ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazlı Ece VARAN

D-LAKTAT DEHİDROGENAZIN KOVALENT İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA-2021

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

D-LAKTAT DEHİDROGENAZIN KOVALENT İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Nazlı Ece VARAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Yıl:2021, Sayfa: 75
Jüri : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ
: Prof. Dr. Deniz YILDIRIM

Bu tez çalışmasında, glutaraldehit ara kolu üzerinden 3–aminopropil silika jele kovalent immobilize edilen *Leuconostoc mesenteroides* D-laktat dehidrogenaz'ın (D-LDH), D-Laktik asit üretebilen aktif ve kararlı preparatları optimize edilmiştir. 0,250 g destek üzerine eklenen 1 mg/mL protein derişimindeki enzim çözeltisi ile % 86 immobilizasyon verimi elde edilmiştir. Serbest ve immobilize D-LDH karakterize edilerek optimum pH ve sıcaklık değerleri ve kinetik parametreleri belirlenmiştir. Ayrıca, serbest ve immobilize D-LDH'ların depolanma ve termal kararlılıkları araştırılmış ve immobilize D-LDH'ın tekrar kullanım kararlılığı kesikli reaktörde incelenmiştir. Serbest D-LDH için optimum pH 7,0, immobilize D-LDH için ise pH 6,0 olarak belirlemiştir. Serbest ve immobilize D-LDH'lar için optimum sıcaklık sırasıyla 37 °C ve 45 °C olarak bulunmuştur. Serbest D-LDH için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,365 mM ve 86,95 U/mg protein, immobilize D-LDH için bu değerler sırasıyla 0,077 mM ve 19,16 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Serbest D-LDH, 4 °C'de 30 gün depolama sonunda başlangıç aktivitesinin % 85'ini korumakta, 25 °C'de ise 10 gün depolama sonunda başlangıç aktivitesinin % 97'sini kaybetmektedir. İmmobilize D-LDH ise 4 °C ve 25 °C'de 30 gün depolama sonunda sırasıyla başlangıç aktivitesinin % 82 ve % 37 'sini koruduğu belirlenmiştir. Serbest D-LDH, 45 °C'de 4 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin % 86'sını korurken, immobilize D-LDH aynı koşullarda % 82'sini korumuştur. İmmobilize D-LDH'ın kesikli reaktörde 10 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 38'ini koruduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: D-laktat dehidrogenaz, immobilizasyon, 3-aminopropil silika jel

ABSTRACT

MSc THESIS

COVALENT IMMOBILIZATION AND CHARACTERIZATION OF D-LACTATE DEHYDROGENASE

Nazlı Ece VARAN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
CHEMISTRY DEPERMENT

Supervisor : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Year:2021, Pages: 75
Jury : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ
: Prof. Dr. Deniz YILDIRIM

In this thesis, the covalent immobilization of D-Lactate dehydrogenase (D-LDH) from *Leuconostoc mesenteroides* onto 3-aminopropyl silica gel via the glutaraldehyde spacer arm was optimized to have an active and stable preparation which is able to produce D-Lactic acid. The immobilization yield of 86 % was achieved using 1 mg/mL protein for 0.250 g support. The free and immobilized D-LDHs were characterized and their optimum pH and temperature values and kinetic parameters were determined. In addition, the storage and thermal stability of free and immobilized D-LDHs were investigated. The reuse stability of immobilized D-LDH was also determined in a batch reactor. The optimum pH for free D-LDH was determined as 7.0, however, it was 6.0 for immobilized D-LDH.The optimum temperatures for free and immobilized D-LDHs were found to be 37 °C and 45 °C, respectively. The K_m and V_{max} values for free D-LDH were determined as 0.365 mM, 86.95 U/mg protein, and the corresponding values were determined as 0.077 mM and 19.16 U/mg protein, respectively for immobilized D-LDH. The free D-LDH retained 85 % of its initial activity after 30 days of storage at 4 °C, however it lost 97 % of its initial activity after 10 days of storage at 25 °C. The immobilized D-LDH retained 82 % and 3 % of its initial activity after 30 days of storage at 4 °C and 25 °C, respectively. The free D-LDH preserved 86 % of its initial activity after 4 hours of incubation at 45 °C, while immobilized D-LDH preserved 82 % under the same conditions. The immobilized D-LDH retained 38 % of its initial activity after 10 uses in a batch reactor.

Keywords: D-lactate dehydrogenase, immobilization, 3-aminopropyl silica gel

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

D-Laktat dehidrogenaz (EC 1.1.1.28, D-LDH), piruvatın NADH'ye bağlı D-laktik aside dönüşümünü ve tersi reaksiyonu kataliz eder. Laktik asit mikrobiyal fermantasyon, kimyasal sentez ve enzimatik reaksiyonlarla üretilir. Laktik asit fermantasyonu, gıda sanayinde, farklı tıbbi ve kimyasal uygulamalarda sıklıkla kullanılır. Günümüzde laktik asidin ana endüstriyel uygulaması, biyolojik olarak parçalanabilen bir polimer olan polilaktik asidin üretilmesi için kullanılmasıdır. Polilaktik asit (PLA) diğer adıyla polilaktat, endüstriyel işleme maliyetlerine ve istenilen mekanik özelliklere sahip, biyobazlı, biyobozunur, biyouyumlu ve toksik olmayan ticari öneme sahip bir malzemedir. D-LDH enzimi, serum veya idrarda artan D-laktat konsantrasyonu ile ilişkili çeşitli hastalıkların belirlenmesi için tanısal biyosensörlerde kullanılılabilmektedir. D-LDH enzim aktivitesi gıda endüstrisinde fermente gıdaların kalitesini izlemek amacıyla da kullanılmaktadır. Ayrıca bakterilerin plak birikintilerinde ürettiği D-laktat çürük boşlukların oluşumunda rol oynar, bu nedenle diş hekimliğinde D-laktat tayini de çok önemlidir.

Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda yarı ömürlerinin düşük olması, tekrar kullanım imkanlarının olmaması, *in vitro* koşullarda in *vivo* koşullara yakınlığın sağlanamamasındaki problemler gibi çeşitli nedenlerle kullanımı sınırlıdır. Bu sınırlamaları aşmanın en yaygın ve etkili yolu enzim immobilizasyon yöntemlerinin kullanılmasıdır.

Bu çalışmada *Leuconostoc mesenteroides* D-laktat dehidrogenaz'ının 3-aminopropil fonsiyonel grubu içeren silika desteğine gluteraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonu araştırılmıştır. Serbest ve immobilize D-laktat dehidrogenaz için optimum pH, sıcaklık, kinetik parametreler, termal ve depolama kararlılıkları ve immobilize enzimin tekrar kullanım kararlılığı belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda aktivite ölçülmüş, spesifik aktiviteler belirlenmiştir. Serbest enzim ve immobilize enzimin FT-IR spektroskopisi analizi yapılarak ikincil yapıları incelenmiştir.

