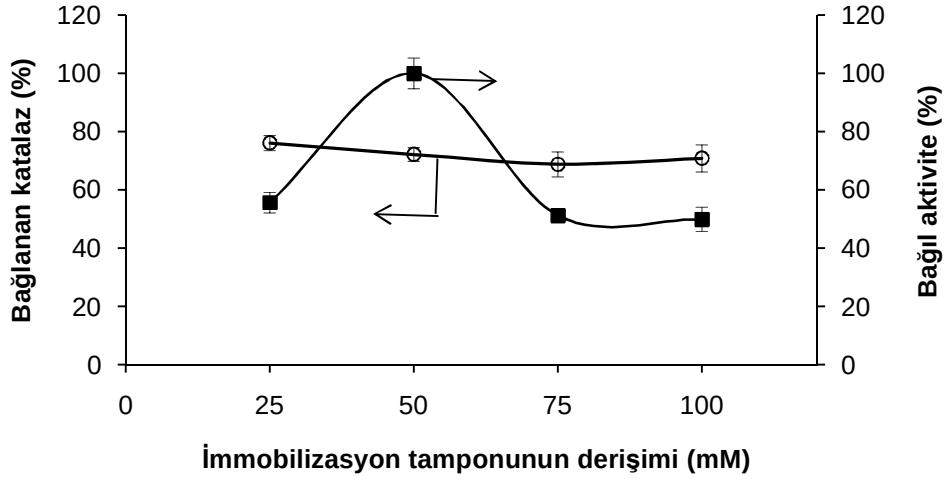


Şekil 4.29. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Şekil 4.29'dan görüldüğü gibi immobilizasyon ortamının pH'sı arttıkça desteğe bağlanan katalaz miktarında artış olmuştur. En yüksek aktivite pH 5,5'te immobilize

edilmiş katalaz için ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre daha sonraki immobilizasyonlarda immobilizasyon pH'sı 5,5 olarak seçilmiştir.

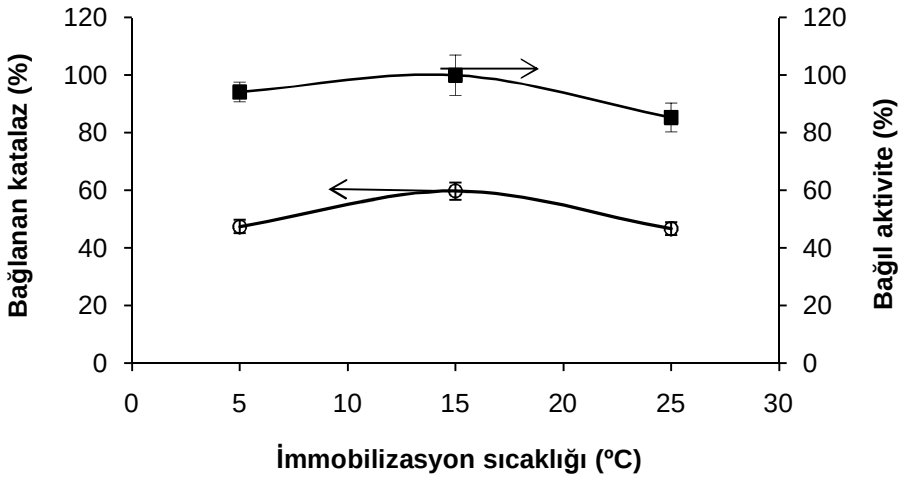
İmmobilizasyonda tampon derişiminin etkisinin belirlenmesi için çeşitli derişimlerdeki (25–100 mM) pH 5,5 asetat tamponunda immobilizasyonlar yapılmış, immobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.30'da gösterilmiştir.



Şekil 4.30. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Katalazın florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda tampon derişimi arttıkça desteğe bağlanan katalazın miktarında hafif bir azalma olmuştur. 50 mM asetat tamponunda yapılan immobilizasyon sonucunda en yüksek aktivite elde edilmiştir. Bu nedenle katalazın 6-AHA ara kolu üzerinden florisile immobilizasyonunda en uygun tampon derişimi 50 mM olarak seçilmiştir.

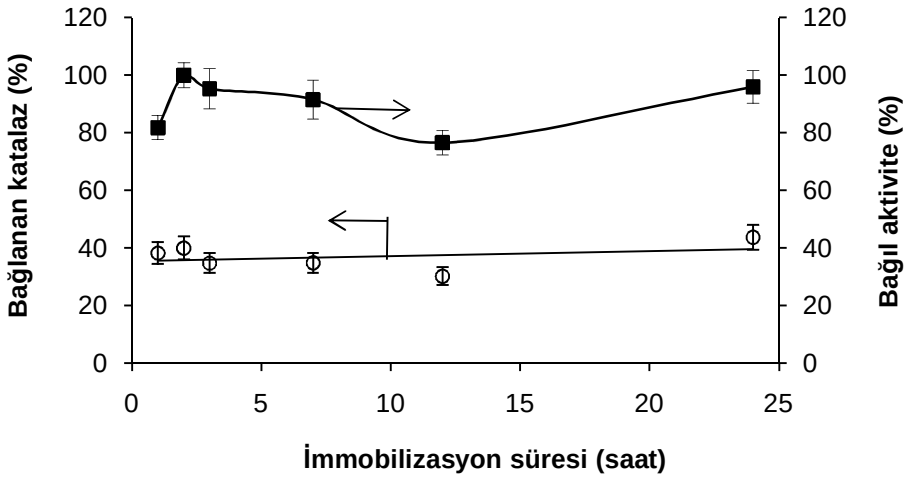
Katalazın florisil'e 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonuna sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 5, 15 ve 25ºC'de immobilizasyon yapılmış, immobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak 6-AHA ara kolu üzerinden florisile immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.31'de gösterilmiştir.



Şekil 4.31. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Katalazın florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda, immobilizasyon sıcaklığı 15ºC olduğunda hem katalazın bağlanma oranı hem de aktivitesi en yüksek bulunmuştur. Bu nedenle en uygun immobilizasyon sıcaklığı 15ºC olarak seçilmiştir.

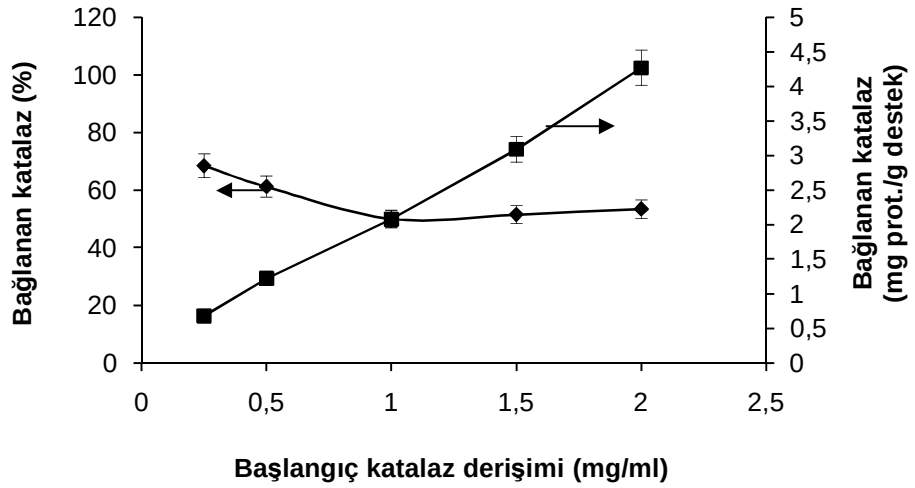
Katalazın florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda immobilizasyon süresinin katalazın bağlanma miktarına ve aktivitesine ektisi incelenmiştir. Bunun için immobilizasyon süresi 1–24 saat aralığında değiştirilerek yukarıdaki aşamalarda belirlenmiş koşullarda immobilizasyon yapılmış, immobilizasyon süresine bağlı olarak florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişim Şekil 4.32'de gösterilmiştir.



Şekil 4.32. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

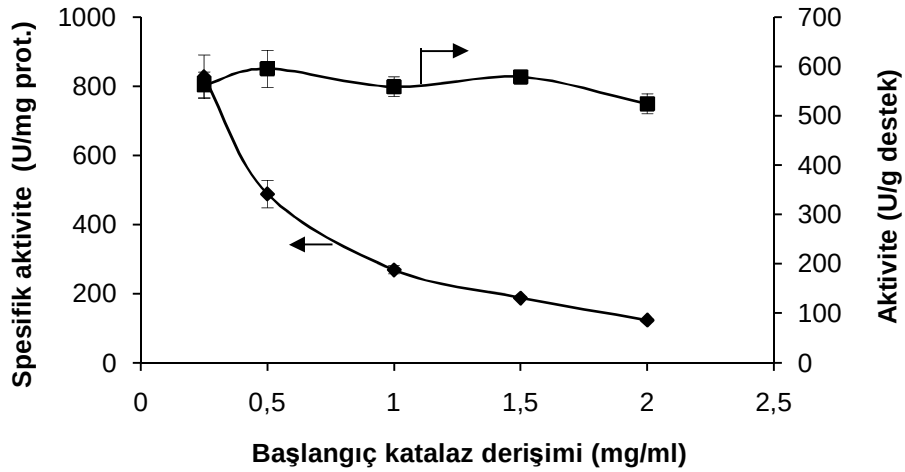
Şekil 4.32'de görüldüğü gibi immobilizasyon süresi arttığında (1–24 saat) bağlanma yüzdesinde hafif bir artış olmuştur. En yüksek spesifik aktivite 2 saat immobilize edilen katalaz örneklerinde bulunduğundan immobilizasyon süresi için 2 saatin yeterli olduğu saptanmıştır.

Birim destek başına sabit hacimde (4,0 ml) farklı katalaz derişimlerinde 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 mg/ml immobilizasyon çalışmaları yapılmış, farklı katalaz derişimlerinde florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve miktarındaki değişimler Şekil 4.33'de gösterilmiştir.



Şekil 4.33. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (♦) ve miktarındaki (■) değişimler.

Katalazın florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda katalaz miktarı arttıkça desteğe bağlanan katalaz miktarı artarken katalazın bağlanma yüzdesinde hafif bir azalma saptanmıştır (Şekil 4.33). İmmobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülmüş, aktiviteleri (U/g immobilize katalaz) ve spesifik aktiviteleri (U/ mg prot.) Şekil 4.34'de gösterilmiştir.

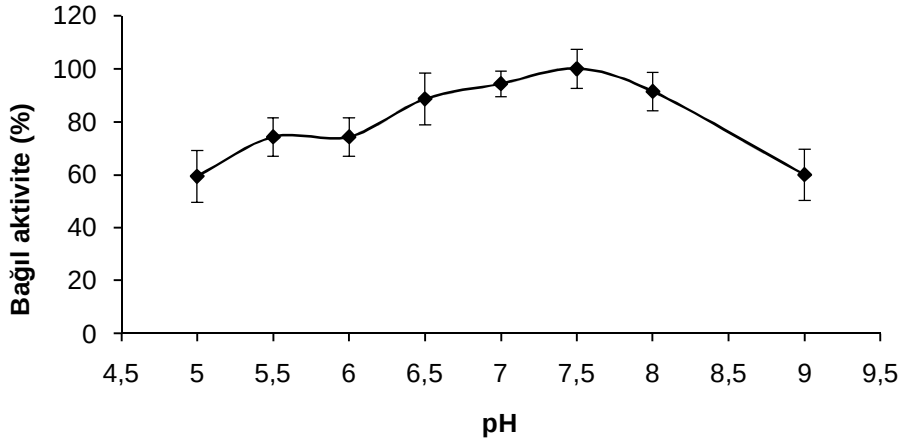


Şekil 4.34. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın spesifik aktivitesindeki (♦) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Aktiviteler incelendiğinde enzimin spesifik aktivitesi azalırken, gram immobilize katalaz başına hesaplanan aktivitede büyük bir farklılık olmamıştır (Şekil 4.34). Bu nedenle en uygun katalaz derişimi 0,25 mg/ml olarak belirlenmiştir.

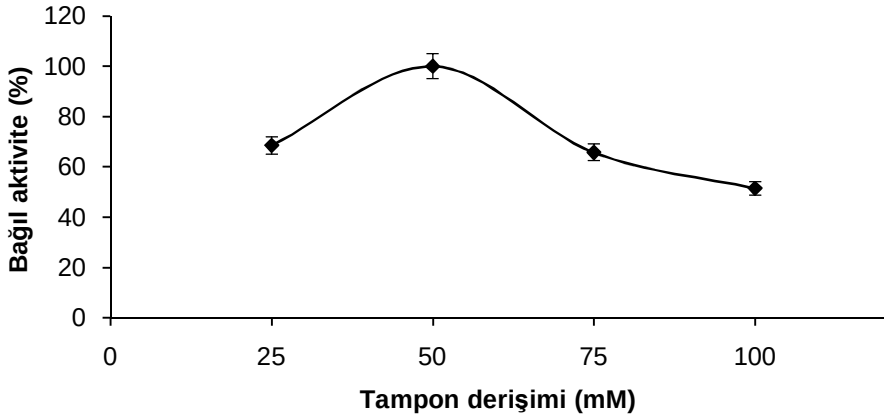
4.1.1.4.(2). Florisile 6-AHA Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

İmmobilizasyon için en uygun koşullar belirlendikten sonra immobilize katalazın en fazla aktivite gösterdiği pH belirlenmiştir. Bunun için 50 mM pH 5,0, 5,5 asetat tamponu, 6,0 sitrat tamponu, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat tamponu ve 9,0 borat tamponunda immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.35'de gösterilmiş, immobilize katalaz için optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir.



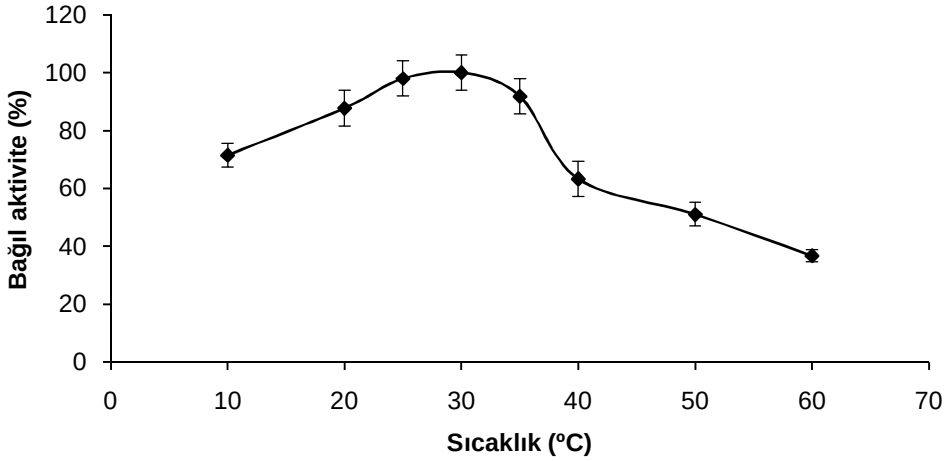
Şekil 4.35. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

İmmobilize katalaz örneklerinin farklı derişimlerdeki (25, 50, 75 ve 100 mM) pH 7,5 fosfat tamponunda aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.36'da verilmiş, immobilize katalaz için optimum tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.36. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi.

İmmobilize katalaz örneklerinin farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40 50 ve 60ºC) aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.37'de gösterilmiştir.

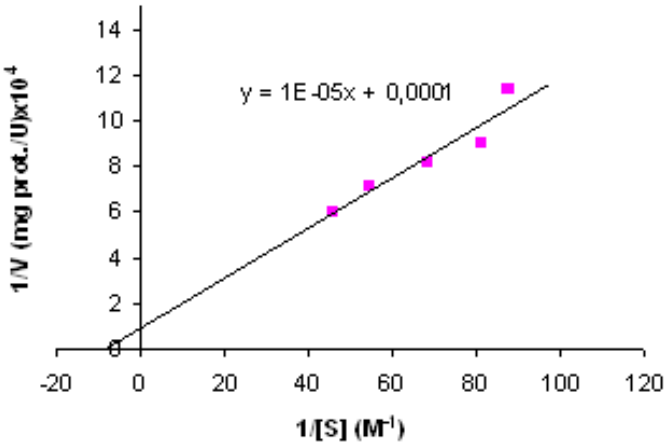


Şekil 4.37. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

İmmobilize katalaz için optimum sıcaklık 30ºC olarak belirlenmiş, Arrhenius denkleminden aktivasyon enerjisi 12,6 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

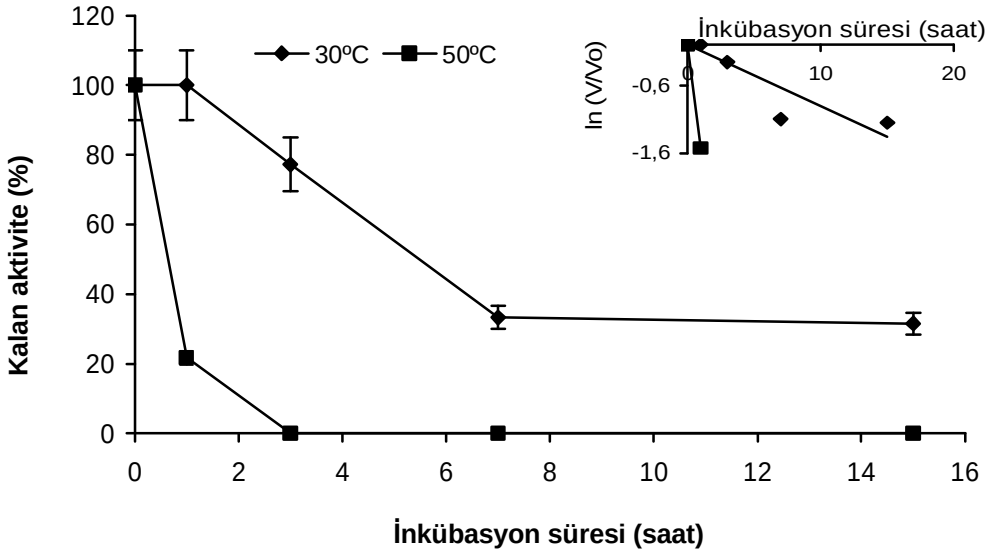
Belirlenmiş olan optimum koşullarda farklı H_2O_2 derişimlerinde immobilize katalazın aktivitesi ölçülerek Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş sonuçlar Şekil

4.38'de verilmiştir. İmmobilize katalaz için V_{max}=5,0x10^3 U/mg prot., K_m= 25 mM H_2O_2, turnover sayısı k_{cat}= 2,1x10^4 s^{-1} ve katalitik etkinliği k_{cat}/ K_m =8,3x10^5 s^{-1}M^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 4.38. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz için Lineweaver-Burk grafiği.

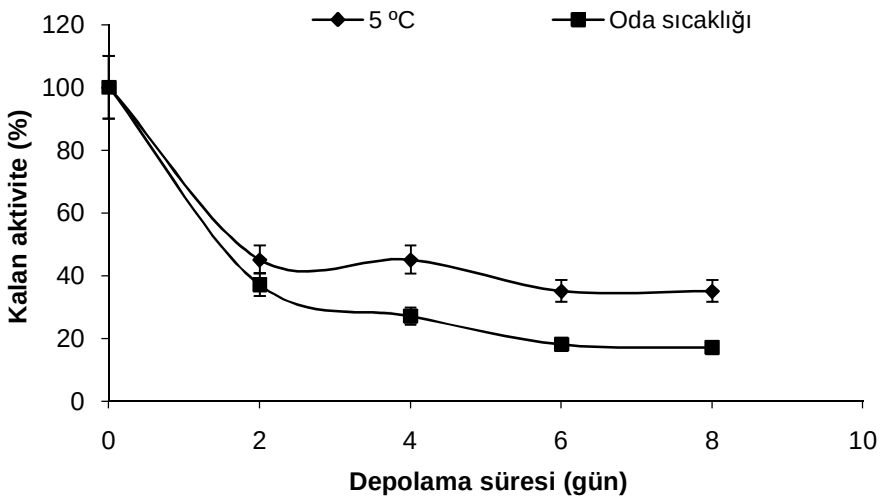
İmmobilize katalaz örnekleri 30ºC ve 50ºC sıcaklıklarda 1, 3, 7 ve 15 saat bekletilerek belirlenmiş olan optimum koşullarda kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi Şekil 4.39'da gösterilmiştir.



Şekil 4.39. Florisile 6-AHA üzerinden immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi. (V_0 başlangıçtaki katalaz aktivitesi, V herhangi bir zamanda ölçülen aktivite)

İmmobilize katalaz 30ºC'de 15 saat inkübe edildikten sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 14'ünü korurken 50ºC'de 3 saat sonunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir. 30ºC'de bekletilen immobilize katalaz için yarı ömür 7,6 saat, 50ºC'de ise 0,45 saat olarak bulunmuştur.

İmmobilize katalaz örnekleri oda sıcaklığında ve 5 ºC'de bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüş, depolama süresine bağlı aktivite değişimi Şekil 4.40'da gösterilmiştir.



Şekil 4.40. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi.

Oda sıcaklığında saklanan immobilize katalaz 8 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 17'sini korurken, 5ºC'de saklanan immobilize katalaz aktivitesinin % 45'ini korumuştur.

4.1.2. Katalazın NPG'ye İmmobilizasyonu

Florisilin silanlanmasında kullanılan yöntem ile NPG'de silanlama yapıldığında işlem sonunda destekte $-NH_2$ grubu tespit edilmemiştir. NPG'de silanlama işlemi ve takiben immobilizasyon işlemleriyle elde edilen immobilize katalazda aktivite gözlenmemiştir. Bunun üzerine desteğin silanlanmasında yine Weethall (1976) tarafından önerilen bir başka silanlama işlemi uygulanmıştır. Daha önceki silanlama işlemi aseton kullanılarak organik fazda gerçekleştirilirken bu kez yapılan işlem sulu fazda gerçekleştirilmiştir. 2,0 g desteğe suda hazırlanmış % 10'luk (v/v) 3-APTES çözeltisinden 40 ml eklenmiş ve 6 M HCl çözeltisi ile ortam pH'sı 3-4'e ayarlanmıştır. Karışım 70 ºC etüvde farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) bekletilmiş ve daha sonra destek 3-APTES kalmayıncaya kadar saf su ile iyice yıkanmıştır. Destek 120ºC'lik etüvde 24 saat bekletildikten sonra $-NH_2$ grubunun miktarı tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. 3-APTES ile etkileştirilen NPG'deki $–NH_2$ miktarının silanlama süresine bağlı değişimi

Silanlama süresi (saat)	$–NH_2$ grubu miktarı (µmol / g destek)
24	0,025
48	0,020
72	0,042

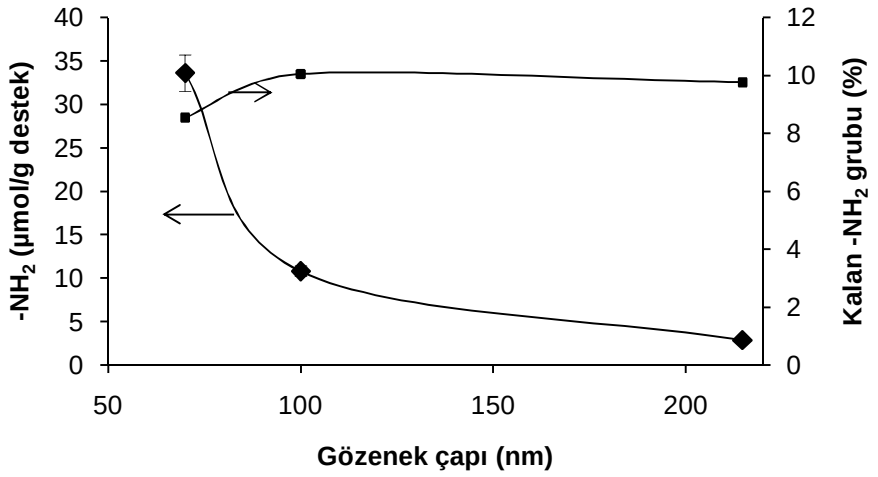
NPG'nin silanlanmasında işlem süresi arttırıldığında destekteki $–NH_2$ grubu bir miktar artmıştır. 72 saat silanlama işlemi yapılan destek glutaraldehit ile muamele edilip kalan serbest $–NH_2$ grubunun miktarı belirlendiğinde ise serbest $-NH_2$ grubunun % 33,3 oranında azaldığı bulunmuştur. Bu sonuç glutaraldehitin NPG'ye bağlandığını göstermektedir. Ancak bu desteğe katalaz immobilize edildiğinde desteğe katalazın bağlanmadığı saptanmıştır. Bu nedenle katalazın NPG'ye immobilizasyonu ile ilgili hedeflenen çalışmalara devam edilememiştir.

4.1.3. Katalazın CPG'ye İmmobilizasyonu

4.1.3.1. Katalazın CPG'ye Doğrudan İmmobilizasyonu

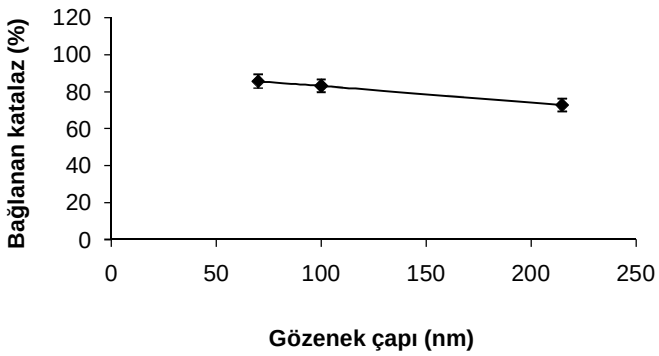
4.1.3.1.(1). Katalazın CPG'ye Doğrudan İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Farklı gözenek büyüklüğüne sahip CPG (70, 100 ve 215 nm) destekler aseton fazında silanlanmış, ardından glutaraldehit ile muamele edilmişlerdir. Silanlanma ve glutaraldehit bağlama aşamalarından sonra destekteki serbest $–NH_2$ gruplarının miktarı belirlenmiş, bulgular Şekil 4.41'de gösterilmiştir.



Şekil 4.41. Silanlanmış CPG'lerde gözenek çapına göre $-NH_2$ grubunun sayısındaki (♦) ve glutaraldehit muamelesinden sonra destekte kalan $-NH_2$ grubunun sayısındaki (■) değişimler.

Şekil 4.41'de görüldüğü gibi silanlama işleminden sonra en fazla $-NH_2$ grubu taşıyan destek gözenek çapı 70 nm olan CPG'dir. Gözenek çapı farklı CPG örnekleri glutaraldehit ile aktifleştirildiklerinde glutaraldehit bağlanmadan kalan serbest $-NH_2$ gruplarının yaklaşık % 10 olduğu ve dolayısıyla glutaraldehit bağlanma oranlarının yaklaşık % 90 olduğu bulunmuştur. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş farklı gözenek büyüklüğüne sahip CPG'lere katalaz immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon işlemi için her 1,0 g destek başına derişimi 1,0 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış 8,0 ml katalaz çözeltisi kullanılmış, sıcaklık 25ºC, tampon derişimi 50 mM ve immobilizasyon süresi 2 saat olarak seçilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.42 ve Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.



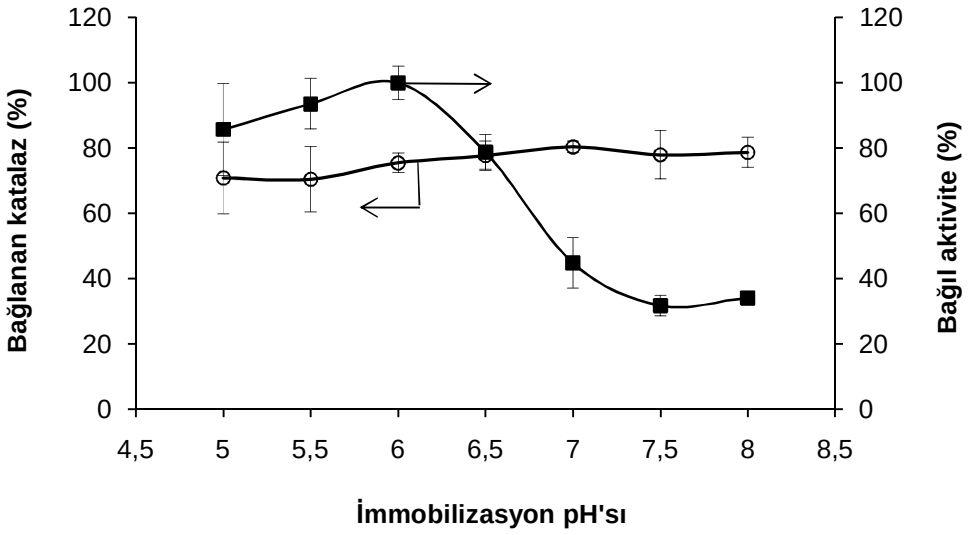
Şekil 4.42. Farklı gözenek çapına sahip aktifleştirilmiş CPG'lere immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişim.

Çizelge 4.3. Farklı gözenek çapına sahip aktifleştirilmiş CPG'lere immobilize edilmiş katalaz örneklerinin aktiviteleri.

CPG Gözenek çapı (nm)	Spesifik Aktivite (U/mg prot.)	Aktivite (U/g imm. katalaz)
70	141,25±5,96	951,53±48,94
100	72,95±7,45	482,14±49,6
215	100,12±9,85	586,73±57,7

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi en yüksek katalaz aktivitesi gözenek çapı 70 nm olan, aktifleştirilmiş CPG'ye immobilize edilmiş katalaz örnekleri için bulunmuştur. Bundan sonraki deneysel çalışmalarda gözenek çapı 70 nm olan CPG kullanımının uygun olduğu saptanmıştır.

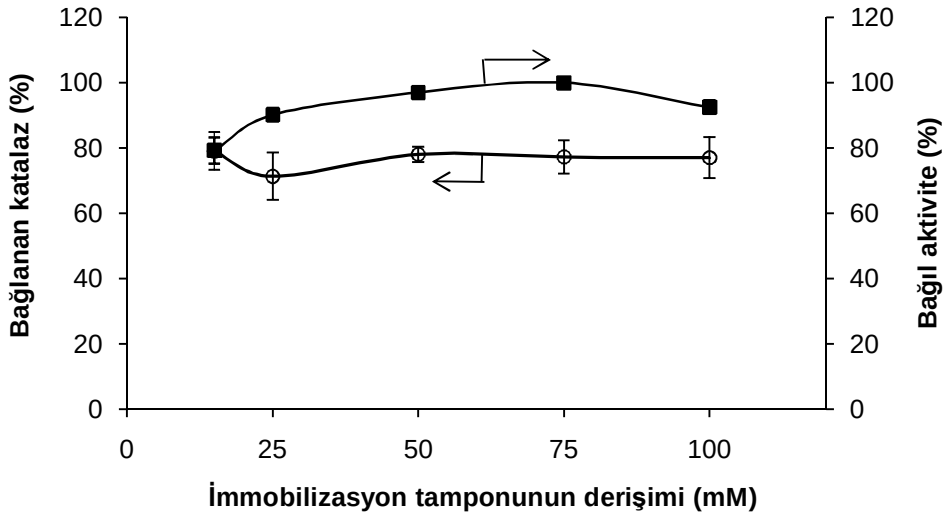
Katalazın CPG'ye immobilizasyonunda öncelikle immobilizasyon koşullarının optimizasyonu yapılmıştır. Katalazın desteğe immobilizasyonunda en uygun bağlanma pH'sının belirlenmesi için farklı pH'larda immobilizasyon yapılmıştır. Farklı pH'larda immobilize edilmiş katalaz örneklerinin aktiviteleri 25ºC'de, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 10 mM H_2O_2 varlığında ölçülmüştür. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişim Şekil 4.43'de gösterilmiştir.



Şekil 4.43. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Katalazın CPG'ye farklı pH'larda immobilizasyonunda ortamın pH'sı arttıkça bağlanan katalaz miktarında hafif bir artış olmuştur (Şekil 4.43). En fazla aktivite ise 50 mM derişimdeki pH 6,0 sitrat tamponunda immobilize edilen katalaz örneklerinde saptanmıştır. Bundan sonraki aşamalarda katalazın CPG'ye immobilizasyonunda pH 6,0 sitrat tamponu kullanılmıştır.

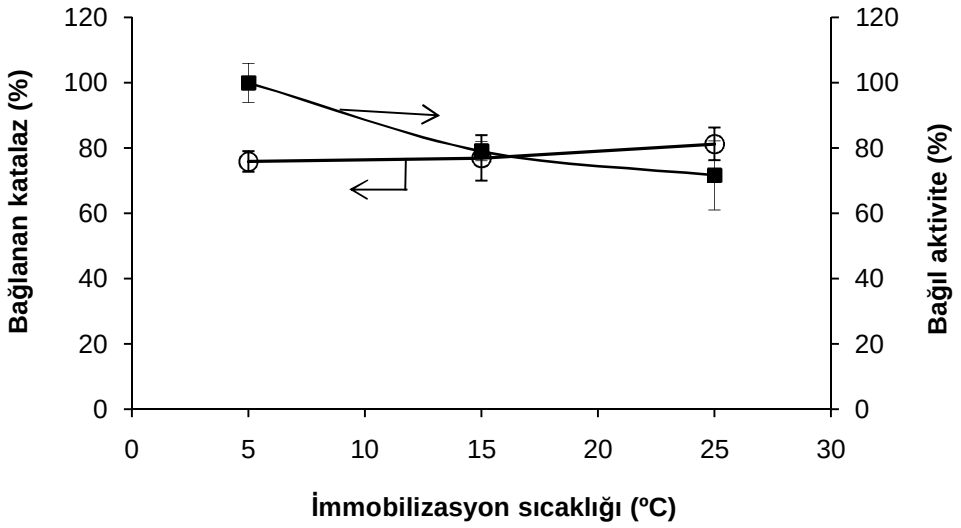
Katalazın CPG'ye immobilizasyonuna tampon derişiminin etkisinin belirlenmesi için çeşitli derişimlerdeki (15–100 mM) pH 6,0 sitrat tamponunda immobilizasyonlar yapılmıştır. İmobilizasyon tamponunun derişiminin CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesine ve aktivitesine etkileri Şekil 4.44'de gösterilmiştir.



Şekil 4.44. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Katalazın CPG'ye immobilizasyonunda 15 mM pH 6,0 sitrat tamponunda desteğe bağlanan katalaz miktarı en yüksek olmasına rağmen en düşük aktivite bu örnekler için ölçülmüştür. 25-100 mM sitrat tamponunda gözlenen aktivite değerleri birbirine yakın olup en fazla aktivite 75 mM'da yapılan immobilizasyon çalışmasında elde edilmiştir.

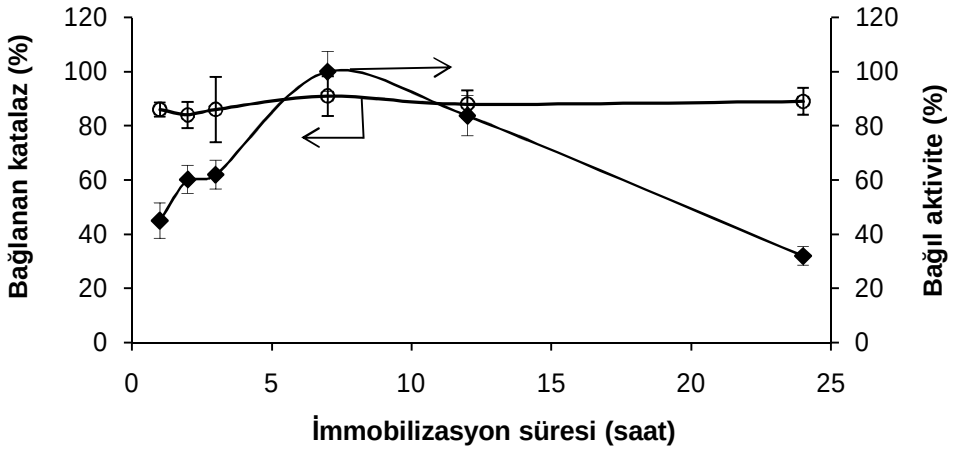
Katalazın CPG'ye immobilizasyonuna sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 5, 15 ve 25ºC'de immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.45'de gösterilmiştir.



Şekil 4.45. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Farklı sıcaklıklarda CPG'ye yapılan immobilizasyon çalışmaları sonucunda 5, 15 ve 25ºC sıcaklıklarında katalazın bağlanma yüzdeleri birbirine yakın bulunmuştur (Şekil 4.45). İmmobilizasyon sıcaklığı arttıkça immobilize katalaz aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. En yüksek aktivite 5ºC'de yapılan immobilizasyon sonucunda elde edildiği için bundan sonraki çalışmalarda CPG'ye immobilizasyon 5ºC'de yapılmıştır.

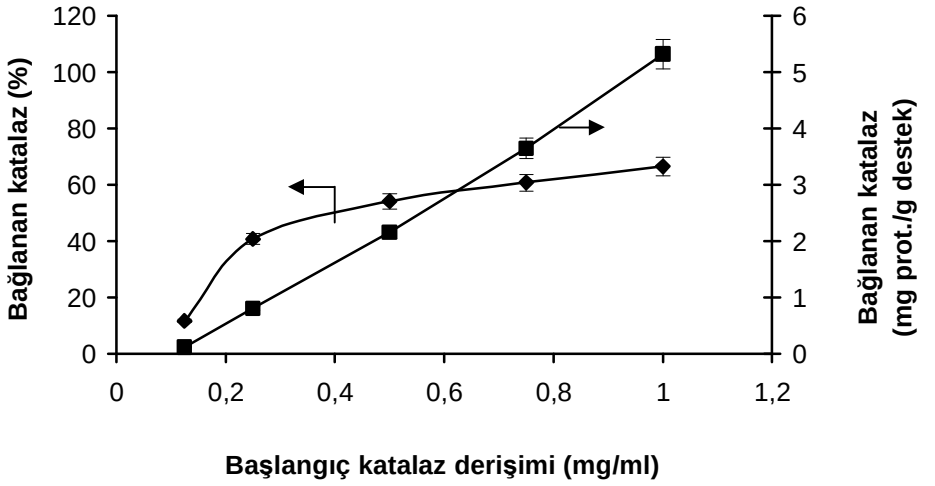
En uygun immobilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla daha önce belirlemiş olduğumuz en uygun koşullarda 1, 2, 3, 7, 12 ve 24 saat immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.46'da gösterilmiştir.



Şekil 4.46. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

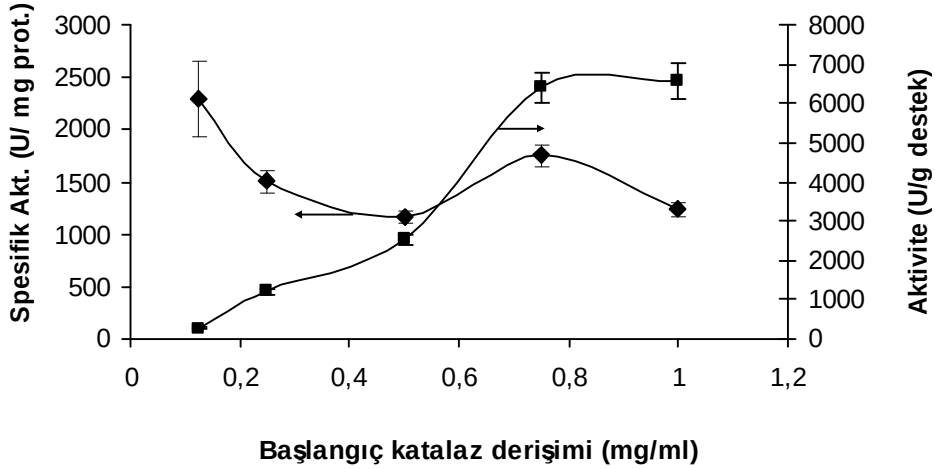
Farklı sürelerde CPG'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin desteğe bağlanma miktarı süre arttıkça az miktarda artmıştır (Şekil 4.46). İmmobilize katalaz örneklerinin aktivitesi incelendiğinde 7 saat immobilizasyon süresine kadar aktivite artmış bu sürenin üstünde ise azalma eğilimi saptanmıştır. Bu sonuçlara göre katalazın CPG'ye immobilizasyonunda en uygun süre 7 saat olarak belirlenmiştir.

Katalazın CPG'ye doğrudan immobilizasyonunda belirlenmiş olan en uygun koşullarda farklı katalaz derişimlerinde 0,125, 0,25, 0,5, 0,75 ve 1,0 mg/ml immobilizasyon çalışmaları yapılmış, farklı katalaz derişimlerinde CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve miktarındaki değişimler Şekil 4.47'de gösterilmiştir.



Şekil 4.47. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (♦) ve miktarındaki (■) değişimler.

Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye doğrudan yapılan immobilizasyon sonucunda katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülmüş, aktiviteleri (U/g immobilize katalaz) ve spesifik aktiviteleri (U/ mg prot.) Şekil 4.48'de gösterilmiştir.

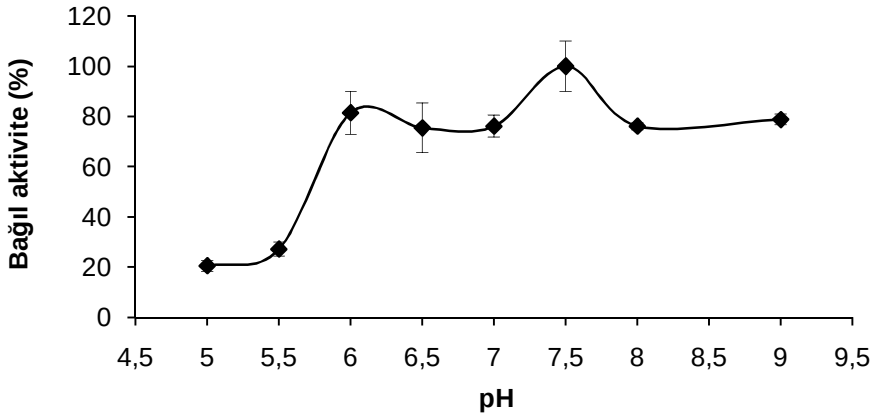


Şekil 4.48. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın spesifik aktivite (♦) ve aktivite (■) değerleri.

Katalazın CPG'ye doğrudan immobilizasyonunda katalaz miktarı arttıkça desteğe bağlanan katalaz miktarı da artmıştır (Şekil 4.47). Aktiviteler incelendiğinde 0,75 mg/ml katalaz derişimine kadar immobilize katalazın 1,0 gramı başına hesaplanan aktivitesi hızlı bir şekilde artmış, bu derişimin üzerinde önemli bir artış olmamıştır (Şekil 4.48). Bu nedenle katalazın CPG'ye immobilizasyonunda en uygun katalaz derişimi 0,75 mg/ml olarak belirlenmiştir.