İmmobilizasyon için en uygun enzim derişimi ve en uygun immobilizasyon

süresi için yapılan çalışmalarda bu değerler sırasıyla 1mg/mL ve 2 saat olarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize D-LDH aktiviteleri için optimum pH sırasıyla 7,0 ve 6,0, optimum sıcaklık ise sırasıyla 37 °C ve 45 °C olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize D-LDH'ların belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta piruvat derişimi sabit tutularak (0,33 mM) başlangıç NADH derişimlerine karşı aktivitelerindeki değişim incelenmiş ve optimum NADH derişimi serbest D-LDH için 0,498 mM, immobilize D-LDH için ise 0,831 mM olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize D-LDH preparatları için K_m değerleri sırasıyla 0,365 mM ve 0,077 mM, V_{max} değerleri ise sırasıyla 86,95 U/mg protein ve 19,16 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize D-LDH'lar için geri dönüşüm sayısı (k_{cat}) sırasıyla 3173 dk^{-1} ve 699 dk^{-1} olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlardan immobilize D-LDH'ın serbeste göre 1,05 kat daha fazla katalitik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize D-LDH örneklerinin depolama kararlılıkları 4 °C ve 25 °C incelenmiştir. Serbest ve immobilize D-LDH preparatları 4 °C'de ve 30 gün depolama sonunda başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 85 ve % 82'sini korumuşlardır. Serbest D-LDH 25 °C'de ve 10. gün depolama sonunda başlangıç aktivitesinin % 97'sini kaybetmiş, buna karşın immobilize D-LDH 25 °C'de ve 30 gün depolama sonunda başlangıç aktivitesinin % 37 'sini korumuştur. Serbest ve immobilize D-LDH preparatlarının termal kararlılıkları ise 45 °C incelenmiş, serbest D-LDH'ın,'de 4 saat inkübasyon sonunda bağıl aktivitesinin % 86'sını koruduğu, immobilize D-LDH aynı koşullarda başlangıç aktivitesinin % 82'sini koruduğu belirlenmiştir. İmmobilize D-LDH kesikli reaktörde 10 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 38'ini korumuştur.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin planlanmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Seyhan TÜKEL'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Biyokimya Anabilim dalının değerli hocaları Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ ve Prof. Dr. Ramazan BİLGİN'e ilgi ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığım ilk günlerde tanıştığım ve çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, hiçbir zaman yardımlarını ve önerilerini esirgemeyen, karşılaştığım her zorluğu kolaylıkla atlatmamı sağlayan, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim Prof. Dr. Deniz YILDIRIM'a, Doç. Dr. Dilek ALAGÖZ'e ve Öğr. Görevlisi Ali TOPRAK'a sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca tez aşamasında manevi desteklerini esirgemeyen Kimya Bölümündeki arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca varlıklarına şükran duyduğum aileme, manevi kardeşlerim Gizem ASLAN'a ve Dilay ERBAKAN'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER VI
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
SİMGELER VE KISALTMALAR XIV
1. GİRİŞ 1
1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri 2
1.1.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri 4
1.1.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri 11
1.1.3. Tutuklama Yöntemleri 12
1.1.4. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması 14
1.2. Silika Desteklerinin Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılması 15
1.3. Laktat Dehidrogenaz 16
3. MATERYAL VE METOD 27
3.1. Materyal 27
3.1.1. Kimyasallar 27
3.1.2. Kullanılan Cihazlar 27
3.2. Metod 27
3.2.1. D-LDH'ın Kovalent İmmobilizasyonu 27
3.2.2. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Aktivitesinin Belirlenmesi 30
3.2.3.Protein Tayini 31
3.2.4. Standart Protein Grafiğinin Çizimi 32
3.2.5. D-LDH'ın İmmobilizasyonu İçin Uygun Enzim Derişiminin Belirlenmesi 32
3.2.6. Nikotinamid adenin dinükleotid Derişiminin Aktiviteye Etkisi 32

3.2.7. D-LDH'ın İmmobilizasyonu için Uygun Sürenin Belirlenmesi..... 33
3.2.8. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Karakterizasyonu 33
3.2.8.1. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Optimum pH'sının Belirlenmesi 33
3.2.8.2. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi 33
3.2.8.3. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi 33
3.2.8.4. İmmobilize D-LDH'ın Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi 33
3.2.8.5. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Depolama Kararlılığının Belirlenmesi 34
3.2.8.6. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Termal Kararlılığının Belirlenmesi 34
3.2.8.7. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi ile Analizi 34
4. BULGULAR ve TARTIŞMA..... 37
4.1.Bulgular..... 37
4.1.1. Serbest D-LDH'ın Aktivitesi için NADH'ın Deneysel Olarak Ekstinksiyon Katsayısının Belirlenmesi 37
4.1.1.1. Serbest D-LDH'ın Aktivitesi için Optimum pH, Sıcaklık ve NADH Derişimin Belirlenmesi 38
4.1.2. D-LDH'ın 3- Aminopropil Silika Jel Desteğe İmmobilizasyonu 45
4.1.2.1. İmmobilizasyon için Uygun Enzim Derişimin ve Sürenin Belirlenmesi..... 45
4.1.2.2. İmmobilize D-LDH'ın Aktivitesi için Optimum pH, Sıcaklık ve NADH Derişiminin Belirlenmesi..... 47
4.1.2.3. İmmobilize D-LDH'ın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi..... 50

4.1.2.4. İmmobilize D-LDH'ın Depolama Kararlılığının Belirlenmesi51
4.1.2.5. İmmobilize D-LDH'ın Termal Kararlılığının Belirlenmesi 52
4.1.2.6. İmmobilize D-LDH'ın Tekrar Kullanım Kararlığının Belirlenmesi 53
4.1.2.7. İmmobilize D-LDH'ın İkincil Yapısının Analizi 54
4.2. Tartışma 57
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 63
5.1. Sonuçlar 63
5.2. Öneriler 64
KAYNAKLAR 67
ÖZGEÇMİŞ 75

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması 15
Çizelge 4.1. Serbest D-LDH için ikincil yapıların dalga sayıları..... 45
Çizelge 4.2. 100 mg Silika jel desteğe immobilize edilen D-LDH'ın en uygun başlangıç enzim miktarının belirlenmesi..... 46
Çizelge 4.3. İmmobilize D-LDH için ikincil yapıların dalga sayıları..... 55
Çizelge 4.4. Serbest ve immobilize D-LDH'ın ikincil yapıları 56
Çizelge 4.5. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Karakterizasyonu..... 57

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Endüstriyel enzimlerin geliştirilmesi için kullanılan biyolojik ve kimyasal araçlar. 1
Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması. 3
Şekil 1.3. Enzim immobilizasyon yöntemlerinden bazı örnekler. (a) tutuklama, (b) çapraz bağlama, (c) adsorpsiyon, (d) iyonik bağlama, (e) kovalent bağlama. 3
Şekil 1.4. Taşıyıcıya bağlama yöntemleriyle enzim immobilizasyonu (A) Fonksiyonel gruplar içeren destek, (B) serbest enzimde bulunan fonksiyonel gruplar, (C) enzim immobilizasyonu. 5
Şekil 1.5. Destek materyallerinin sınıflandırılması. 6
Şekil 1.6. Kovalent enzm immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan aktif fonksiyonel gruplar. (A) anhidrit, (B) karbonat, (C) aldehit, (D) epoksit, (E) açilazid, (F) izosiyanat, (G) karboksilli asit fenil ester, (H) lakton. 8
Şekil 1.7. Kovalent immobilizasyonda rol oynayan reaktif amino asit artıkları; (++) çok sık kullanılır, (+) sık kullanılır, (-) kulllanılmaz. 8
Şekil 1.8. Adsorpsiyon yöntemiyle enzim immobilizasyonun şematik gösterimi. . 9
Şekil 1.9. İyonik bağlama yöntemiyle enzim immobilizasyonu 9
Şekil 1.10. Enzimlerin affinite yöntemiyle immobilizasyonu 10
Şekil 1.11. Enzimlerin metal bağlama yöntemiyle immobilizasyonu 10
Şekil 1.12. Çapraz bağlı immobilize enzim yöntemleri (a) kristallendirme ile çapraz bağlı enzim kristalleri oluşturma (CLEC), (b) çöktürme ile çapraz bağlı enzim agregatları oluşturma(CLEA), (c) püskürterek kurutma yöntemiyle çapraz bağlı enzim immobilizasyonu (CSDS), (d) doğrudan çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu (CLE). 11
Şekil 1.13. Polimer bir matriks içerisinde enzim molekülünün tutuklanması. 13
Şekil 1.14. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu. 13
Şekil 1.15. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu. 14

Şekil 1.16. L-LDH ve D-LDH tarafından katalizlenen reaksiyonlar. 16
Şekil 3.1. Glutaraldehit ile modifiye edilen 3-aminopropil silikajel desteğine D-Laktat Dehidrogenazın İmmobilizasyon Reaksiyonu..... 29
Şekil 4.1. NADH'ınekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için kullanılan standart grafik 38
Şekil 4.2. Serbest D-LDH aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi 39
Şekil 4.3. Serbest D-LDH'ın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi 40
Şekil 4.4. Serbest D-LDH'ın aktivitesinin NADH derişime bağlı değişim grafiği 41
Şekil 4.5. Serbest D-LDH için Lineweaver- Burk grafiği 42
Şekil 4.6. Serbest D-LDH'ın bağıl aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi..... 42
Şekil 4.7. Serbest D-LDH'ınınkübasyon süresinin aktiviteye bağlı değişimi 43
Şekil 4.8. Serbest D-LDH'ın 1600-1700 cm^{-1} aralığında alınan IR spektrumunun 2.dereceden türevi 44
Şekil 4.9. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak aktivitede değişimler 47
Şekil 4.10. İmmobilize D-LDH aktivitesinin pH'ya bağlı değişim grafiği..... 48
Şekil 4.11. İmmobilize D-LDH'ın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişim grafiği 49
Şekil 4.12. İmmobilize D-LDH'ın aktivitesinin NADH derişime bağlı değişim grafiği 50
Şekil 4.13. İmmobilize D-LDH için Lineweaver- Burk grafiği..... 51
Şekil 4.14. İmmobilize D-LDH'ın bağıl aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi..... 52
Şekil 4.15. İmmobilize D-LDH'ınınkübasyon süresinin aktiviteye bağlı değişimi 53
Şekil 4.16.İmmobilize D-LDH'ın tekrar kullanım kararlılığı grafiği 53
Şekil 4.17. İmmobilize D-LDH'ın 1600-1700 cm^{-1} aralığında alınan IR spektrumunun 2.dereceden türevi..... 54

SİMGELER VE KISALTMALAR

D-LDH : D- Laktat Dehidrogenaz

FT-IR : Fourier Transform Infrared

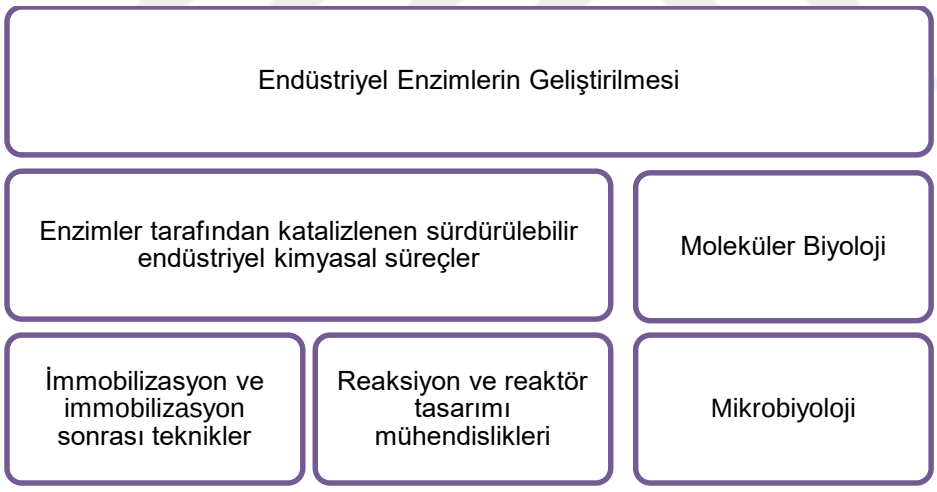
k_{cat} : Geri dönüşüm sayısı

K_m : Michealis Menten hız sabiti

V_{max} : Maksimum hız

1. GİRİŞ

Enzimler aktivite, seçicilik ve özgüllük gibi fonksiyonel özellikleri sayesinde en karmaşık kimyasal süreçleri ılımlı deneysel ve çevresel koşullarda katalizleyen biyomoleküllerdir. Endüstride çok yaygın kullanım alanlarına sahip olan enzimler başta gıda olmak üzere, kimyasal analiz, ilaç, temizlik, kozmetik, tekstil ve kağıt sektörlerinde kullanılan biyokatalizörlerdir. Enzimlerin suda çözünür olmaları endüstriyel uygulamalar için uygunluğunu desteklese de genellikle yüksek sıcaklıklarda kararsız olmaları, yoğun substrat derişimlerinde aktivitelerini gösterememeleri, üretimde kullanılan diğer kimyasallarla inhibe olabilmeleri ve genellikle fizyolojik koşullarda çalışıyor olmaları nedenleriyle endüstride kullanılmaları sınırlı olabilmekte ve bu nedenle kullanılmadan önce etkinliklerinin geliştirilmesine yönelik yöntemler gerekmektedir (Guisan, 2006), (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Endüstriyel enzimlerin geliştirilmesi için kullanılan biyolojik ve kimyasal araçlar