4.1.3.1.(2). CPG'ye Doğrudan İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

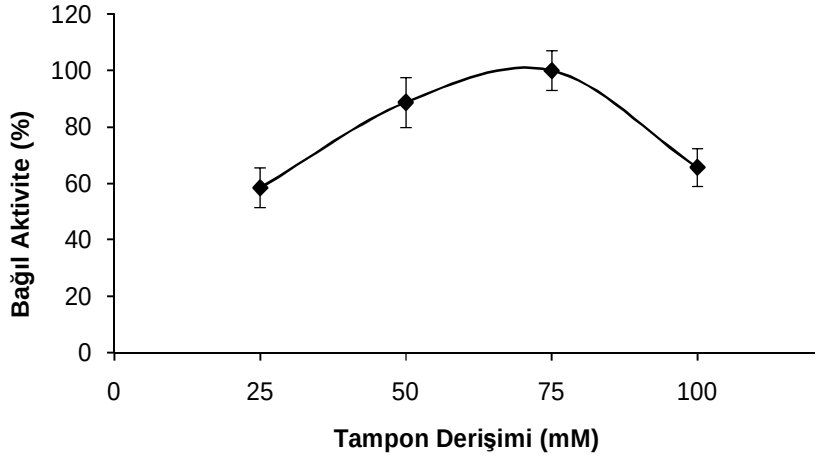
İmmobilizasyon için en uygun koşullar belirlendikten sonra immobilize katalazın en fazla aktivite gösterdiği pH belirlenmiştir. CPG'ye immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi Şekil 4.49'da gösterilmiştir.



Şekil 4.49. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

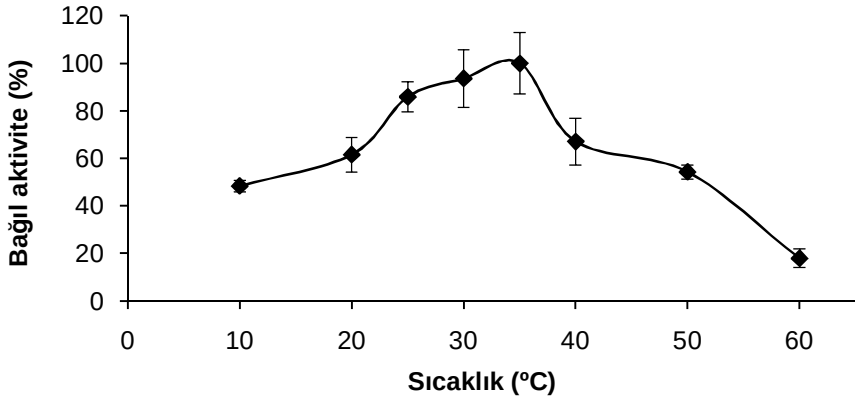
Genel olarak CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın pH 6,0-9,0 aralığında aktivitesi yüksek olup, en yüksek aktiviteyi pH 7,5 fosfat tamponunda göstermiştir.

İmmobilize katalaz örneklerinin farklı derişimlerdeki (25, 50, 75 ve 100 mM) pH 7,5 fosfat tamponunda aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.50'de gösterilmiş ve immobilize katalaz için optimum tampon derişimi 75 mM olarak belirlenmiştir.



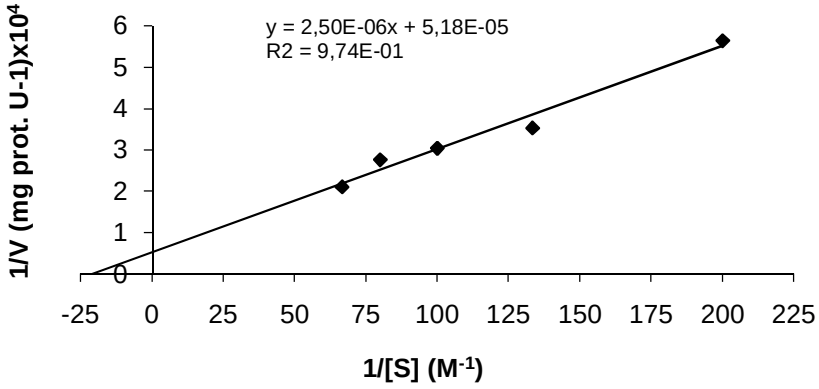
Şekil 4.50. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi.

İmmobilize katalaz örneklerinin farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40 50 ve 60ºC) aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.51'de gösterilmiş, immobilize katalaz için optimum sıcaklık 35ºC olarak belirlenmiş ve Arrhenius denkleminden aktivasyon enerjisi 22,6 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.



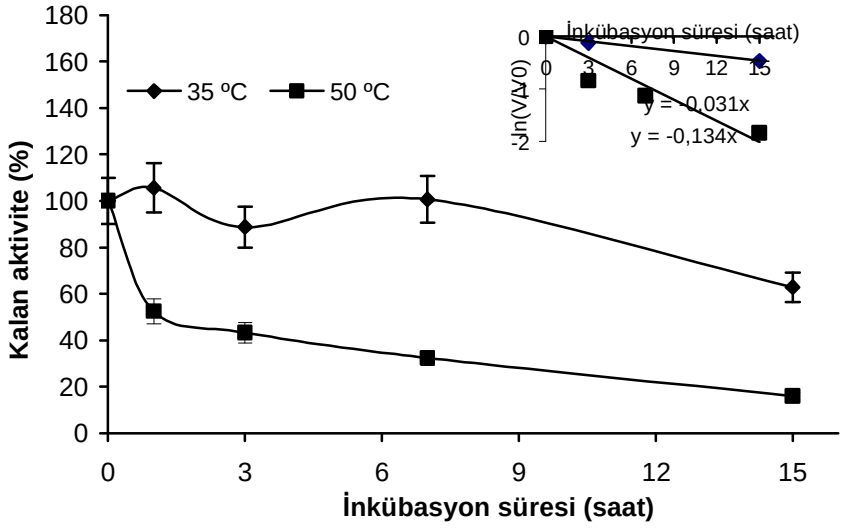
Şekil 4.51. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

Daha önce belirlenmiş olan optimum koşullarda farklı H_2O_2 derişimlerinde immobilize katalazın aktivitesi ölçülerek Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir (Şekil 4.52). İmmobilize katalaz için V_{max}=1,9x10^4 U/mg prot., K_m= 48,3 mM H_2O_2, turnover sayısı k_{cat}=8,0x10^4 s^{-1} ve katalitik etkinliği k_{cat}/K_m =1,7x10^6 s^{-1}M^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 4.52. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz için Lineweaver-Burk grafiği.

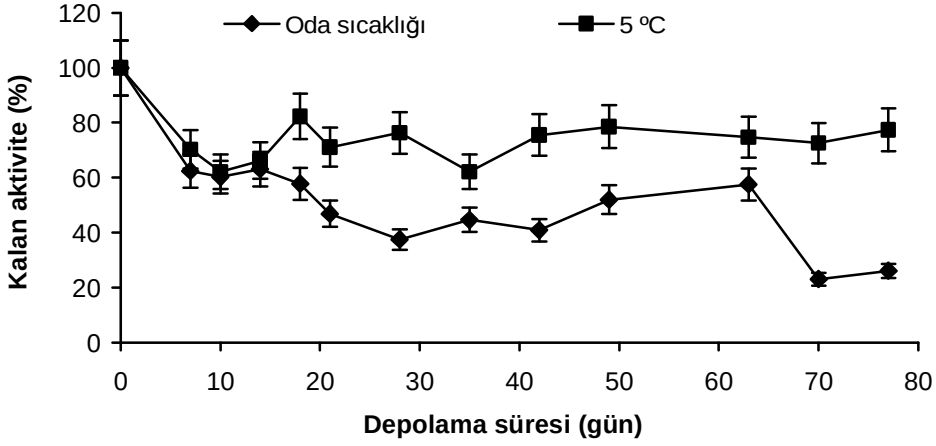
İmmobilize katalaz örnekleri 35ºC ve 50ºC sıcaklıklarda 1, 3, 7 ve 15 saat bekletilerek belirlenmiş olan optimum koşullarda kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Şekil 4.53'de gösterilmiştir



Şekil 4.53. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı aktivite değişimi. (V_0 başlangıçtaki katalaz aktivitesi, V herhangi bir zamanda ölçülen aktivite)

İmmobilize katalaz 35ºC'de 15 saat inkübe edildikten sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 64'ünü korurken 50ºC'de ancak % 16'sını koruyabilmiştir. 35ºC'de bekletilen immobilize katalaz için yarı ömür 21,1 saat, 50ºC'de ise 5,2 saat olarak bulunmuştur.

İmmobilize katalaz örnekleri oda sıcaklığında ve 5ºC'de bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Şekil 4.54'de gösterilmiştir.

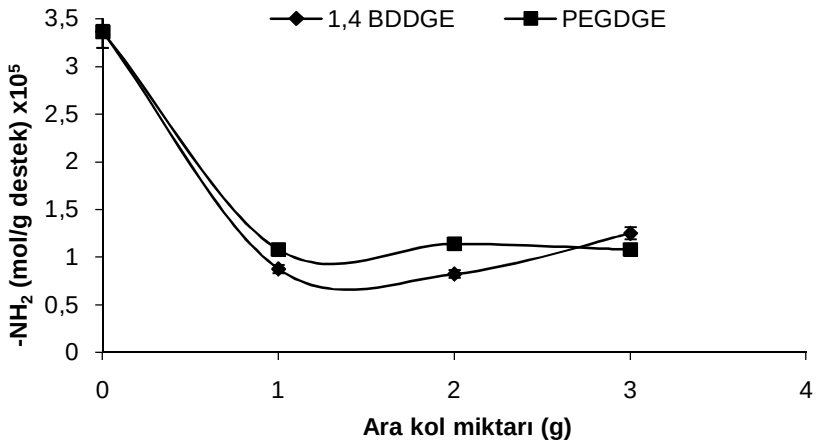


Şekil 4.54. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi.

Oda sıcaklığında saklanan immobilize katalaz 77 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 26'sını korurken, 5ºC'de saklanan immobilize katalaz aktivitesinin % 77'sini korumuştur.

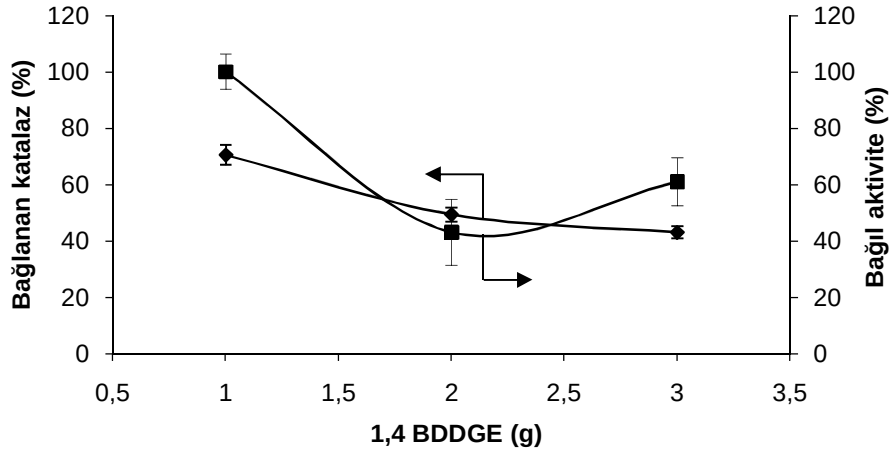
4.1.3.2. Katalazın CPG'ye 1,4 BDDGE ve PEGDGE Ara Kolları Üzerinden İmmobilizasyonu

Silanlanmış CPG'ye 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları bağlandıktan sonra destekte kalan serbest $-NH_2$ grubunun miktarı ölçülmüş, sonuçlar Şekil 4.55'de gösterilmiştir.



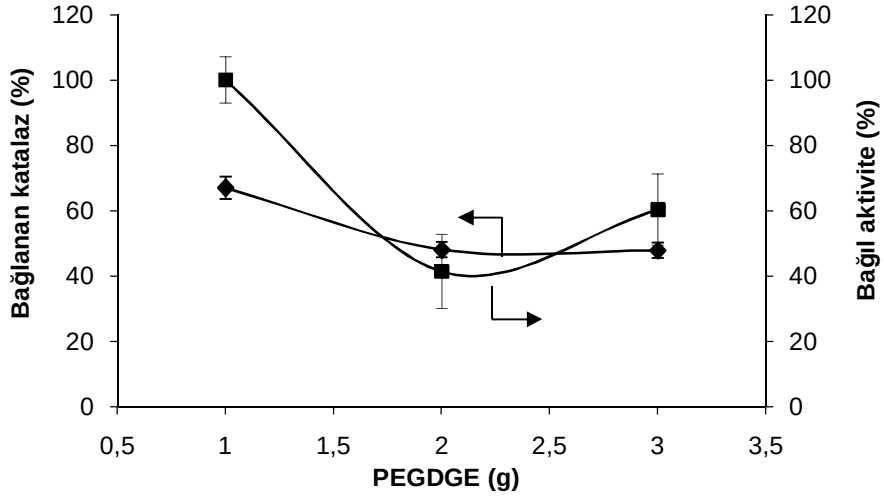
Şekil 4.55. 1,4 BDDGE ve PEGDGE miktarına bağlı olarak destekte bulunan serbest $-NH_2$ miktarındaki değişimler.

1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları ile aktifleştirilen CPG'de aktifleştirme işleminden sonra serbest $-NH_2$ gruplarının % 40'u kalmıştır. Ara kolların miktarının artması ile destekteki kalan serbest $-NH_2$ gruplarının miktarında çok fazla bir değişim olmamıştır (Şekil 4.55). Farklı miktarda 1,4 BDDGE ile aktifleştirilen CPG'ye bağlanan katalaz miktarı ve aktivite değişimi Şekil 4.56'da gösterilmiştir.



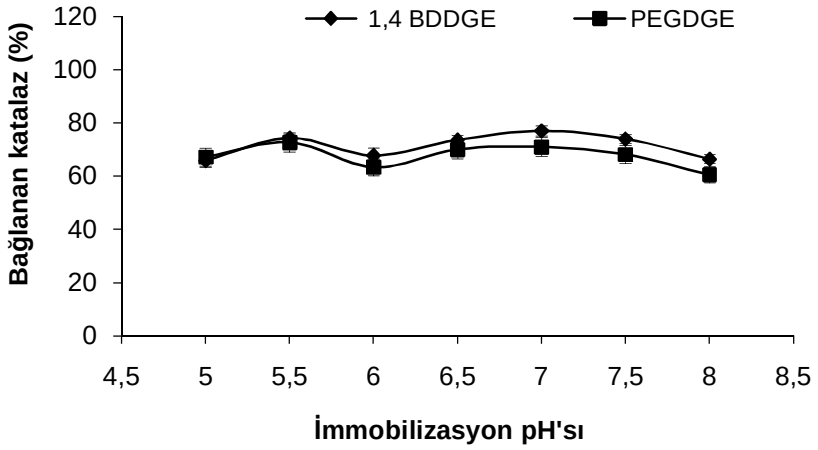
Şekil 4.56. Farklı miktarda 1,4 BDDGE ile aktifleştirilen CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (♦) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Desteğe bağlanan katalaz miktarı ve immobilize katalazın aktivitesi en yüksek 1,0 g 1,4 BDDGE ile aktifleştirilen CPG'de saptanmıştır (Şekil 4.56). 1,4 BDDGE'nin miktarı arttıldığında bağlanan enzim miktarında ve aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Farklı miktarda PEGDGE ile aktifleştirilen CPG'ye bağlanan katalaz miktarı ve aktivite değişimi Şekil 4.57'de gösterilmiştir.



Şekil 4.57. Farklı miktarda PEGDGE ile aktifleştirilen CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (♦) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

1,0 g PEGDGE ile aktifleştirilen CPG'ye bağlanan katalaz miktarının ve aktivitesinin en yüksek bulunmuştur. Ara kolların derişiminin arttırılması ile CPG'ye bağlanan katalazın aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Bu nedenle ara kolların 1,0 gramı ile aktifleştirilmiş CPG'ye farklı pH'larda katalaz immobilize edilerek immobilizasyon pH'sına bağlı aktivite değişimi incelenmiştir. Bir gram 1,4 BDDGE ve PEGDGE ile aktifleştirilmiş CPG'de oksiran grubunun miktarı sırasıyla 25,5 μmol/ g destek ve 19,6 μmol/ g destek olarak bulunmuştur. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak 1,4 BDDGE ve PEGDGE ile aktifleştirilmiş CPG'ye bağlanan katalaz miktarlarındaki değişimler Şekil 4.58'de gösterilmiştir.

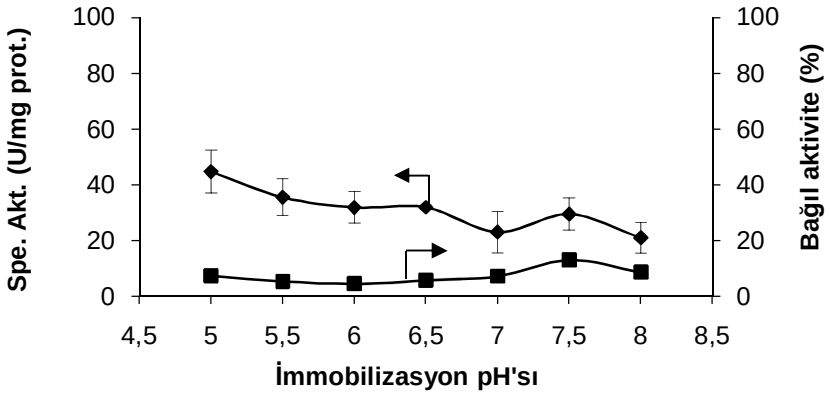


Şekil 4.58. 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları ile aktifleştirilmiş CPG'ye farklı pH'larda immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişim.

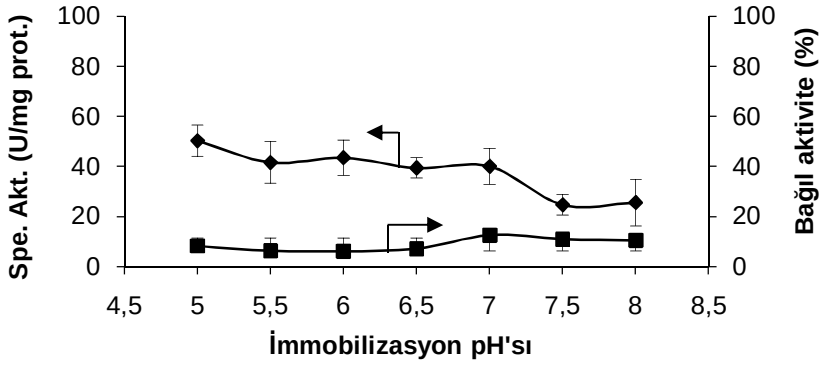
1,4 BDDGE ile aktifleştirilmiş CPG'ye farklı pH'larda yapılan immobilizasyon çalışması sonucunda pH 5,5-8,0 aralığında desteğe bağlanan katalaz miktarı başlangıçtaki katalazın % 66-77'si aralığında bir değişim göstermektedir (Şekil 4.58). Aynı şekilde PEGDGE ile aktifleştirilmiş CPG'de yapılan çalışma sonucunda bu değişim % 64-74 aralığındadır. Desteğe bağlanan katalaz miktarının 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları ile yapılan çalışmalarda benzer olduğu ve katalaz miktarının denenen immobilizasyon pH'larından çok etkilenmediği belirlenmiştir.

1,4 BDDGE veya PEGDGE ara kolları üzerinden farklı pH'larda immobilize edilen katalaz örneklerinin spesifik aktiviteleri pH 7,0 (50 mM) fosfat tamponunda

25ºC'de ölçülmüştür. Her bir pH değeri için bu örneklerin spesifik aktiviteleri ve aynı pH'larda CPG'ye doğrudan immobilize edilmiş katalaz örneklerinin spesifik aktiviteleri ile karşılaştırılarak hesaplanan bağıl oranlar ve aktivite değerleri 1,4 BDDGE ara kolu için Şekil 4.59'da ve PEGDGE ara kolu için Şekil 4.60'da gösterilmiştir.



Şekil 4.59. 1,4 BDDGE ara kolu ile aktifleştirilmiş CPG'ye farklı pH'larda immobilize edilen katalaz örneklerinin spesifik aktiviteleri (♦) ve bu örneklerin spesifik aktivitelerinin CPG'ye aynı pH'larda doğrudan immobilize edilen katalazın spesifik aktivitelerine oranları (■).



Şekil 4.60. PEGDGE ara kolu ile aktifleştirilmiş CPG'ye farklı pH'larda immobilize edilen katalaz örneklerinin spesifik aktiviteleri (♦) ve bu örneklerin spesifik aktivitelerinin CPG'ye aynı pH'larda doğrudan immobilize edilen katalazın spesifik aktivitelerine oranları (■).

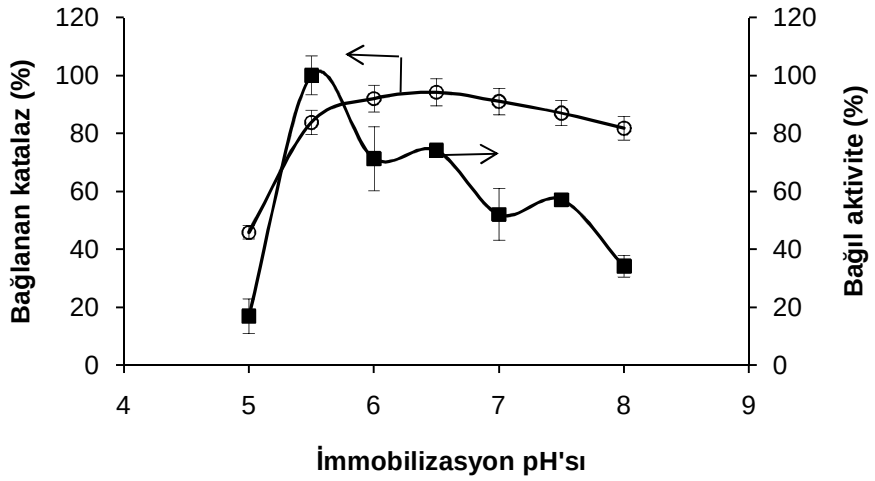
Şekil 4.59 ve Şekil 4.60'da görüldüğü gibi her iki ara kol üzerinden farklı pH'larda yapılan immobilizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen örneklerin

spesifik aktivite değerleri, CPG'ye farklı pH'larda doğrudan immobilize edilen katalaz örneklerinin spesifik aktivite değerlerinden oldukça düşüktür. Örneğin pH 7,0 (50 mM) fosfat tamponunda yapılan immobilizasyon çalışmasında 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz örneklerinin spesifik aktiviteleri sırasıyla CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın spesifik aktivitesinin % 7'si ve % 12'si kadardır. Sonuçlarımızdan 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları kullanılarak CPG'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin aktivitelerinin azaldığı açıkça görülmektedir. Bu nedenle katalazın CPG'ye 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları üzerinden immobilizasyon çalışmalarında immobilizasyon koşullarının optimizasyonu ve immobilize katalazın karakterizasyonunu içeren çalışmalara devam edilememiştir.

4.1.3.3. Katalazın 5-APA Ara Kolu Üzerinden CPG'ye İmmobilizasyonu

4.1.3.3.(1). Katalazın 5-APA Ara Kolu Üzerinden CPG'ye İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

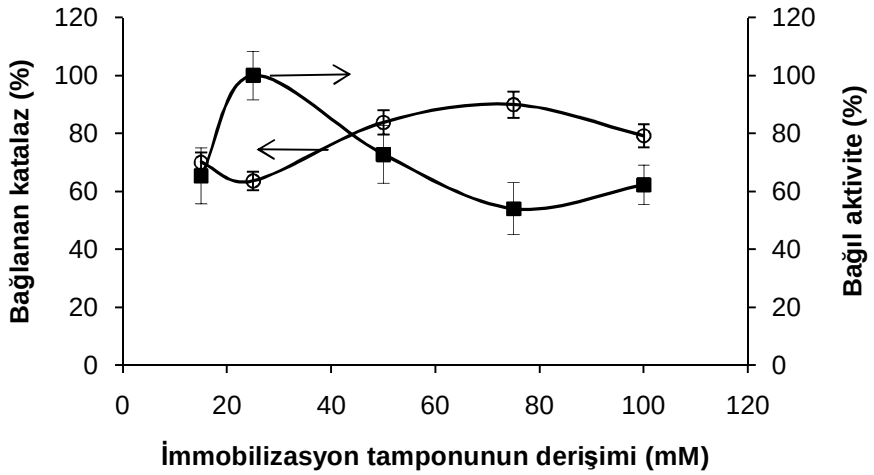
Katalazın CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda en uygun bağlanma pH'sının belirlenmesi için farklı pH'larda (5,0, 5,5 asetat; 6,0 sitrat; 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 fosfat) immobilizasyonlar yapılmıştır. 1,0 g destek başına derişimi 1,0 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış 8,0 ml katalaz çözeltisi kullanılmış ve sıcaklık 25 ^{o}C, tampon derişimi 50 mM, immobilizasyon süresi 2 saat olarak seçilmiştir. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak 5-APA ara kolu üzerinden florisile immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişim Şekil 4.61'de gösterilmiştir.



Şekil 4.61. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Şekil 4.61'den görüldüğü gibi immobilizasyon ortamının pH'sı 5,0'dan 5,5'e arttırıldığında katalazın bağlanma miktarı % 46'dan % 84'e yükselmiş, en yüksek oranda bağlanma (% 94) pH 6,5'de gerçekleşmiştir. İmmobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri incelendiğinde en yüksek aktivite pH 5,5'te immobilize edilen katalaz örneğinde elde edilmiştir. Bu bulgulara göre en uygun immobilizasyon pH'sı 5,5 olarak seçilmiştir.

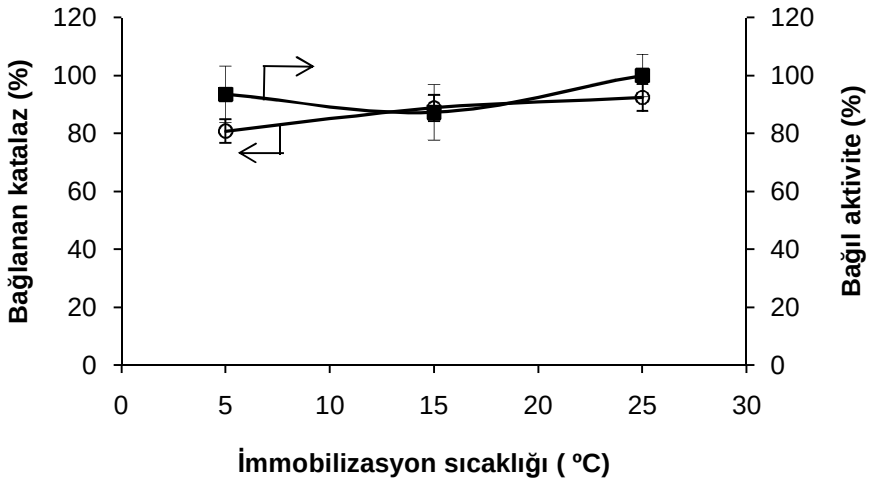
İmmobilizasyonda tampon derişiminin etkisinin belirlenmesi için çeşitli derişimlerdeki (25–100 mM) pH 5,5 asetat tamponunda immobilizasyonlar yapılmış, immobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.62'de gösterilmiştir.



Şekil 4.62. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

İmmobilizasyon tamponunun derişimi 15–100 mM arasında değiştirildiğinde en yüksek bağlanma oranı (% 90) 75 mM tampon derişiminde yapılan immobilizasyon çalışmasında elde edilmiştir (Şekil 4.62). Aktiviteler incelendiğinde en yüksek aktivite 25 mM'da immobilize edilen katalaz örnekleri için saptanmıştır. Bu nedenle katalazın CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda en uygun tampon derişimi 25 mM olarak seçilmiştir.

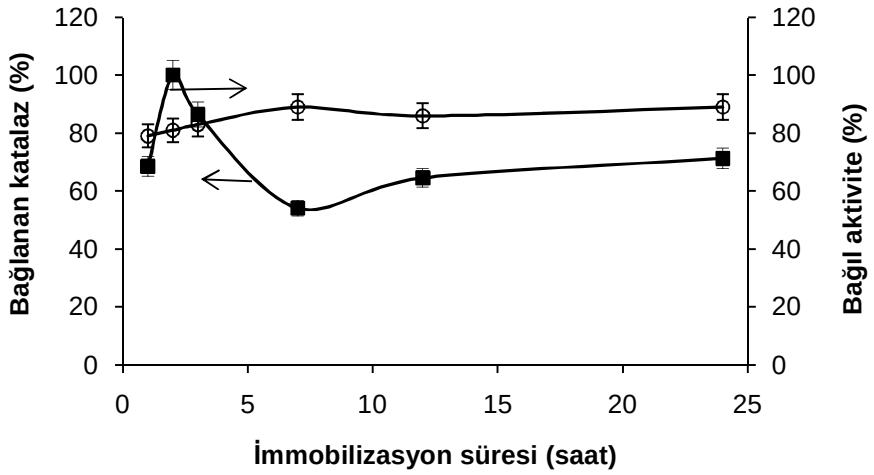
Katalazın CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilizasyonuna sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 5, 15 ve 25^{o}C'de immobilizasyon yapılmış, immobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak 5-APA ara kolu üzerinden CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.63'de gösterilmiştir.



Şekil 4.63. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Katalazın 5-APA ara kolu üzerinden CPG'ye immobilizasyonunda, immobilizasyon sıcaklığı 5ºC'den 25ºC'ye arttırıldığında bağlanan katalaz miktarında hafif bir artış olmuştur (Şekil 4.63). Denenen immobilizasyon sıcaklıklarında immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri birbirine yakın olup en yüksek değer 25ºC'de immobilize edilen katalaz örneği için elde edilmiştir. Bu nedenle en uygun immobilizasyon sıcaklığı olarak 25 ºC seçilmiştir.

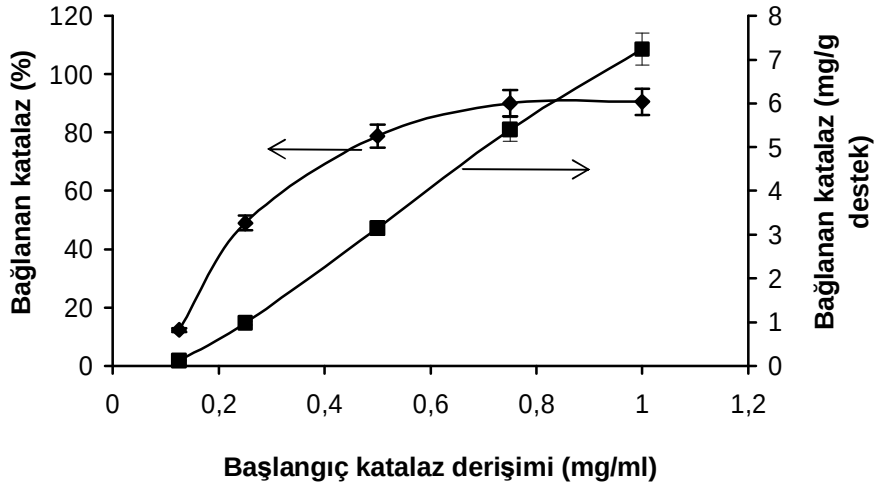
Katalazın CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda immobilizasyon süresinin aktiviteye etkisi incelenmiştir. Bunun için immobilizasyon süresi 1–24 saat aralığında değiştirilerek yukarıdaki aşamalarda belirlenmiş koşullarda immobilizasyon yapılmış, immobilizasyon süresine bağlı olarak 5-APA ara kolu üzerinden CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişim Şekil 4.64'de gösterilmiştir.



Şekil 4.64. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

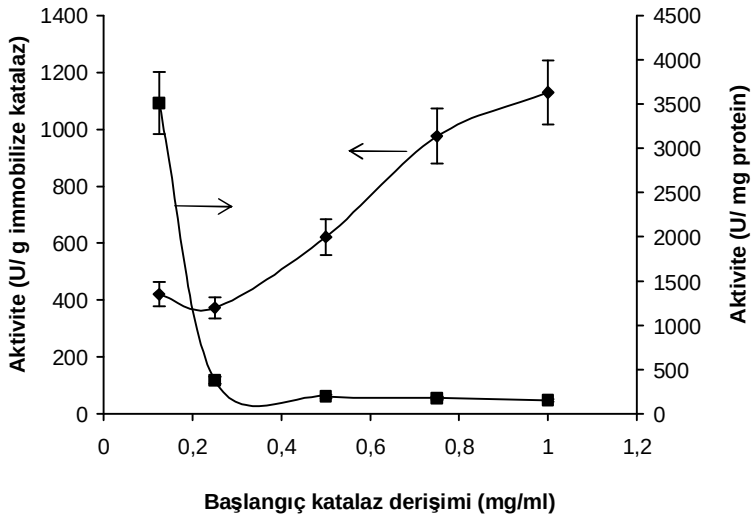
Elde edilen verilere göre farklı sürelerde (1–24 saat) yapılan immobilizasyon çalışmalarında katalazın bağlanma miktarının immobilizasyon süresine bağlı olarak arttığı belirlenmişir. İmmobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri kıyaslandığında en yüksek aktivite 2 saat immobilize edilen katalaz örneklerinde belirlenmiş ve bu nedenle immobilizasyon için en uygun sürenin 2 saat olarak seçilmiştir.

Belirlenmiş olan en uygun koşullarda (pH 5,5 25 mM asetat tamponunda 25ºC'de 2 saat immobilizasyon) birim destek başına sabit hacimde farklı katalaz derişimlerinde 0,125, 0,25, 0,5, 0,75 ve 1,0 mg/ml immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı katalaz derişimlerinde CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve miktarındaki değişimler Şekil 4.65'de gösterilmiştir.



Şekil 4.65. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (♦) ve miktarındaki (■) değişimler.

Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye 5-APA üzerinden yapılan immobilizasyon sonucunda katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülmüş, aktiviteleri (U/g immobilize katalaz) ve spesifik aktiviteleri (U/ mg prot.) Şekil 4.66'da gösterilmiştir.

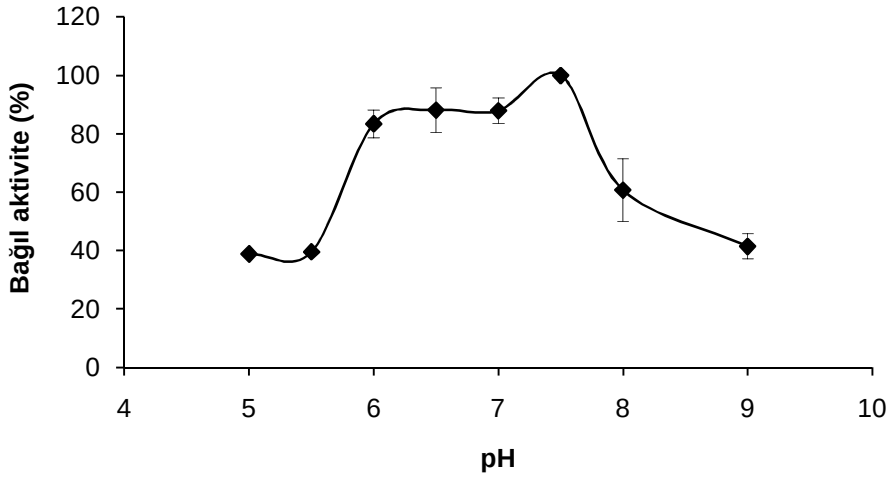


Şekil 4.66. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz için ölçülen aktivite (■) ve spesifik aktivite (♦) değerleri.

Katalazın CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda katalaz miktarı arttıkça desteğe bağlanan katalaz miktarı ve bağlanma yüzdesinde artış saptanmıştır (Şekil 4.65). Aktiviteler incelendiğinde enzimin spesifik aktivitesi başlangıç katalaz derişimi 0,125 mg/ml'den 0,25 mg/ml'ye arttırıldığında büyük oranda azalmış, 0,25 mg/ml katalaz derişiminin üstündeki derişimlerde ölçülen spesifik aktivite değerleri oldukça birbirine yakın bulunmuştur. İmmobilize katalazın 1 gramı başına hesaplanan aktivite değerleri 0,125 mg/ml ve 0,25 mg/ml katalaz derişimlerinde birbirine yakın olup 0,25 mg/ml üstündeki derişimlerde artmıştır (Şekil 4.66). Aktiviteler ve bağlanma oranları dikkate alındığında en uygun katalaz derişimi 0,75 mg/ml olarak belirlenmiştir.

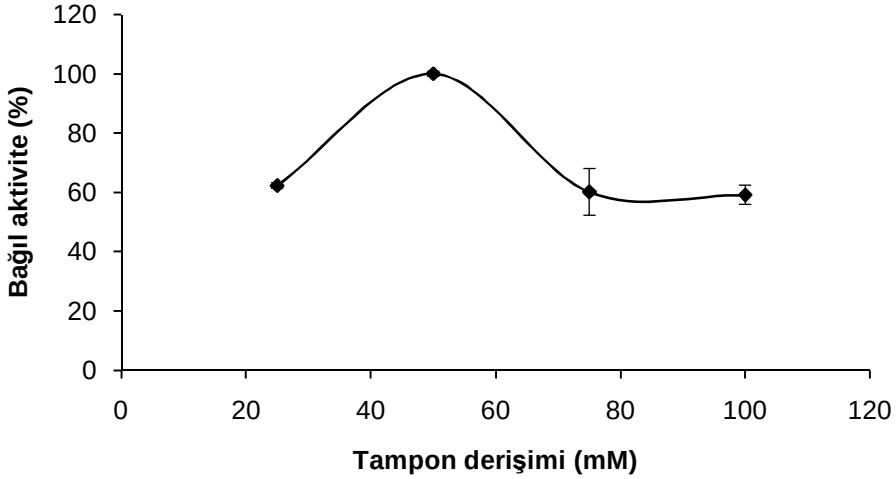
4.1.3.3.(2). CPG'ye 5-APA Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

İmmobilizasyon için en uygun koşullar belirlendikten sonra immobilize katalazın en fazla aktivite gösterdiği pH belirlenmiştir. Bunun için 50 mM pH 5,0, 5,5 asetat tamponu, 6,0 sitrat tamponu, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat tamponu ve 9,0 borat tamponunda immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülerek immobilize katalaz için optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.67).



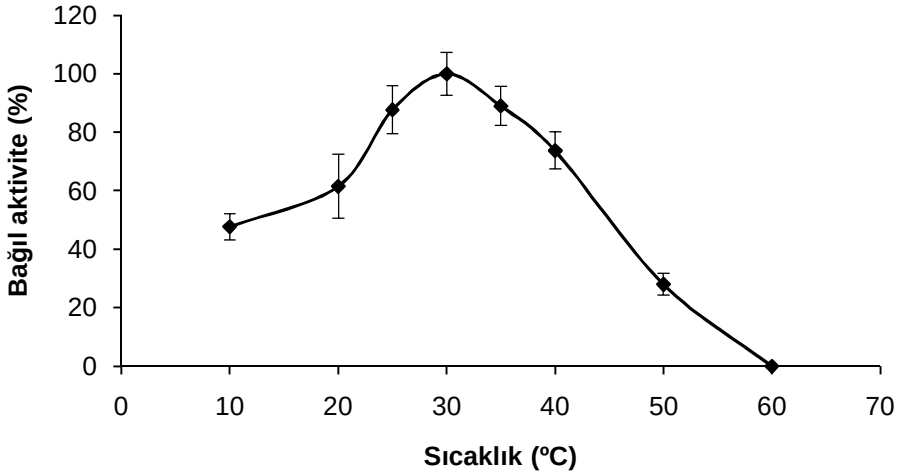
Şekil 4.67. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

İmmobilize katalaz örneklerinin farklı derişimlerdeki (25, 50, 75 ve 100 mM) pH 7,5 fosfat tamponunda aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.68'de gösterilmiş ve immobilize katalaz için optimum tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.



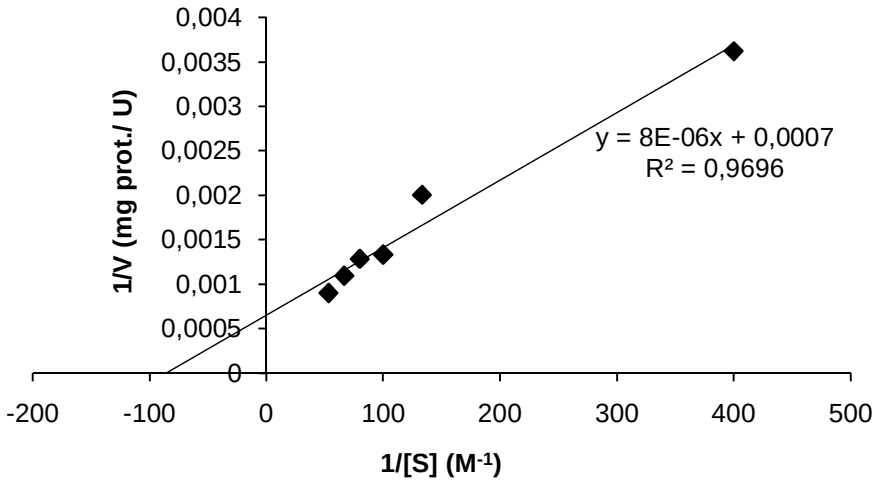
Şekil 4.68. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinen immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi.

İmmobilize katalaz örneklerinin farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60ºC) aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.69'da gösterilmiş, immobilize katalaz için optimum sıcaklık 30ºC olarak belirlenmiş ve Arrhenius denkleminden aktivasyon enerjisi 27,4 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.



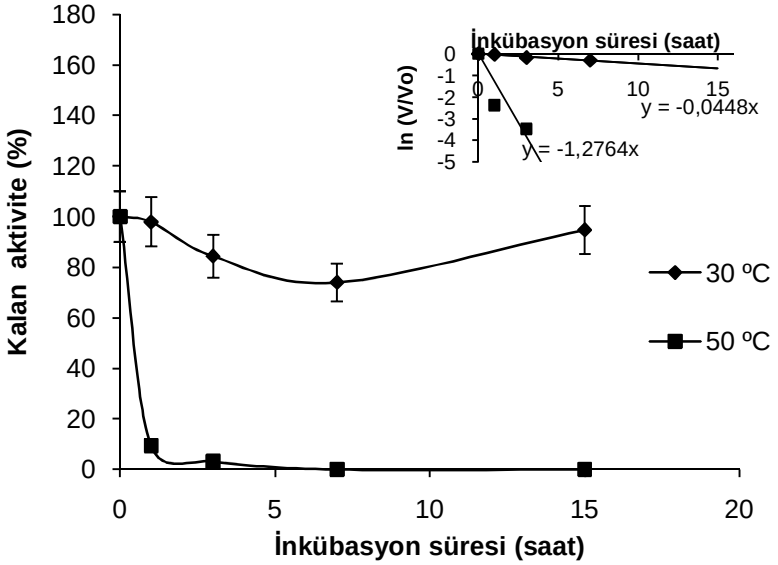
Şekil 4.69. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

Belirlenmiş olan optimum koşullarda farklı H_2O_2 derişimlerinde immobilize katalazın aktivitesi ölçülerek Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir (Şekil 4.70). İmmobilize katalaz için V_{max}=1,4x10^{3}U/mg prot., K_m= 11,4 mM H_2O_2, turnover sayısı k_{cat}= 5,9x10^3 s^{-1} ve katalitik etkinliği k_{cat}/K_m=5,2x10^5 s^{-1}M^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 4.70. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın için Lineweaver-Burk grafiği.

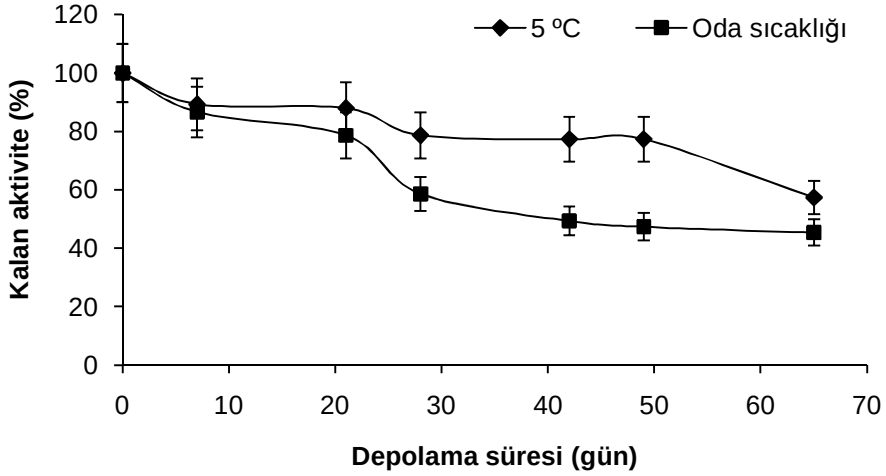
İmmobilize katalaz örnekleri 30ºC ve 50ºC sıcaklıklarda 1, 3, 7 ve 15 saat bekletilerek, belirlenmiş olan optimum koşullarda kalan aktiviteleri ölçülmüştür. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi Şekil 4.71'de gösterilmiştir.



Şekil 4.71. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi. (V_0 başlangıçtaki katalaz aktivitesi, V herhangi bir zamanda ölçülen aktivite)

30ºC'de bekletilen immobilize katalaz için yarı ömür 15,5 saat, 50ºC'de ise 0,5 saat olarak bulunmuştur.

İmmobilize katalaz örnekleri oda sıcaklığında ve 5ºC'de bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi Şekil 4.72'de gösterilmiştir.



Şekil 4.72. CPG'ye 5-APA arakolu üzerinden immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi.

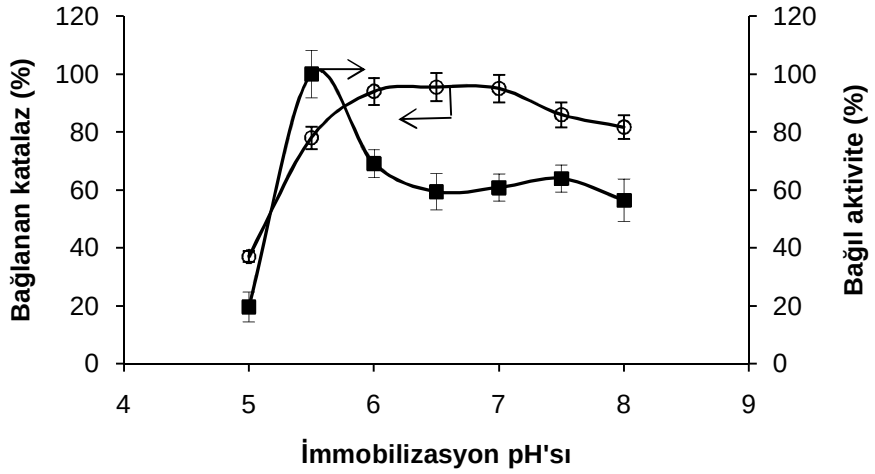
Oda sıcaklığında saklanan immobilize katalaz 28 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 59'unu korurken, 5ºC'de saklanan immobilize katalaz aktivitesinin % 79'unu korumuştur.

4.1.3.4. Katalazın 6-AHA Ara Kolları Üzerinden CPG'ye İmmobilizasyonu

4.1.3.4.(1). Katalazın 6-AHA Ara Kolları Üzerinden CPG'ye İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Katalazın 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda en uygun bağlanma pH'sının belirlenmesi için farklı pH'larda (5,0, 5,5 asetat; 6,0 sitrat; 6,5,

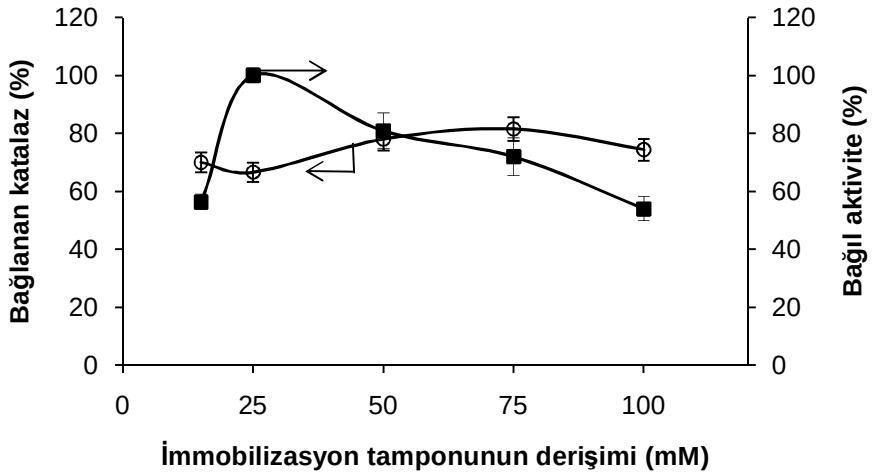
7,0, 7,5 ve 8,0 fosfat) immobilizasyonlar yapılmıştır. 1,0 g destek başına derişimi 1,0 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış 8,0 ml katalaz çözeltisi kullanılmış ve sıcaklık 25ºC, tampon derişimi 50 mM, immobilizasyon süresi 2 saat olarak seçilmiştir. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesineki değişimler Şekil 4.73'de gösterilmiştir.



Şekil 4.73. Farklı pH'larda CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Şekil 4.73'den görüldüğü gibi genel olarak ortam pH'sı arttıkça (pH 7,0'ye kadar) desteğe bağlanan katalaz miktarı artmaktadır. Ancak, en yüksek aktivite pH 5,5'te immobilize edilmiş katalaz için ölçülmüştür. Bu bulgulara göre daha sonraki çalışmalarda katalazın CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda immobilizasyon pH'sı 5,5 olarak seçilmiştir.

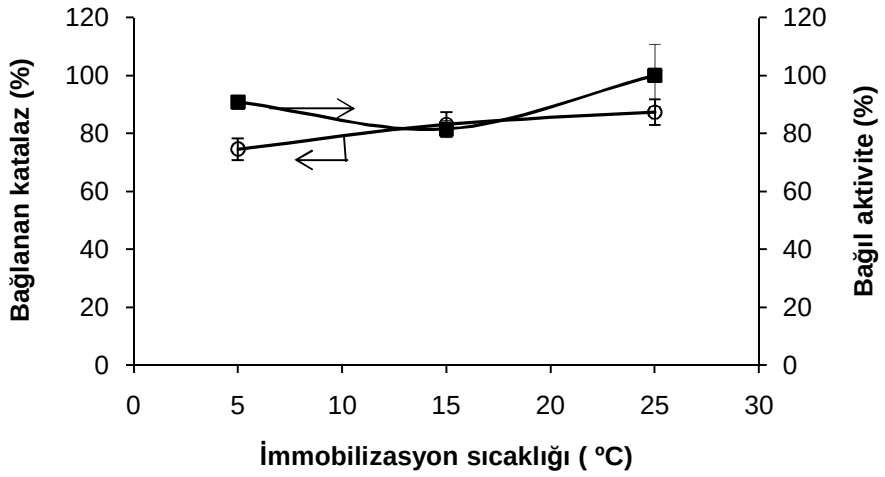
İmmobilizasyonda tampon derişiminin etkisinin belirlenmesi için çeşitli derişimlerdeki (25–100 mM) pH 5,5 asetat tamponunda immobilizasyonlar yapılmış, immobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişim Şekil 4.74'de gösterilmiştir.



Şekil 4.74. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Katalazın desteğe bağlanma miktarının immobilizasyon tamponunun derişiminden çok etkilenmediği, buna karşın immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri incelendiğinde immobilizasyon tamponundan etkilendikleri belirlenmiştir. Katalazın CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda en yüksek aktivite 50 mM tampon derişiminde immobilize edilen katalaz örnekleri için saptanmış ve en uygun tampon derişimi olarak 50 mM seçilmiştir (Şekil 4.74).

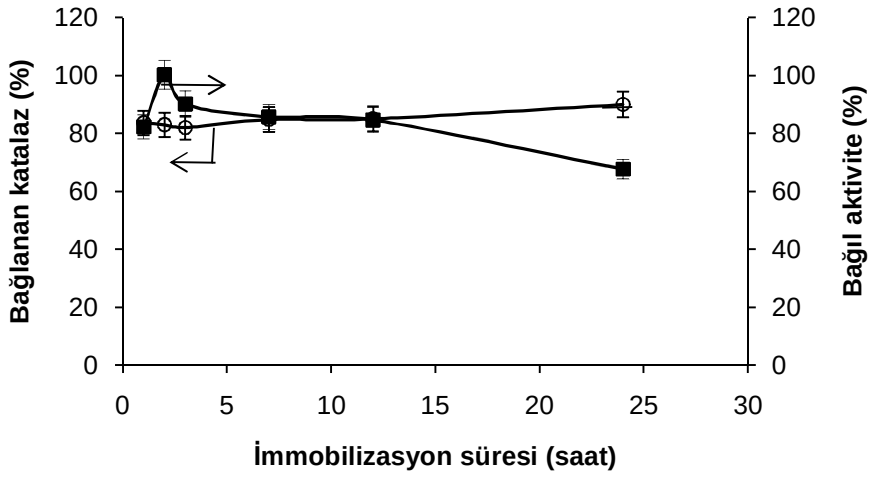
Katalazın CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonuna sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 5, 15 ve 25^{o}C'de immobilizasyon yapılmış, immobilizasyon sıcaklığına bağlı immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.75'de gösterilmiştir.



Şekil 4.75. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

Katalazın CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda, immobilizasyon sıcaklığı 5ºC'den 25ºC'ye arttırıldığında bağlanan katalaz miktarında hafif bir azalma olmuş fakat immobilize katalaz örneklerinin aktivitelerinde büyük bir değişim olmamıştır (Şekil 4.75). En uygun immobilizasyon sıcaklığı olarak 15 ºC seçilmiştir.

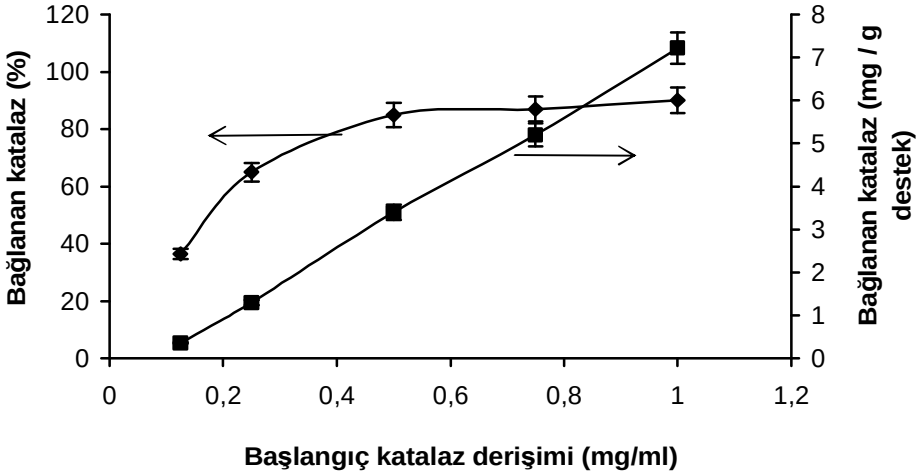
Katalazın CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda immobilizasyon süresinin aktiviteye etkisi incelenmiştir. Bunun için immobilizasyon süresi 1–24 saat aralığında değiştirilerek yukarıdaki aşamalarda belirlenmiş koşullarda immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve aktivitesindeki değişimler Şekil 4.76'da gösterilmiştir.



Şekil 4.76. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (o) ve aktivitesindeki (■) değişimler.

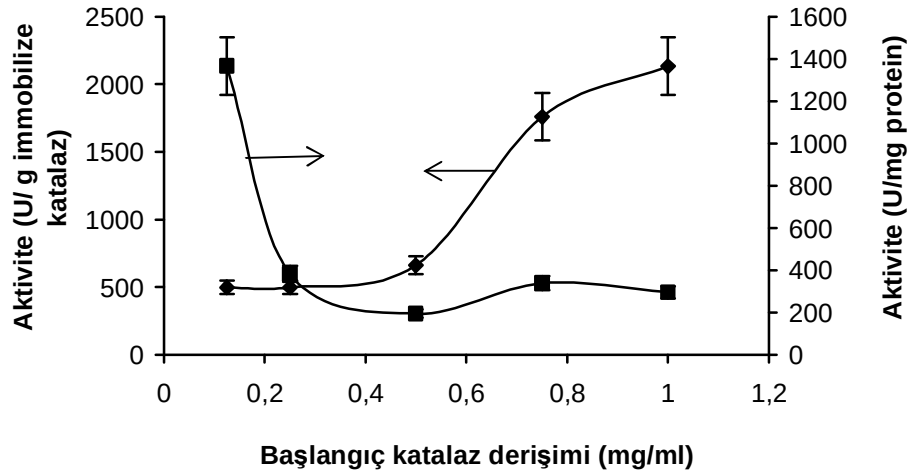
Bu verilere göre farklı sürelerde yapılan immobilizasyon çalışmalarında katalazın bağlanma miktarının immobilizasyon süresinden fazla etkilenmediği ve en yüksek aktivite 2 saat immobilize edilen katalaz örneklerinde bulunduğu için 2 saat immobilizasyon süresinin yeterli olduğu saptanmıştır.

Belirlenmiş olan en uygun koşullarda (pH 5,5 50 mM asetat tamponunda 15ºC'de 2 saat immobilizasyon) birim destek başına sabit hacimde farklı katalaz derişimlerinde 0,125, 0,25, 0,75 ve 1,0 mg/ml immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı katalaz derişimlerinde 6-AHA ara kolu üzerinden CPG'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki ve miktarındaki değişimler Şekil 4.77'de gösterilmiştir.



Şekil 4.77. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki (♦) ve miktarındaki (■) değişimler.

Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden yapılan immobilizasyon sonucunda katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülmüş, aktiviteleri (U/g immobilize katalaz) ve spesifik aktiviteleri (U/ mg prot.) Şekil 4.78'de gösterilmiştir.

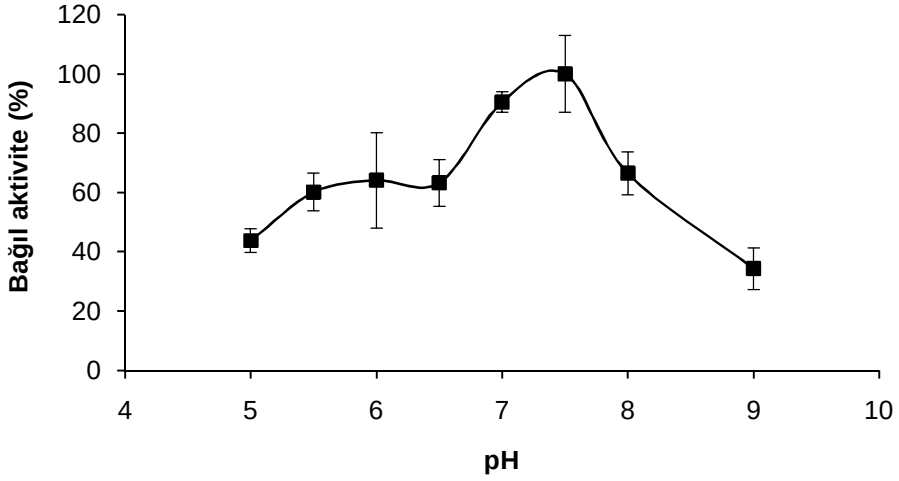


Şekil 4.78. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde 6-AHA ara kolu üzerinden CPG'ye immobilize edilen katalaz için ölçülen aktivite (♦) ve spesifik aktivite (■) değerleri.

Katalazın CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilizasyonunda katalaz miktarı 0,125 mg/ml'den 1,0 mg/ml'ye arttırıldığında desteğe bağlanan katalaz miktarı artarken katalazın bağlanma yüzdesi 0,5 mg/ml'ye kadar artmış bunun üzerindeki derişimlerde fazla değişmemiştir (Şekil 4.77). Aktiviteler incelendiğinde enzimin spesifik aktivitesi azalırken, immobilize katalazın 1 gramı başına hesaplanan aktivitede en büyük artış katalaz derişimi 0,5 mg/ml'den 0,75 mg/ml'ye arttırıldığında gerçekleşmiştir (Şekil 4.78). Bu nedenle en uygun katalaz derişimi 0,75 mg/ml olarak belirlenmiştir.

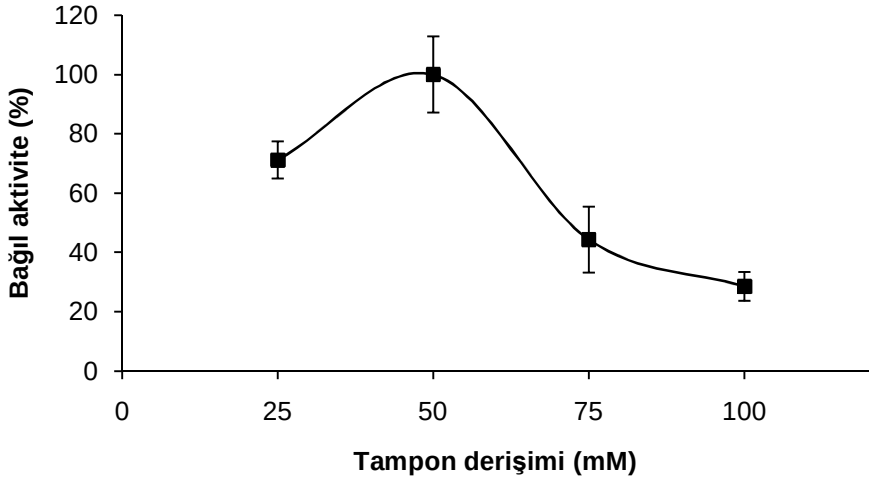
4.1.3.4.(2). CPG'ye 6-AHA Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

İmmobilizasyon için en uygun koşullar belirlendikten sonra immobilize katalazın en fazla aktivite gösterdiği pH belirlenmiştir. Bunun için 50 mM pH 5,0, 5,5 asetat tamponu, 6,0 sitrat tamponu, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat tamponu ve 9,0 borat tamponunda immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülerek immobilize katalaz için optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.79).



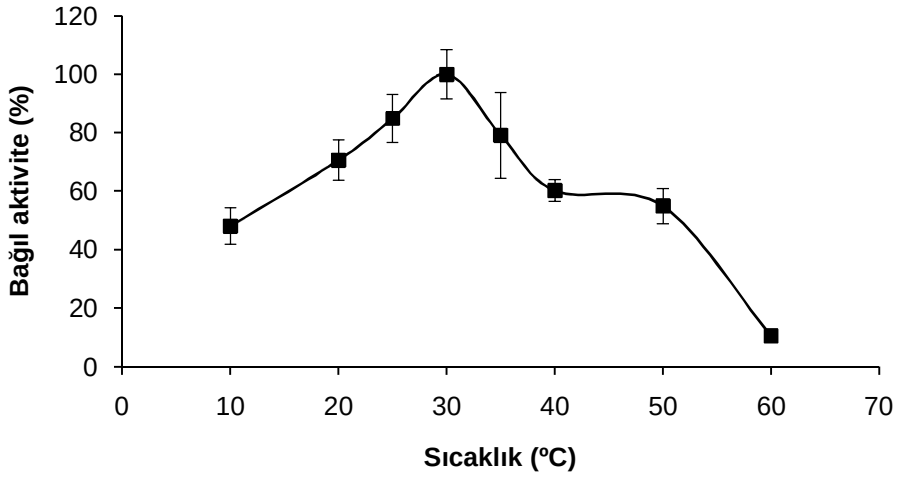
Şekil 4.79. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

İmmobilize katalaz örneklerinin farklı derişimlerdeki (25, 50, 75 ve 100 mM) pH 7,5 fosfat tamponunda aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.80'de gösterilmiş, immobilize katalaz için optimum tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.



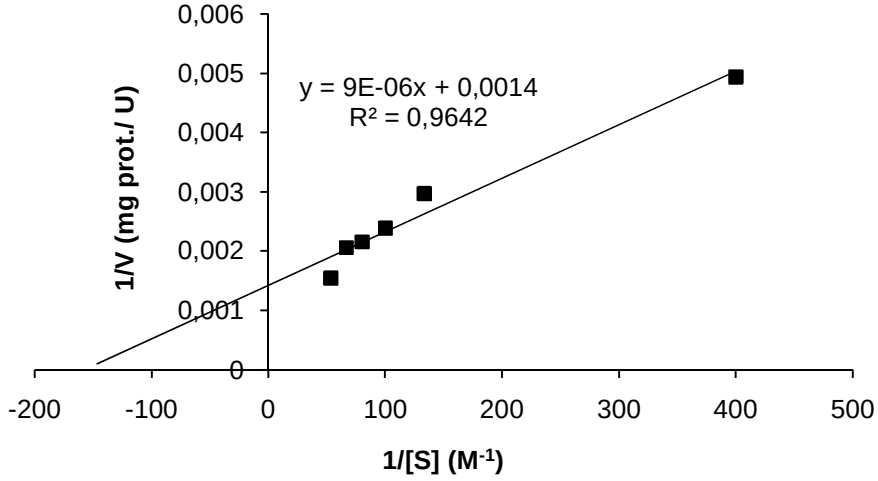
Şekil 4.80. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinen immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi.

İmmobilize katalaz örneklerinin farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60ºC) aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.81'de verilmiş, immobilize katalaz için optimum sıcaklık 30ºC olarak belirlenmiş ve Arrhenius denkleminden aktivasyon enerjisi 26,2 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.



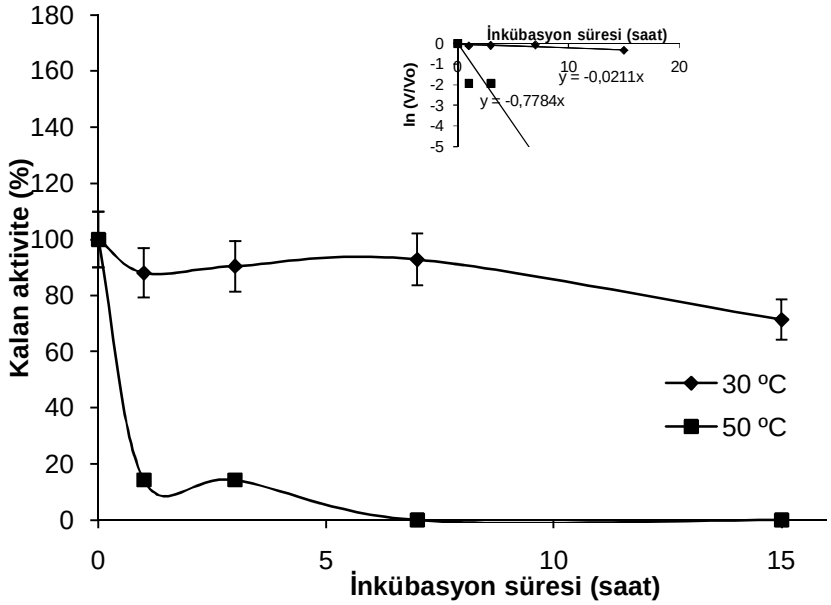
Şekil 4.81. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

Belirlenmiş olan optimum koşullarda farklı H_2O_2 derişimlerinde immobilize katalazın aktivitesi ölçülerek Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir (Şekil 4.82). İmmobilize katalaz için V_{max}=6,2x10^2 U/mg prot., K_m= 5,6 mM H_2O_2, turnover sayısı k_{cat}= 2,6x10^3 s^{-1} ve katalitik etkinliği k_{cat}/K_m= 4,6x10^5 s^{-1}M^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 4.82. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz için Lineweaver-Burk grafiği.

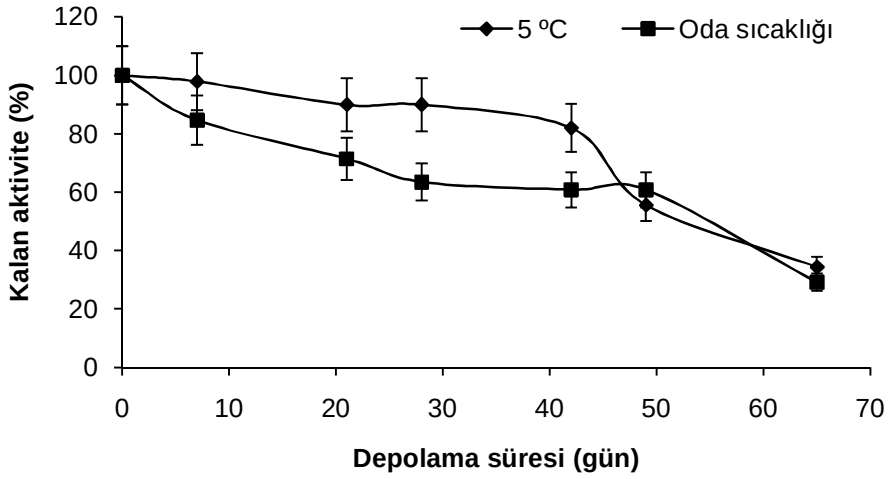
İmmobilize katalaz örnekleri 30ºC ve 50ºC sıcaklıklarda 1, 3, 7 ve 15 saat bekletilerek belirlenmiş olan optimum koşullarda kalan aktiviteleri ölçülmüştür. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi Şekil 4.83'de gösterilmiştir.



Şekil 4.83. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi. (V_0 başlangıçtaki katalaz aktivitesi, V herhangi bir zamanda ölçülen aktivite)

30ºC'de bekletilen immobilize katalaz için yarı ömür 32,8 saat, 50ºC'de ise 0,9 saat olarak bulunmuştur.

İmmobilize katalaz örnekleri oda sıcaklığında ve 5ºC'de bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi Şekil 4.84'de gösterilmiştir.



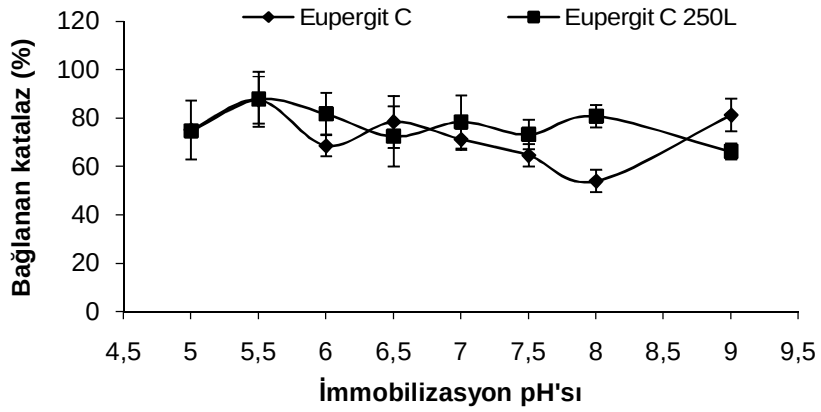
Şekil 4.84. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi.

Oda sıcaklığında saklanan immobilize katalaz 28 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 63'ünü korurken, 5ºC'de saklanan immobilize katalaz aktivitesinin % 90'nını korumuştur.

4.1.4. Katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye İmmobilizasyonu

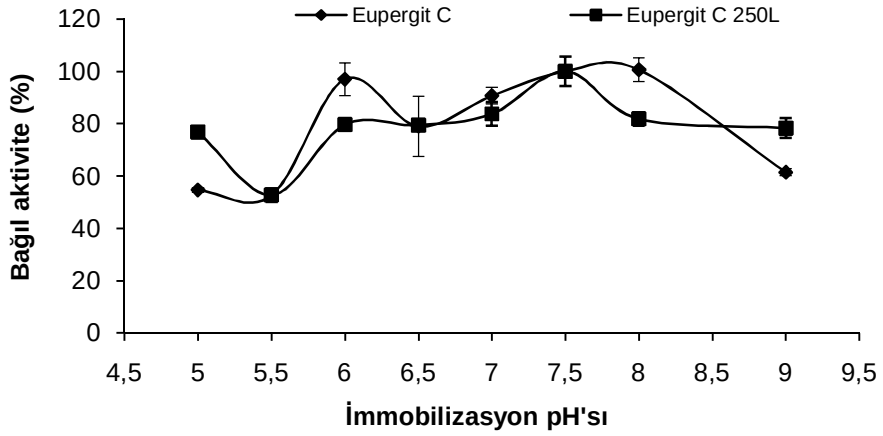
4.1.4.1. Katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye İmmobilizasyonunda İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilizasyonunda en uygun bağlanma pH'sının belirlenmesi için farklı pH'larda (5,0-8,0) immobilizasyon yapılmıştır. 1,0 g destek için derişimi 1,0 mg/ml olacak şekilde hazırlanan 9,0 ml katalaz çözeltisi kullanılmıştır. İmmobilizasyon işleminde kullanılan tamponların derişimi 1,0 M, immobilizasyon sıcaklığı 25 ºC, immobilizasyon süresi 24 saat olarak seçilmiştir. Farklı pH'larda Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler Şekil 4.85'de gösterilmiştir.



Şekil 4.85. Farklı pH'larda Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler.

Farklı pH'larda immobilize edilmiş katalaz örneklerinin aktiviteleri 25ºC'de, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 10 mM H_2O_2 varlığında ölçülmüş, aktivitelerdeki değişimler Şekil 4.86'da gösterilmiştir.

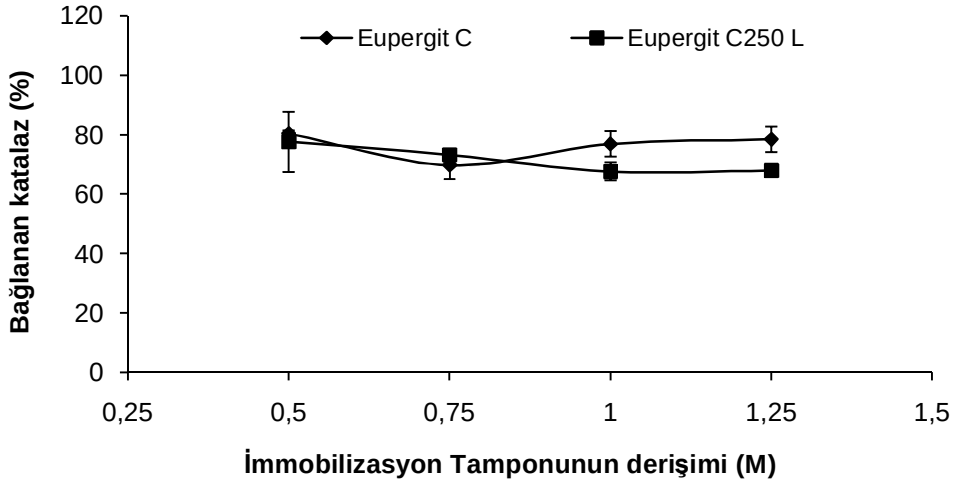


Şekil 4.86. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitelerindeki değişimler.

Eupergit C'ye immobilize edilen katalaz, genel olarak pH 6,0-8,0 aralığında yüksek aktiviteye sahip olup, en yüksek aktiviteyi pH 7,5'te göstermiştir. Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz pH 5,5 hariç diğer pH'larda yüksek aktiviteye

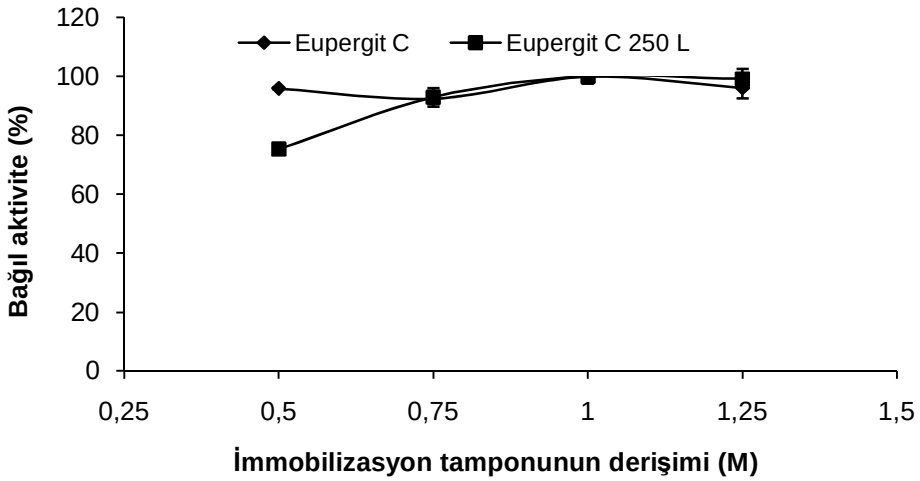
sahip olup, en yüksek aktiviteyi pH 7,5'te göstermiştir. Bu verilere göre bundan sonraki aşamalarda katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilizasyonunda immobilizasyon pH'sı 7,5 olarak kullanılmıştır.

Katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilizasyonunda tampon derişiminin etkisinin belirlenmesi için çeşitli derişimlerdeki (0,50, 0,75, 1,00 ve 1,25 M) pH 7,5 fosfat tamponunda immobilizasyonlar yapılmıştır. Tampon derişimine bağlı olarak Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler Şekil 4.87'de gösterilmiştir.



Şekil 4.87. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler.

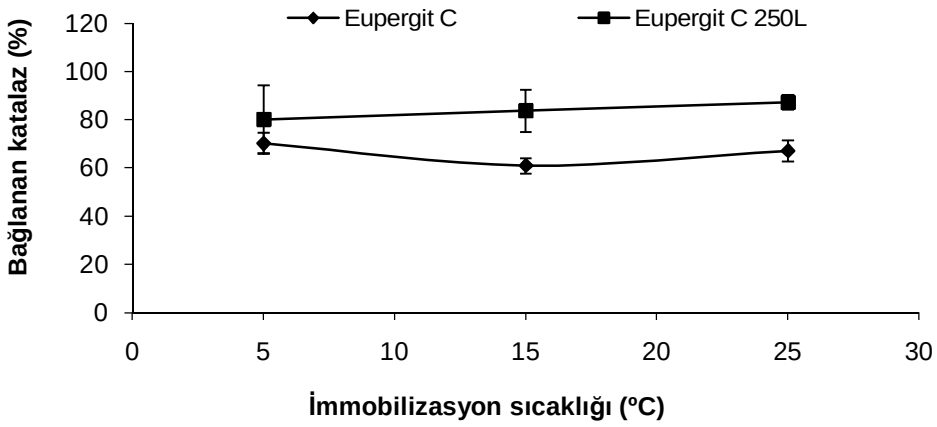
Tampon derişiminin artmasına bağlı olarak bağlanan katalaz miktarı çok fazla değişmemiştir. Farklı tampon derişimlerinde immobilize edilmiş katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülmüş ve immobilize katalaz aktivitesinin immobilizasyon tamponunun derişimine bağlı değişimleri Şekil 4.88'de gösterilmiştir.



Şekil 4.88. İmmobilizasyon tamponunun derişimine bağlı olarak Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitelerindeki değişimler.

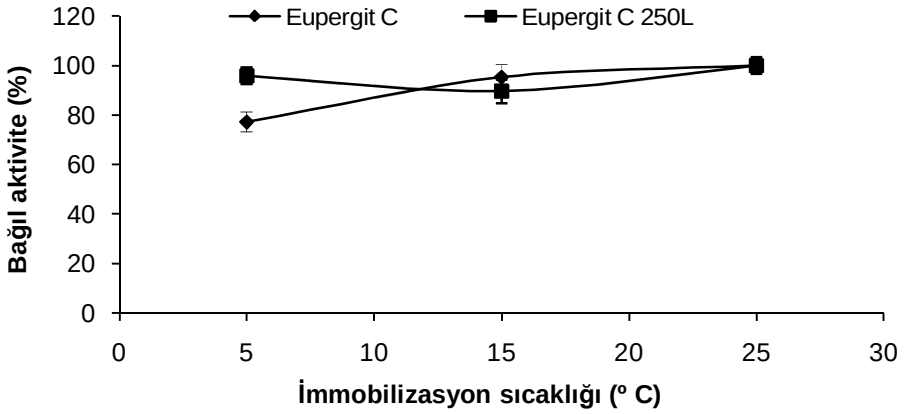
Aktiviteler incelendiğinde en yüksek aktivite 1,0 M tampon derişiminde immobilize edilen katalaz örnekleri için saptanmıştır (Şekil 4.88). Bu nedenle daha sonraki immobilizasyon çalışmalarında 1,0 M pH 7,5 fosfat tamponu kullanılmıştır.

Katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilizasyonuna sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 5, 15 ve 25 ºC'de immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilizasyon sıcaklığının Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye bağlanan katalaz miktarına etkisi Şekil 4.89'da gösterilmiştir.



Şekil 4.89. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdesindeki değişimler.

5, 15 ve 25ºC'de immobilize edilen örneklerin aktiviteleri ölçülmüş, farklı sıcaklıklarda Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitelerindeki değişimler Şekil 4.90'da gösterilmiştir.

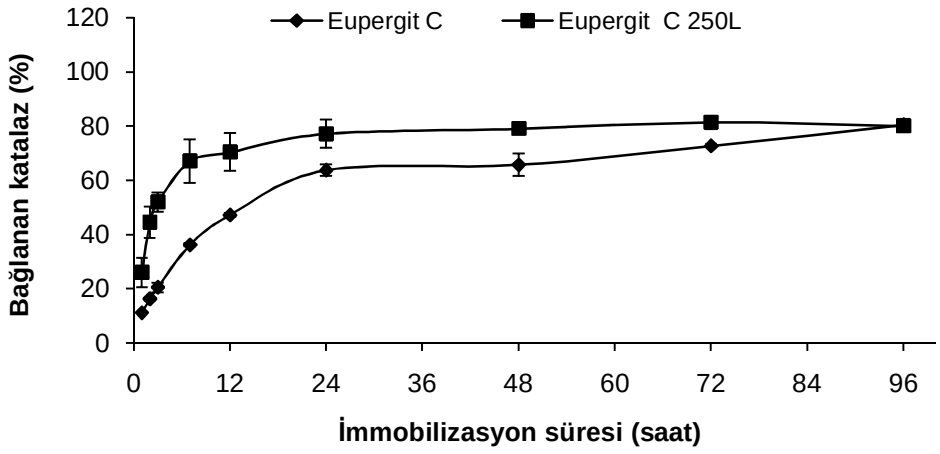


Şekil 4.90. Farklı sıcaklıklarda Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitelerindeki değişimler.

Farklı sıcaklıklarda Eupergit C ve Eupergit C 250 L'ye yapılan immobilizasyon çalışmaları sonucunda 5, 15 ve 25ºC sıcaklıklarında katalazın bağlanma yüzdeleri birbirine yakın bulunmuştur (Şekil 4.89). Eupergit C'ye 15 ve 25ºC sıcaklıklarda yapılan immobilizasyon sonucunda immobilize katalaz örneklerinin aktivite değerleri

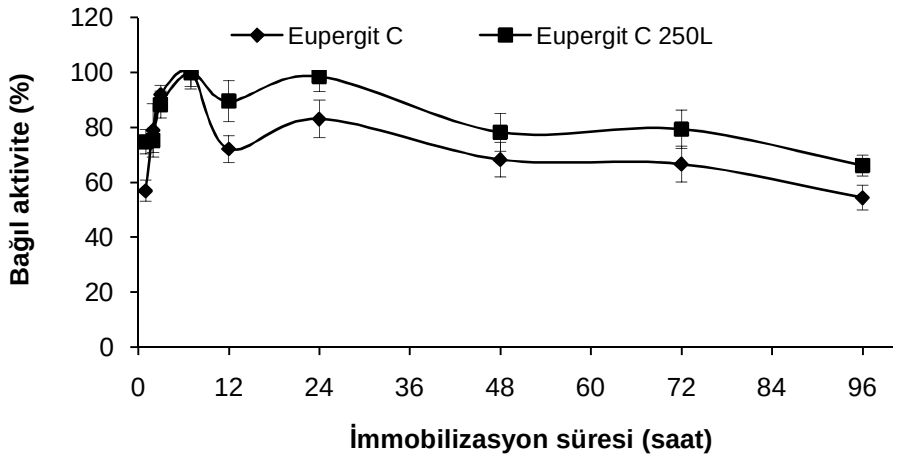
birbirine yakın olup, 5ºC'de immobilize edilen katalaz örneklerinin aktiviteleri biraz daha düşük bulunmuştur (%77). Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin aktiviteleri üç sıcaklıkta da birbirine yakın bulunmuştur. Katalazın Eupergit C 250L'ye immobilizasyonunda, immobilizasyon sıcaklığının değişimi immobilize katalaz örneklerinin aktivitelerini fazla etkilememiştir. Her iki destekte de 25ºC'de yapılan immobilizasyon sonucunda elde edilen aktivite değerleri en yüksek bulunduğu için (Şekil 4.90) daha sonraki çalışmalarda immobilizasyon 25ºC'de yapılmıştır.

Katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilizasyonunda immobilizasyon süresinin aktiviteye ektisi incelenmiştir. Bunun için immobilizasyon süresi 1–96 saat aralığında değiştirilerek yukarıdaki aşamalarda belirlenmiş en uygun koşullarda immobilizasyon yapılmıştır. İmmobilizasyon süresinin Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye bağlanan katalaz miktarına etkisi Şekil 4.91'de gösterilmiştir.



Şekil 4.91. Farklı immobilizasyon sürelerinde Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın immobilizasyon süresine bağlı olarak bağlanma yüzdesindeki değişimler.