Enzimlerin reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılması çok güçtür. Enzimin istenilen anda uzaklaştırılabilmesi için reaksiyon ortamına denatüre edici,

inhibe edici ajanlar eklenmesi gerekir ve bu da yeni bir kirlilik oluşumuna sebep olmaktadır. Ürünlerin bu kirliliklerden arındırılması maliyeti oldukça yükseltmektedir. Bunun yanı sıra serbest enzimi reaksiyon ortamından geri kazanmak oldukça zor olduğundan serbest enzimin tekrar kullanılabilmesi mümkün değildir. Hem teknik hem de ekonomik nedenlerden dolayı enzimler tarafından katalize edilen çoğu reaksiyon, enzimlerin sürekli kullanılmasını veya uzun bir süre tekrar kullanılmasını gerektirir. Enzimlerin endüstriyel alanlarda geliştirilmesinde kullanılan tekniklerden biri enzim immobilizasyon yöntemleridir (Guisan, 2006). Biyololojik ve kimyasal araçlar yardımıyla geliştirilen enzimler, ılımlı ve uygun maliyetli koşullar altında çok daha etkin şekilde katalizör olarak kullanılmaktadırlar.

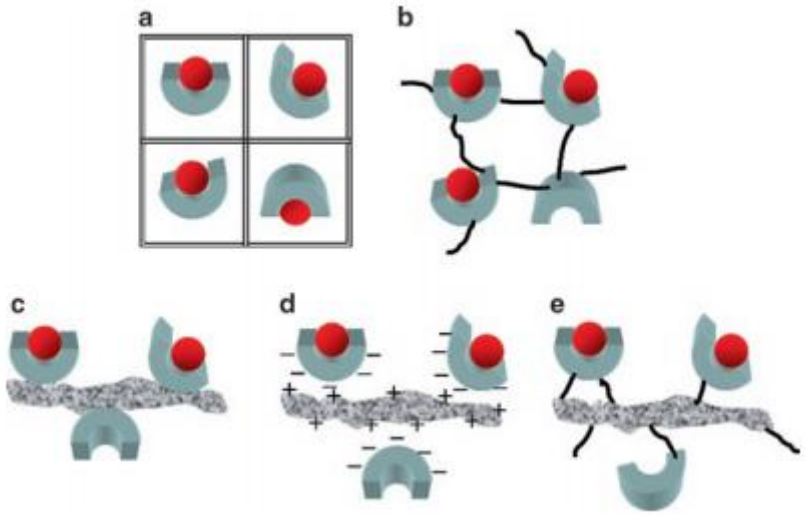
1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Çözünmüş durumdaki bir enzimin yeniden veya sürekli kullanımına izin verebilmek, kararlılığını arttırmak, bazı durumlarda aktivitesini arttırmak için enzimin organik veya inorganik desteğe bağlanması veya bir membran tarafından sarılması enzim immobilizasyon yöntemleriyle sağlanır. Enzim immobilizasyonu yöntemleri Şekil 1.2'de gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

Enzim immobilizasyon yöntemlerinden bazıları Şekil 1.3'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Enzim immobilizasyon yöntemlerinden bazı örnekler. (a) tutuklama, (b) çapraz bağlama, (c) adsorpsiyon, (d) iyonik bağlama, (e) kovalent bağlama.(Allan ve ark., 2011)

Enzim immobilizasyonunda amaç immobilize enzimin serbest enzime göre pH, sıcaklık gibi çevre koşullarına karşı daha dayanıklı olması, reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılması, tekrar kullanabilmesi, enzimin kinetik özelliklerinin iyileştirilmesi, ürün oluşumunun kontrol altında tutulabilmesi, birbirini izleyen çok basamaklı reaksiyonlar için ve sürekli işlemlere uygulanabilir olmasıdır (Alagöz, 2012).

Enzimlerin immobilizasyonunda enzimin aktivitesinin düşmesi, denatürasyon veya inaktivasyon nedeniyle önlenemeyen bir durumdur. Ancak enzim inaktivasyonun veya denatürasyonun seviyesi enzim immobilizasyon yöntemlerine, işlevselleştirilmiş desteğe, ortam koşullarına (tampon derişimi, pH ve sıcaklık) ve enzimin immobilizasyonu için reaksiyon koşullarına bağlıdır (Yıldırım, 2010). Bu

nedenle immobilize enzimin aktivitesini serbest enzimin aktivitesine en yakın olacak şekilde tutabilmek, aktivitesindeki düşüşü en aza indirmek, zayıf tutunmanın üstesinden gelebilmek ve enzimin aktif merkezi ve fonksiyonel gruplarına zarar vermeden immobilizasyonu gerçekleştirmek için desteği, yöntemini ve immobilizasyon koşullarını iyi belirlemek gerekir (Sulaiman,2015).

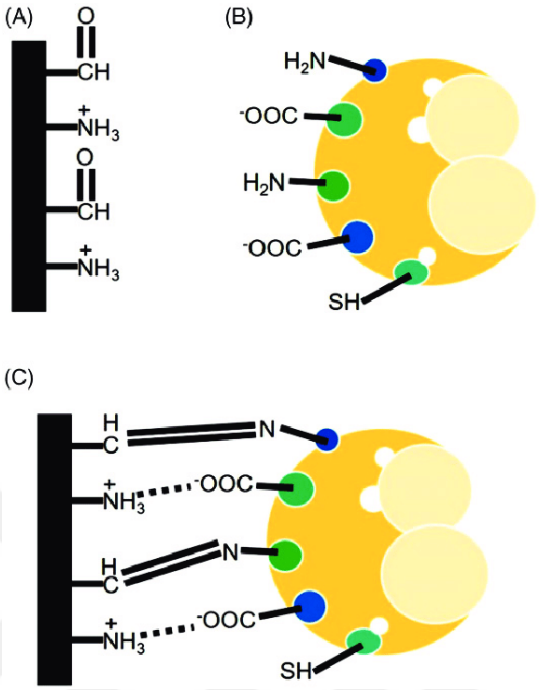
İmmobilizasyon yöntemi seçilirlen göz önünde bulundurulması gereken faktörler;

- Enzimin immobilizasyonu sırasında ve sonrasında aktif merkezindeki değişiklikler,
- Enzimin immobilizasyon yöntemine toleransı,
- İmmobilizasyon yönteminde kullanılan kimyasal ve fiziksel ortam,
- Enzim proteini üzerindeki yüzey fonksiyonel gruplar,
- Enzimin boyutu,
- Enzim proteini üzerindeki yük (veya izoelektrik pH)
- Enzimin polaritesi (hidrofobik/ hidrofilik bölgeler)'dir.