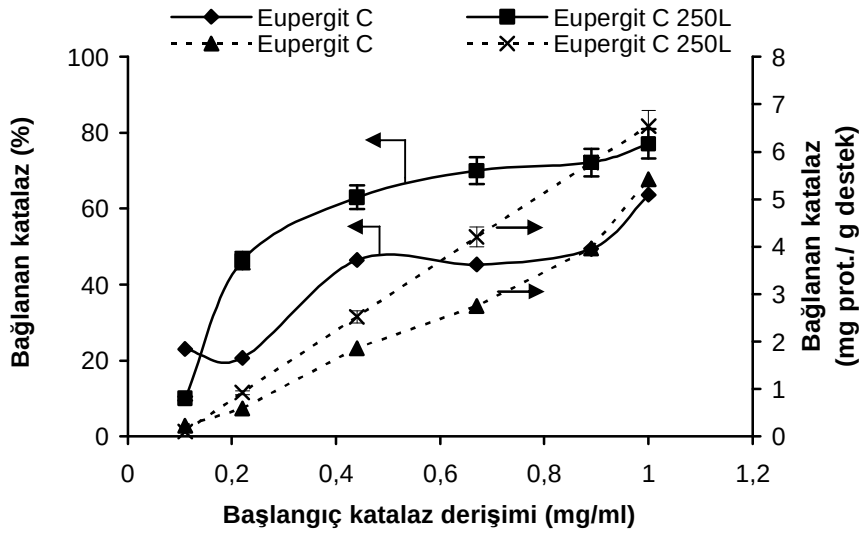
Farklı immobilizasyon süreleri kullanılarak immobilize edilen örneklerin aktiviteleri ölçülmüş, immobilize edilen katalazın aktivitelerindeki bağıl değişim Şekil 4.92'de gösterilmiştir.



Şekil 4.92. Farklı immobilizasyon sürelerinde Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitelerindeki değişimler.

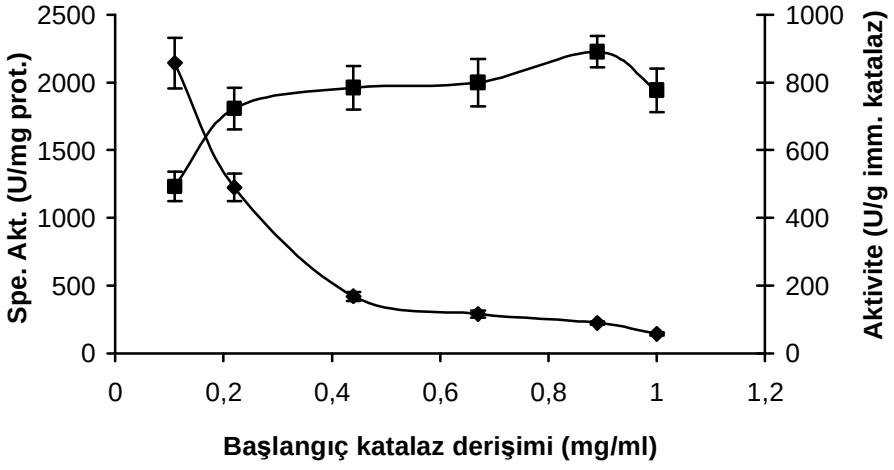
İmmobilizasyon süresi 1 saat olduğunda Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye katalazın sırasıyla % 11,2 ve 26,0'sı bağlanırken, immobilizasyon süresi 24 saat olduğunda % 63,7 ve % 77,1'i bağlanmıştır. İmmobilizasyon süresi 96 saat yapıldığında Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye bağlanan katalaz miktarları hemen hemen aynı bulunmuştur (%80) (Şekil 4.91). İmmobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri immobilizasyon süresine bağlı olarak incelendiğinde en yüksek aktivite immobilizasyon süresi 7 saat olan immobilize katalaz örneklerinde görülmektedir. Ancak immobilizasyon süresi 24 saat olan immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri de (özellikle Eupergit C için) bu değerlere yakındır (Şekil 4.92). Bunun için katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye bağlanan miktarlarının immobilizasyon süresine bağlı olarak değişimi de göz önünde bulundurulduğunda en uygun immobilizasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir.

Birim destek başına sabit hacimde farklı katalaz derişimlerinde (0,11–1,0 mg/ml) Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilizasyon yapılmıştır. Katalazın desteklere bağlanma yüzdeleri ile miktarlarındaki değişimler Şekil 4.93'de gösterilmiştir.

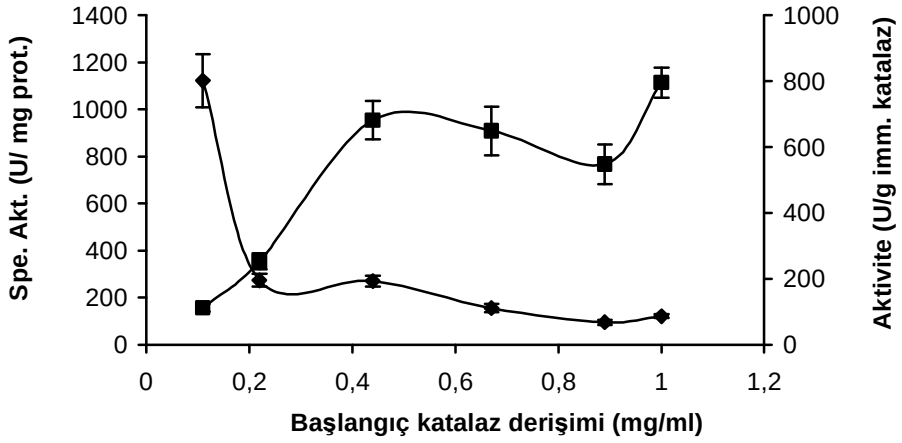


Şekil 4.93. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın bağlanma yüzdelerindeki ve miktarlarındaki değişimler.

Başlangıç katalaz miktarı arttıkça Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye bağlanan katalaz miktarlarında da artış olduğu belirlenmiştir. İmmobilize katalazın aktivitesinin başlangıç katalaz miktarına bağlı olarak değişimi Eupergit C için Şekil 4.94 ve Eupergit C 250L için Şekil 4.95'de gösterilmiştir.



Şekil 4.94. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın aktivite (■) ve spesifik aktivite (♦) değerleri.



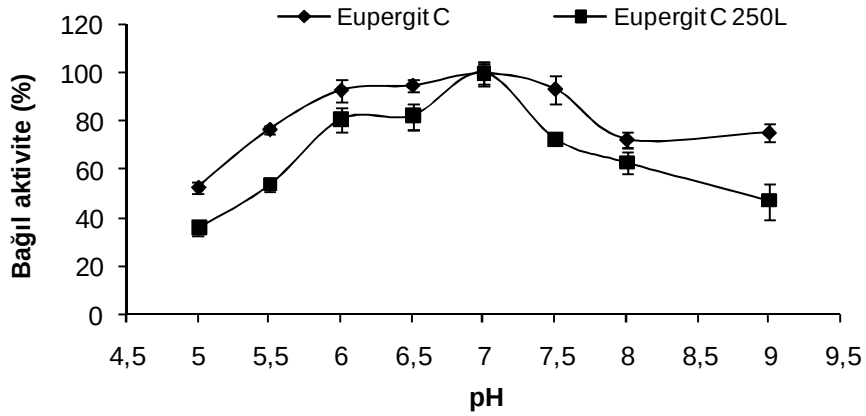
Şekil 4.95. Farklı başlangıç katalaz derişimlerinde Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivite (■) ve spesifik aktivite (♦) değerleri.

Farklı katalaz derişimlerinde Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın spesifik aktiviteleri incelendiğinde başlangıç katalaz derişiminin artmasıyla birlikte aktiviteler azalırken, immobilize katalazın 1 gramı başına hesaplanan aktiviteler artmaktadır (0,89 mg/ml başlangıç katalaz derişimine kadar, Şekil 4.94). Eupergit C 250L'de ise genel olarak başlangıç katalaz derişimi arttıkça immobilize katalazın spesifik aktivitesi azalmış, immobilize katalazın 1 gramı başına hesaplanan aktivitede ise artış olduğu bulunmuştur (Şekil 4.95). Katalazın desteklere bağlanma miktarları ile hesaplanan aktiviteler ve spesifik aktiviteler gözönüne alındığında immobilizasyon için en uygun derişimin 0,44 mg/ml katalaz derişimi olduğuna karar verilmiştir.

4.1.4.2. Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye İmmobilize Edilen Katalaz Örneklerinin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

İmmobilizasyon için en uygun koşullar belirlendikten sonra immobilize katalazın en fazla aktivite gösterdiği pH belirlenmiştir. Bunun için 50 mM pH 5,0, 5,5 asetat tamponu, 6,0 sitrat tamponu, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat tamponu ve 9,0 borat

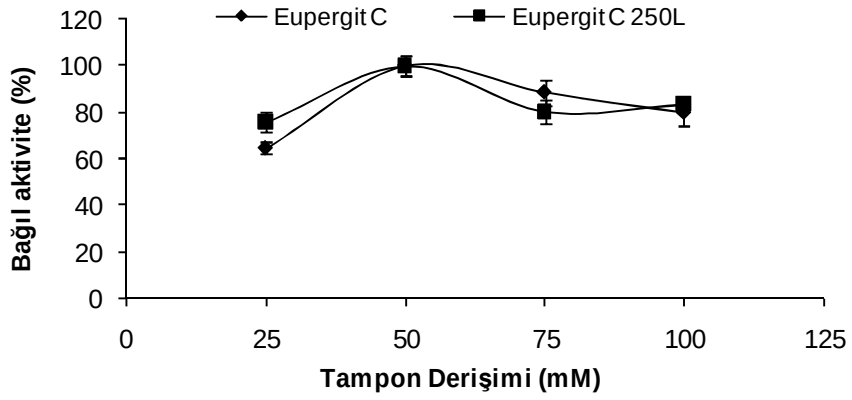
tamponunda immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.96'da gösterilmiştir.



Şekil 4.96. Eupergit C ve Eupergit C 250 L'ye immobilize edilen katalazların aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

Genel olarak Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin pH 6,0–7,5 aralığında aktiviteleri yüksek olup, en yüksek aktiviteyi pH 7,0 fosfat tamponunda göstermişlerdir.

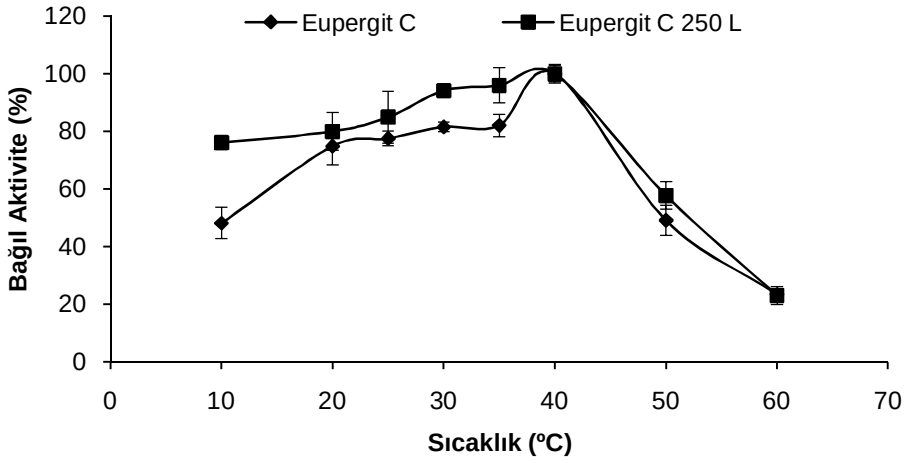
İmmobilize katalaz örneklerinin farklı derişimlerdeki (25, 50, 75 ve 100 mM) pH 7,0 fosfat tamponunda aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.97'de gösterilmiştir.



Şekil 4.97. Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi.

Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz örnekleri en yüksek aktiviteyi 50 mM fosfat tamponunda göstermişlerdir.

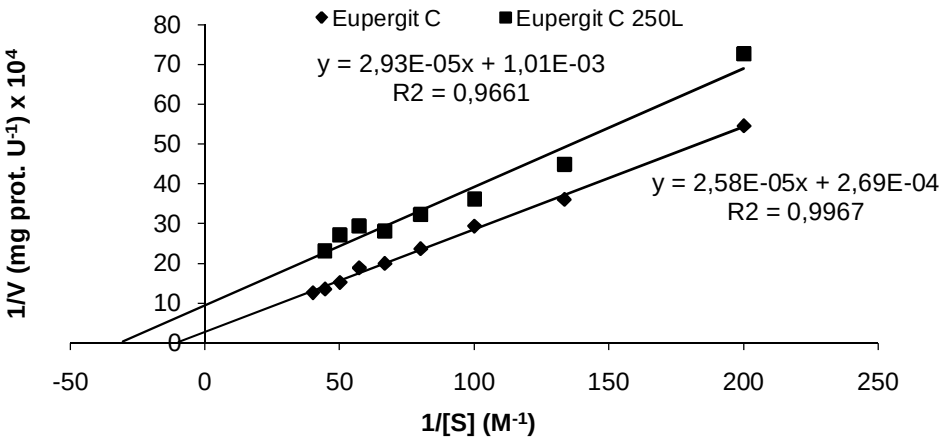
İmmobilize katalaz örneklerinin farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60ºC) aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 4.98'de gösterilmiştir.



Şekil 4.98. Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

Şekil 4.98'de görüldüğü gibi Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz örnekleri en yüksek aktiviteyi 40ºC'de göstermişlerdir. Arrhenius denkleminden Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin katalizlediği reaksiyonun aktivasyon enerjileri sırasıyla 15,4 kJ/mol ve 9,6 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

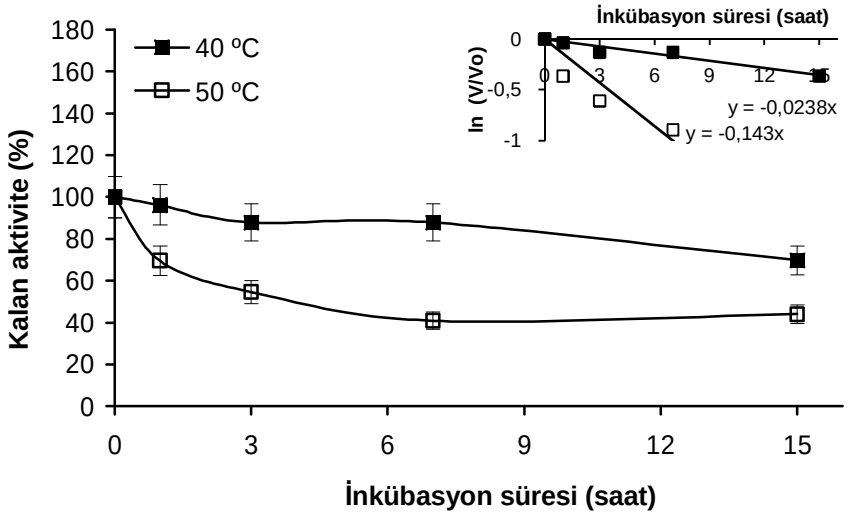
Belirlenmiş olan optimum koşullarda farklı H_2O_2 derişimlerinde immobilize katalazların aktiviteleri ölçülerek Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve sonuçlar Şekil 4.99'da gösterilmiştir.



Şekil 4.99. Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazlar için Lineweaver-Burk grafiği.

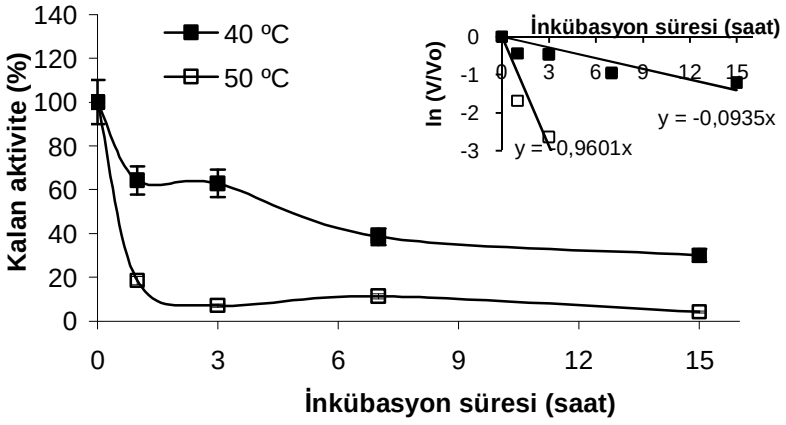
Eupergit C'ye immobilize edilen katalaz için V_{max}=3,7x10^3 U/mg prot., K_m= 95,9 mM H_2O_2, turnover sayısı k_{cat}=1,5x10^4 s^{-1} ve katalitik etkinliği k_{cat}/K_m=1,6x10^5 s^{-1}M^{-1} olarak bulunmuştur. Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz için V_{max}=1,0x10^3 U/mg prot., K_m= 29,0 mM H_2O_2, turnover sayısı k_{cat}=4,1x10^3 s^{-1} ve katalitik etkinliği k_{cat}/K_m=1,4x10^5 s^{-1}M^{-1} olarak bulunmuştur.

İmmobilize katalaz örnekleri 40ºC ve 50ºC sıcaklıklarda 1, 3, 7 ve 15 saat bekletilerek optimum koşullarda kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Eupergit C için Şekil 4.100'de ve Eupergit C 250L için Şekil 4.101'de gösterilmiştir.



Şekil 4.100. Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi. (V_o: Katalazın başlangıç aktivitesi, V: herhangi bir zamanda ölçülen aktivite)

Eupergit C'ye immobilize edilen katalaz 40ºC'de 15 saat inkübe edildikten sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 70'ini korurken, 50ºC'de ancak % 44'ünü koruyabilmiştir. 40ºC'de bekletilen immobilize katalaz için yarı ömür 29,1 saat, 50ºC'de ise 4,8 saat olarak bulunmuştur.

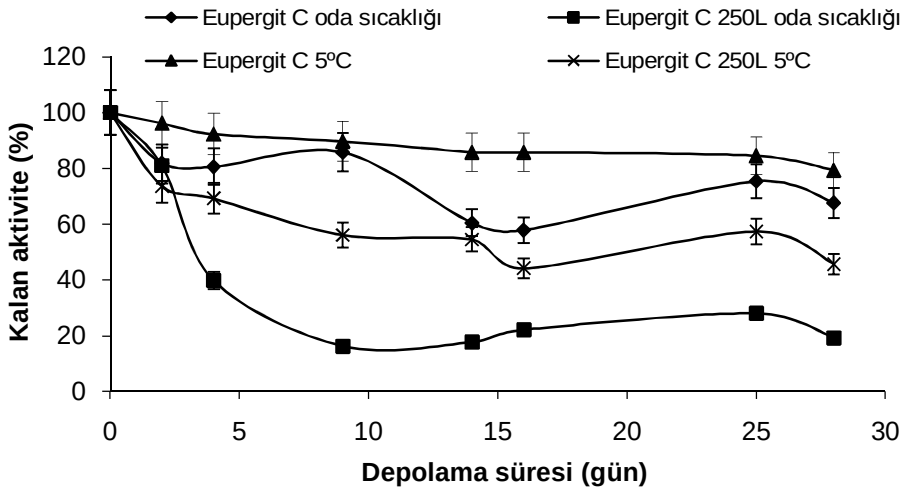


Şekil 4.101. Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimi. (V_o: Katalazın başlangıç aktivitesi, V: herhangi bir zamanda ölçülen aktivite)

Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz 40ºC'de 15 saat inkübe edildikten sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık %40'unu korurken, 50ºC'de ancak

%4'ünü koruyabilmiştir. 40ºC'de bekletilen immobilize katalaz için yarı ömür 7,4 saat, 50ºC'de ise 0,7 saat olarak bulunmuştur.

İmmobilize katalaz örnekleri oda sıcaklığında ve 5ºC'de bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Şekil 4.102'de gösterilmiştir.



Şekil 4.102. Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın depolama süresine bağlı aktivite değişimi.

Oda sıcaklığında saklanan Eupergit C'ye immobilize edilen katalaz 28 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 67'sini korurken, 5ºC'de saklanan immobilize katalaz aktivitesinin % 79'unu korumuştur. Oda sıcaklığında saklanan Eupergit C 250L'ye immobilize edilmiş katalaz 28 günün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 19'unu korurken, 5ºC'de saklandığında başlangıç aktivitesinin % 46'sını korumuştur.

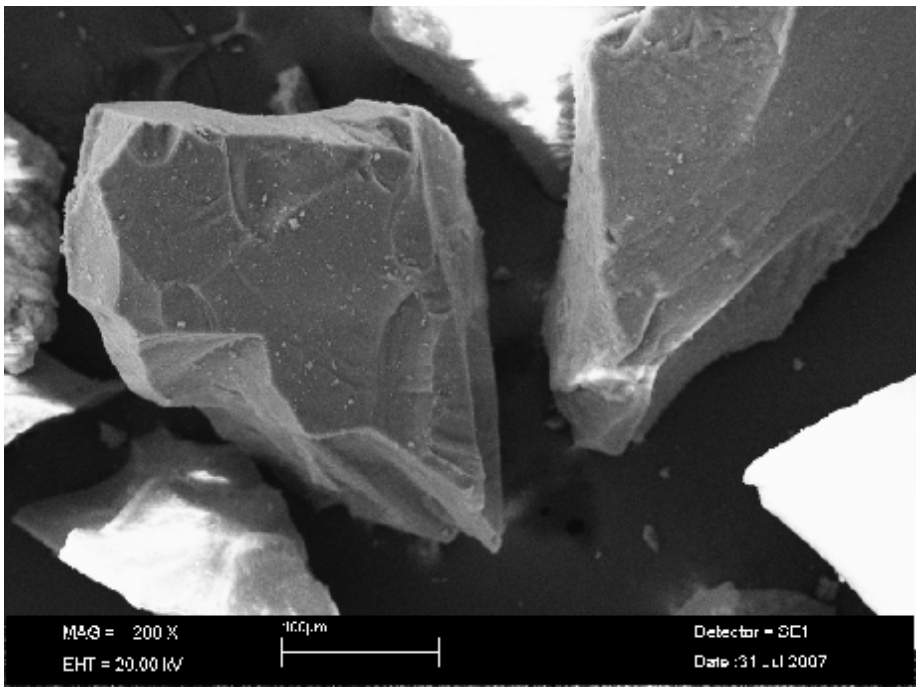
Bu aşamaya kadar katalazın florisile doğrudan glutaraldehit üzerinden, florisile 5-APA ara kolu üzerinden, florisile 6-AHA ara kolu üzerinden, CPG doğrudan glutaraldehit üzerinden, CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden, CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden, Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilizasyonunda belirlenen en uygun immobilizasyon koşulları, immobilize katalazın maksimum aktivite gösterdiği koşullar ve kinetik parametreler Çizelge 4.4'de özetle verilmiştir.

Çizelge 4.4. Florisil, CPG ve Eupergit desteklere immobilize edilen katalazın en uygun immobilizasyon koşulları, maksimum aktivite gösterdiği koşullar ve kinetik parametreleri.

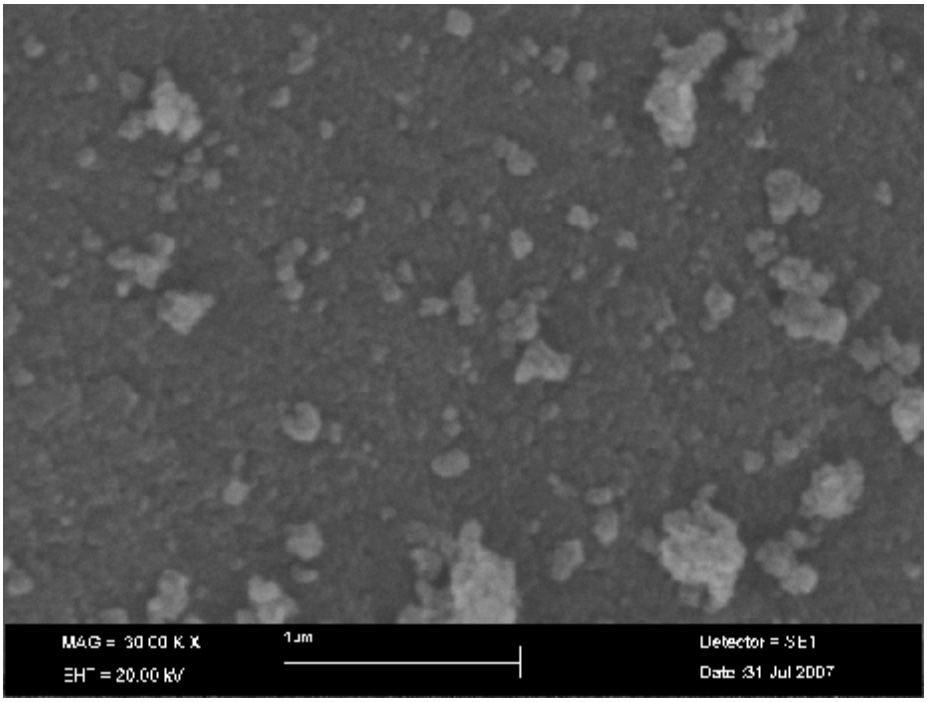
	Destek	Florisil	Florisil -5-APA	Florisil-6-AHA	CPG	CPG-5-APA	CPG-6-AHA	Eupergit C	Eupergit C 250L
İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu	İmm. pH'sı	7,5	5,5	5,5	6,0	5,5	5,5	5,5	7,5
	İmm. tamponunun derişimi (mM)	25	50	50	75	50	50	1000	1000
	İmm. sıcaklığı (°C)	5-25	5-25	5-25	5	5-25	5-25	15-25	15-25
	İmm. süresi (saat)	1	2	2	7	2	2	24	24
	Katalaz derişimi (mg/ml)	1,0	0,25	0,25	0,75	0,75	0,75	0,44	0,44
	1 g destek için kullanılan katalaz miktarı (mg)	4,0	1,0	1,0	6,0	6,0	6,0	4,0	4,0
İmmobilize katalazın karakterizasyonu	Optimum pH	6,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,0	7,0
	Optimum tampon	75	50	50	75	50	50	50	50
	Optimum sıcaklık (°C)	30	30	30	35	30	30	40	40
	E_a (kJ/mol)	3,3	24,2	12,6	22,6	27,4	26,2	15,4	9,6
	50°C'deki yarı ömür	6,2	0,3	0,45	5,2	0,5	0,9	4,8	0,7
	V_{max} (U/mg prot.)	$7,95x10^2$	$1,0x10^4$	$5,0x10^3$	$1,9x10^4$	$1,4x10^3$	$6,2x10^2$	$3,7x10^3$	$1,0x10^3$
	K_m (mM)	157,3	100,0	25,0	48,3	11,4	5,6	95,9	29,0
	kcat (s^{-1})	$3,3x10^3$	$4,2x10^4$	$2,1x10^4$	$8,0x10^4$	$5,9x10^3$	$2,6x10^3$	$1,5x10^4$	$4,1x10^3$
	kcat /K_m (s^{-1} M^{-1})	$2,1x10^4$	$4,2x10^5$	$8,3x10^5$	$1,7x10^6$	$5,2x10^5$	$4,6x10^5$	$1,6x10^5$	$1,4x10^5$

4.1.5. Desteklerin ve İmmobilize Katalaz Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) İncelenmesi

Çalışmada kullanılan desteklerin ve immobilize katalaz örneklerinin SEM görüntülemesi yapılmıştır. Florisilin 200x ve 30000x büyütülmüş hallerinin fotoğrafı Şekil 4.103 ve Şekil 4.104'de gösterilmiştir. Şekil 4.103'den görüldüğü gibi florisil belirli bir geometrik şekle sahip değildir. Yüzey yapısı incelendiğinde, girintili çıkıntılı bir yüzeye sahip olduğu görülmektedir.

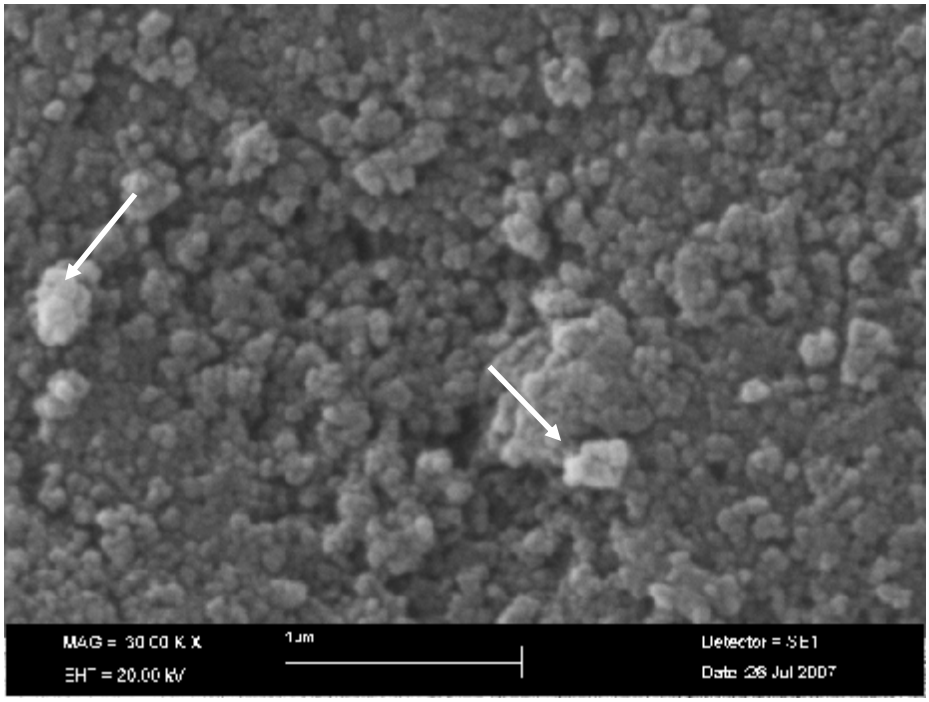


Şekil 4.103. Florisilin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 200x)

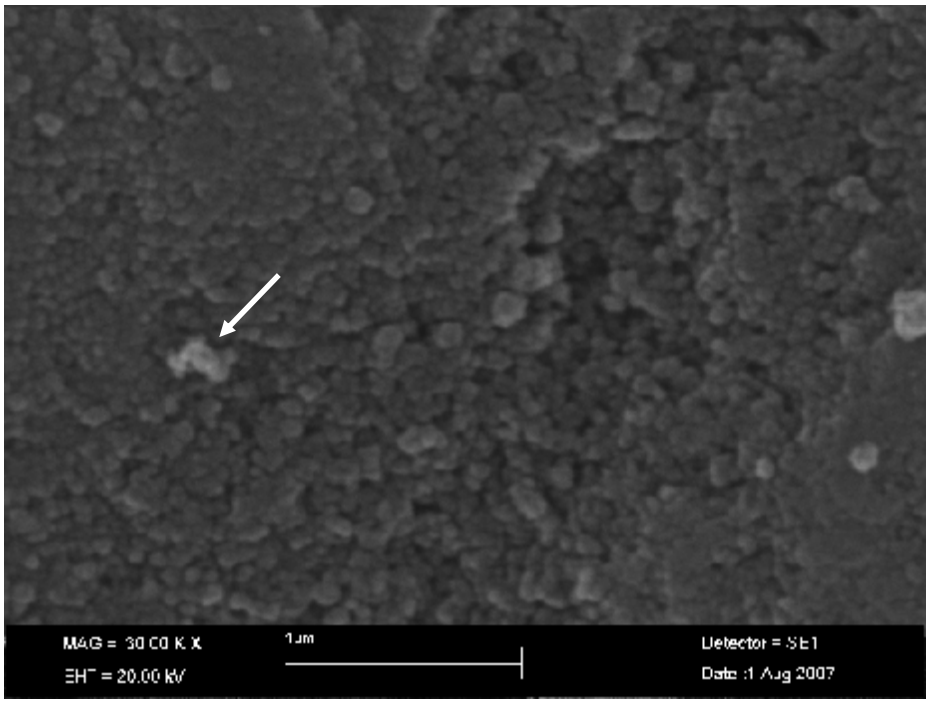


Şekil 4.104. Florisilin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)

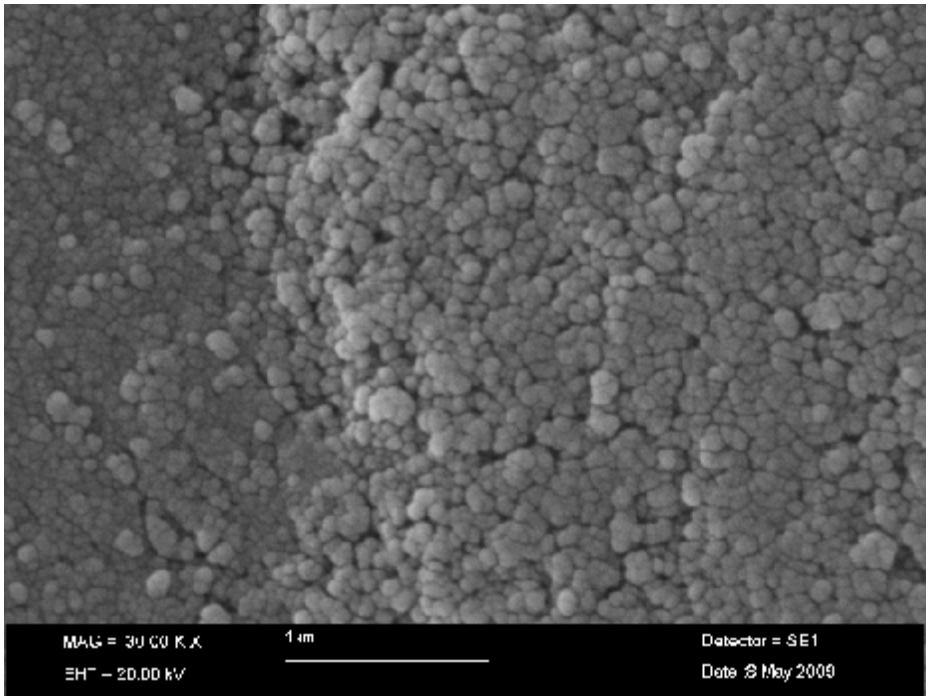
Florisile doğrudan, 1,4 BDDGE ara kolu, PEGDGE ara kolu, 5-APA ara kolu ve 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz örneklerinin SEM fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.105, Şekil 4.106, Şekil 4.107, Şekil 4.108 ve Şekil 4.109'da verilmiştir. Bu fotoğraflardan görüldüğü gibi katalazın desteğe immobilize edildiği örneklerde desteğin gözenekli yapısı daha belirgin olarak görülmektedir. Ayrıca bazı fotoğraflarda görülen beyaz bölgelerin desteğe bağlanan katalaz olduğu düşünülmektedir.



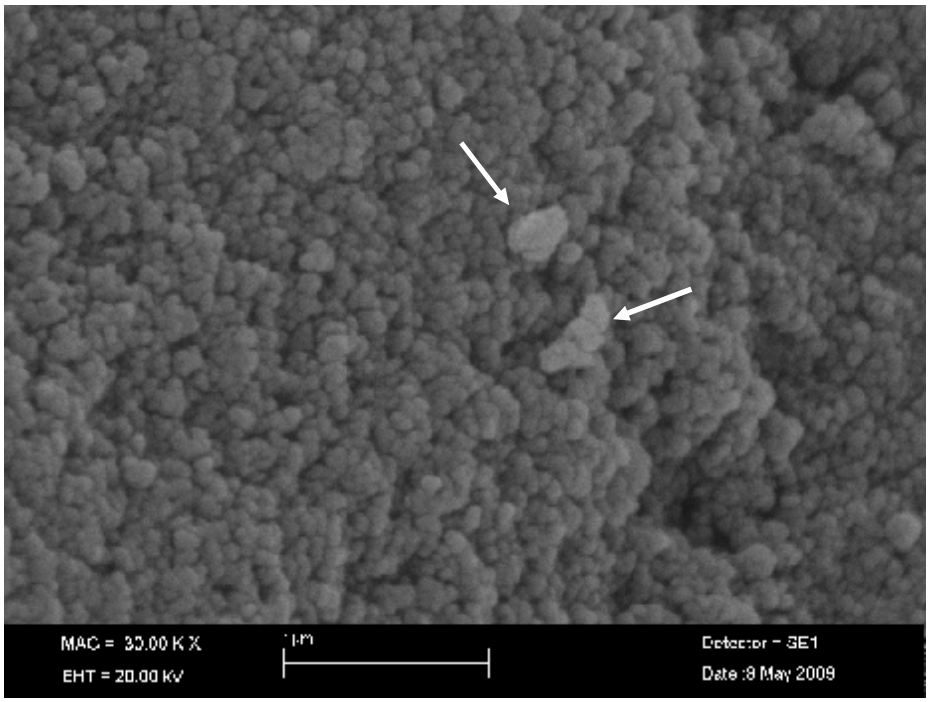
Şekil 4.105. Katalazın florisile doğrudan immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)



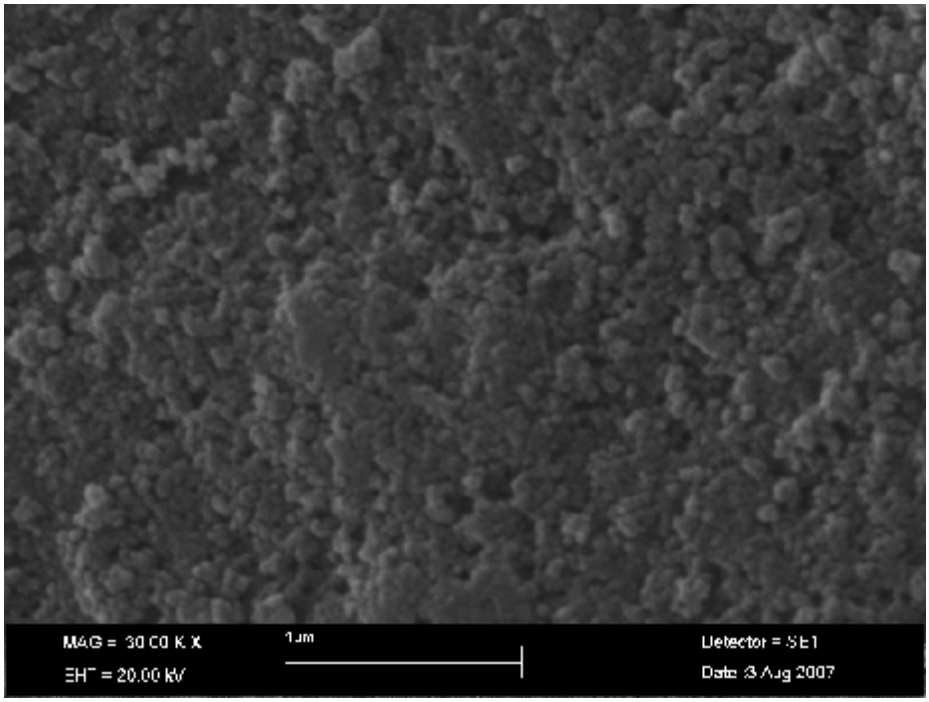
Şekil 4.106. Katalazın florisile 1,4 BDDGE ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)



Şekil 4.107. Katalazın florisile PEGDGE ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)

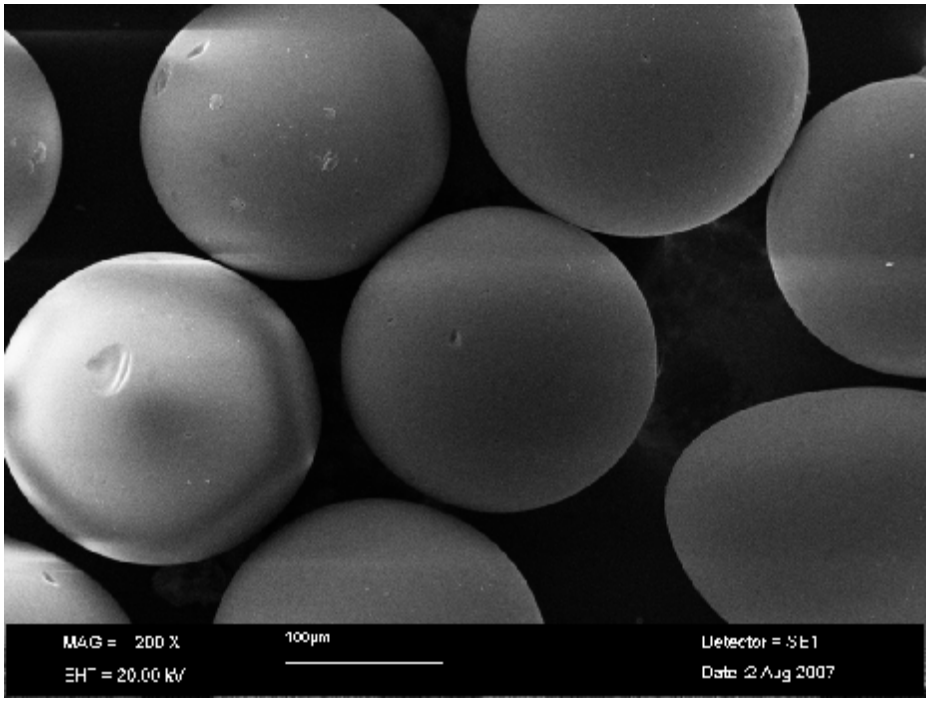


Şekil 4.108. Katalazın florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)

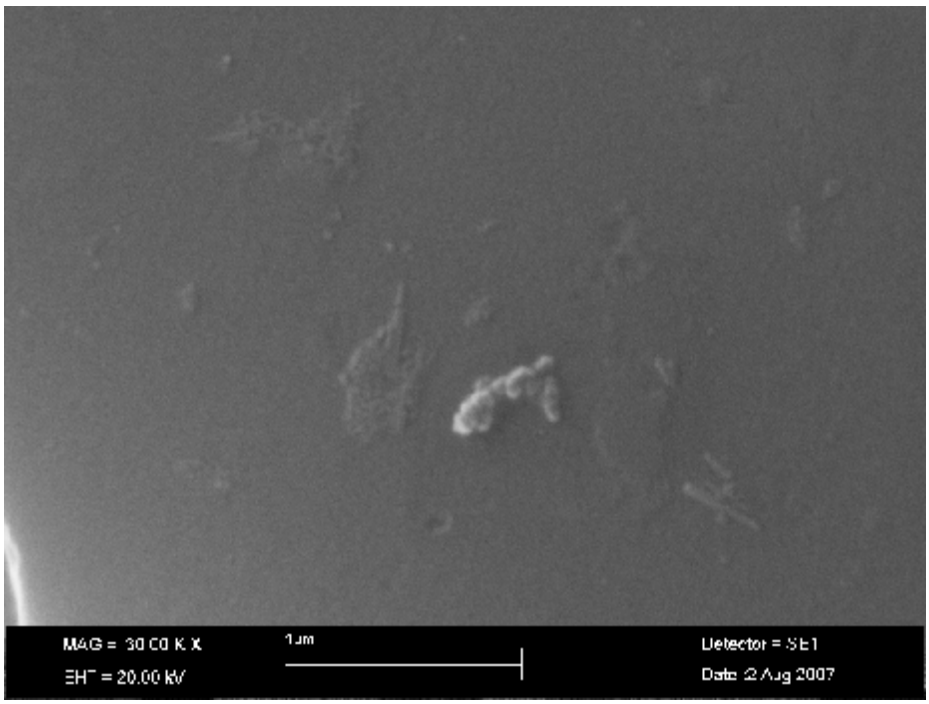


Şekil 4.109. Katalazın florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)

NPG'nin 200x ve 30000x büyütülmüş hallerinin fotoğrafı Şekil 4.110 ve Şekil 4.111'de gösterilmiştir. Bu fotograflarda görüldüğü gibi NPG küresel bir şekle sahip olup yüzeyinde çok fazla girintiler çıkıntılar bulunmamaktadır.

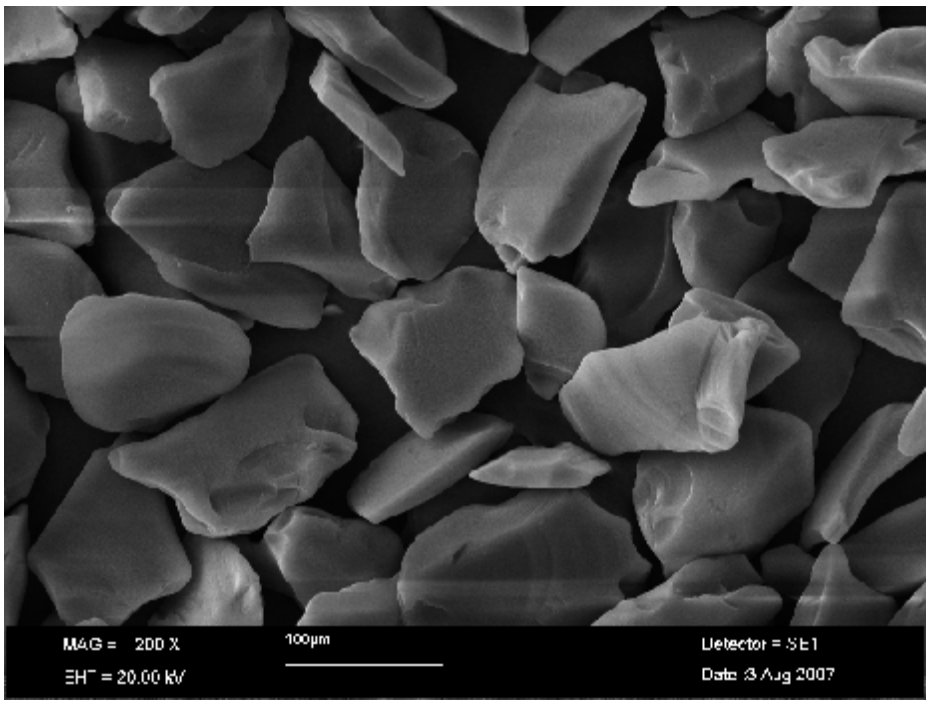


Şekil 4.110. NPG'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 200x)

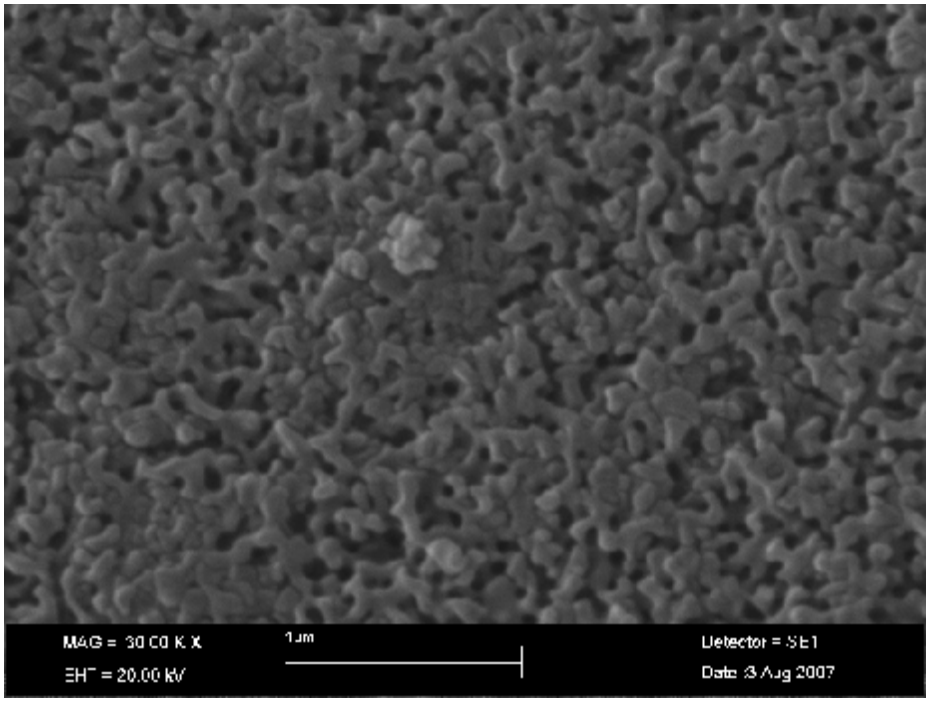


Şekil 4.111. NPG'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)

Gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'nin 200x ve 30000x büyütülmüş halinin fotografları Şekil 4.112 ve Şekil 4.113'de gösterilmiştir. CPG belirli bir geometrik şekle sahip değildir. Ayrıca CPG'nin oldukça düzenli bir gözenek yapısına sahip olduğu Şekil 4.113'de rahatlıkla görülmektedir.

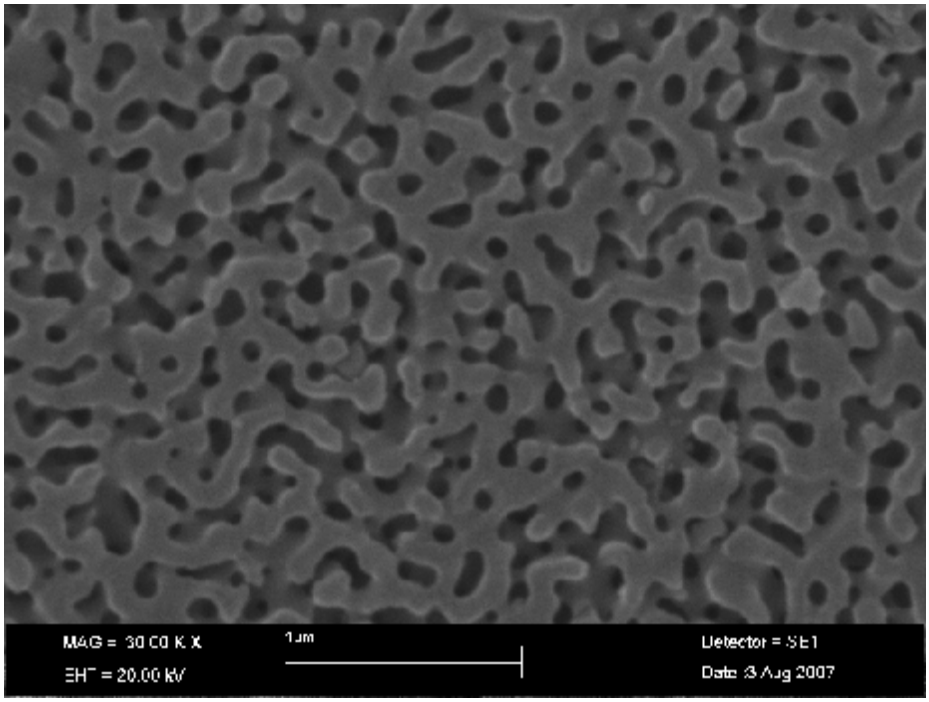


Şekil 4.112. Gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 200x)

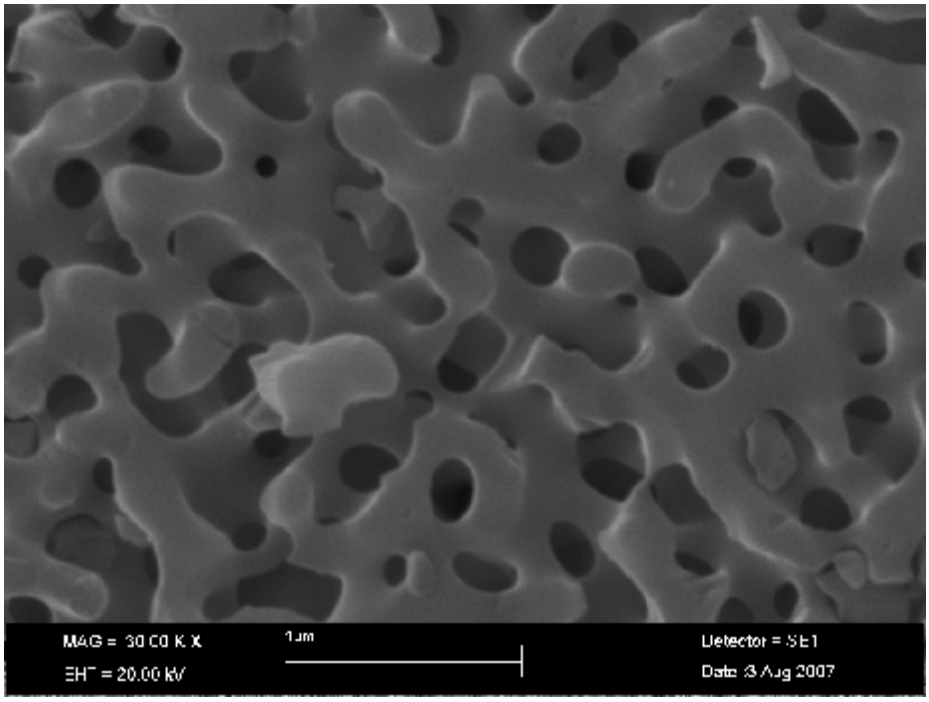


Şekil 4.113. Gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 300000x)

Gözenek büyüklüğü 100 nm ve 215 nm olan CPG için SEM fotoğrafları Şekil 4.114 ve Şekil 4.115'de verilmiştir. Bu fotoğraflardan da farklı gözenek büyüklüğünde olan CPG'nin gözeneklerinin oldukça homojen bir dağılım gösterdiği görülmektedir.

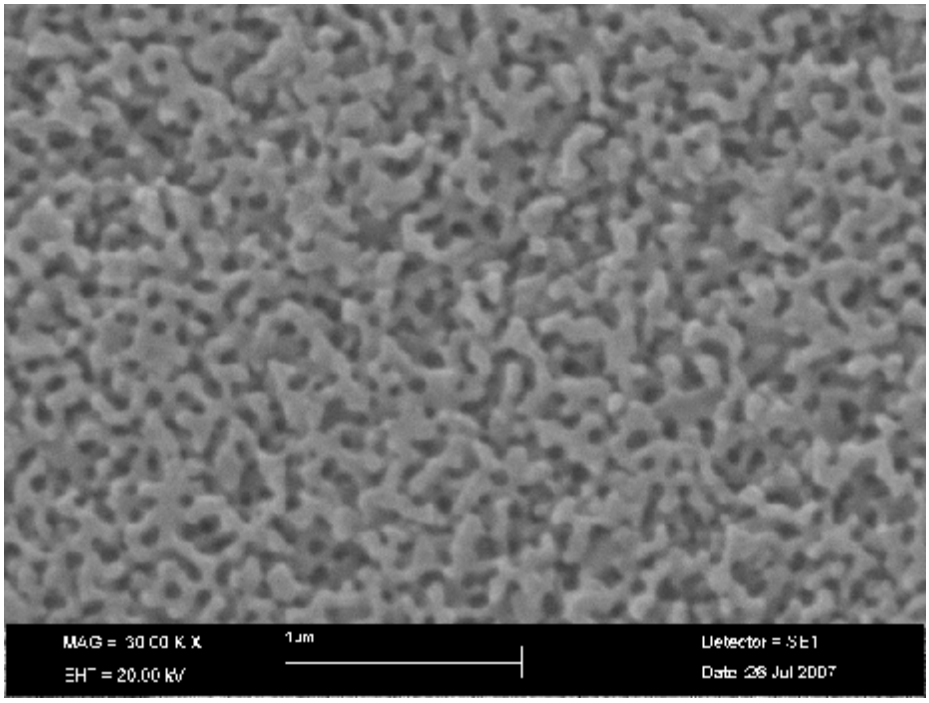


Şekil 4.114. Gözenek büyüklüğü 100 nm olan CPG'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)

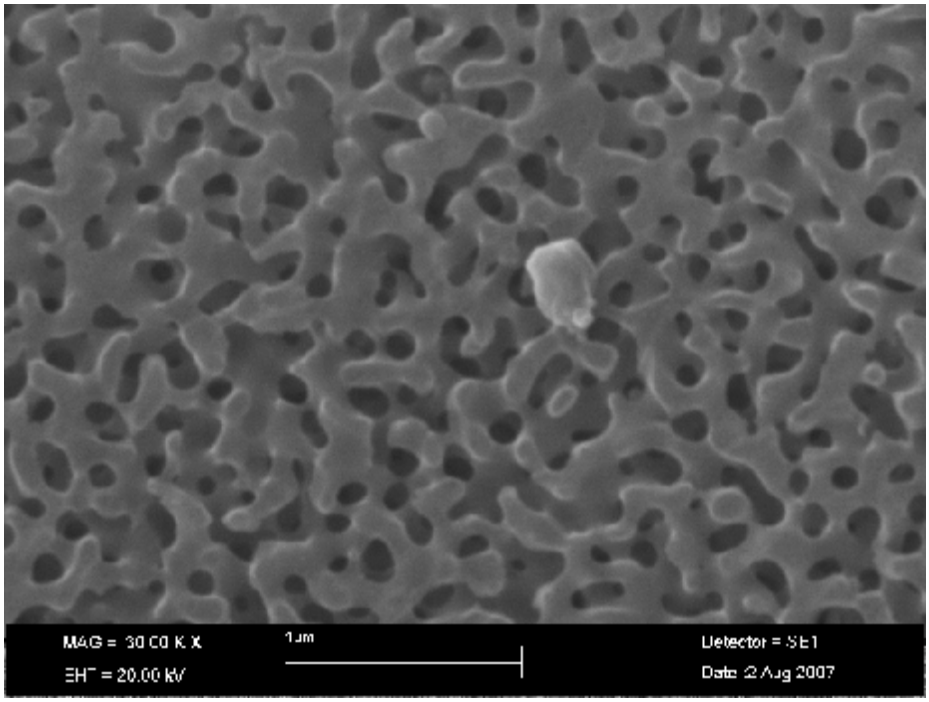


Şekil 4.115. Gözenek büyüklüğü 215 nm olan CPG'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x).

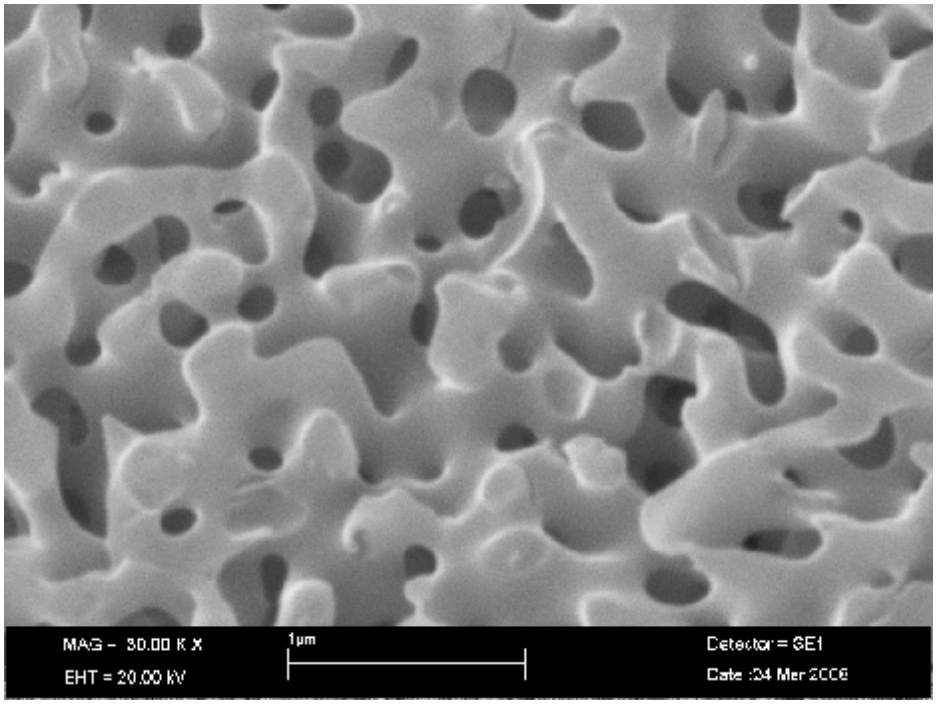
Gözenek büyüklüğü 70, 100 ve 215 nm olan CPG'lere katalazın immobilize edildiği örneklerin SEM fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.116, Şekil 4.117 ve Şekil 4.118'de verilmiştir. Gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'ye katalazın immobilize edildiği örneğin fotoğrafı desteğin orijinal hali ile kıyaslandığında (Şekil 4.113) immobilizasyon işlemi sırasında yapılan işlemlerin (HNO_3 ile yıkama, silanlama, glutaraldehit ile muamele edilmesi) desteğin gözenekli yapısının daha da belirgin hale gelmesini sağladığını söylemek mümkündür. Genel olarak tüm CPG örnekleri için immobilizasyon işleminin yüzey morfolojini etkilemediği görülmektedir.



Şekil 4.116. Katalazın CPG'ye (gözenek büyüklüğü 70 nm) doğrudan immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)

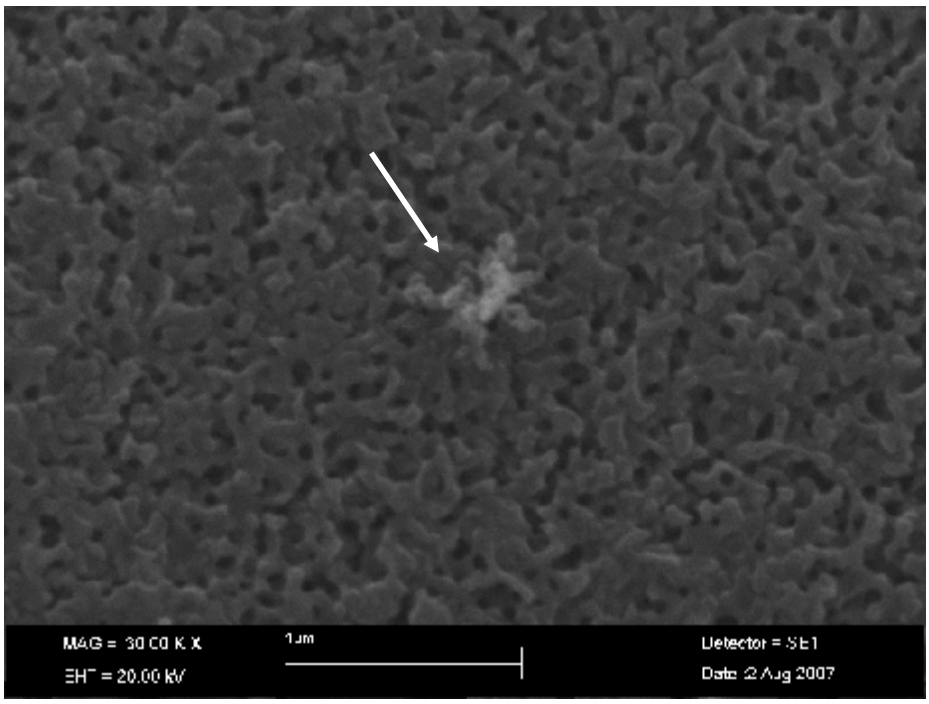


Şekil 4.117. Katalazın CPG'ye (gözenek büyüklüğü 100 nm) doğrudan immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)

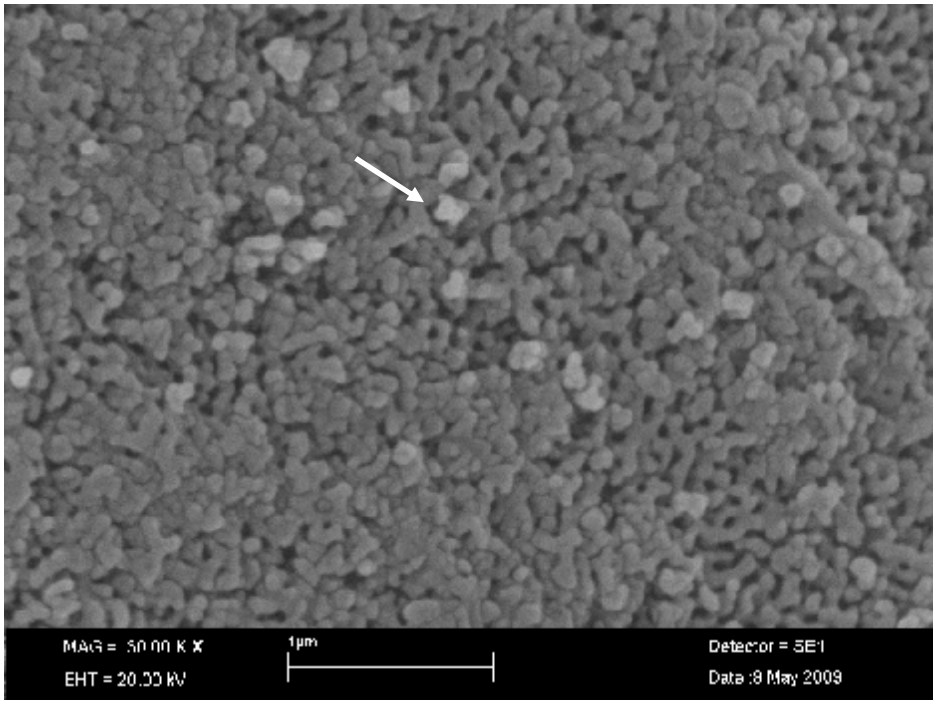


Şekil 4.118. Katalazın CPG'ye (gözenek büyüklüğü 215 nm) doğrudan immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)

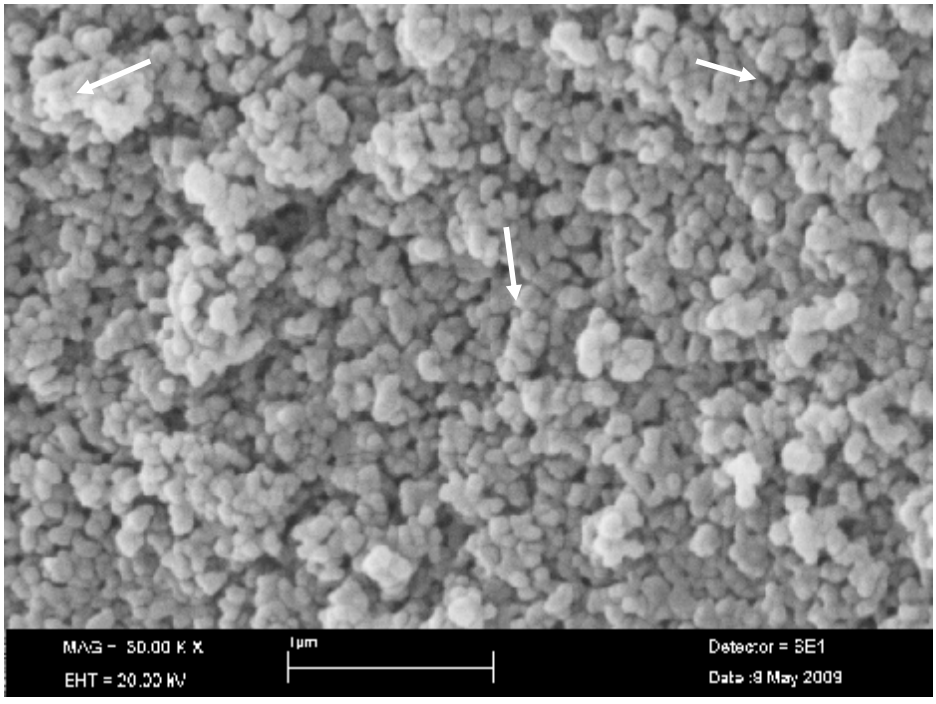
Gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'ye 1,4 BDDGE, PEGDGE, 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilize edilen katalaz örneklerinin fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.119, Şekil 4.120, Şekil 4.121 ve Şekil 4.122'de verilmiştir. Bu fotoğraflarda bulunan bazı beyaz bölgelerin desteğe bağlanan katalaza ait olduğu düşünülmektedir. Ayrıca CPG'ye 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilize edilen katalaz örneklerine ait fotoğraflarda yüzey, orjinal haline göre daha fazla girintili çıkıntılı görülmektedir. Bu durum enzimin desteğin gözeneklerinden çok desteğin dış yüzeyine bağlandığını düşündürmektedir.



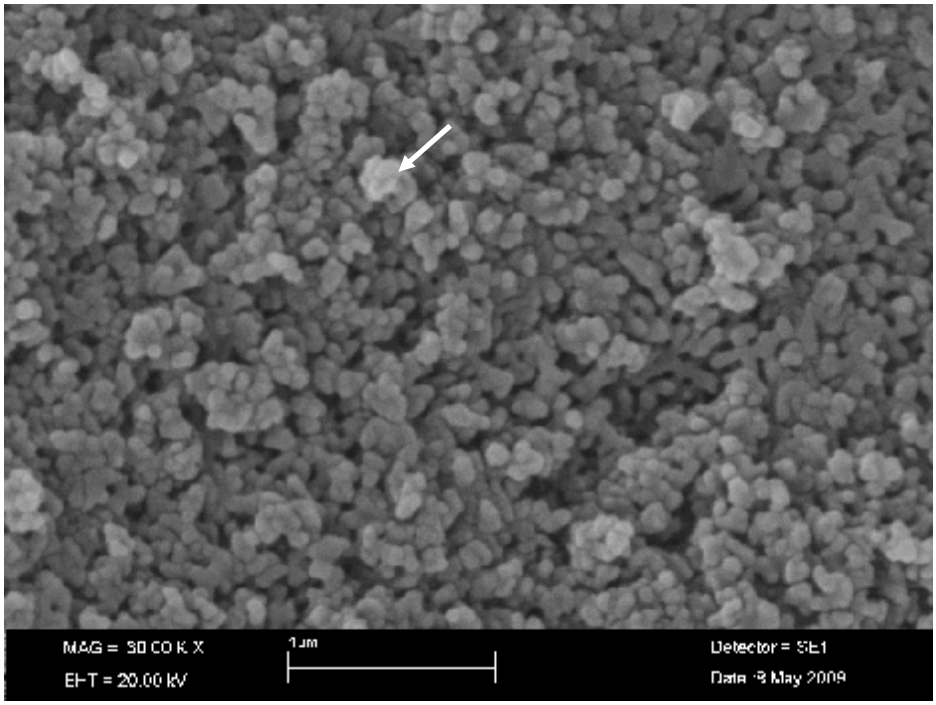
Şekil 4.119. Katalazın CPG'ye 1,4 BDDGE ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x).



Şekil 4.120. Katalazın CPG'ye PEGDGE ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x).

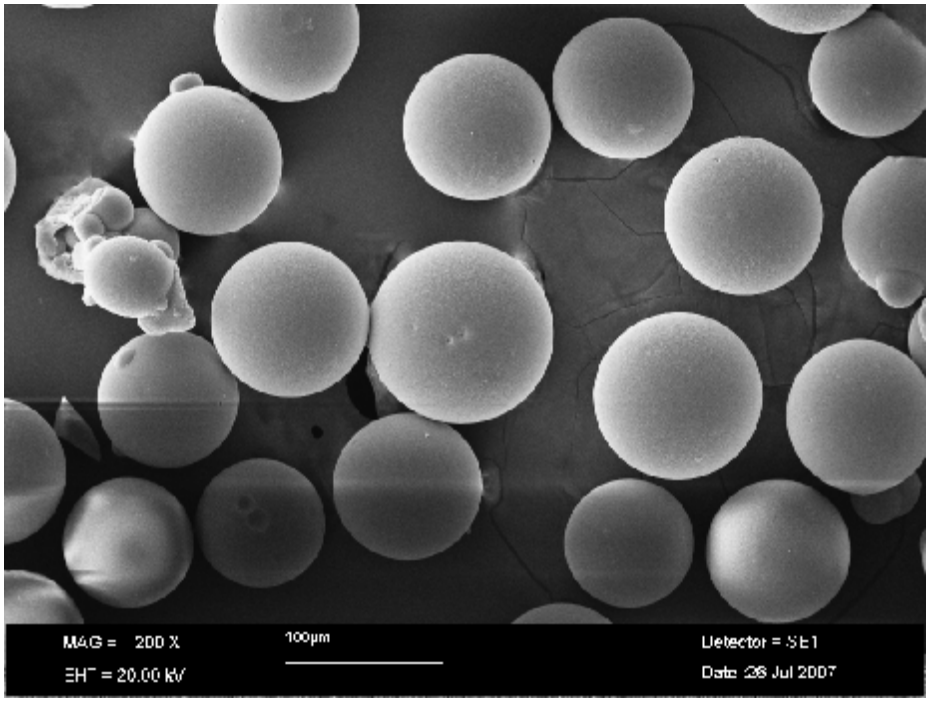


Şekil 4.121. Katalazın CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x).

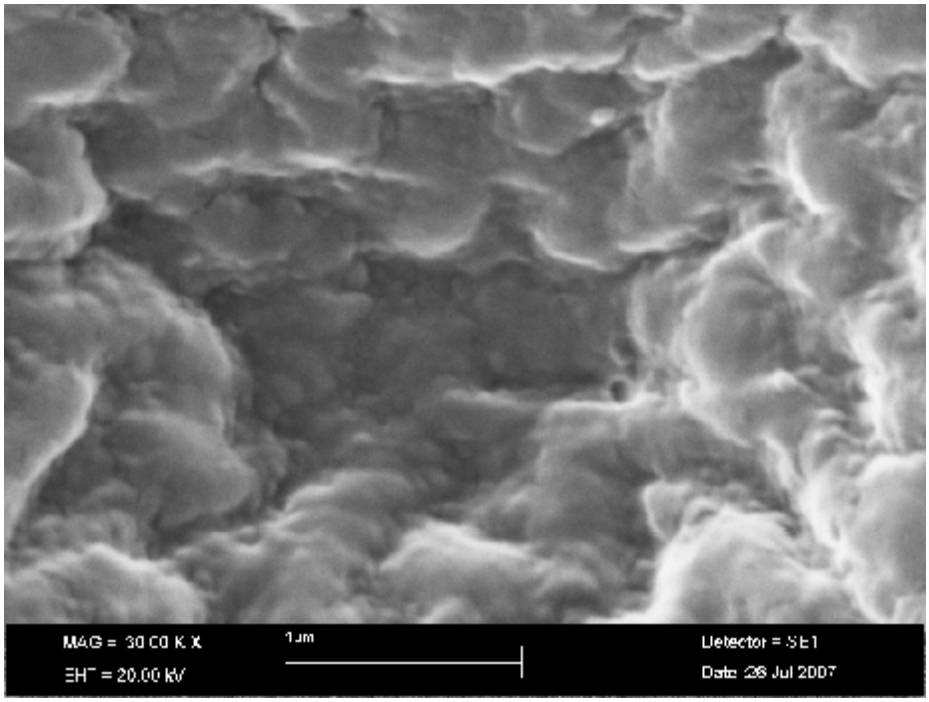


Şekil 4.122. Katalazın CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x).

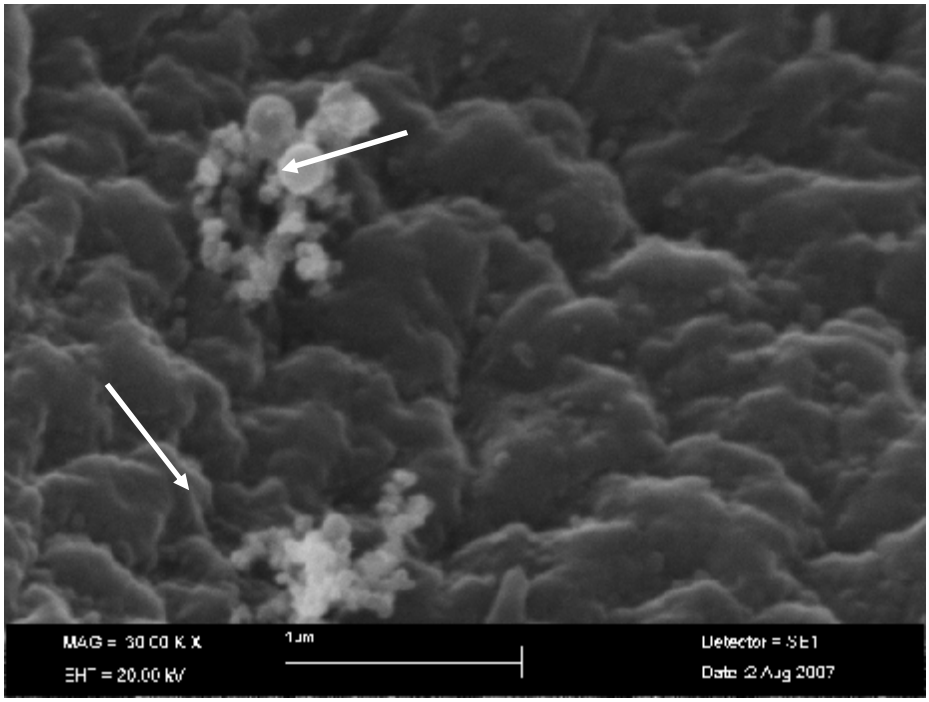
Eupergit C'nin 200x ve 30000x büyütülmüş halinin fotografları Şekil 4.123 ve Şekil 4.124'de gösterilmiştir. Eupergit C küresel bir şekle sahip olup, tanecik büyüklüklerindeki dağılım florisil ve CPG ile kıyaslandığında oldukça homojen görülmektedir. Katalazın immobilize edildiği örneğe ait fotoğraf ise Şekil 4.125'de verilmiştir. Bu fotoğrafta görülen beyaz bölgelerin desteğe bağlanan katalaza ait olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.123. Eupergit C'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 200x)

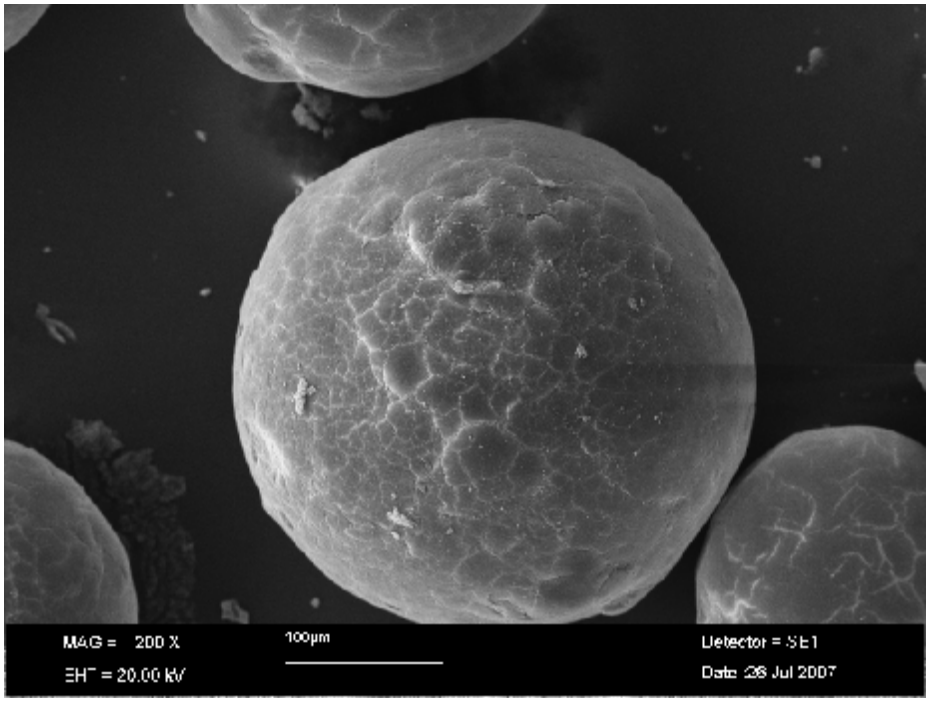


Şekil 4.124. Eupergit C'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)

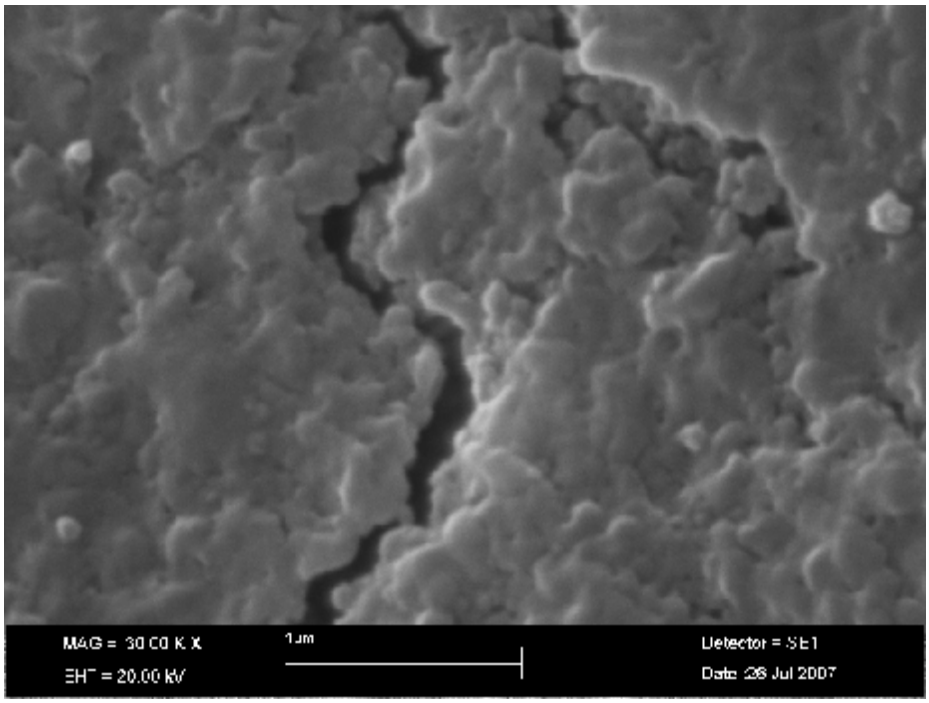


Şekil 4.125. Katalazın Eupergit C'ye immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x).

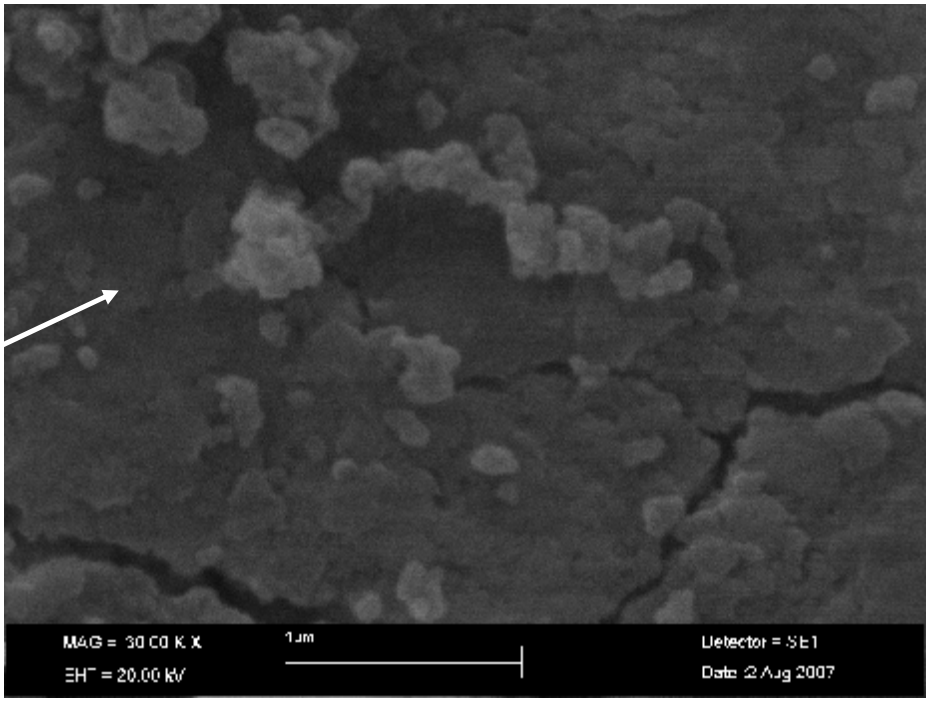
Eupergit C 250 L'nin 200x ve 30000x büyütülmüş halinin fotografları Şekil 4.126 ve Şekil 4.127'de gösterilmiştir. Eupergit C 250 L'nin tanecik büyüklüğünün Eupergit C'den yaklaşık 2-3 kat daha büyük olduğu görülmektedir. Katalazın immobilize edildiği örneğe ait fotoğraf ise Şekil 4.128'de verilmiştir. Bu fotoğrafta görülen beyaz bölgelerin desteğe bağlanan katalaza ait olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.126. Eupergit C 250 L'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 200x)



Şekil 4.127. Eupergit C 250 L'nin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x).



Şekil 4.128. Katalazın Eupergit C 250 L'ye immobilize edildiği örneğin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x).

4.1.6. İmmobilize Katalaz Örnekleri İçin Maliyet Hesabı

Sigma Firmasından sağladığımız enzim, destek ve reaktifler için yapılan fiyat araştırması sonucunda kullanılan her bir kimyasal için yaklaşık fiyat Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Çizelge 4.5'deki fiyatlar göz önüne alınarak en uygun koşullarda yapılan immobilizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen 1 g immobilize katalaz örnekleri için maliyet ve 1€'luk maliyet başına gösterdiği katalaz aktivitesi (U/€) hesaplanmış, sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Bu hesaplamalar yapılırken işlem süresi, gerekli olan donanım ve iş gücü dikkate alınmamıştır. Çizelge 4.6'dan görüleceği gibi immobilize katalaz örnekleri arasında birim maliyet başına en yüksek aktivite CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örneğinde elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. İmmobilizasyonda kullanılan enzim, destek ve reaktiflerin birim fiyatı.

Kimyasalın Adı	Birim miktarı	Fiyatı (€)
Sığır karaciğer katalazı	1 mg	0,62
Florisil	1 g	0,20
CPG (70 nm)	1 g	38,85
Epergit C	1 g	8,44
Eupergit C 250 L	1g	10,72
Glutaraldehit	1 ml	0,22
3-APTES	1 ml	0,33
5-APA	1 g	5,85
6-AHA	1 g	1,32
CDI	1 g	13,2

Çizelge 4.6. Bir gram immobilize katalaz örnekleri için maliyet ve birim maliyet başına immobilize katalaz örneklerinden elde edilen aktivite değerleri.