Bu faktörlerin her biri enzim immobilizasyonu için farklı stratejilerle ilişkilidir ve en uygun immobilizasyon yöntemi seçilerek hedefe ulaşılabilir.

1.1.1.Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama yöntemleri enzimin organik veya inorganik desteklere kovalent bağlama, adsorpsiyon, iyonik bağlama, affinite ve metal bağlama olmak üzere beş grupta incelenir (Şekil 1.4). Enzimin yapısından yararlanılan bu bağlama yönteminde molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, hidrofobik bölgeler ve iyonik gruplar bağlanmada rol oynar (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Taşıyıcıya bağlama yöntemleriyle enzim immobilizasyonu (A) Fonksiyonel gruplar içeren destek, (B) serbest enzimde bulunan fonksiyonel gruplar, (C) enzim immobilizasyonu

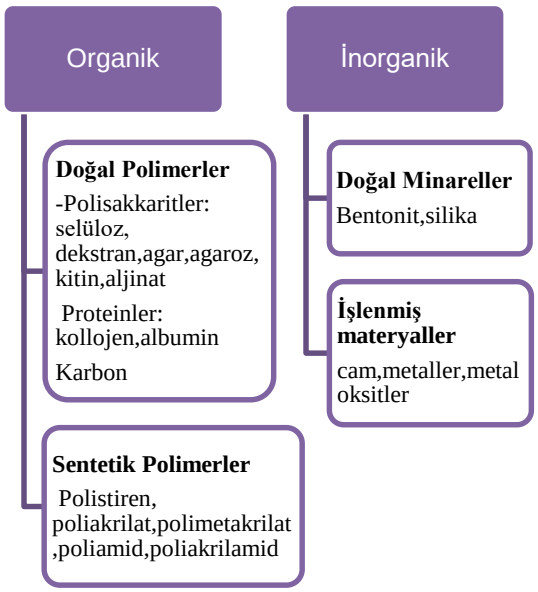
Kovalent Bağlama: Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu, enzimin reaktif gruplarının desteğin aktif yüzeyi ile kimyasal olarak bağlanmasıyla gerçekleşir. Enzim ve destek arasındaki etkileşim enzimin nükleofilik grubuyla destekte bulunan amino grubu (-NH_2), karboksil grubu (-COOH), hidroksil grubu (-OH), imidazol grubu ($C_3N_2H_4$) gibi fonksiyonel grupları arasında gerçekleşir. Enzimlerin kovalent immobilizasyonu enzim ve destek arasındaki bağın güçlü olması ve destek yüzeyinden ayrılmasının çok düşük olması nedeniyle birçok reaksiyon için tercih edilen bir yöntemdir. (Allan ve ark.,2011).

Kovalent immobilizasyonun en büyük dezavantajı enzimin bağlanmadan sonra aktivitesinin düşmesidir. Bu yöntemde bağlanmanın enzimin aktif bölgesinden

gerçekleşmesi ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeniyle bu grupların konformasyonel değişikliliklerine tamamen izin vermeyeceğinden aktivite kaybı görülmesi olağandır. Ancak elde edilen immobilize enzimin genellikle termal stabilitesinin serbest enzime göre daha fazla olması ve çevresel koşullara karşı serbest enzimden daha kararlı olması bu dezavantajı telafi etmektedir (Tran ve ark., 2011).

Kovalent immobilizasyon yönteminde taşıyıcının özellikleri enzim immobilizasyonun performansını büyük ölçüde etkiler. İdeal bir desteğin özellikleri suda çözünmeme, basınca karşı fiziksel direnç, hidrofilik gruplar içermesi, kolaylıkla türevlendirilebilme, mikrobiyal saldırılara karşı direnç, biyouyumluluk, zehirli olmama ve düşük maliyetle kullanılabilirlik olarak sıralanabilir (Yıldırım, 2010).

Destekler kimyasal özelliklerine göre organik veya inorganik polimerler olabilir. Organik destekler de doğal ve sentetik olmak üzere iki alt başlıkta toplanır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Destek materyallerinin sınıflandırılması (Cabral ve Kennedy, 1991)

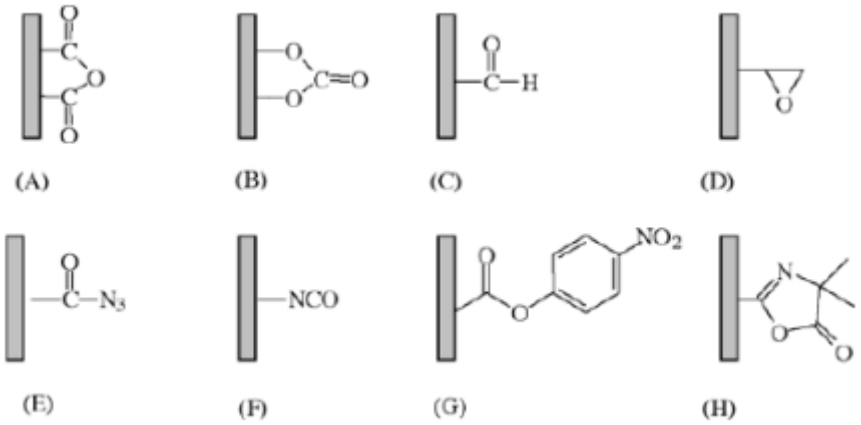
Desteklerin fiziksel özellikleri (örneğin ortalama parçacık çapı, şişme davranışı, mekanik mukavemet ve sıkıştırma davranışı v.b.) immobilize enzimlerin performansı için büyük önem taşır. Özellikle gözenek parametleri, partikül boyutu ve toplam yüzey alanları enzimin desteğe bağlanma kapasitesini doğrudan etkiler (Yıldırım, 2010).