İmmobilize katalaz	İmmobilize katalazın maliyeti (€/g)	İmmobilize katalazın aktivite maliyeti (U/€)
Florisil+Katalaz	3,29	628
Florisil+5APA-Katalaz	3,00	1160
Florisil+6-AHA-Katalaz	2,88	711
CPG+Katalaz	**43,2**	**1604**
CPG+5APA-Katalaz	44,6	202
CPG+6-AHA-Katalaz	44,5	90
Eupergit C+Katalaz	10,9	631
Eupergit C 250 L+Katalaz	13,2	191

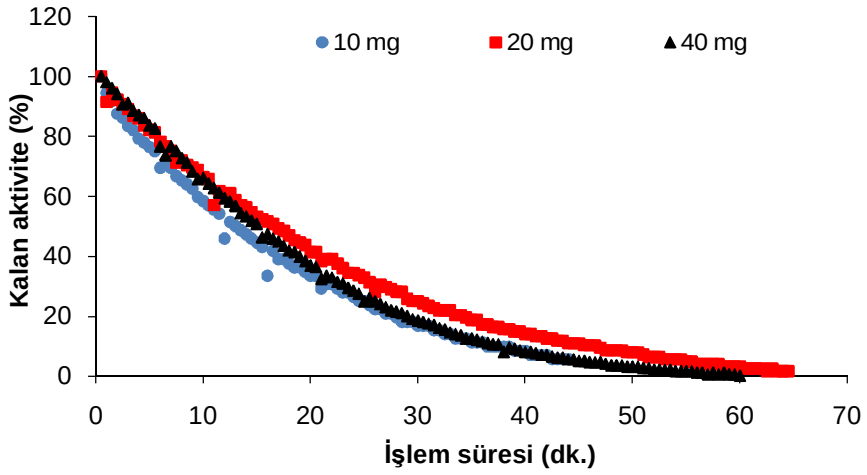
4.1.7. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Reaktörlerde Kullanımı

4.1.7.1. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Sürekli Reaktörlerde Kullanımı

İmmobilize katalaz örneklerinin sürekli reaktör sisteminde kullanım kararlılıklarının incelenmesi için immobilize katalaz örneklerinden farklı miktarlarda (10, 20 ve 40 mg) alınarak kolona yüklenmişlerdir. Derişimi 10 mM olan H_2O_2

çözeltisi 2 farklı akış hızında (2,3 ml/dk. ve 5,6 ml/dk.) kolona gönderilmiştir. H_2O_2 çözeltisi hazırlanırken kullanılan tamponun pH'sı ve derişimi her bir immobilize katalaz örneğinin maksimum aktivite gösterdiği koşullarda hazırlanmıştır. Kolondan çıkan çözeltinin absorbansı 30 sn. aralıklarla 240 nm'de ölçülmüş ve işlem süresine bağlı olarak immobilize katalaz örneklerinin aktivitelerindeki değişimler ve H_2O_2'nin parçalanma oranı hesaplanmıştır.

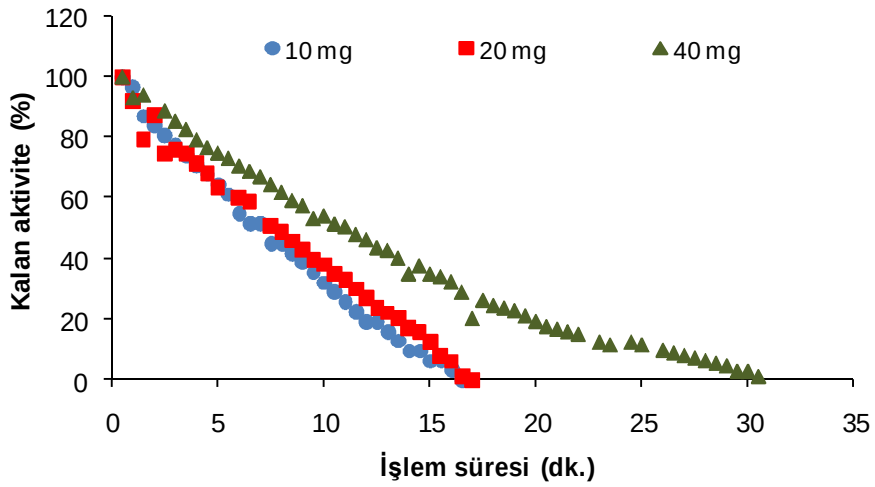
Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın maksimum aktivite gösterdiği pH'da, tampon derişiminde (pH 6,5 75 mM fosfat tamponu) 10 mM H_2O_2 çözeltisi hazırlanarak oda sıcaklığında sürekli reaktörde kullanımı incelenmiştir. Substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak immobilize katalazın aktivitesindeki değişim Şekil 4.129'da gösterilmiştir.



Şekil 4.129. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

İmmobilize katalaz örneğinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta (ilk 30 saniye sonunda) H_2O_2'nin sırasıyla % 18, % 42 ve % 51'i parçalanmış ve immobilize katalazın aktivitesinin % 50'sinin kaldığı süreler sırasıyla (yarı ömür) 14, 17 ve 15 dk. olarak belirlenmiştir.

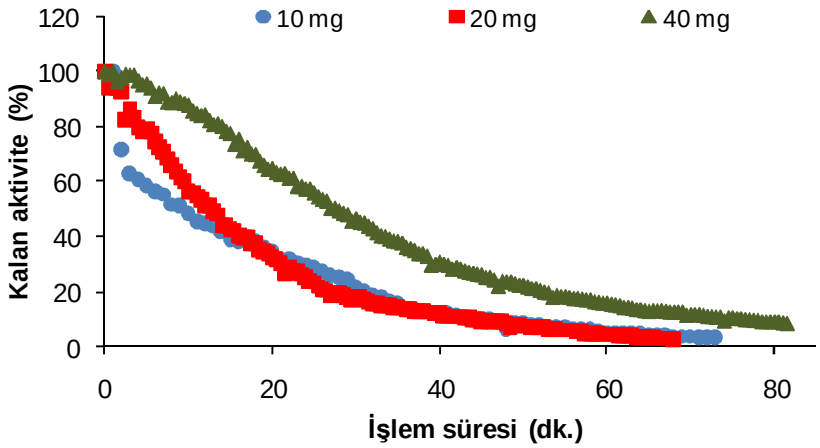
Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.130'da gösterilmiştir.



Şekil 4.130. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

Sürekli reaktörde 5,6 ml/dk. akış hızında florisile doğrudan immobilize edilen katalazdan 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 8, % 16 ve % 42'si parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 7, 7,5 ve 15 dk. olarak belirlenmiştir.

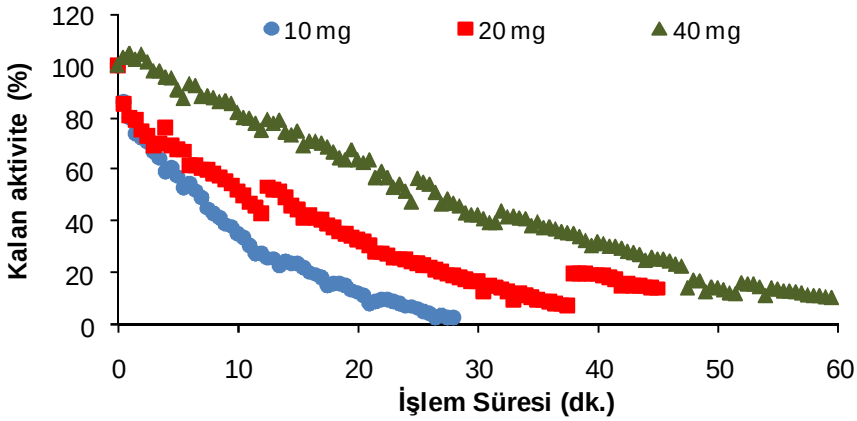
Florisile 5-APA üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.131'de gösterilmiştir. H_2O_2 çözeltisi pH'sı 7,5 olan 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmıştır.



Şekil 4.131. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

İmmobilize katalaz örneğinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 54, % 54 ve % 82'si parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 4, 12,5 ve 27 dk. olarak belirlenmiştir.

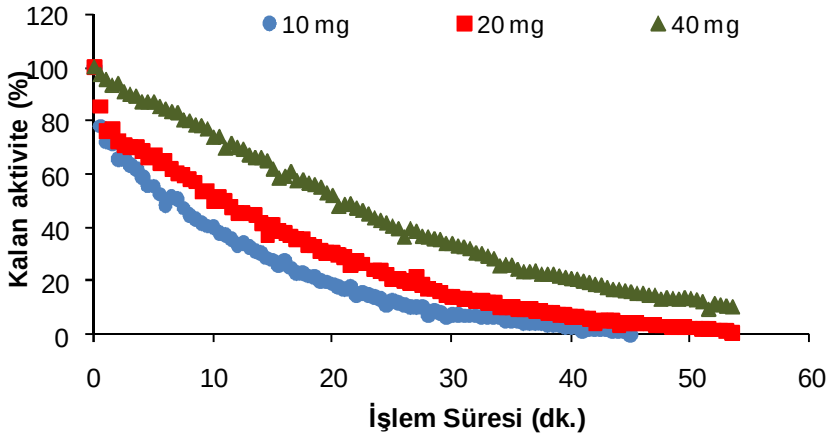
Florisile 5-APA üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.132'de gösterilmiştir.



Şekil 4.132. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

İmmobilize katalaz örneğinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 28, % 50 ve % 66'sı parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 4, 12,5 ve 27 dk. olarak belirlenmiştir.

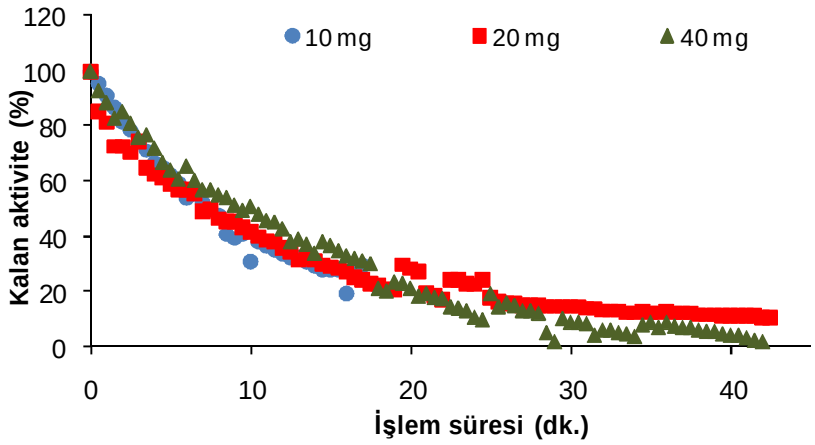
Florisile 6-AHA üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.133'de gösterilmiştir. H_2O_2 çözeltisi pH'sı 7,5 olan 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmıştır.



Şekil 4.133. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

İmmobilize katalaz örneklerinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 45, % 64 ve % 86'sı parçalanmış ve immobilize katalazın aktivitesinin yarı ömrü sırasıyla 5,5, 10 ve 20 dk. olarak belirlenmiştir.

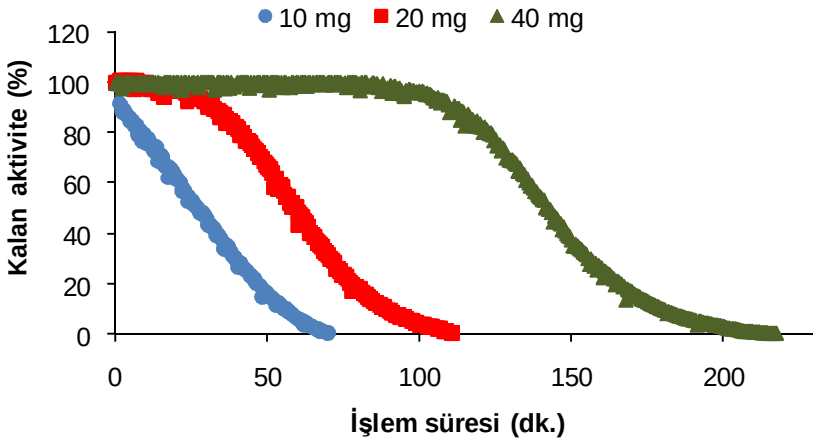
Florisile 6-AHA üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.134'de gösterilmiştir.



Şekil 4.134. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

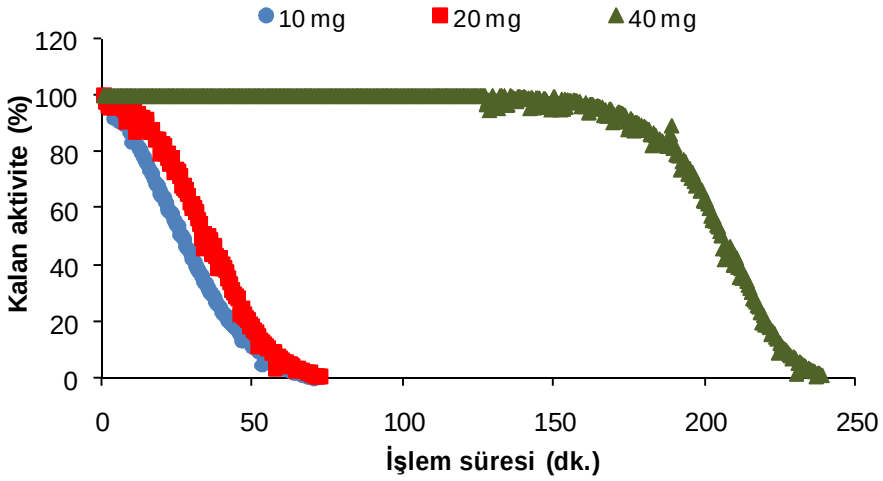
İmmobilize katalaz örneklerinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 17, % 47 ve % 54'ü parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 8, 7 ve 9,5 dk. olarak belirlenmiştir.

Sürekli reaktörde CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.135'de gösterilmiştir. H_2O_2 çözeltisi pH'sı 7,5 olan 75 mM fosfat tamponunda hazırlanmıştır.



Şekil 4.135. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

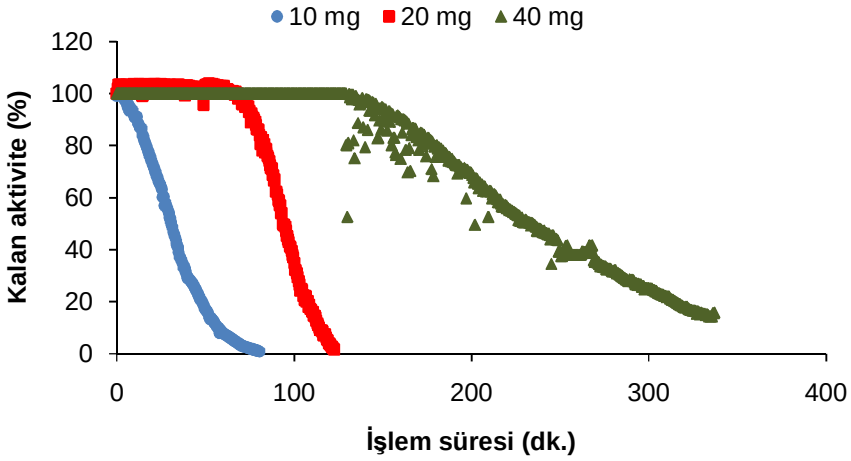
İmmobilize katalaz örneklerinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 94, % 100 ve % 100'ü parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 27, 58 ve 144 dk. olarak belirlenmiştir. Sürekli reaktörde CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.136'da gösterilmiştir.



Şekil 4.136. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

İmmobilize katalaz örneklerinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 64, % 94 ve % 100'ü parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 26,5 ve 44 ve 205 dk. olarak belirlenmiştir.

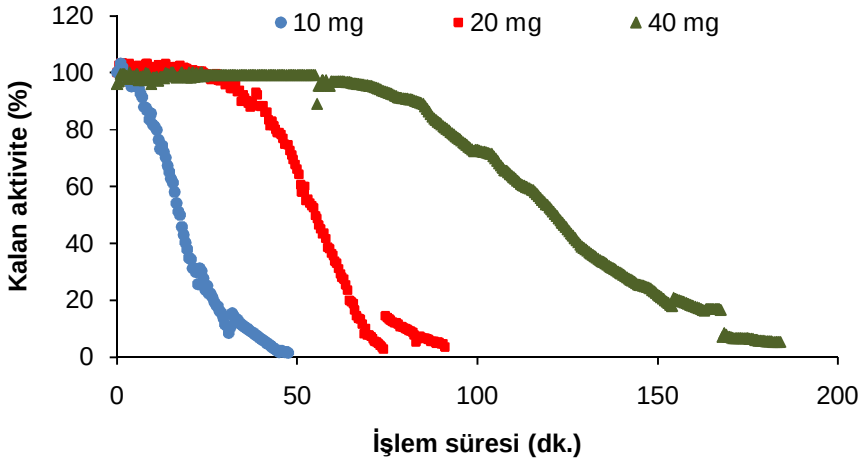
Sürekli reaktörde CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.137'de gösterilmiştir. H_2O_2 çözeltisi pH'sı 7,5 olan 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmıştır.



Şekil 4.137. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

Sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda 10 mg immobilize katalaz içeren kolonda başlangıçta H_2O_2'nin % 75'i parçalanırken 20 ve 40 mg içeren kolonlarda H_2O_2'nin tamamı parçalanmıştır. 10, 20 ve 40 mg immobilize katalaz yüklenmiş kolonlarda immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 31, 194 ve 234 dk. olarak belirlenmiştir.

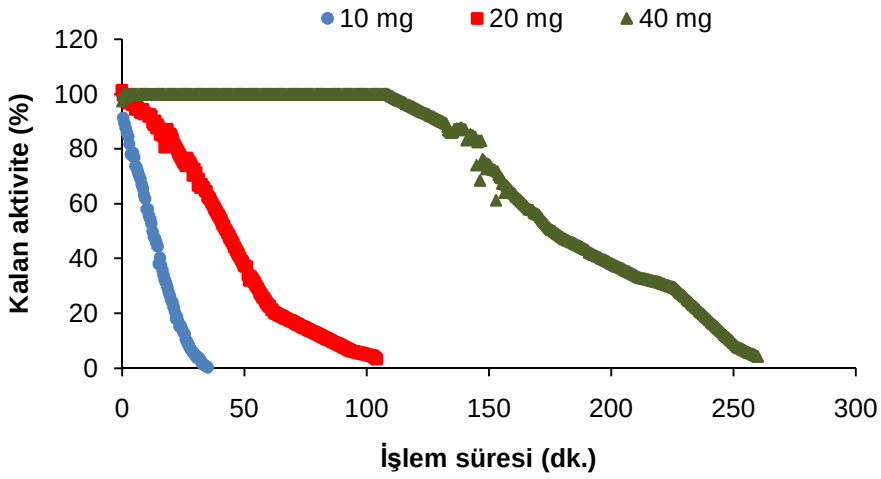
Sürekli reaktörde CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.138'de gösterilmiştir.



Şekil 4.138. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

10 mg immobilize katalaz yüklenmiş kolonda, 5,6 ml/dk. akış hızında başlangıçta H_2O_2'nin % 87'si parçalanırken, 20 ve 40 mg immobilize katalaz içeren reaktörlerde H_2O_2'nin tamamı parçalanmıştır. 10, 20 ve 40 mg immobilize katalaz içeren reaktörde immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 17, 55 ve 122 dk. olarak belirlenmiştir.

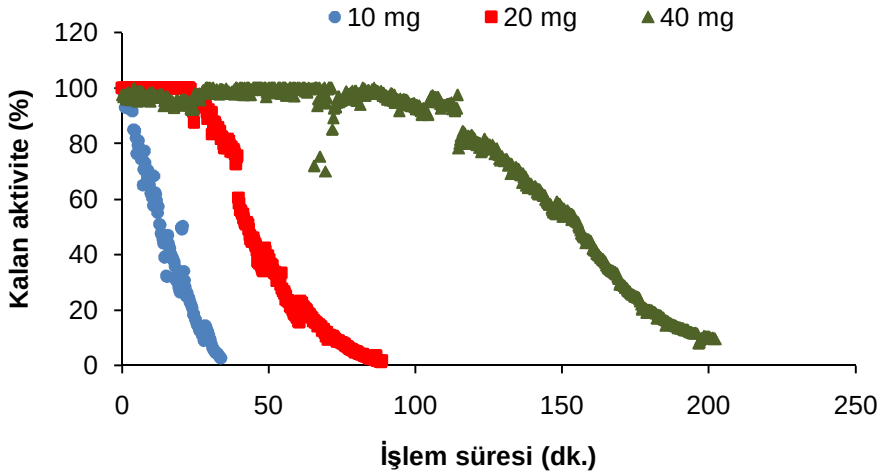
Sürekli reaktörde CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.139'da gösterilmiştir. H_2O_2 çözeltisi pH'sı 7,5 olan 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmıştır.



Şekil 4.139. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

İmmobilize katalaz örneğinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 85, % 100 ve % 100'ü parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 12,5, 41 ve 191 dk. olarak belirlenmiştir.

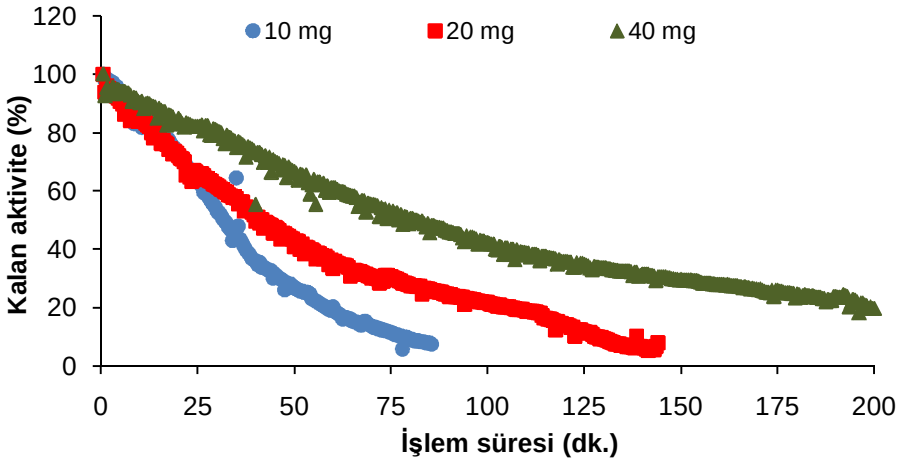
Sürekli reaktörde CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.140'da gösterilmiştir.



Şekil 4.140. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

İmmobilize katalaz örneğinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 81, % 86 ve % 100'ü parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 12, 39 ve 141 dk. olarak belirlenmiştir.

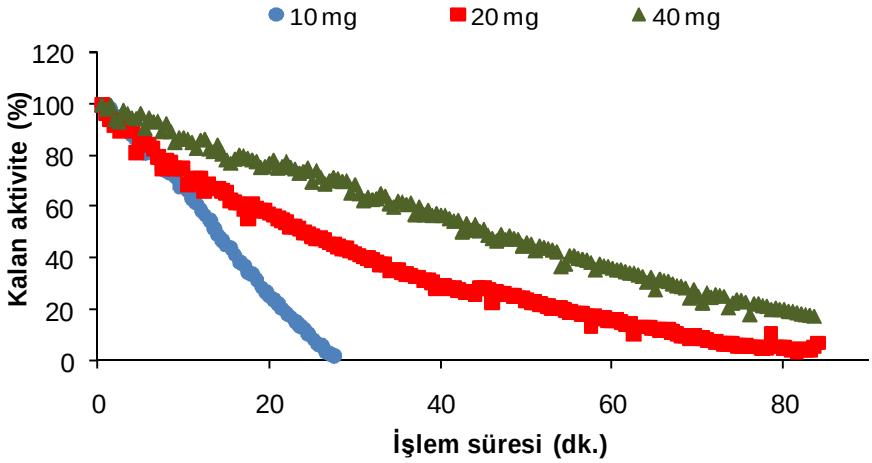
Sürekli reaktörde Eupergit C'ye doğrudan immobilize edilen katalazın substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.141'de gösterilmiştir. H_2O_2 çözeltisi pH'sı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmıştır.



Şekil 4.141. Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

İmmobilize katalaz örneğinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 64, % 86 ve % 96'sı parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 42, 41,5 ve 82 dk. olarak belirlenmiştir.

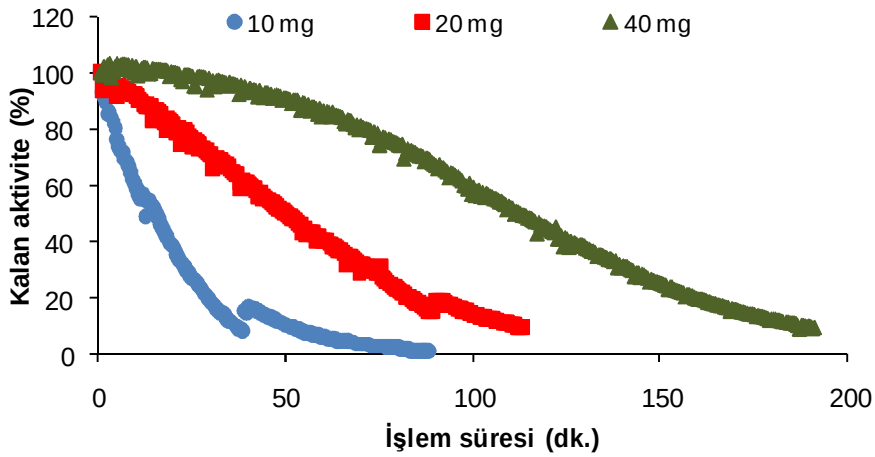
Sürekli reaktörde Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.142'de gösterilmiştir.



Şekil 4.142. Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

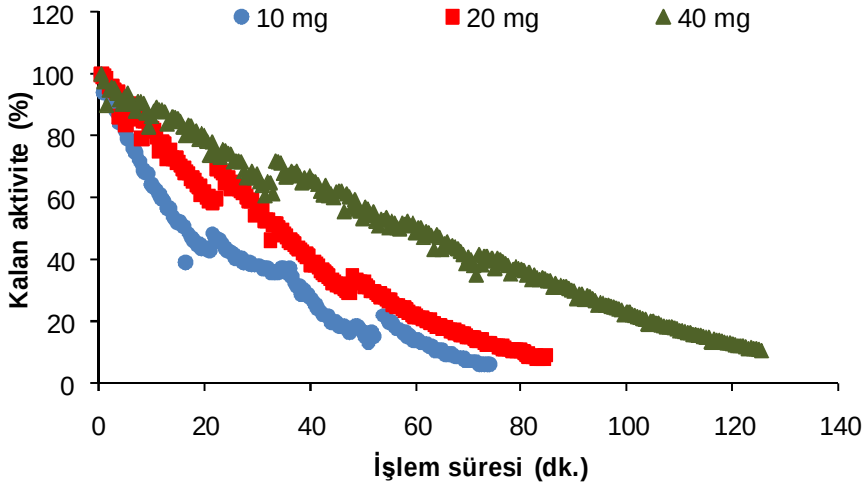
İmmobilize katalaz örneğinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 27, % 64 ve % 79'u parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 14,5, 24,5 ve 45 dk. olarak belirlenmiştir.

Sürekli reaktörde Eupergit C 250L'ye doğrudan immobilize edilen katalazın substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.143'de gösterilmiştir. H_2O_2 çözeltisi pH'sı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmıştır.



Şekil 4.143. Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 2,3 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

İmmobilize katalaz örneklerinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 49, % 84 ve % 95'i parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 15,5, 50 ve 112,5 dk. olarak belirlenmiştir. Sürekli reaktörde Eupergit C 250L'ye doğrudan immobilize edilen katalazın 5,6 ml/dk. akış hızında işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.144'de gösterilmiştir.



Şekil 4.144. Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın sürekli reaktörde substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşulda işlem süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

İmmobilize katalaz örneklerinden 10, 20 ve 40 mg kullanıldığında başlangıçta H_2O_2'nin sırasıyla % 22, % 65 ve % 84'ü parçalanmış ve immobilize katalazın yarı ömrü sırasıyla 16, 44 ve 56,5 dk. olarak belirlenmiştir.

Sürekli reaktörde farklı desteklere immobilize edilen katalaz örneklerinin başlangıçtaki aktivitelerinin (% parçalanan H_2O_2 cinsinden) ve yarı ömürlerinin akış hızına ve immobilize katalaz miktarına bağlı değişimi Çizelge 4.7'de özetle verilmiştir.

Çizelge 4.7. Sürekli reaktörde farklı desteklere immobilize edilen katalaz örneklerinin başlangıçtaki aktivitelerinin ve yarı ömürlerinin akış hızına ve immobilize katalaz miktarına bağlı değişimi.(AH: Akış hızı, İKM:immobilize katalaz miktarı)

	AH (ml/ dk.)	İKM (mg)	İmm. Katalazın başlangıçtaki aktivitesi (% Parçalanan H_2O_2)	İmm. katalazın yarı ömrü (dk.)
Florisil+Katalaz	2,3	10	18	14
		20	42	17
		40	51	15
	5,6	10	8	7
		20	16	7,5
		40	40	11
Florisil+ 5-APA+Katalaz	2,3	10	54	4
		20	54	12,5
		40	82	27
	5,6	10	28	7
		20	50	10
		40	66	27
Florisil+ 6-AHA+Katalaz	2,3	10	45	5,5
		20	64	10
		40	86	20
	5,6	10	17	8
		20	47	7
		40	54	9,5
CPG+Katalaz	2,3	10	94	27
		20	100	58
		40	100	144
	5,6	10	64	26,5
		20	94	44
		40	100	205
CPG+ 5-APA+Katalaz	2,3	10	75	31
		20	100	94
		40	100	234
	5,6	10	87	34
		20	100	55
		40	100	122
CPG+ 6-AHA+Katalaz	2,3	10	85	12,5
		20	100	41
		40	100	191
	5,6	10	81	12
		20	86	39
		40	100	141
Eupergit C +Katalaz	2,3	10	64	42
		20	86	41,5
		40	96	82
	5,6	10	27	14,5
		20	64	24,5
		40	79	45
Eupergit C 250 L + Katalaz	2,3	10	49	15,5
		20	84	50
		40	95	112,5
	5,6	10	22	16
		20	65	44
		40	84	56,5

CPG'ye immobilize edilen katalaz örnekleri diğer desteklere immobilize edilen katalaz örneklerinden daha fazla aktiviteye sahip olması ve sürekli reaktörde kullanım süresinin diğerlerine göre daha uzun olması nedeniyle sürekli reaktörde toplam aktiviteleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamada immobilize katalaz örneklerinin başlangıç aktivitelerinin %50 kalıncaya kadar geçen süredeki aktivite toplamlarının akış hızına ve immobilize katalaz miktarına bağlı olarak değişimi Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. CPG'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin sürekli reaktördeki aktivite toplamları.

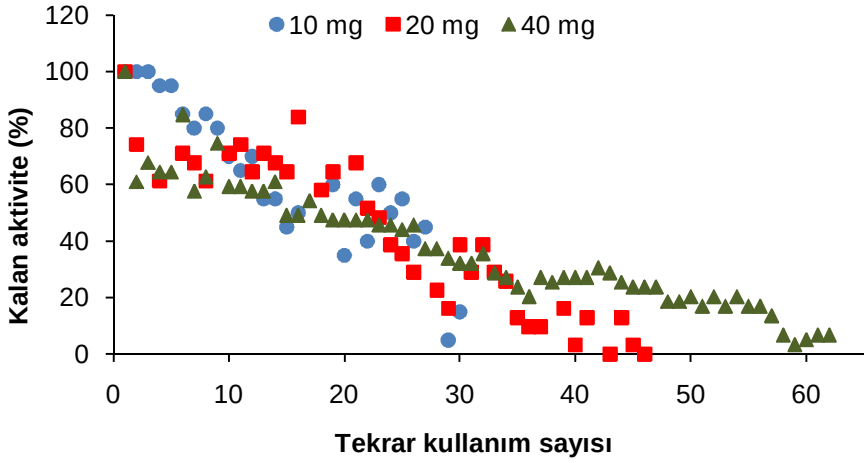
AH (ml/dk.)	İKM (mg)	Spesifik aktivite toplamı (U/mg prot.)	Aktivite toplamı (U/g imm. katalaz)
2,3	10	$1,1x\ x10^5$	4.0×10^5
	20	$2,2\ x10^5$	8.0×10^5
	40	$4,3\ x10^5$	15.7×10^5
5,6	10	$1,6\ x10^5$	5.8×10^5
	20	$2,2\ x10^5$	8.0×10^5
	40	$19,1\ x10^5$	69.7×10^5

CPG'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin sürekli reaktörde kullanımına bağlı olarak aktivite toplamları incelendiğinde aynı miktardaki immobilize katalazın aktivite toplamı akış hızı arttıkça artmakta ve aynı akış hızında reaktördeki immobilize katalaz miktarı arttıkça aktivite toplamı artmaktadır.

4.1.7.2. İmmobilize Katalaz Örneklerinin Kesikli Reaktörlerde Kullanımı

İmmobilize katalaz örneklerinin kesikli reaktörde kullanımının araştırılmasında çapı 1 cm, uzunluğu 7 cm olan cam kolon kullanılmıştır. İmmobilize katalaz örneklerinden 10, 20 ve 40 mg kolona yüklenerek üzerine 10 mM H_2O_2 çözeltisinden 5 ml eklenmiş ve 2 dk. sonunda çözelti kolondan hızla uzaklaştırılmıştır. Her bir immobilize katalaz örneği için elde edilen bulgular aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

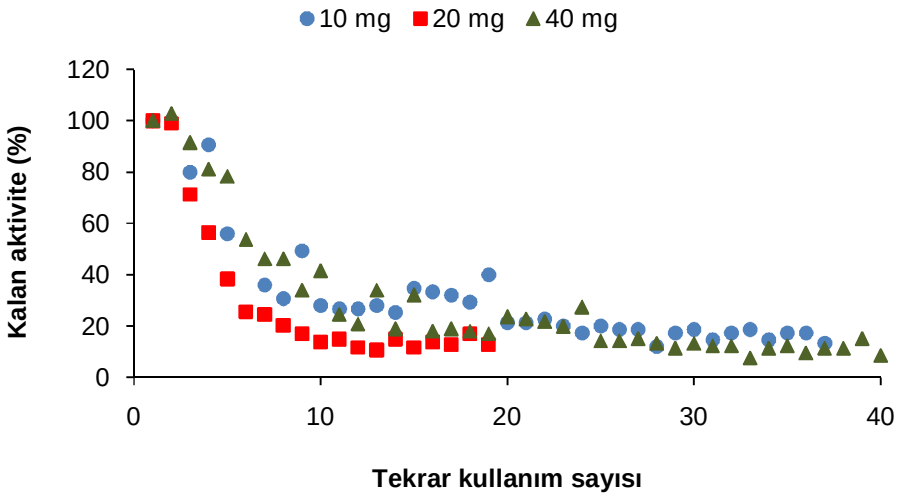
Florisile doğrudan immobilize edilen katalazdan 10, 20 ve 40 mg alınarak kesikli reaktörlerde kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.145'de gösterilmiştir.



Şekil 4.145. Florisile doğrudan immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

Kesikli reaktörde kolona yüklenen 10, 20 ve 40 mg immobilize katalaz örnekleri ilk kullanımda H_2O_2'nin sırasıyla % 5, % 9 ve % 14'ünü parçalamışlar ve 16, 22 ve 15 kullanımları sonunda başlangıç aktivitelerinin % 50'sini korumuşlardır.

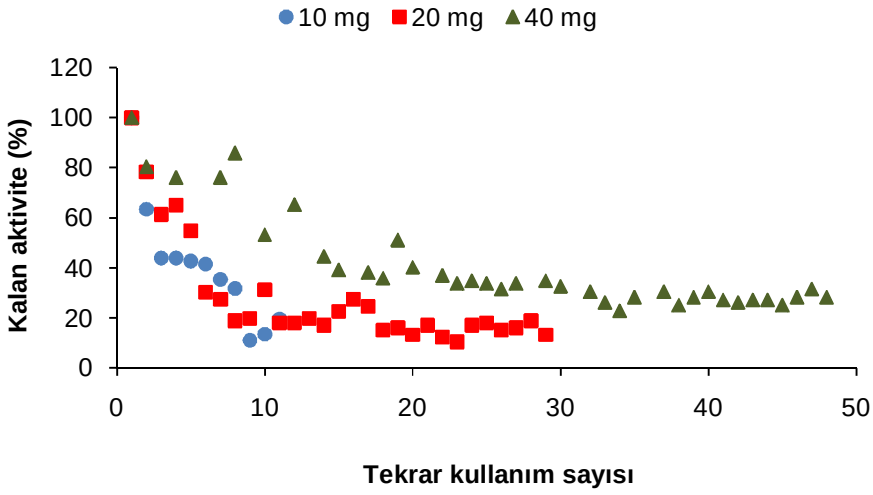
Florisile 5-APA üzerinden immobilize edilen katalazdan 10, 20 ve 40 mg alınarak kesikli reaktörlerde kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.146'da gösterilmiştir.



Şekil 4.146. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

10, 20 ve 40 mg immobilize katalaz örnekleri ilk kullanımda H_2O_2'nin sırasıyla % 19, % 24 ve % 27'sini parçalamışlar ve 5, 4 ve 6 kullanımları sonunda başlangıç aktivitelerinin % 50'sini korumuşlardır.

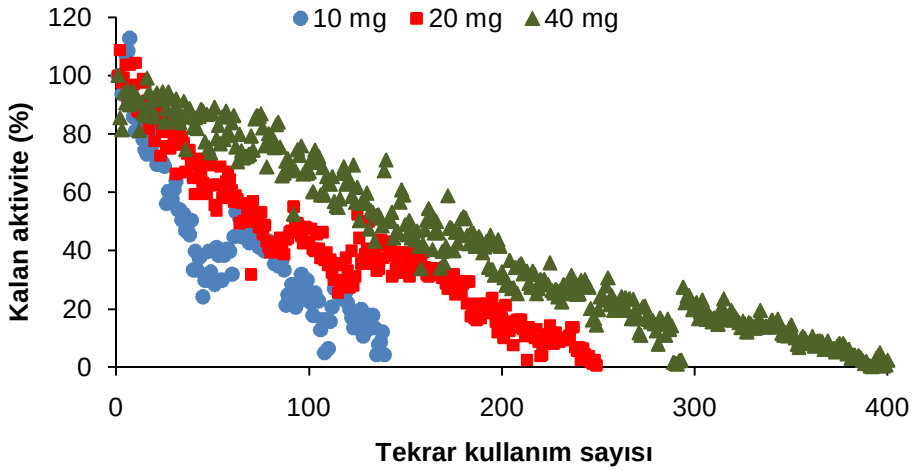
Florisile 6-AHA üzerinden immobilize edilen katalazdan 10, 20 ve 40 mg alınarak kesikli reaktörlerde kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.147'de gösterilmiştir.



Şekil 4.147. Florisile 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın kesikli eaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

10, 20 ve 40 mg immobilize katalaz örnekleri ilk kullanımda H_2O_2'nin sırasıyla % 21, % 24 ve % 27'sini parçalamışlar ve 2, 5 ve 10 kullanımları sonunda başlangıç aktivitelerinin % 50'sini korumuşlardır.

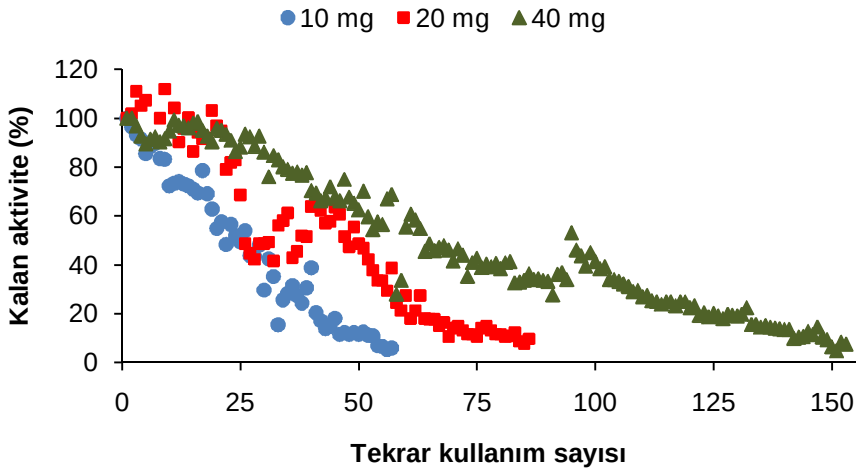
CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazdan 10, 20 ve 40 mg alınarak kesikli reaktörlerde kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.148'de gösterilmiştir.



Şekil 4.148. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

10, 20 ve 40 mg immobilize katalaz örnekleri ilk kullanımda H_2O_2'nin sırasıyla % 42, % 49 ve % 88'ini parçalamışlar ve 44, 72 ve 180 kullanımları sonunda başlangıç aktivitelerinin % 50'si kalmıştır.

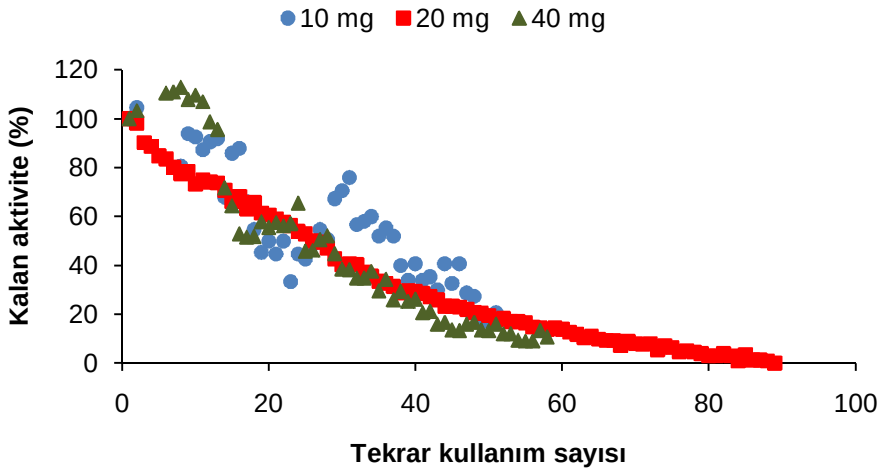
CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazdan 10, 20 ve 40 mg alınarak kesikli reaktörlerde kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.149'da gösterilmiştir.



Şekil 4.149. CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

10, 20 ve 40 mg immobilize katalaz örnekleri ilk kullanımda H_2O_2'nin sırasıyla % 55, % 73 ve % 81'ini parçalamışlar ve 25, 47 ve 60 kullanımları sonunda başlangıç aktivitelerinin % 50'sini korumuşlardır.

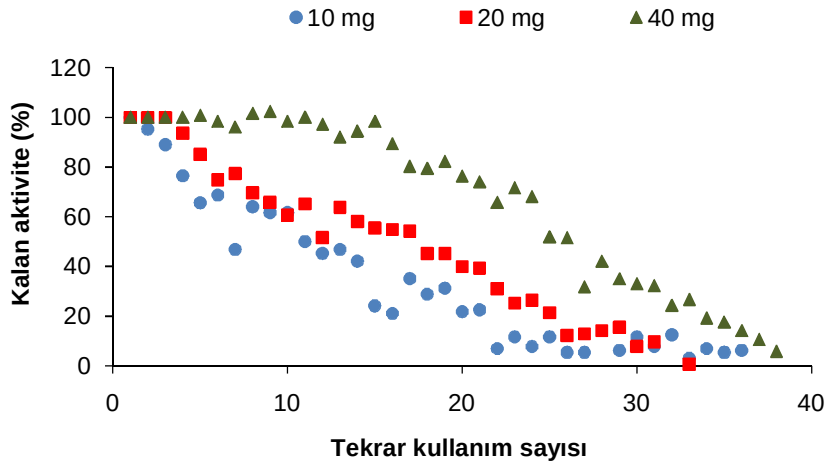
CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazdan 10, 20 ve 40 mg alınarak kesikli reaktörlerde kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.150'de gösterilmiştir.



Şekil 4.150. CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

10, 20 ve 40 mg immobilize katalaz örnekleri ilk kullanımda H_2O_2'nin sırasıyla % 38, % 64 ve % 77'ini parçalamışlar ve 18, 27 ve 27 kullanımları sonunda başlangıç aktivitelerinin % 50'sini korumuşlardır.

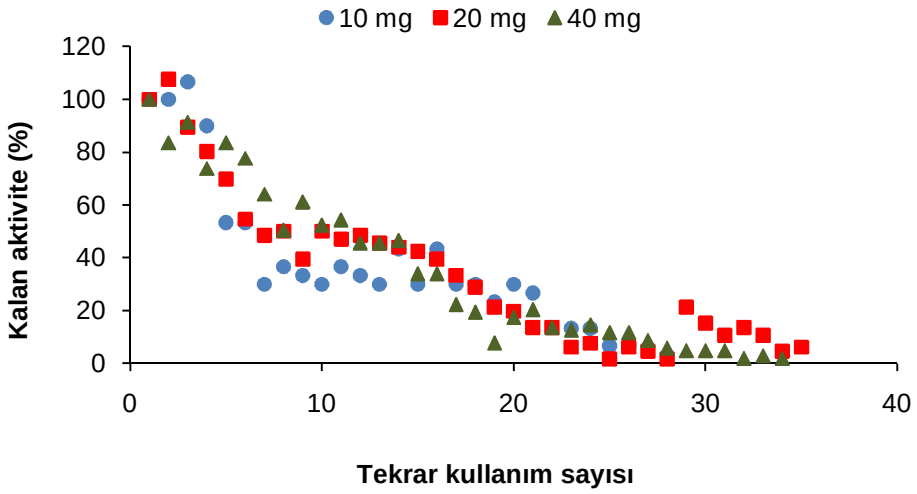
Eupergit C'ye immobilize edilen katalazdan 10, 20 ve 40 mg alınarak kesikli reaktörlerde kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.151'de gösterilmiştir.



Şekil 4.151. Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

10, 20 ve 40 mg immobilize katalaz örnekleri ilk kullanımda H_2O_2'nin sırasıyla % 42, % 45 ve % 61'ini parçalamışlar ve 11, 15 ve 22 kullanımları sonunda başlangıç aktivitelerinin % 50'sini korumuşlardır.

Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazdan 10, 20 ve 40 mg alınarak kesikli reaktörlerde kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim Şekil 4.152'de gösterilmiştir.



Şekil 4.152. Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde tekrar kullanıma bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

10, 20 ve 40 mg immobilize katalaz örnekleri ilk kullanımda H_2O_2'nin sırasıyla % 8, % 17 ve % 27'sini parçalamışlar ve 4, 10 ve 11 kullanımları sonunda başlangıç aktivitelerinin % 50'sini korumuşlardır.

Kesikli reaktörde kullanılan immobilize katalazların miktarlarına bağlı olarak immobilize edilen katalaz örneklerinin başlangıçtaki aktivitelerinin (% parçalanan H_2O_2 cinsinden) ve aktivitelerinin %50'sinin kaldığı tekrar kullanım sayılarının değişimi Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Kesikli reaktörde kullanılan immobilize katalazların miktarlarına bağlı olarak immobilize katalaz örneklerinin başlangıçtaki aktiviteleri ve aktivitelerinin %50'sinin kaldığı tekrar kullanım sayılarının değişimi.

	İKM (mg)	İmm. katalazın başlangıçtaki aktivitesi (% Parçalanan H_2O_2)	Tekrar kullanım sayısı
Florisil+Katalaz	10	5	16
	20	9	22
	40	14	15
Florisil+5-APA+Katalaz	10	19	5
	20	24	4
	40	27	6
Florisil+6-AHA+Katalaz	10	21	2
	20	24	5
	40	27	10
CPG+Katalaz	10	42	44
	20	49	72
	40	88	180
CPG+ 5-APA+Katalaz	10	55	25
	20	73	47
	40	81	60
CPG+ 6-AHA+Katalaz	10	38	18
	20	64	27
	40	77	27
Eupergit C+Katalaz	10	42	11
	20	45	15
	40	61	22
Eupergit C 250 L+ Katalaz	10	8	4
	20	17	10
	40	27	11

En yüksek tekrar kullanım sayısına ve yüksek aktiviteye CPG'ye immobilize edilen katalaz örnekleri sahiptir. CPG'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin başlangıç aktivitelerinin %50'si kalıncaya kadar ki kullanım sayıları dikkate alınarak aktivite toplamları hesaplanmış, elde edilen veriler Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. CPG'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin kesikli reaktördeki aktivite toplamları.

İKM (mg)	Spesifik aktivite toplamları (U/mg prot.)	Aktivite toplamları (U/g imm. katalaz)
10	$0,4 \times 10^5$	1.5×10^5
20	$0,5 \times 10^5$	1.8×10^5
40	$1,7 \times 10^5$	6.2×10^5

CPG'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı olarak hesaplanan aktivite toplamları reaktörde kullanılan immobilize katalaz miktarı arttıkça artmıştır.

4.2. Tartışma

Katalazın immobilize formu, reaksiyon ortamından kolay ayırılabilmesi, tekrar kullanıma olanak sağlaması ve endüstriyel uygulamalara (örneğin sütün soğuk pastörizasyonu için kullanılan H_2O_2'nin işlem sonrasında ortamdan uzaklaştırılması, tekstilde ağartıcı olarak kullanılan H_2O_2'nin aşırısının uzaklaştırılması, kağıt sanayinde kağıdın ağartılmasından sonra kalan H_2O_2'nin, reçine ve plastik üretiminde oksitleyici ve köpükleştirici olarak kullanılan H_2O_2'nin uzaklaştırılması gibi) daha uygun olması nedeniyle serbest katalaza göre daha geniş potansiyel kullanım alanına sahiptir. Bu çalışmada, katalaz çeşitli desteklere kovalent olarak immobilize edilmiştir. Katalazın kovalent immobilizasyonunda seçilen desteğin fiziksel ve kimyasal özellikleri (desteğin tanecik ve gözenek büyüklüğü, geçirgenliği, kimyasal bileşimi, sahip olduğu aktif ve aktif olmayan fonksiyonel grupları, eğer ara kol kullanılıyorsa bu ara kolların uzunluğu ve yapısı) immobilize katalazın performansını (aktivitesini, seçiciliğini ve kararlılığını) doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle bu çalışmada katalazın kovalent immobilizasyonunda farklı kimyasal yapıya, partikül büyüklüğüne, gözenek büyüklüğüne ve yüzey alanına sahip destekler ve farklı yapıda ve uzunlukta ara kollar kullanılarak uygun destek ve kovalent immobilizasyon yöntemi belirlenmeye çalışılmıştır.

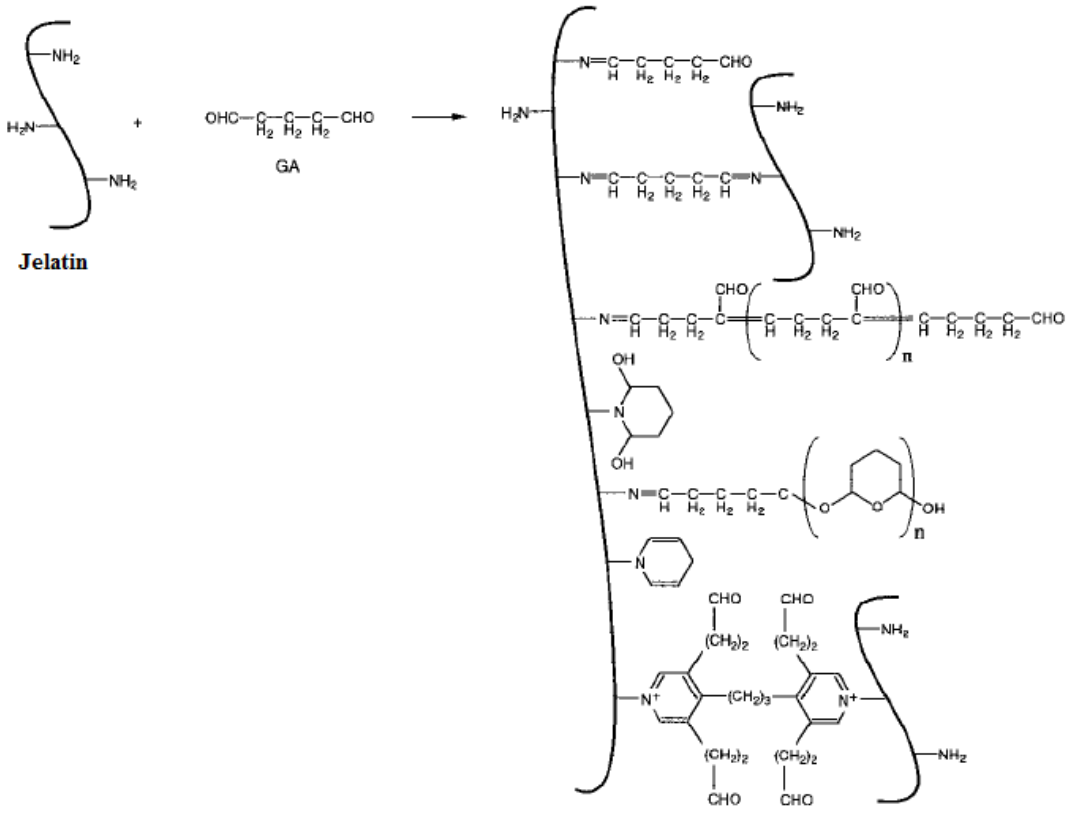
Çeşitli enzimlerin çeşitli inorganik desteklere kovalent immobilizasyonunda, desteğin önce silanlanması, ardından glutaraldehit ile modifiye edilmesi ve daha sonra enzimin bağlanması pekçok araştırıcı tarafından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Azevedo ve ark., 2004; El-Zahab ve ark., 2004; Limbut ve ark., 2004; Sasahi ve ark., 2004; Nam ve ark., 2005; Taylor ve ark., 2005; Gomez ve ark., 2006, Kahraman ve ark., 2007; Karakuş ve Pekyardımcı, 2009; Cabana ve ark., 2009). Destekte yapılan modifikasyonlardan sonra destekteki fonksiyonel grupların sayısı enzim immobilizasyonunu etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Florisil ve

CPG destekler katalaz immobilizasyonundan önce 3-APTES ile silanlanarak desteklere $–NH_2$ grupları bağlanmıştır. Bu işlemden sonra gözenek büyüklüğü 6-8 nm (ortalama yüzey alanı 235 m^2/g) olan florisilde, gözenek büyüklüğü (yüzey alanı) 70 nm (39,4 m^2/ g), 100 nm (21,8 m^2/ g) ve 215 nm (7,4 m^2/ g) olan CPG'lerde $-NH_2$ grubu miktarı sırasıyla 270, 33,5, 10,8 ve 2,9 µmol/g destek olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi silanlama işleminden sonra 1,0 g destek yüzeyinde bulunan $-NH_2$ grubunun miktarı desteğin yüzey alanı arttıkça artmaktadır. Florisil ve CPG'ler silanlama işleminden sonra glutaraldehit ile modifiye edildiğinde florisilde ve CPG'lerde glutaraldehit bağlanmadan kalan serbest $-NH_2$ grubunun miktarının silanlama sonrasındaki $-NH_2$ grubunun miktarına oranı yaklaşık % 10'dur. Bu oran desteklerde bulunan $-NH_2$ gruplarının % 90'ının glutaraldehit ile modifiye edildiğini göstermektedir. CPG'ye alternatif olarak kolay bulunan ve daha ucuz olan NPG (yüzey alanı ~0,04 m^2/g) destek olarak kullanıldığında ise silanlama işleminden sonra 1,0 g NPG'deki $-NH_2$ grubu 0,04 µmol/g olarak bulunmuştur. Bir gram NPG'deki $-NH_2$ grubu miktarı aynı miktardaki florisil için belirlenen $-NH_2$ grubu miktarının % 0,02'si, gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'deki $-NH_2$ grubunun % 0,1'i kadardır. Silanlama işleminden sonra NPG glutaraldehit ile modifiye edildiğinde destekte glutaraldehit bağlanmadan kalan serbest $-NH_2$ grubu başlangıçtakinin yaklaşık % 70'i kadardır. Bir başka ifadeyle destekteki $–NH_2$ gruplarının % 30'u glutaraldehit ile modifiye edilebilmiştir. NPG ile yapılan denemelerde desteğe bağlanan katalaz miktarının ve bu örneklerde herhangi bir katalaz aktivitesinin saptanamamış olmasının nedeni enzimin desteğe bağlanmasından sorumlu fonksiyonel grubun destekteki sayısının oldukça az olması olabilir. Vasudevan ve Weiland (1994) yaptıkları bir çalışmada spesifik aktiviteleri 2500 U/mg prot. ve 12500 U/mg prot. olan 2 farklı sığır karaciğer katalazını silanlayarak glutaraldehit ile modifiye ettikleri NPG'ye immobilize ettiklerini ve immobilize katalaz örneklerinin aktivitelerinin sırasıyla 21 U/g destek ve 45 U/g destek olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada desteğin silanlama işleminden sonra ne kadar $-NH_2$ grubu içerdiği, glutaraldehit ile modifikasyondan sonra destekte ne kadar serbest $-NH_2$ grubunun kaldığı, desteğe bağlanan katalaz miktarı ve

immobilize katalaz örneklerinin aktivitelerinin nasıl ölçüldüğü ile ilgili herhangi bir bilgi verilmemiştir.

Literatürde, bizim araştırmalarımız dışında katalazın aktifleştirilmiş florisile kovalent olarak immobilize edildiği bir başka çalışmaya rastlanmamıştır. Bir çalışmada lipaz immobilizasyonu için aktifleştirilmiş florisil kullanılmış, ancak bu çalışmada desteğin 3-APTES ile silanlanmasından sonra desteğe bağlanan -NH_2 grubunun ve takiben glutaraldehit ile modifikasyonundan sonraki serbest kalan -NH_2 grubunun miktarı hakkında herhangi bir bilgi verilmemiştir (Cho ve Rhee, 1994). CPG'nin destek olarak kullanıldığı çeşitli immobilizasyon çalışmalarında da yine desteğe bağlanan ve glutaraldehit ile modifikasyonundan sonra destekte serbest kalan -NH_2 grubunun miktarı hakkında herhangi bir sayısal veriye rastlanmamıştır (Traher, 1974; Tai ve ark., 1982; Hossain ve Do, 1988; Sasaki ve ark., 2004). Lee ve Swaisgood (1997) yaptıkları bir çalışmada CPG ve NPG'yi 3-APTES ile silanladıktan sonra desteklere 2,4,6-trinitro benzen sülfonik asit (TNBS) çözeltisinden ekleyerek TNBS'nin destekdeki –NH_2 grubu ile oluşturduğu kompleksin sarı renginden silanlanmanın gerçekleştiğini kalitatif olarak test etmişler, fakat destekteki –NH_2 grubu hakkında kantitatif bir bilgi vermemişlerdir. Bu araştırmada, florisil ve cam desteklerin silanlanmasından sonra destekte bulunan -NH_2 grubu ve glutaraldehit ile modifikasyonundan sonra glutaraldehitin bağlanmadığı serbest –NH_2 grubunun miktarı spektroskopik yöntemle kantitatif olarak belirlenmiştir. Desteğin glutaraldehit ile muamele edilmesinden sonra reaksiyona girmeden kalan glutaraldehitin tamamen destekten uzaklaştırıldığından emin olmak için yıkama çözeltisinde glutaraldehitin olup olmadığı spektrofotometrik bir yöntem kullanılarak takip edilmiştir. Betancor ve ark. (2004) katalaz immobilizasyonu sırasında ortamda bulunabilecek az miktardaki serbest glutaraldehitin katalaz aktivitesinin azalmasına neden olduğunu ve glutaraldehitin tamamen uzaklaştırılması gerektiğini bildirmişlerdir. Literatürde bazı çalışmalarda yıkama suyunda glutaraldehit kokusu gelmeyinceye kadar desteğin su ile yıkanması ile glutaraldehitin uzaklaştırıldığı bildirilmekte ancak glutaraldehitin yıkama çözeltisinde varlığının araştırılmasına yönelik herhangi bir ölçümden bahsedilmemektedir. Matsuda ve ark. (1999) jelatin moleküllerini bir birine

bağlamak için glutaraldehiti çapraz bağlayıcı olarak kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada protein ile glutaraldehit arasında meydana gelebilecek reaksiyonları Şekil 4.161'de özetlemişlerdir. Bu reaksiyonlardan da anlaşıldığı gibi destek glutaraldehit ile muamele edildikten sonra "destekte azalan $-NH_2$ grubunun miktarı kadar aldehit grubu bulunmaktadır" diyebilmek mümkün değildir.



Şekil 4.153. Jelatin ve glutaraldehit arasındaki reaksiyon (Matsuda ve ark., 1999).

Literatürde gözenekli desteklere verimli bir kovalent immobilizasyon için gözenek büyüklüğünün enzimin büyüklüğünün 3-9 katı olması önerilmektedir (Cao, 2005). Sığır karaciğer katalazı için enzimin boyutu 9,0x6,0x2,0 nm^3 olarak bildirilmiştir (Zhang ve ark., 1998). Katalazın ana ekseni 9,0 nm olduğuna göre teorik bir yaklaşımla en uygun gözenek büyüklüğünün 27-81 nm arasında olabileceği düşünülerek, gözenek büyüklükleri 70, 100 ve 215 nm olan CPG'ler immobilizasyon çalışmasında denenmiştir. Gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'de en yüksek bağlanma ve en yüksek katalaz aktivitesinin elde edilmesi bu desteğin gözenek

büyüklüğü bakımından en uygun olduğunu, difüzyon sınırlamasının olmadığını göstermektedir (Şekil 4.43 ve Çizelge 4.3). Gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'ye diğer CPG'lere göre daha fazla katalaz bağlanması da bu desteğin birim yüzey alanının diğer CPG'lerinkinden daha büyük olmasından kaynaklanmaktadır. Tartışmanın bundan sonraki bölümlerinde bahsedilen CPG, gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG'dir. Literatürde gözenekleri kontrollü olmayan florisil, Eupergit C ve Eupergit C 250 L için gözenek büyüklüğü sırasıyla 6-8 nm , 10-50 nm ve 100-200 nm aralıklarında bildirilmektedir (Segura ve ark., 2004; Martin ve ark., 2004). Bu durumda katalazın florisil destekte daha çok dış yüzeyde, Eupergit C ve Eupergit C 250L desteklerinde ise hem iç hem de dış yüzelerde bağlandığı düşünülmektedir.

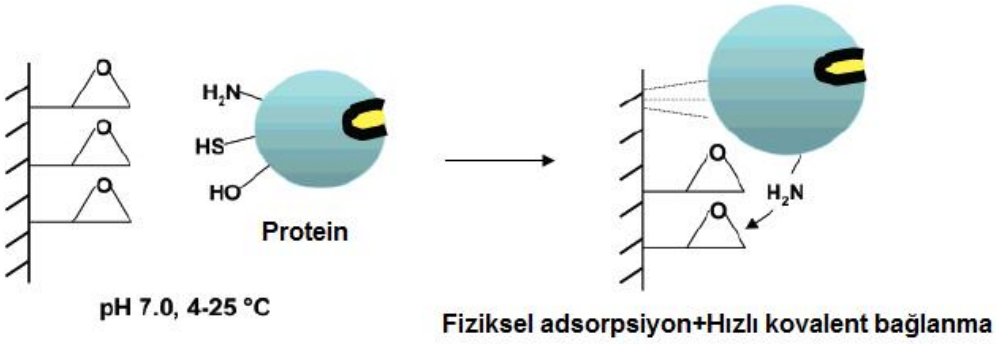
Aktifleştirilmiş florisile doğrudan, 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilize edilen katalazın bağlanan miktarları immobilizasyon pH'sı (5,0-8,0) arttırıldıkça artmakta, ancak aktiviteler aynı eğilimi göstermemektedir (Şekil 4.3, Şekil 4.17, Şekil 4.29). Florisile doğrudan, 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilize edilen katalaz örnekleri içerisinde en yüksek aktiviteyi immobilizasyon pH'sının sırasıyla 7,5, 5,5 ve 5,5 olduğu örneklerin göstermesi enzimin bu pH'larda uygun konformasyonda desteğe bağlandığını göstermektedir. Benzer şekilde aktifleştirilmiş CPG'ye doğrudan, 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden yapılan immobilizasyonlarda immobilizasyon ortamının pH'sı 5,0'dan 7,0'a arttırıldığında desteğe bağlanan katalaz miktarı (özellikle ara kollar üzerinden yapılan immobilizasyon çalışmalarında) artmaktadır (Şekil 4.43, Şekil 4.61 ve Şekil 4.73). Ancak en yüksek aktivitelerin CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz için immobilizasyon pH'sının 6,0, CPG'ye 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilize edilen katalaz örnekleri için immobilizasyon pH'sının 5,5 olduğunda elde edilmesi yine katalazın bu pH'larda desteğe en uygun konformasyonda bağlandığını göstermektedir.

Katalazın florisile doğrudan, 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları üzerinden immobilizasyonunda en yüksek bağlanma miktarları sırasıyla pH 8,0, 7,0 ve pH 6,5'de yapılan immobilizasyonlarda elde edilmiş olup bu değerler sırasıyla 3,5 mg prot./g destek, 3,4 mg prot./g destek ve 2,1 mg prot./g destek'tir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.16). Bununla birlikte florisile 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları üzerinden

immobilize katalaz örneklerinde aktivite tespit edilememiştir. CPG'ye doğrudan, 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları üzerinden farklı pH'larda yapılan immobilizasyon çalışmalarında desteğe bağlanan katalaz miktarı immobilizasyon pH'sından çok fazla etkilenmemektedir (Şekil 4.58). Katalazın CPG'ye doğrudan, 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları üzerinden immobilizasyonunda en yüksek bağlanma miktarları sırasıyla pH 7,0, pH 7,0 ve pH 5,5'de yapılan immobilizasyon çalışmasında elde edilmiş olup bu değerler sırasıyla 6,4 mg prot./g destek, 6,2 mg prot./g destek ve 5,8 mg prot./ g destek'tir (Şekil 4.43 ve Şekil 4.58). İmmobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri incelendiğinde elde edilen aktiviteler son derece düşük olup CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin yaklaşık % 10'u kadardır (Şekil 4.59 ve Şekil 4.60). 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları üzerinden florisile ve CPG'ye yapılan immobilizasyon çalışmalarında immobilize katalaz örneklerinin aktivite göstermemesi ya da çok düşük aktivite göstermesi enzimin uygun konformasyonda bağlanamamasından kaynaklanabilir.

Eupergit desteklere immobilize edilen katalazın bağlanma miktarı ortam pH'sına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Şekil 4.85). Bunun en büyük nedeni enzimdeki bağlanmada rol oynayan fonksiyonel grupların reaktivitelerinin ortam pH'sına bağlı olarak farklılık göstermesidir. Segura ve ark. (2004) proteinlerin Eupergit C'ye hafif asidik ortamda karboksil grubu üzerinden, nötral ve hafif bazik ortamda tiyol grupları üzerinden ve pH 9,0'un üstünde amino grupları üzerinden bağlanabildiğini bildirmişlerdir. Ancak Novic ve Rozzell (2005) nötral ve alkali koşullarda enzimdeki amino gruplarının Eupergit C'ye bağlanmada asıl sorumlu gruplar olduğunu, asidik ve nötral koşullarda sülfidril gruplarının ve karboksil gruplarının rol aldığını bildirmişlerdir. Mateo ve ark. (2007) epoksi gruplarının nötral pH'da düşük reaktivite gösterdiğini bu nedenle enzimin desteğe immobilizasyonunun 2 basamakta gerçekleştiğini; birinci basamakta enzimin desteğe hızlı bir fiziksel adsorpsiyonun, ikinci basamakta ise adsorbe olan enzimin yakın çevresindeki epoksi grupları ile enzim arasında kovalent bağın oluştuğunu bildirmişlerdir (Şekil 4.154). Çalışma sonuçlarımızdan görüleceği gibi Eupergit desteklere en yüksek bağlanma oranı enzimin izoelektrik noktasına (pI 5,4) yakın bir pH olan pH 5,5'te olmasına rağmen pH 6,0-8,0 aralığında enzim oldukça aktiftir (Şekil 4.86). Bu sonuç katalazın

geniş bir pH aralığında Eupergit desteklere uygun konformasyonda bağlanabildiğini göstermektedir.



Şekil 4.154. Eupergit destek ile protein arasındaki bağlanma mekanizması (Mateo ve ark., 2003).

Literatürde hidrofilik desteklere enzim immobilizasyonunda düşük iyonik güce sahip tamponların kullanımı, hidrofobik desteklerde ise yüksek iyonik güce sahip tamponların kullanımı önerilmektedir (Mateo ve ark., 2002). Çeşitli enzimlerin florisile doğrudan ve ara kollar üzerinden immobilizasyonu ve CPG'ye immobilizasyonunda düşük tampon derişimleri kullanılırken (Cho ve Rhee, 1994; Lee ve ark., 1997; Ettalibi ve ark., 2001; Azevedo ve ark., 2004; El-Zahab, 2004; Özyılmaz ve ark., 2007), Eupergit desteklere immobilizasyonunda daha yüksek tampon derişimlerinde immobilizasyon yapılmıştır (D'annibale ve ark., 2000; Segura ve ark., 2004). Hermanson ve ark. (1992) Eupergit desteğe amino, hidroksil ve sülfidril grubu içeren ligandların bağlanması için oda sıcaklığında, 1,0 M fosfat tamponunun kullanımının uygun olduğunu ve fosfat iyonlarının bağlanma reaksiyonunu katalizlediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda katalazın Eupergit desteklere immobilizasyonunda, tampon derişimi 0,5-1,25 M aralığında denenmiştir. Eupergit desteklere bağlanan katalaz miktarı ve immobilize katalaz örneklerinin aktiviteleri immobilizasyon tamponunun denenen derişimleri ile çok fazla değişmemekle birlikte en uygun tampon derişimi 1,0 M'dır ve bu sonuçlar literatürdeki bilgileri desteklemektedir.

Katalazın farklı sıcaklıklarda (5, 15 ve 25ºC) yapılan immobilizasyon çalışmalarında genel olarak tüm desteklere immobilize edilen katalaz örneklerinin

aktivitelerinin denenen immobilizasyon sıcaklıklarında çok fazla etkilenmediği görülmüştür.

Katalazın florisile ve CPG'ye doğrudan immobilizasyonunda, immobilizasyon mekanizması (imin bağının oluşması) aynı olmasına rağmen en uygun immobilizasyon süreleri birbirinden oldukça farklı bulunmuştur. Katalazın florisile doğrudan immobilizasyonunda en uygun süre 1 saat iken CPG'de bu süre 7 saattir. İmmobilizasyon sürelerinin arttırılması bağlanan katalaz miktarında fazla bir değişime neden olmazken aktiviteler immobilizasyon süresinden etkilenmiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.46). Florisilin küçük gözenek büyüklüğüne sahip olması nedeniyle enzimin daha çok desteğin yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir. CPG'ye yapılan immobilizasyonda ise enzimin desteğin gözeneklerinden içeri doğru difüzlenmesinin ve uygun konformasyonda bağlanmasının biraz daha zaman gerektirdiği düşünülmektedir. Florisil ve CPG'ye 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden yapılan immobilizasyon çalışmalarında en uygun immobilizasyon süresi 2 saat olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). İmmobilizasyon süresinin CPG'ye ara kollar üzerinden immobilizasyonunda daha kısa olmasının nedeni enzimin daha çok desteğin yüzeyine bağlanmasından kaynaklanabilir.

Katalazın Eupergit desteklere immobilizasyon mekanizması florisil ve CPG'dekinden farklıdır. Literatürde Eupergit desteklere enzim immobilizasyonunda, destekteki oksiran halkasının açılarak enzimin bağlanmasının uzun zaman gerektirdiği, genellikle immobilizasyon süresinin 12-72 saat aralığında olduğu bildirilmektedir (Hermanson, 1992). Bu nedenle katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilizasyonunda diğer destekler için denenen immobilizasyon sürelerine ek olarak daha uzun immobilizasyon süreleri de (48, 72 ve 96 saat) denenmiştir (Şekil 4.91). Enzimin bağlanma oranı dikkate alındığında 96 saatten daha kısa olan immobilizasyon sürelerinde katalazın Eupergit C 250L'ye bağlanma oranı Eupergit C'ye olan bağlanma oranından daha yüksektir. Bunun nedeni Eupergit C'nin içerdiği oksiran grubunun miktarı Eupergit C 250L'den yaklaşık 3 kat daha fazla olmasına rağmen Eupergit C'nin gözenek büyüklüğünün (10-50 nm) Eupegit C 250L'den (100-400 nm) küçük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Eupergit desteklerin her ikisi için de en uygun immobilizasyon süresi 24 saat olarak

belirlenmiş, 48, 72 ve 96 saat immobilize edilen katalaz örneklerinin aktiviteleri düşük bulunmuştur (Şekil 4.92). Bunun nedeni, oligomerik yapıda olan katalazın uzun süreli immobilizasyonlarda termal denaturasyonu ve/veya alt birimlerine ayrılması ve/veya enzimin desteğe birçok noktadan bağlanması olabilir.

Farklı katalaz derişimlerinde tüm desteklere yapılan immobilizasyon çalışmalarında katalaz derişimi arttırıldıkça gram destek başına bağlanan katalaz miktarları artmakla birlikte, immobilize katalazın spesifik aktiviteleri azalmaktadır. Diğer taraftan immobilize katalaz örneklerin bir gramı başına hesaplanan aktivite değerlerinde artış veya fazla bir değişimin olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla katalazın desteklere immobilizasyonunda en uygun katalaz derişiminin seçiminde, sadece enzimin spesifik aktiviteleri değil, immobilize katalazın 1 gramı başına hesaplanan aktiviteler ve enzimin desteğe bağlanma oranları da dikkate alınmıştır.

İmmobilize katalaz örneklerinin pH'ya bağlı aktivite değişimleri incelenmiştir. Daha önce yaptığımız çalışmada serbest katalaz için optimum pH'nın 7,5 olduğu belirlenmiştir (Tükel ve Alptekin, 2004). Çizelge 4.4'den görüldüğü gibi florisile doğrudan immobilize edilen katalazın optimum pH'sı (6,5) serbest katalaza kıyasla daha asidik bölgeye kayarken, florisile 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilize edilen katalaz örneklerinin optimum pH'ları serbest katalazla aynı bulunmuştur. Florisil bazik karakterde bir destek olduğu için florisile doğrudan immobilize edilen katalazın mikroçevresindeki hidronyum iyonlarının bir kısmı destek tarafından nötralleştirileceği için o bölge yığın çözeltide ölçülen pH'ya göre daha bazik olacaktır. Bu nedenle katalazın bulunduğu mikroçevrede pH'nın optimum değere ulaşması için yığın çözeltinin asitliği biraz arttırılmalıdır. Elde ettiğimiz bulgulara göre yığın çözeltinin pH'sı 6,5 olduğunda katalazın mikroçevresinde pH'nın 7,5 olduğunu söyleyebiliriz. Florisilde 5-APA ve 6-AHA ara kolların kullanılması ile enzimle destek arasındaki mesafe artmış ve buna bağlı olarak da enzimin mikroçevresi değişmiştir. Bu nedenle florisile ara kollar üzerinden immobilize edilen katalaz örnekleri için optimum pH (7,5) serbest enzimle aynı bulunmuştur. Eupergit C ve Eupergit C 250 L'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin her ikisi de en yüksek aktivitelerini pH 7,0'da göstermişlerdir (Çizelge 4.4). İmmobilizasyondan sonra optimum pH'nın serbest katalazdan 0,5 birim daha

düşük olmasının nedenini desteğin hidrofobik çevresine bağlayabiliriz. Hidrofobik çevre enzimde bulunan aminoasitlerin fonksiyonel gruplarının iyonlaşma sabitlerinin bir miktar değişmesine neden olabilmektedir. Literatürde sığır karaciğeri kaynaklı serbest katalazın optimum pH'sı 7,0-7,5 olarak bildirilmiştir. Ancak farklı desteklere değişik yöntemlerle immobilize edilmiş katalaz için optimum pH'nın 6,0-7,5 aralığında gözlendiği de rapor edilmiştir (Akgöl ve ark., 2001; Tükel ve Alptekin, 2004; Alkan ve ark., 2005; Wang ve ark., 2007; Wan ve ark., 2007; Wang ve ark., 2008; Alptekin ve ark., 2009).

İmmobilize katalaz örneklerinin aktivitelerinin tampon derişimine (25-100 mM) bağlı değişimleri incelendiğinde, bulgularımız tüm immobilize katalaz örneklerinin aktivitelerinin denenen tampon derişimlerinden etkilendiğini göstermektedir. Enzimatik reaksiyonlarda reaksiyon ortamında bulunan iyonlar enzim stabilizasyonunun sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Düşük iyon derişimine sahip tampon çözeltileri enzim stabilizasyonunu sağlamada yetersiz kalırken yüksek tampon derişimi de enzimle substrat etkileşimini azaltacağı için aktivitenin düşmesine neden olabilmektedir.

Serbest katalaz için optimum sıcaklık 25ºC olup, enzimin katalizlediği reaksiyon için aktivasyon enerjisi 14,4 kJ/mol'dür (Tükel ve Alptekin, 2004). Çizelge 4.4'den görüldüğü gibi immobilize katalaz örneklerinin optimum sıcaklıkları 30-40ºC aralığında değişmektedir. İmmobilize katalaz örnekleri için hesaplanan aktivasyon enerjileri serbest katalazınki ile kıyaslandığında, florisile doğrudan, florisile 6-AHA ara kolu üzerinden, Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin aktivasyon enerjileri daha düşük bulunmasının nedeni, literatürde de bildirildiği gibi immobilizasyon sonrasında enzim stabilitesinin artmasından kaynaklanabilir (Rogalski ve ark., 1997). Florisile 5-APA ara kolu, CPG'ye doğrudan, CPG'ye 5-APA ara kolu ve 6-AHA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz örnekleri için ise aktivasyon enerjilerinin serbest katalazınkinden daha büyük bulunmasının nedeni, internal difüzyon sınırlamalarından ve/veya enzimin bağlandıktan sonraki konformasyounundaki esnekliğin azalmasından kaynaklanabilir (Wiseman, 1986; Costa ve ark., 2004).

Çizelge 4.4'den görüldüğü gibi immobilize katalaz örnekleri arasında CPG'ye doğruda immobilize edilen katalaz örnekleri en yüksek V_{max} değerine ($1,9x10^4$ U/mg prot.) sahip olup, bu değer serbest katalazın maksimum aktivitesinin ($1,4x10^5$ U/mg prot.) % 14'ü kadardır. Katalazın CPG'ye 5-APA ve 6-AHA ara kollar üzerinden immobilizasyonu sonucunda immobilize katalazların V_{max} değerleri CPG'ye doğrudan immobilize edilin katalazın V_{max} değerinden daha düşük bulunmuştur. V_{max} değerlerinin azalmasının nedeni, ara kollar üzerinden immobilize edilen katalazın hareketinin doğrudan immobilizasyona göre daha esnek olmasına rağmen destekte yapılan modifikasyonlar sonucunda enzimin gözenek içinde hareket alanının daha kısıtlı olması olabilir. Florisile 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilize edilen katalaz örneklerinin V_{max} değerleri florisile doğrudan immobilize edilen katalazın V_{max} değerinden sırasıyla 12 kat ve 6 kat daha fazladır. Florisilin gözenek büyüklüğü enzimin boyutundan daha küçük olduğu için enzimin daha çok desteğin yüzeyine bağlanması beklenir. Bu durumda ara kol kullanılarak immobilize edilen enzimin daha serbest hareket etmesi ve/veya destekle enzim arasındaki bağlanma sayısının azalması V_{max} değerinin artmasına neden olabilir. Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın V_{max} değeri Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalazdan yaklaşık 3 kat daha fazladır. Bu durum Eupergit C'nin gözenek büyüklüğünün ve tanecik büyüklüğünün Eupergit C 250L'den daha küçük olmasına bağlanabilir. Şekil 1.8 ve Şekil 1.9'dan görüldüğü gibi desteğin gözenek büyüklüğü ve tanecik boyutu azaldıkça immobilize enzimin aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Literatürde çeşitli desteklere kovalent immobilize edilen katalaz için bildirilen V_{max} değerleri serbest katalazın V_{max} değeri ile kıyaslandığında % 0,1-15'i aralığında değişen oranlarda olduğu görülmektedir (Tükel ve Alptekin, 2004; Çetinus ve ark., 2004; Shioji ve ark., 2004; Eberhardt ve ark., 2004; Horst ve ark., 2006; Çetinus ve ark., 2009). Bununla birlikte adsorpsiyon, tutuklama gibi farklı yöntemler kullanılarak katalazın immobilize edildiği çalışmalarda bu oran %10-52 aralığında değişmektedir (Arıca ve ark., 1999; Lida ve ark., 2000; Avila ve ark., 2004; Öztürk ve ark., 2008). 2007 yılında yapılan bir çalışmada Wang ve ark. sığır karaciğer katalazını porfirin halkası içeren poliakrilonitril (PAN)-karbon nanotüpüne kovalent immobilize etmişler, serbest katalaz için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 44,1 mM,

12124,7 U/mg prot., immobilize katalaz için sırasıyla 64,8 mM ve 11097,4 U/mg prot. olarak belirlemişlerdir. İmmobilize katalazın aktivitesinin serbest katalazın aktivitesine oldukça yakın olmasının nedeni, desteğin elektron alıcı/verici olarak rol oynamasından dolayı immobilize katalazlar arasında elektron transferinin kolay olmasıdır. Bir başka deyişle destek katalizlemeye bizzat katkıda bulunmaktadır. Dolayısıyla katalazın desteğe immobilizasyonundan sonra ölçülen aktivite değerleri immobilize katalazın ve desteğin toplam etkisini yansıtmaktadır.

Çizelge 4.4'den görüldüğü gibi, florisil ve CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örneklerinin K_m değerleri serbest katalazın K_m değerinden (28 mM) daha yüksek iken bu desteklere 5-APA ve 6-AHA ara koları üzerinden immobilize edilen katalaz örneklerinin K_m değerlerinde azalma meydana gelmiştir. İmmobilize katalaz örneklerinin V_{max} ve K_m değerlerinden hesaplanan k_{cat}/ K_m değerleri incelendiğinde tüm immobilize katalaz örnekleri arasında CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın katalitik etkinliği ($1,7x10^6$ s^{-1} M^{-1}) en yüksek olup, bu değer serbest katalazın katalitik etkinliğinin ($2,1x10^7$ s^{-1} M^{-1}) yaklaşık % 8'i kadardır. İmmobilize katalaz örneklerinin kinetik parametrelerinin serbest katalazdan farklılık göstermelerinin nedenleri literatürde bildirildiği gibi enzimin üç boyutlu yapısındaki değişimler, sterik etkiler, mikroçevre ve difüzyon (internal ve eksternal) sınırlamaları olabilir (Viseman, 1986; Rogalski ve ark., 1997).

İmmobilize katalaz örnekleri arasında 50ºC'de yarı ömrü en uzun olan florisile doğrudan immobilize edilen katalaz (6,2 saat), ardından CPG'ye immobilize edilen katalaz (5,2 saat) ve Eupergit C'ye immobilize edilen katalaz örnekleri (4,8 saat) gelmektedir. Florisile ve CPG'ye 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilize edilen katalazların 50ºC'deki yarı ömürleri 1 saatten daha kısa bulunmuştur. Bu durum florisile ve CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın desteğe birçok noktadan bağlanması sonucu katalazın daha rijid bir yapı kazanması ve termal kararlılığının artmasıyla açıklanabilir. Murthy ve ark. (1981) sığır karaciğer katalazının 92 tane lizin amino asit artığı içerdiğini, bunun 72 tanesinin de tetramerin yüzeyinde bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu durumda katalazın desteğe birden fazla noktadan bağlanması beklenebilir. Eupergit C ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin 50ºC'deki yarı ömürleri (sırasıyla 4,8 ve 0,7 saat)

arasında büyük farklılık bulunmaktadır. Bunun nedeni, Eupergit C'de bulunan oksiran gruplarının sayısının (144 µmol/m^2) Eupergit C 250L'dekinden (6,1 µmol/m^2) daha fazla olması ve Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın Eupergit C 250L'ye göre desteğe birçok noktadan bağlanması ile açıklanabilir. Enzimlerin kovalent immobilizasyonunda enzimin desteğe birçok noktadan bağlanması enzimin termal kararlılığının artmasına neden olabilmektedir (Ferrira ve ark., 2004).

İmmobilize katalaz örneklerinin 5ºC ve oda sıcaklığında depolama kararlılıkları incelenmiştir. CPG'ye doğrudan, CPG'ye 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden ve Eupergit C'ye immobilize edilen katalaz örnekleri 5ºC'de saklandığında yaklaşık 1 ay sonunda başlangıç aktivitelerinin % 80-90'nını korurken, florisile doğrudan ve Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz örnekleri başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 67 ve % 46'sını göstermektedirler (Şekil 4.54, Şekil 4.72. Şekil 4.84, Şekil 4.102, Şekil 4.14 ve Şekil 4.102). Florisile 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilize edilen katalaz örnekleri ise 8 gün sonunda başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 44 ve % 45'ini göstermektedirler (Şekil 4.28, Şekil 4.40). İmmobilize katalaz örneklerinin 5ºC'deki depolama kararlılığı oda koşullarındaki depolama kararlılığından daha yüksek bulunmuştur. Serbest katalaz 5ºC ve oda sıcaklığında 2 ve 4 gün bekletildiğinde başlangıç aktivitesinin % 50'si kalmaktadır (Tükel ve Alptekin, 2004). Tüm immobilize katalaz örneklerinin depolama kararlılığı serbest katalazın depolama kararlılığından daha yüksektir. Literatürde çeşitli desteklere immobilize edilen katalaz örnekleri için 4ºC'deki yarı ömürlerin 11-70 gün aralığında değiştiği (Legaz ve ark., 1998; Wan ve ark., 2007; Çetinus ve ark., 2007) bildirilmiştir.