Kovalent bağlama yönteminde immobilize enzimin aktivitesini gösterebilmesi için kullanılacak destekteğin;

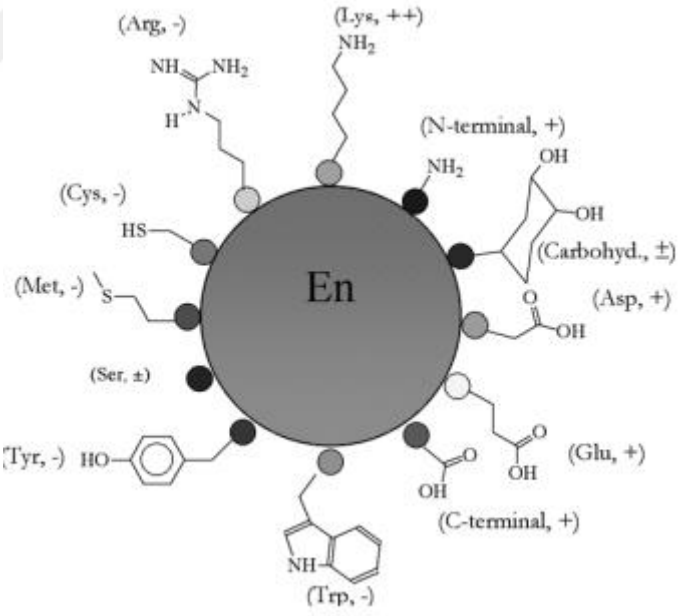
- Fiziksel özellikleri (gözenek ve partikül büyüklüğü, şekli, geçirgenliği vb.),
- Kimyasal yapısı (kimyasal bileşenleri ve fonksiyonel grupları) ,
- Ara kol uzunluğu ve yapısı

gibi özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır. Desteğin sahip olduğu bu özelliklerin yanı sıra kimyasal bağın yapısı, immobilizasyon sonrasında enzimin ikincil yapısındaki değişiklikler, enzim yönlenmesi, immobilizasyon ortamının özellikleri (pH, sıcaklık, enzim derişimi) ve desteğin yüzeyine ya da içerisine bağlanan enzimin dağılımı da immobilize enzimin performansını büyük ölçüde etkiler.

Kovalent immobilizasyon yönteminde, kullanılan destek materyalinin bağlanmada rol alan fonksiyonel gruplarına göre farklı bağlanma türleri oluşabilir. İmmobilizasyon öncesi kullanılacak olan desteğin fonksiyonel grubunu çeşitli yöntemlerle aktifleştirmek gerekir. Desteğin aktifleştirilen fonksiyonel grubuyla enzim yüzeyinde bulunan amino asit artıkları (Şekil 1.6) kovalent bağlanmanın oluşumunu sağlar. Şekil 1.7'de kovalent immobilizasyonda rol oynayan enzim proteininde bulunabilecek reaktif amino asit artıkları gösterilmiştir.

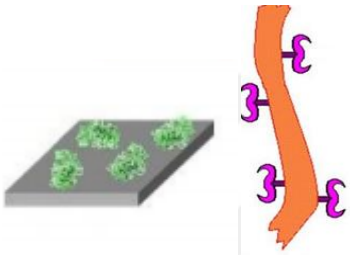


Şekil 1.6. Kovalent enzm immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan aktif fonksiyonel gruplar. (A) anhidrit, (B) karbonat, (C) aldehit, (D) epoksit, (E) açilazid, (F) izosiyanat, (G) karboksilli asit fenil ester, (H) lakton



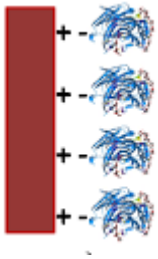
Şekil 1.7. Kovalent immobilizasyonda rol oynayan reaktif amino asit artıkları; (++) çok sık kullanılır, (+) sık kullanılır, (-) kulllanılmaz (Cao, 2005).

Adsorpsiyon: Kullanılan ilk immobilizasyon yöntemi olmasının yanı sıra kolay, hızlı ve ekonomik bir yöntemdir.Fiziksel adsorpsiyonda enzim desteğe zayıf etkileşimlerle bağlanır (hidrojen bağları, Vander Waals ve hidrofobik etkileşimler). En önemli özelliği enzimin katalitik aktivitesini önemli ölçüde korumasıdır. Ancak enzim desteğe kolaylıkla adsorbe olmasına rağmen aradaki etkileşimlerin zayıf olmasından kaynaklı protein kaçışını görmek de mümkündür (Guisan, 2006).



Şekil 1.8. Adsorpsiyon yöntemiyle enzim immobilizasyonun şematik gösterimi

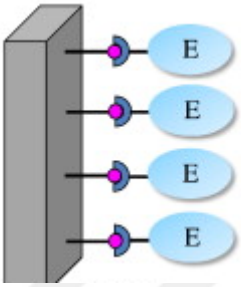
İyonik Bağlama: Suda çözünmeyen ve net bir yüke sahip destek ile serbest enzimin iyonik etkileşimlerle bağlanmasıyla gerçekleşir. İyonik bağlama yöntemi de adsorpsiyon yöntemi gibi ılımlı koşullarda gerçekleştiğinden enzimde konformasyonel değişikler veya aktif merkezde değişikler meydana gelmez.



Şekil 1.9. İyonik bağlama yöntemiyle enzim immobilizasyonu

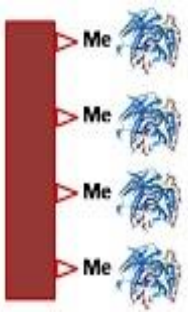
Affinite: Bu yönteminin en dikkat çekici özelliği biyospesifik etkileşimlerden yararlanarak immobilizasyonun gerçekleşmesidir. Enzimlerin antikorlar ve lektinler affinite yöntemiyle immobilizasyonu gerçekleştirebilir ancak

bu affinite ligandlarının enzimin immobilizasyonu öncesi desteğe kovalent bağlanmasını gerektirir (Brena ve Batista-Viera,2006).



Şekil 1.10. Enzimlerin affinite yöntemiyle immobilizasyonu

Metal Bağlama: Organik taşıyıcıların yüzeyinde bulunan geçiş metal tuzları ve hidroksitler enzim molekülünün nükleofilik gruplarıyla koordinasyon bileşikleri oluşturarak immobilizasyon gerçekleşir. Titanyum ve zirkonyum sıkça kullanılan geçiş metalleridir. Nötrleştirme veya ısıtma yoluyla metaz tuzları veya hidroksit destek materyali üzerine çöktürülür Enzimin metalin her boş orbitalini doldurabilmesi olanaksızdır. İmmobilizasyon metalin boş d orbitaliyle enzimde bulunan amino asit artıkları arasında gerçekleşebilir (Cabral ve ark.,1986;Brena ve ark.,1994).