İmmobilize katalaz örnekleri için yapılan maliyet hesabında, 1 g immobilize katalaz örneğinin hazırlanmasında en yüksek maliyet (yaklaşık 45€) CPG'ye immobilize edilen katalaz örnekleri için hesaplanmıştır (Çizelge 4.6). Bununla birlikte birim maliyet başına (1 €) elde edilen en yüksek aktivite değeri de (1604 U) CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örnekleri için elde edilmiştir. Florisile 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz örnekleri birim maliyet başına elde edilen ikinci en yüksek aktivite değerine (1160 U) sahiptir. Bu immobilize katalaz örnekleri için en büyük dezavantaj, termal ve depolama kararlılıkların,

sürekli ve kesikli reaktördeki kullanım kararlılıklarının CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örneklerine göre oldukça düşük olmasıdır.

Tüm immobilize katalaz örneklerinin sürekli reaktörde kullanım kararlılıkları incelendiğinde immobilize katalaz miktarı sabit tutulup substrat akış hızı 2,3 ml/dk.'dan 5,6 ml/dk.'ya arttırıldığında immobilize katalazlarının yarı ömürlerinin azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.7). İmmobilize katalaz türlerinin yarı ömürleri kıyaslandığında CPG'ye doğrudan ve 5-APA ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz örneklerinin diğerlerine göre en uzun yarı ömürlere sahip oldukları görülmektedir.

CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın en yüksek V_{max} değerine sahip olması, termal ve depolama kararlılığının yüksek olması nedeniyle bu katalaz örnekleri için aktivite toplamları (verim) hesabı yapılmıştır (Çizelge 4.8). Sabit miktarda immobilize katalaz örneği içeren reaktöre gönderilen substratın akış hızı 2,3 ml/dk.'dan 5,6 ml/dk.'ya arttırıldığında toplam verimin arttığı Çizelge 4.8'den görülmektedir. Bunun nedeni, sürekli reaktör sistemlerinde akış hızı arttıkça eksternal difüzyon sınırlamalarının azalmasına bağlanabilir (Viseman, 1986). Sürekli reaktörde, immobilize katalaz örnekleri başlangıç aktivitelerin %50'sini kaybedinceye kadar geçen süre içinde en yüksek verim ($19,1x10^5$ U/mg prot.), reaktöre yüklenen immobilize katalaz miktarının 40 mg ve substrat akış hızının 5,6 ml/dk. olduğu koşullarda elde edilmiştir.

Kesikli reaktöre CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazdan 10, 20 ve 40 mg'lık örnekler yüklendiğinde bu örneklerin başlangıçtaki aktivitelerinin % 50'si kalıncaya kadarki tekrar kullanım sayıları sırasıyla 44, 72 ve 180 olup bu değerler diğer tüm immobilize katalaz örneklerinden oldukça yüksektir (Çizelge 4.9). Kesikli tip reaktörde en yüksek verim ($1,7x10^5$ U/mg prot.) 40 mg immobilize katalaz örneği kullanıldığında elde edilmiştir. Bu değer serbest katalaz için elde edilecek maksimum aktivite ($1,4x10^5$ U/mg prot.) değerinden yaklaşık 1,2 kat daha fazladır. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örnekleri için sürekli reaktörde elde edilen en yüksek verim kesikli reaktörde elde edilen verimden 11 kat daha fazladır (Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.10). Bunun nedeni eksternal difüzyon sınırlamalarının kesikli reaktör sisteminde daha fazla olması olabilir. Bulgularımıza göre CPG'ye doğrudan

immobilize edilen katalaz örneklerinin aktivitesinin % 50'sinin kaldığı tekrar kullanım sayısı, çeşitli yöntemlerle çeşitli desteklere immobilize edilen katalaz için literatürde bildirilen tekrar kullanım sayıları ile kıyaslandığında oldukça yüksektir. Literatürde Opwis ve ark. (2005) dialilftalat (DAP) kullanılarak poliamid (PA) 6.6'ya katalazı immobilize etmişlerdir. Serbest katalazın aktivitesinin 2,40 mmol/mg prot. dk., immobilize edilen katalazın 20 kullanımdan sonra aktivitesinin 0,42 mmol/mg prot. dk. (serbest katalazın %18'i kadar) olduğununu bildirmişlerdir. 20 kullanım boyunca immobilize katalazın bağıl aktivitesinin değişmediğini kabul ederek immobilize katalazın serbest katalaza göre bağıl aktivitesini kullanım sayısı ile çarparak integral aktivite hesaplamışlardır. Bu hesaplama sonucunda PA 6.6'ya immobilize edilen katalazın integral aktivitesinin serbest katalazın aktivitesinin 4,6 katı olduğunu bildirmişlerdir. Literatürde, pHEMA membrana immobilize edilen katalazın 12 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %58'inin kaldığı (Akgöl ve ark.,2001), silika kürelere adsorpsiyon ve enkapsülasyon yöntemleri ile immobilize edilen katalazlarının 25 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 45 ve % 70'inin kaldığı (Wang ve Caruso, 2005), porfirin halkası içeren poliakrilonitril (PAN)-karbon nanotüpüne kovalent olarak immobilize edilen katalazın10 kullanım sonra başlangıç aktivitesinin % 40'nın kaldığı (Wan ve ark., 2007), bentonite immobilize edilen katalazın 12 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 50'sinin kaldığı (Öztürk ve ark., 2008), kitosana immobilize edilen katalazın 7 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %50'nin kaldığı (Çetinus ve ark., 2009) bildirilmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. İmmobilizasyon çalışmasında kullanılan desteklerden NPG, gözenek büyüklüğü 215, 100 ve 70 nm olan CPG'ler ve florisil için yüzey alanları sırasıyla 0,04, 7,4, 21,8, 39,4 ve 235 m^2/g olup; bu desteklerde yapılan silanlama işleminden sonra yüzeyde bulunan $–NH_2$ grubu sırasıyla 0,04, 2,9, 10,8, 33,5 ve 270 µmol/g destek olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar silanlama sonrası desteğe bağlanan $–NH_2$ grubunun miktarının desteğin yüzey alanı bağlı olduğunu göstermektedir.

2. Katalazın florisile doğrudan immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon pH'sı, tampon derişimi, katalaz derişimi, sıcaklık ve immobilizasyon süresi sırasıyla 7,5, 25 mM, 1,0 mg/ml, 15ºC ve 1 saat olarak belirlenmiştir.

3. Katalazın florisile 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kolları üzerinden immobilizasyonunda, en yüksek bağlanma sırasıyla pH 7,0 ve pH 6,5'de gerçekleşmiş olup, bağlanan miktar 1,4 BDDGE ara kolu varlığında 3,4 mg prot./ g destek iken PEGDGE ara kolu varlığında 1,8 mg prot./g destek olarak saptanmıştır, ancak bu immobilize katalaz örneklerinde herhangi bir katalaz aktivitesi bulunamamıştır.

4. Katalazın florisile 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilizasyonunda her ikisi için de en uygun immobilizasyon pH'sı, tampon derişimi, katalaz derişimi, sıcaklık ve immobilizasyon süresi sırasıyla 5,5, 50 mM, 0,25 mg/ml, 25 ºC ve 2 saat olarak belirlenmiştir.

5. Katalazın NPG'ye immobilizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda silanlama işleminden sonra bir gram desteğin içerdiği amino grubunun miktarının (0,042 µmol) florisil ve CPG ile kıyaslandığında son derece az olduğu bulunmuş ve NPG'ye katalaz etkin bir şekilde immobilize edilememiştir.

6. Katalazın CPG'ye doğrudan immobilizasyonunda farklı gözenek büyüklüklerine sahip (70, 100 ve 215 nm) CPG'ler kullanılmıştır. En yüksek spesifik aktivite (141,25±5,96 U/mg prot.) gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG destek için saptanmıştır. Bu nedenle katalazın CPG'ye doğrudan ve ara kollar üzerinden

yapılan immobilizasyon çalışmalarında gözenek büyüklüğü 70 nm olan CPG kullanılmıştır.

7. Katalazın CPG'ye doğrudan immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon pH'sı, tampon derişimi, katalaz derişimi, sıcaklık ve immobilizasyon süresi sırasıyla 6,0, 75 mM, 0,75 mg/ml, 5ºC ve 7 saat olarak belirlenmiştir.

8. Katalazın CPG'ye immobilizasyonunda 1,4 BDDGE ve PEGDGE ara kollarının kullanılması ile enzim aktivitesindeki değişimler incelenmiştir. Bu ara kollar kullanılarak yapılan immobilizasyon çalışmasında desteğe bağlanan katalazın aktivitesinin CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalazın aktivitesinin yaklaşık % 10'u kadar olduğu saptanmıştır.

9. Katalazın CPG'ye 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilizasyonunda her ikisi için de en uygun immobilizasyon pH'sı, tampon derişimi, sıcaklık, immobilizasyon süresi ve katalaz derişimi sırasıyla 5,5, 25 mM, 0,75 mg/ml, 25ºC ve 2 saat olarak belirlenmiştir.

10. Katalazın Eupergit C ve Eupergit C 250 L'ye immobilizasyonunda her ikisi için de en uygun immobilizasyon koşullarının aynı olduğu bulunmuş ve immobilizasyon pH'sı, tampon derişimi, katalaz derişimi, sıcaklık ve immobilizasyon süresi sırasıyla 7,5, 1,0 M, 0,44 mg/ml, 25ºC ve 24 saat olarak belirlenmiştir.

11. İmmobilize katalaz örneklerinin maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklıklar incelendiğinde en düşük sıcaklık 30ºC iken en yüksek sıcaklık 40ºC olarak saptanmıştır. Serbest katalaz için optimum sıcaklık değeri 25ºC olup, immobilizasyon işlemi katalazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığının artmasına neden olmuştur.

12. Tüm immobilize katalaz örneklerinin V_{max} değerleri birbirleriyle kıyaslandığında, CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örneğinin en yüksek V_{max} değerine ($1{,}9 \times 10^4$ U/mg prot.) sahip olduğu saptanmıştır. Bu değer serbest katalazın V_{max} değerinin % 14'ü kadardır.

13. Katalazın florisile ve CPG'ye 5-APA ve 6-AHA ara kolları üzerinden immobilizasyonu sonucunda immobilize katalaz örneklerinin K_m değerleri bu

desteklere doğrudan immobilize edilen katalaz örneklerinden daha düşük bulunmuştur.

14. Tüm immobilize katalaz örneklerinin 50 ºC'deki termal kararlılıkları yarı ömür olarak kıyaslandığında en yüksek yarı ömürlere sahip olan ilk 3 immobilize katalaz, florisile doğrudan, CPG'ye doğrudan ve Eupergit C'ye immobilize edilen katalaz örnekleri olup, bunların yarı ömürleri sırasıyla 6,2, 5,2 ve 4,8 saat olarak belirlenmiştir.

15. Tüm immobilize katalaz örneklerinin 5ºC ve oda sıcaklığındaki depolama kararlılıkları serbest katalazdan daha yüksek olduğu bulunmuştur. İmmobilize katalaz örneklerinin 5ºC'deki depolama kararlılıkları birbirleriyle kıyaslandığında en yüksek kararlılığı CPG'ye doğrudan, CPG'ye 5-APA ara kolu üzerinden, CPG'ye 6-AHA ara kolu üzerinden ve Eupergit C'ye immobilize edilen katalaz örnekleri göstermiş olup, bu örnekler 1 ay depolanma süresi sonunda başlangıç aktivitelerinin % 80-90'nını korumuşlardır.

16. İmmobilize katalaz örnekleri birim maliyet başına elde edilen aktivite açısından kıyaslandıklarında CPG'ye doğrudan immobilize katalaz en yüksek değere (1604 U/€) sahiptir.

17. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örneklerinin başlangıç aktivitelerinin % 50'si kalıncaya kadar ki koşullar için sürekli reaktördeki en yüksek aktivite toplamının ($69,7x10^5$ U/g immobilize katalaz) kesikli reaktördeki en yüksek aktivite toplamından ($6,2x10^5$ U/g immobilize katalaz) 11 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu durumda CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örneklerinin sürekli reaktörde kullanımı daha uygun görülmektedir.

5.2. Öneriler

1. CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örneklerinin aktivitelerinin, termal ve depolama kararlılıklarının ve sürekli reaktör sistemlerinde verimliliğinin yüksek olması nedenleri ile CPG'ye doğrudan immobilize edilen katalaz örnekleri, tekstil sanayinde pamuklu kumaşın, kağıt sanayinde kağıdın ağartılması

amacıyla kullanılan H_2O_2 içeren yıkama sularının, H_2O_2 içeren atık sularının hidrojen peroksitsizleştirilmesi için kolayca kullanılabilir, özellikle H_2O_2 içeren homojen sıvılar için sürekli reaktörde kullanımı son derece uygundur. İmmobilize katalazın bu şekilde kullanımı serbest katalaza göre daha fazla ekonomik katkı sağlayabilecektir.

2. Eupergit C, CPG'ye göre daha ucuz bir destek olup, immobilizasyon öncesinde destekte bir takım modifikasyonlar yapmaya gerek yoktur. Bu nedenle Eupergit C denenen destekler arasında katalazın immobilizasyonunda CPG'den sonra tercih edilebilinecek bir destektir. Özellikle Eupergit C'ye immobilize edilen katalazın optimum sıcaklığının 40ºC olması nedeniyle, H_2O_2'in aşırısının giderileceği işlemlerde ortam sıcaklığının 40ºC olduğu durumlarda Eupergit C'ye immobilize edilen katalaz örnekleri kullanım alanı bulabilirler. Eupergit C 250L'nin partikül büyüklüğü CPG'den daha büyük olduğu için reaksiyon ortamından süzme işlemi ile daha kolay ayrılabilirler bu durumda Eupergit C 250L'ye immobilize edilen katalaz örnekleri çeşitli reaktör sistemlerinde rahatlıkla uygulama alanı bulabilirler.

3. Farklı boyutlarda çeşitli reaktör tankları (örneğin çöktürerek geri kazanımlı karıştırılmalı reaktör tankı veya ultrafiltrasyonla geri kazanımlı reaktör tankı) tasarlanarak, CPG'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin sürekli reaktör sistemlerinde kullanımı araştırılabilir.

4. Katalazın florisile, CPG'ye ve Eupergit desteklere daha ileri immobilizasyon çalışmalarında immobilizasyon ortamına inert bir protein veya amino asitin eklenmesiyle katalazın desteğe birden fazla bölgeden bağlanma olasılığı azaltılarak immobilize katalazın katalitik etkinliğindeki değişimler araştırılabilir. Katalazın florisil ve CPG'ye ara kollar üzerinden immobilizasyonunda sığır serum albumini gibi inert bir protein ara kol olarak kullanılarak immobilize katalazın katalitik özellikleri ve kararlılıkları araştırılabilir.

KAYNAKLAR

AKERTEK, E., TARHAN, L., 1995. Characterization of Immobilized Catalases and Their Application in Pasteurization of Milk with H_2O_2, Applied Biochemistry and Biotechnology 50:291-303.

AKGÖL, S., KAÇAR, Y., ÖZKARA, S., YAVUZ, H., DENİZLİ, A., ARICA, M.Y., 2001. Immobilization of Catalase via Adsorption onto L-Histidine Grafted Functional pHEMA Based Membrane, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 15:197-206.

AKGÖL, S., DİNÇKAYA, E., 1999. A Novel Biosensor for Specific Determination of Hydrogen Peroxide: Catalase Enzyme Electrode Based on Dissolved Oxygen Probe. Talanta, 48:363-367.

ALKAN, S., CEYLAN, H., ARSLAN, O., 2005. Bentonite-support Catalase. Journal of Serbian Chemical Society, 70(5):721-726.

ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S.S., YILDIRIM, D., 2008. Immobilization and Characterization of Bovine Liver Catalase on Eggshell, Journal of the Serbian Chemical Society, *73* (6) 609–618.

ARICA, M.Y., ÖKTEM, H.A., ÖKTEM, Z., TUNCEL, S.A., 1999. Immobilization of Catalase in Poly(isopropylacrylamide-co-hydroxyethylmethacrylate) Thermally Reversible Hydrogels. Polymer International, 48:879-884.

ARICA, M.Y., BAYRAMOĞLU, G., BIÇAK, N., 2004. Characterisation of Tyrosinase Immobilised onto Spacer-arm Attached Glycidyl Methacrylate-based Reactive Microbeads. Process Biochemistry, 39:2007–2017.

AVILA, L.E.V., ZAMUDIO, E.M., CAMACHO, P.M.G., 2004. Activity and Reusability of Sol-Gel Encapsulated α-Amylase and Catalase. Performance in Flow-Through Systems. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 30:197–204.

AZEVEDO, A.M., CABRAL, J.M.S., GIBSON, T.D., FONSECA, L.P., 2004. Operation and Performance of Analytical Packed-Bed Reactors with an

Immobilised Alcohol Oxidase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 28:45–53.

BAYRAMOĞLU, G., ALTINOK, H., BULUT, A., DENİZLİ, A., 2003. Preparation and Application of Spacer-arm-attached Poly(hydroxyethyl methacrylate-*co*-glycidyl methacrylate) Films for Urease Immobilisation. Reactive & Functional Polymers 56:111–121.

BERGMEYER, H.U., 1974. In Methods of Enzymatic Analysis, (H.U. Bergmeyer editor). Academic Press, New York-London, 2n ed. Vol 1, pp. 438.

BETANCOR, L., HIDALGO, A., LORENTE, G.F., MATEO, C., LAFUENTE,R.F., GUISAN, J.M., 2003. Preparation of a Stable Biocatalyst of Bovine Liver Catalase Using Immobilization and Postimmobilization Techniques. Biotechnology Progress, 19:763-767.

BIO030E, 2008. Enzyme for Industrial Applications. Focus on Catalysts, 2008(4):2.

BIRCAKOVA, M., TRUKSA, M., SCOUTEN, W.H., 1996. Oriented Immobilization of Restriction Endonuclease EcoRI. Journal of Molecular Recognition, 9:683-690.

BORATYNSKI, J., ZAL, T., 1990. Colorimetric Micromethods for Glutaraldehyde Determination by Means Phenol and Sulfuric Acid or Perchloric Acid. Analytic Biochemistry. 184:259-62.

CABANA, H., ALEXANDRE, C., AGATHOS, S.N., JONES, J.P., 2009. Immobilization of Laccase from the White Rot Fungus Coriolopsis Polyzona and Use of the Immobilized Biocatalyst for the Continuous Elimination of Endocrine Disrupting Chemicals. Bioresource Technology, 100:3447–3458.

CAO, L., 2005. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p:174.

CHATERJEE, U., KUMAR, A., SANWAL, G.G., 1990. Goat Liver Catalase Immobilization on Various Solid Supports. Journal of Fermentation and Bioengineering, 70:429-430.

CHATTERJEE U, SANWAL GG. 1993. Purification and characterization of catalase from goat (Capra capra) lung. Molecular and Cellular Biochemistry, 126(2):125-33.

CHEN, H., MOUSTY, C., CHEN, L., COSNIER, S., 2008. A New Approach for Nitrite Determination Based on a HRP/Catalase Biosensor. Materials Science and Engineering C, 28:726–730.

CHO, S.W., RHEE, J.S., 1993. Immobilization of Lipase for Effective Interestification of Fats and Oils in Organic Solvents. Biotechnology and Bioengineering, 41:204-210.

CHOI, M.M.F., YIU, T.P., 2004. Immobilization of Beef Liver Catalase on Eggshell Membrane for Fabrication of Hydrogen Peroxide Biosensor, Enzyme and Microbial Technology. 34(1): 41-47.

CLAIBORNE, A., FRIDOVICH, I., 1979. Purification of the o-Dianisidine Peroxidase from *Escherichia coli* B. Physicochemical Characterization and Analysis of Its Dual Catalatic and Peroxidatic Activities. Journal of Biological Chemistry, 254(10):4245-52.

COSTA, S.A., TZANOV, T., CARNEİRO, F., GÜBİTZ, G.M., PAULU, A.C., 2002. Recycling of Textile Bleaching Effluents for Dyeing Using Immobilized Catalase. Biotechnology Letters, 24:173-176.

COSTA, S.A., TZANOV, T., PAAR, A., GUDELJ, M., GÜBITZ, G.M., PAULO, A.C., 2001. Immobilization of *Bacillus SF* on Alumina for the Treatment of Textile Bleaching Effluents. Enzyme and Microbial Technology, 28:815-819.

CUI, Y., BARFORD, J.P., RENNEBERG, R., 2006. A Disposable, Screen-Printed Electrode for the Amperometric Determination of Azide Based on the Immobilization with Catalase or Tyrosinase. Analytical Sciences, 22:1279-1281.

ÇETİNUS, Ş.A., ÖZTOP, H.N., 2003. Immobilization of Catalase into Chemically Crosslinked Chitosan Beads. Enzyme and Microbial Technology, 32:889-894.

ÇETİNUS, Ş.A., ÖZTOP, H.N., SARAYDIN, D., 2007. Immobilization of Catalase onto Chitosan and Cibacron Blue F3GA Attached Chitosan Beads. Enzyme and Microbial Technology, 41:447-454.

ÇETİNUS, Ş.A., ŞAHİN, E., SARAYDIN, D., 2009. Preparation of Cu(II) Adsorbed Chitosan Beads for Catalase Immobilization, Food Chemistry, 114:962-969.

D'ANNIBALE, A., STAZI, S.R., VINCIGUERRA, V., SERMANNI, .G., 2000. Oxirane-Immobilized Lentinula Edodes Laccase:Stability and Phenolics Removel Efficiency in Olive Mill Wastewater. Journal of Biotechnology, 77:265-273.

DENİZLİ, A., ARICA, M.Y., YAVUZ, H., 2000. Monosize and Non-porous p(HEMA-co-MMA) Microparticles Designed as Dye- and Metal-Chelate Affinity Sorbents, Colloids and Surfaces A:Physicochemical and Engineering Aspect. 174:307-317.

EBERHARDT, A.M., PEDRONI, V., VOLPE, M., FERREIRA, M.L., 2004. Immobilization of Catalase from *Aspergillus niger* on Inorganic and Biopolymeric Support for H_2O_2 Decomposition. Applied Catalysis B: Environmental, 47:153-163.

EL-ZAHAB, B., JIA, H., WANG, P., 2004. Enabling Multienzyme Biocatalysis Using Nanoporous Materials. Biotechnology and Bioengineering, 87(29):178-183.

ERTAŞ, N., TİMUR, S., AKYILMAZ, E., DİNÇKAYA, E., 2004. Specific Determination of Hydrogen Peroxide with a Catalase Biosensor Based on Mercury Thin Film Electrodes. Turkish Journal of Chemistry, 24:95-99.

ETTALIBI, M., BARRATTI, J.C., 2001. Sucrose Hydrolysis by Thermostable Immobilized Inulinases from *Aspergillus ficuum*. Enzyme and Microbial Technology, 28:596-602.

GAO, X., YANG, W., PANG, P., LIAO, S., CAI, Q;., ZENG, K., GRIMES, C.A., 2007. A Wireless Magnetoelastic Biosensor for Rapid Detection of Glucose Concentrations in Urine Samples. Sensors and Actuators B, 128:161–167.

GODJEVARGOVA, T., DAYAL, R., MARINOV, I., 2004. Simultaneous Covalent Immobilization of Glucose Oxidase and Catalase onto Chemically

Modified Acrylonitrile Copolymer Membranes. Journal of Applied Polymer Science, 91:4057-4063.

GOMEZ, J.L., B´ODALO, A., G´OMEZ, E., BASTIDA, J., HIDALGO, A.M., G´OMEZ, M., 2006. Immobilization of Peroxidases on Glass Beads: An Improved Alternative for Phenol Removal. Enzyme and Microbial Technology, 39:1016–1022.

GOVARDHAN, C.P., 1999. Crosslinking of Enzymes for Improved Stability and Performance. Current Opinion in Biotechnology, l0:331-335.

HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., SMITH, P.K., 1992. Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, London. p: 283-284.

HORST, F., RUEDA, E.H., FERREIRA, A.M.L., 2006. Activity of Magnetite-Immobilized Catalase in Hydrogen Peroxide Decomposition. Enzyme and Microbial Technology, 38:1005–1012.

HOSSAIN, M., DO, D.D., 1988. Determination of Intrinsic Parameters for Immobilization Reaction of Catalase and Amylglucosidase in Porous Glass Supports. Biotechnology and Bioengineering, 35(13):646-649.

ITOH, T., ISHII, R., MATSUURA, S.I., HAMAKAWA, S., HANAOKA, T., TSUNODA, T., MIZUGUCHI, J., MIZUKAMI, F., 2009. Catalase Encapsulated in Mesoporous Silica and Its Performance. Biochemical Engineering Journal, 44:167-173.

JIANG, B., ZHANG, Y., 1993. Immobilization of Catalase on Crosslinked Polymeric Hydrogels-Effect of Anion on the Activity of Immobilized Enzyme, The European Polymer Journal, 29(9):1251-1254.

JIANG, H.J., YANG, H., AKİNS, D.L., 2008. Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Catalase Immobilized on a SWNT-nanocomposite Film. Journal of Electroanalytical Chemistry, 623:181–186.

KAHRAMAN, M.V., BAYRAMOĞLU, G., APOHAN, N.K., GÜNGÖR, A., 2007. α-Amylase Immobilization on Functionalized Glass Beads by Covalent Attachment. Food Chemistry, 104:1385–1392.

KARAKUŞ, E., PEKYARDIMCI, Ş., 2009. Immobilization of Apricot Pectinesterase (*Prunus Armeniaca L.*) on Porous Glass Beads and Its Characterization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 56(1):13-19.

KATZIR, E.K., KRAEMER, D.M., 2000. Eupergit C, A Carrier for Immobilization of Enzymes of Industrial Potential. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 10:157–176.

KLIBANOV, A.M., 1983. Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. Science, 219:722-727.

KRAMER, L., VE STECKHAN, E., 1997. Coimmobilization of L-α-glycerophosphate Oxidase with Catalase and Its Application for the Synthesis of Dihydroxyacetone Phosphate, Tetrahedron, 53(43):14645-14650.

KUBAL, B.S., D'SOUZA, D., 2004. Immobilization of Catalase by Entrapment of Permeabilized Yeast Cells in Hen Egg White Using Glutaraldehyde. Journal of Biochemistry Biophysic Methods, 59:61-64.

LAFUENTE, R.F., RODRIGUEZ, V., GUISAN, J.M., 1998. The Coimmobilization Of D-Amino Acid Oxidase And Catalase Enables the Quantitative Transformation of D-Amino Acids (D-Phenylalaline) into α-Keto Acids (Phenylpyruvic Acid). Enzyme and Microbial Technology, 23:28-33.

LARTILLOT, S., KADZIORA, P., ATHIOS, A., 1988. Purification and Characterization of New Fungal Catalase. Preparative Biochemistry, 8(3):241-246.

LEE, P., SWAISGOOD, H.E., 1997. Characterization of a Chemically Conjugated Lipase Bioreactor. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45:3350-3356.

LIANG, J.F., LI, Y.T., YANG, V.C., 2000. Biomedical Application of Immobilized Enzymes. Journal of Pharmaceutical Sciences, 89:979-990.

LIDA, T., MARUYAMA, D., FUKUNAGA, K., 2000. Stabilization of Entrapped Catalase Using Photo Crosslinked Resin Gel for Use in Wastewater Containing Hydrogen Peroxide. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 75:1026-1030.

LIMBUT, W.,THAVARUNGKUL, P., KANATHARANA, P., ASAWATRERATANAKUL, P., LİMSAKUL, C., WONGKİTTİSUKSA,

B., 2004. Comparative Study of Controlled Pore Glass, Silica Gel and Poraver® for the Immobilization of Urease to Determine Urea in a Flow Injection Conductimetric Biosensor System. Biosensors and Bioelectronics, 19:813–821.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RONDALL, R.J, 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 261-275.

MAOI A.D., AL-MASRY, M.M., PORTACCIO, M., DIANO, N., MARTINO S.D., MATTEI, A., BENCIVENGA, U., MITA, D.G., 2003. Influence of the Spacer Length on the Activity of Enzymes Immobilised on Nylon/polyGMA Membranes Part 1. Isothermal Conditions. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 21:239–252

MANTA, C., FERRAZ, N., BETANCOR, L., ANTUNES, G., BATISTA-VIERA, F., CARLSSON, J., CALDWELL, K., 2003. Polyethylene Glycol as a Spacer for Solid-phase Enzyme Immobilization. Enzyme and Microbial Technology, 33: 890–898.

MARTIN, M.T., PLOU, J., ALCALDE, M., BALLESTEROS, A., 2003. Immobilization on Eupergit C of Cyclodextrin Glucosyltransferase (CGTase) and Properties of the Immobilized Biocatalyst. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 21:299-308.

MATEO, C., ABAIN, O., LAFUENTE, R.F., GUISAN, J.M., 2000. Increase in Conformational Stability of Enzymes Immobilized on Epoxy-activated Supports by Favoring Additional Multipoint Covalent Attachment. Enzyme and Microbial Technology, 26:509-515.

MATEO, C., TORRES, R., FERNANDEZ-LORENTE, G., ORTIZ, C., FUENTES, M., HIDALGO, A., LOPEZ-GALLEGO, F., ABIAN, O., PALOMO, J.M., BETANCOR, L., PESSELA, B.C.C., GUISAN, J.M., FERNANDEZ-LAFUENTA, R., 2003. Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. Biomacromolecules, 4:772-77.

MATSUDA, S., HIROO, I., SE, N., IKADA, Y., 1999. Bioadhesion of Gelatin Films Crosslinked with Glutaraldehyde. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 45(1):20-27.

MODRZEJEWSKA, B., GUWY, A.J., DINSDALE, R., HAWKES, D.L., 2007. Measurement of Hydrogen Peroxide in an Advanced Oxidation Process Using an Automated Biosensor. Water Research, 41:260 – 268.

MURTY, M.R., REID, T.J., SICIGNANO, A., TANAKA, N,. ROSSMANN, M.G., 1981. Structure of Beef Liver Catalase. Journal of Molecular Biology, 152 :465-499.

NAKA K, IWAKI K, KITANO N, OHKI A, MAEDA S 1996. Adsorption of Enzymes at Silica-Gel with Amphiphilic Block Copolymers, Polymer Journal 28(10) 911-915

NAM, S.H., WALSH, M.K., 2005. Covalent Immobilization of Bovine Phospholipase A_2. Journal of Food Biochemistry, 29:1-12.

NOUIMI, M., MOSCHELL, K., BISSWANGER, H., 2001. Immobilization of Trypsin on Polyester Fleece via Different Spacers. Enzyme and Microbial Technology, 29:567–574.

NOVIC, S.J., ROZZEL, J.D., BARREDO, J.L. (Ed.), Methods in Biotechnology vol 17: Microbial Enzymes and Biotransformations, Humana Press, Totowa, 2005, pp. 256-257.

O'BRIEN, K.B., KILLORAN, S.J., O'NEILL, R.D., LOWRYA, J.P., 2007. Development and Characterization *in vitro* of a Catalase-based Biosensor for Hydrogen Peroxide Monitoring. Biosensors and Bioelectronics 22:2994–3000.

OGURA, Y., YAMAZAKI, I., 1983. Steady-State Kinetics of the Catalase Reaction in the Presence of Cyanide. Journal of Biochemistry, 1983, Vol. 94, No. 2 403-408

OPWIS, K., KNITEL, D., SCHOLLMEYER, E., 2005. Photochemical Enzyme Immobilization on Textile Carrier Materials. Engineering Life of Science, 5(1):63-67.

OPWIS, K., KNITEL, D., SCHOLLMEYER, E., 2007. Functionalization of Catalase for a Photochemical Immobilization on Poly(ethylene terephthalate). Biotechnology Journal, 2(3):347 – 352.

ÖNAL, S., TELEFONCU, A., 2003. Comparison of Chitin and Amberlite IRA-938 for a-Galactosidase Immobilization. Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology, 31(1):19–33.

ÖZTÜRK, N., TABAK, A., AKGÖL, S., DENİZLİ, A., 2008. Reversible Immobilization of Catalase by Using a Novel Bentonite-Cystein (Bent-Cys) Microcomposite Affinity Sorbents. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 322:148-154.

ÖZYILMAZ, G., TÜKEL, S.S., ALPTEKİN, Ö., 2005. Activity and Storage Stability of Immobilized Glucose Oxidase onto Magnesium Silicate. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**,** 35(4-6):154-160.

PAAR, A., COSTA, S., TZANOV, T., GUDELJ, M., ROBRA, K.H., CAVACO-PAULO, A., GUBITZ, G.M., 2002. Thermo-alkali-Stable Catalases from Newly Isolated *Bacillus sp*. for the Treatment and Recycling of Textile Bleaching Effluents. Journal of Biotechnology, 89:147-153.

PENZOL, G., ARMISE'N, P., FERNANDEZ-LAFUENTE R., RODE'S L., GUISA'N, J.M., 1998. Use of Dextrans as Long and Hydrophilic Spacer Arms to Improve the Performance of Immobilized Proteins Acting on Macromolecules. Biotechnology and Bioengineering, 60(4):518-523.

POTAPOVICH, M.V., ERYOMIN A.N., ARTZUKEVICH, I.M., CHERNIKEVICH, I.P., METELITZA, D.I., 2001. Isolation, Purification, and Characterization of Catalase from the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris.* Biochemistry (Mosc),66(6):646-57.

PRAKASH, P.A., YOGESWARAN, U., CHEN, S.M., 2009. Direct Electrochemistry of Catalase at Multiwalled Carbon Nanotubes-nafion in Presence of Needle Shaped DDAB for H_2O_2 Sensor. Talanta, 15:1414-1421.

RAMANATHAN, K., JÖNSSON, B.R., DANIELSSON, B., 2001. Sol–gel Based Thermal Biosensor for Glucose. Analytica Chimica Acta. 427:1–10.

REGEN, S.L., SINGH, M., SAMEUL, N.K., 1984. Functionalized Polymeric Liposomes, Efficient Immobilisation of α-Chymotrypsin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 119:646–651.

ROGALSKI, J., SZCZODRAK, J., PLESZCZYNSKA, M., FIEDUREK, J., 1997. Immobilisation and Kinetics of *Penicillium notatum* Dextranase on Controlled Porous Glass. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 3:271-283.

SALİMİ, A., NOORBAKHSH, A., GHADERMARZ, M., 2005. Direct Electrochemistry and Electrocatalytic Activity of Catalase Incorporated onto Multiwall Carbon Nanotubes-Modified Glassy Carbon Electrode. Analytical Biochemistry 344: 16–24.

SANTONI, T., SANTIANNI, D., MANZONI, A., ZANARDI, S., MASCINI, M., 1997. Enzyme Electrode for Glucose Determination in Whole Blood. Talanta, 44:1573-1580.

SASAKI, S., ARAI Y., 2004. Oscillatory Reaction Using Immobilized Catalase. Analytical Sciences, 20:895-898.

SCHOEVAART, R., WOLBERS, M.W., GOLUBOVIC, M., OTTENS, M., KIEBOOM, A.P.G., RANTWIJK, F.V., VAN DER WIELEN, L.A.M., SHELDON, R.A., 2004. Preparation, Optimization, and Structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). Biotechnology and Bioengineering, 6(20):754-762.

SEGURA, A.G., ALCALDE, M., YATES, M., CERVANTES, M.L.R., CORTES, N.L, BALLESTEROS, A., PLOU, F.J., 2004. Immobilization of Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C Supports, Biotechnology Proggress, 20:1414-1420.

SEIP.E., FAGER, S.K., GAVAGAN, J.E, ANTON, D.L., COSİMO, R.D., 1994. Glyoxylic Acid Production Using Immobilized Glycolate Oxidase and Catalase. Bioorganic&Medicine Chemistry, 2(6):371-378.

SEO, H., ITOYAMA, K., MORIMOTO, K., TAKAGISHI, T., OKA, M., HAYASHI, T., 1998. Spacer Effects on Enzymatic Activity of Bromelain

Immobilized onto Porous Chitosan Beads. Europan Polymer Journal, 34(7):917-922.

SEZGİNTÜRK, M.K., GÖKTUĞ, S., DİNÇKAYA, E., 2005. A Biosensor Based on Catalase for Determination of Highly Toxic Chemical Azide in Fruit Juices, Biosensors and Bioelectronics, 21:684–688.

SHAH, S., SHARMA, A, GUPTA, M.N.,2006. Preparation of Cross-linked Enzyme Aggregates by Using Bovine Serum Albumin as a Proteic Feeder. Analytical Biochemistry, 351:207–213.

SHELDON, R.A., SCHOEVAART, R., VAN LANGEN, L.M., 2005. Cross-linked Enzyme Aggregates (CLEAs): A Novel and Versatile Method for Enzyme Immobilization A Review. Biocatalysis and Biotransformation, 23(3/4):141-147.

SHIOJI, S., HANADA, M., HAYASHI, Y., TOKAMI, K., YAMAMOTO, H., 2003. Continuous Surface Modification of Silica Particles for Enzyme Immobilization. Advanced Powder Technology, 14(2):231– 245.

SPERINDE, J.J., GRIFFITH, L.G., 1997. Synthesis and Characterization of Enzymatically-crosslinked Poly(ethylene glycol) Hydrogels. Macromolecules, 30:5255–5264

SOLAS M.T, VICENTE C, XAVIES L, LEGAZ M.E, 1994. Ionic Adsorption of Catalase on Bioskin: Kinetic and Ultrastructural Studies, Journal of Biotechnology 33 63-70.

STREITENBERGER, S.A., VILLAVERDE, M.J., SÁNCHEZ-FERRER, A., GARCIA-CARMONA, F., 2002. Microencapsulation of Aerococcus viridans with Catalase and its Application for the Synthesis of Dihydroxyacetone Phosphate. Applied Microbiology and Biotechnology, 58:73–76.

SUKYAI, P., REZI, T., LORENZ, C., MUEANGTOOM, K., LORENZ, W., HALTRICH, D., LUDWIG, R., 2008. Comparing Soluble and Co-immobilized Catalysts for 2-ketoaldose Production by Pyranose 2-oxidase and Auxiliary Enzymes. Journal of Biotechnology, 135:281–290.

SUNDBERG, L., PORATH, J., 1974. Preparation of Adsorbents for Biospecific Affinity Chromatography I. Attachment of Group-Containing Ligands to Insoluble Polymers by Means of Bifunctional Oxiranes. Journal of Chromatography, 90:87-98.

TARHAN, L., 1995. Use of Immobilised Catalase to Remove H_2O_2 Used in the Sterilisation of Milk, Process Biochemistry, 30(7):623-628.

TAI, N.M., GREENFIELD, P.F., 1982. Determination of the Inherent Deactivation Characteristics for the Parallel Poisoning of Immobilized Catalase. Biotechnology and Bioengineering, XXIII:805-822.

TAYLOR, R., FOURNIER, S.M., SIMONS, B.L., KAPLAN, H., HEFFORD, M.A., 2005. Covalent Protein Immobilization on Glass Surfaces:Application to Alkaline Phosphatase. Journal of Biotechnology, 118:265–269.

TRAHER, A.D., KITTRELL, J.R., 1974. Immobilization of Catalase on Nickel-Silica Alumina. Biotechnology and Bioengineering, XVI:413-417.

TÜKEL, S.S., ALPTEKİN, Ö., 2004. Immobilization and Kinetics of Catalase onto Magnesium Silicate, Process Biochemistry, 39(12): 2149-2155.

TWYMAN, R.M., 2005, Immobilized Enzymes. Encyclopedia of Analytical Science 523-529.

UHLIG, H., 1998. Industrial Enzymes and Their Applications. John Wiley & Sons,Canada. p: 333.

VARMA, S., MITRA C.K., 2002. Bioelectrochemical Studies on Catalase Modified Glassy Carbon Paste Electrodes, Electrochemistry Communications, 4:151-157.

VARMA, S., MATTIASSON, B., 2005. Amperometric Biosensor for the Detection of Hydrogen Peroxide Using Catalase Modified Electrodes in Polyacrylamide. Journal of Biotechnology, 119:172–180.

VASUDEVAN, P.T., WEILAND, R.H., 1994. Studies on the Morphology of Immobilized Catalase. The Chemical Engineering Journal, 55:B41-B45.

WAN, L.S., KE, B.B., WU, J., XU, Z.K., 2007. Catalase Immobilization on Electrospun Nanofibers: Effects of Porphyrin Pendants and Carbon Nanotubes. Journal of Physical Chemistry, 111:14091-14097.

WAN, Z. G., KE, B.B., XU, Z.K., 2008. Covalent Immobilization of Redox Enzyme on Electrospun Nonwoven Poly(Acrylonitril-co-Acrylic Acid) Nanofiber Mesh Filled With Carbon Nanotubes: A Comprehensive Study. Biotechnology and Bioengineering, 97(4):708-720.

WANG, Y., HSIEH, Y.L., 2004. Enzyme Immobilization to Ultra-Fine Cellulose Fibers via Amphiphilic Polyethylene Glycol Spacers. Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 42:4289–4299.

WANG, Y., CARUSO, F., 2005. Mesoporous Silica Spheres as Supports for Enzyme Immobilization and Encapsulation. Chemistry of Materials, 17:953-961.

WANG, Z.G., KE B.B., XU Z.K., 2007. Covalent Immobilization of Redox Enzyme on Electrospun Nonwoven Poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) Nanofiber Mesh Filled with Carbon Nanotubes : A Comprehensive Study. Biotechnology and Bioengineering, 97(4): 708-720.

WANG, QING., XUAN, LI., FAN, XUERONG, WANG, PING., CUI, LI., 2008. Immobilization of Catalase on Cotton Fabric Oxidized by Sodium Periodate. Biocatlysis and Biotransformation, 26(5):437-443.

WEETHALL, H.H., 1976. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. Methods of Enzymology, 44:134-148.

WISEMAN, A. 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England.

YOON, D.S., WON, K., KIM, Y.H., SONG, B.K., KIM, S.J., MOON, S.J., KIM, B.S., 2007. Continuous Removal of Hydrogen Peroxide with Immobilised Catalase for Wastewater Reuse. Water Science& Technology, 55(1-2):27-33.

YOSHIMOTO, M., SAKAMOTO, H., YOSHIMOTO, N., KUBOI, R., NAKAO, K., 2007. Stabilization of Quarternary Structure and Activity of bovine Liver Catalase Through Encapsulation in Liposomes. Enzyme and Microbial Technology, 41:849-858.

ZAMOCKY, M., KOLLER, F., 1999. Understanding the Structure and Function of Catalases: Clues from Molecular Evolution and in Vitro Mutagenesis. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 72:19-66.

ZHANG, J., CHI, Q., ZHANG, B., DONG, S., WANG, E., 1998. Molecular Characterization of Beef Liver Catalase by Scanning Tunneling Microscopy. Electroanalysis, 10(11):738-746.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Adana'da doğdum. İlk ve orta eğitimimi Adana'da tamamladıktan sonra 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldum. 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde yüksek lisansa başladım ve 2000 yılında araştırma görevlisi kadrosuna atandım. 2003 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde yüksek lisans eğitimimi tamamlayarak aynı yıl doktora eğitimime başladım. Evli ve bir kız çocuğu annesiyim.