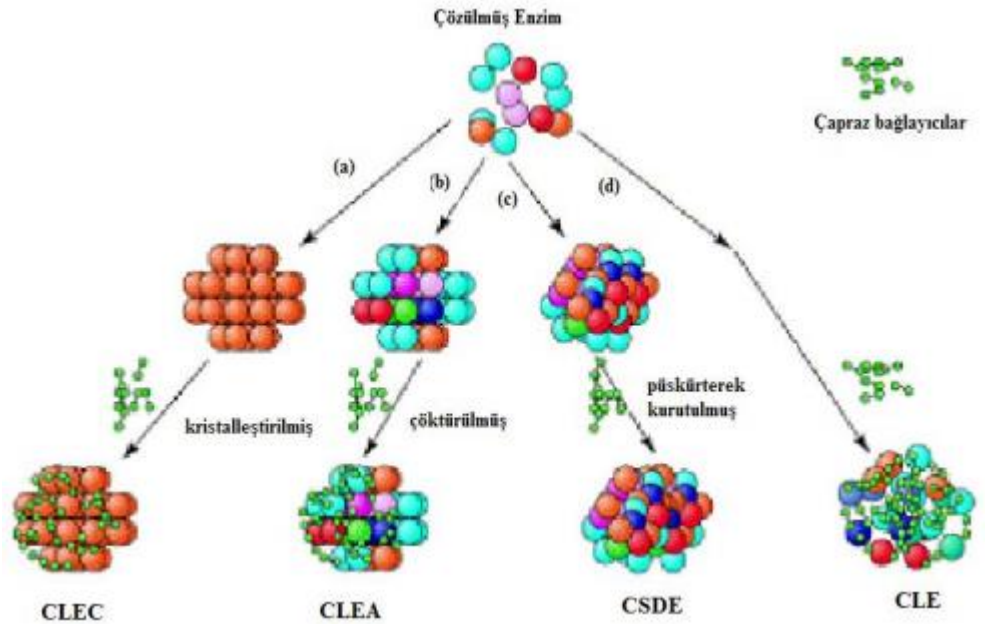


Şekil 1.11.Enzimlerin metal bağlama yöntemiyle immobilizasyonu

1.1.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri

Çapraz bağlama yöntemiyle enzim immobilizasyonunda bir veya çoklu fonksiyonel gruba sahip reaktifler kullanılarak enzim desteğe bağlanarak suda çözünmeyen kompleksler oluşturulur (Govardhan, 1999; Schoevaart ve ark., 2004; Sheldon ve ark., 2005). Gluteraldehit, toluen diizosiyanat, kloroformat, heterosiklik halojenürler ve epiklorohidrinlerdir. Enzimlerin çapraz bağlama yöntemleriyle immobilizasyonu kendi içerisinde dört alt başlıkta incelenir (Şekil 1.12).

Çapraz bağlı immobilize enzimler; çapraz bağlı çözünmüş enzim (cross-linked dissolved enzyme), çapraz bağlı enzim kristalleri (cross-linked enzyme crystal), çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim (cross-linked spray dried enzyme) ve çapraz bağlı enzim agregatları (cross-linked enzyme agregate) olarak çeşitli yöntemlerle hazırlanabilirler (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Çapraz bağlı immobilize enzim yöntemleri (a) kristallendirme ile çapraz bağlı enzim kristalleri oluşturma (CLEC), (b) çöktürme ile çapraz bağlı enzim agregatları oluşturma(CLEA), (c) püskürterek kurutma yöntemiyle çapraz bağlı enzim immobilizasyonu (CSDS), (d) doğrudan çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu (CLE) (Twyman,2005)

Doğrudan Çapraz Bağlama (CLE): Enzim yüzeyindeki reaktif amino grupları ile çapraz bağlama reaktifi arasındaki oluşan bağ ile sağlanır. Enzime direkt uygulanan reaktifin derişimine bağlı olarak enzimi denatüre edebileceğinden veya enzim molekülleri arasında intermoleküler çapraz bağların oluşması genellikle immobilize enzimde aktivite kaybına neden olur (Cao ve ark., 2003).

Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA): Çözünmüş enzim üzerine tuzlar, organik çözücüler ve iyonik olmayan polimerler eklenerek enzim denatüre edilmeden çöktürülür ve sonrasında biyofonksiyonel çapraz bağlayıcı reaktifler eklenerek agregatlar oluşturulur (Cao ve ark., 2003).

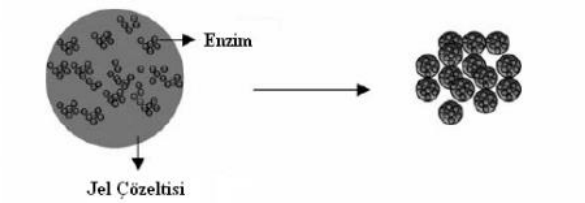
Çapraz Bağlı Enzim Kristalleri (CLEC): Partikül büyüklükleri kontrol edilebilen, çok yüksek oranda aktivite kaybı görülmeyen, ısı ve organik çözücülere karşı dayanıklı, tekrar kullanım kararlılığı yüksek immobilize enzimler üretilebilen bir yöntemdir. (Cao ve ark., 2003).

Enzim Kopolimerizasyonu ile Çapraz Bağlama: Serbest enzim kopolimerizasyon reaksiyonunda monomer olarak kullanılarak matrikse bağlanır. Yöntemin en önemli avantajı protein kaçışı engellenmesidir (Yıldırım, 2010).

1.1.3. Tutuklama Yöntemleri

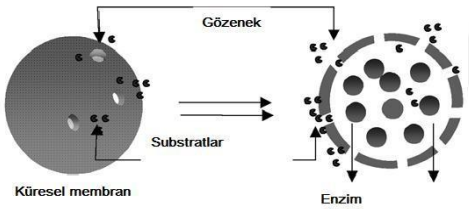
Tutuklama yöntemleriyle enzim immobilizasyonu substrat ve reaksiyon sonucunda oluşan ürünlerin geçişine izin verebilen ancak enzim moleküllerinin organik veya inorganik matriksler içinde sabit kalarak geçişini engelleyen bir yöntemdir (O'Driscoll, 1976). Jelde tutuklama, mikrokapsüleme, lipozom oluşturma ve membran yöntemleriyle gerçekleştirilir.

Jelde Tutuklama: Bu yöntemde immobilizasyon ortamında monomer, ko-monomer ve enzim çözeltisi bulunmaktadır. Serbest enzim monomerlerin oluşturduğu polimer içerisinde tutuklu kalır. Bu yöntem için en sık kullanılan polimerler akrilamid, akrilik asit, hidroksietilmetilakrilat, polietilen glikol metilakrilat, N-vinilpirolidondur (Şekil 1.13).



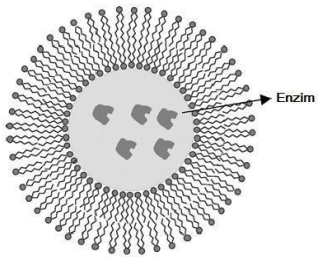
Şekil 1.13.Polimer bir matriks içerisinde enzim molekülünün tutuklanması (Cao,2005)

Mikrokapsülleme: Enzim moleküllerin yarı geçirgen bir membran içerisinde tutuklanması ile gerçekleşen immobilizasyon yöntemidir. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 µm arasında değişebilir. Bu büyüklük substratın ve reaksiyon ürünlerinin yarı geçirgen membrandan geçişine izin verebilecek ve aynı zamanda enzim moleküllerinin dışarıya çıkışını engelleyecek seviyede olmalıdır.



Şekil 1.14. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu

Lipozom Oluşturma: Bu yöntem sıvı-yüzey yapıcı membran temelini esas alır. Çapı 1-100 µm arasında değişen enzim çözeltisi damlacıklarını içeren hidrokarbon çözücünün, farklı katkı maddeleri ve yüzey yapıcılarla hazırlanan enzim çözeltisi damlacıklarının çevresinde oluşturduğu suda çözünmeyen formda membranlardır (Şekil 1.15).



Şekil 1.15.Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu

Membran Yöntemi: Enzimler hücre içi ortamı oluşturmak için bir zar sistemiyle kapsüllenerek dışarıya geçişi ve dış çevreyle doğrudan etkileşimi engellenir. Proteinler gibi büyük moleküller zar sistemini geçemeyeceğinden tutuklanmış enzimle etkileşime giremezler. Substratların geçişi sağlanabildiği için tutuklanan enzim aktivitesini gösterebilmek için membran boyunca kolayca hareket edebilir ve ürünün dışarıya çıkışı sağlanır (Aldhadri ve ark., 2021).

1.1.4. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Enzimlerin kimyasal yapılarının, bileşenlerinin, ürünlerinin ve substratlarının farklı özellikler taşıması nedeniyle tek bir immobilizasyon yöntemi belirlemek olanaksızdır. Enzim immobilizasyonunun sağladığı avantajlar (kararlılık, enzim aktivitesini koruma, maliyet, tekrar kullanılabilirlik, bağlanma gücü v.b.) göz önünde bulundurularak immobilize yapılacak enzim için en uygun yöntem seçilmelidir. Enzim immobilizasyon yöntemleri Çizelge 1.1'de ayrıntılı olarak kıyaslanmıştır.

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

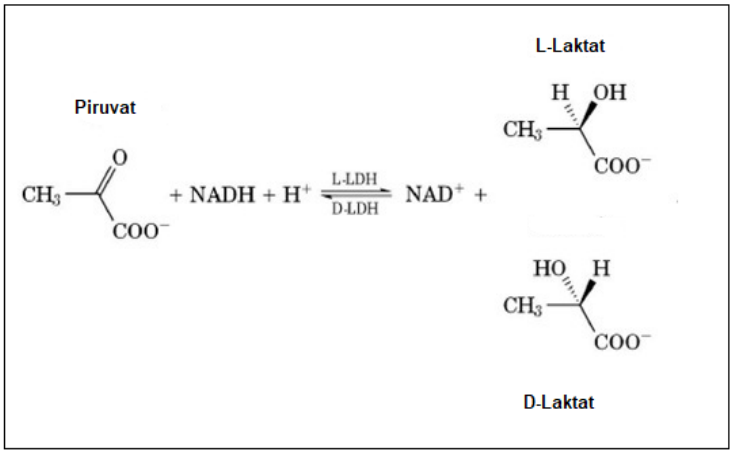
1.2.Silika Desteklerinin Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılması

Silikatlar yüksek termal ve kimyasal dirençleri, toksik olmamaları, yüksek yüzey alanı ve gözenekli yapıları, reaktör kullanımlarında aşınmaya karşı dirençleri (kesikli reaktörler için uygun mekanik özellikler) ve birçok farklı formda bulunmaları nedeniyle enzim immobilizasyonu için en sık kullanılan doğal destek materyallerinden biridir. Silanol (-Si-OH) grupları kuvvetli iyon değiştirme karakterindedirler ve proteinlerle spesifik olmayan etkileşimlere girerler. Silikat materyallerin yüzeyleri çeşitli gruplarla kolaylıkla türevlendirilebilmekte ve yüzeylerinde kovalent enzim immobilizasyonu için uygun fonksiyonel gruplar oluşturulabilmektedir. Silikatlar bakteri ve mantar üremesi için substrat görevi görmediğinden mikroorganizmaların çoğalmasına karşı bir direnç de sağlarlar (Alagöz ve ark., 2021). Silikat destek üzerine immobilize edilen enzimler, serbest enzime göre daha yüksek katalitik aktivite, termal kararlılık ve pH direnci gösterirler (Zdarta ve ark.,2018).

Son yıllarda 3-aminopropil silika jel, üzerinde propilamino artığı içerrmesi (yaklaşık 1 µmol/g destek), bu destek materyaline immobilize enzimlerin diğer desteklere immobilize edilen aynı enzimlere karşı daha yüksek termal ve tekrar kullanım kararlılığı göstermesi nedenleriyle enzim immobilizasyon çalışmalarında tercih edilen türevlendirilmiş destek materyallerinden biri olmuştur.

1.3.Laktat Dehidrogenaz

Piruvat ve laktatın karşılıklı geri dönüşümü, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) koenzimi varlığında laktik dehidrogenaz enzimi olarak da bilinen laktat dehidrogenaz tarafından katalize edilir. Laktatın D- ve L- izomerleri için doğal olarak oluşan iki LDH izoformu vardır. L-LDH piruvatı L-laktata indirgerken, D-LDH D-laktat oluşumunu katalizler (Zaboli ve ark., 2019), (Şekil 1.16).



Şekil 1.16. L-LDH ve D-LDH tarafından katalizlenen reaksiyonlar

L-LDH (L- (+) - laktat:NAD^+ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.27), tüm omurgalı organizmalarda bulunan bir enzimdir. LDH glikolitik metabolizmadaki rolüyle önemli bir yere sahiptir ve glikolizin son reaksiyonunu, piruvattan L-(+)- laktik asit oluşumunu katalize eden H^+ transferi sağlayan (oksidoredüktaz) enzimlerden biridir. Temel olarak oksijensiz ortamda veya sınırlı miktarda oksijen tedarik edildiğinde

glukozun aerobik metabolizmasında rol alır. Hücreler anaerobik koşullara maruz kaldıklarında oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi bozulur. Bu süreç, hücrelerin alternatif bir metabolizma ile enerji üretmesini gerektirir. LDH, enerji üretimi ihtiyacını karşılamak için bu gibi koşullarda düzenlenir. Bununla birlikte, glukozun anaerobik dönüşümü sırasında üretilen laktat, karaciğer dışında hiçbir dokudan metabolizmaya giremez. Bu nedenle, laktat kanda salınır ve karaciğere taşınır. Burada LDH Cori döngüsü yoluyla laktatı piruvata dönüştürmenin ters reaksiyonunu gerçekleştirir (Farhana ve ark., 2021).

LDH ayrıca birçok omurgasızda, bitkide ve çeşitli mikroorganizmalarda bulunur. L-LDH 1940'ta Sraub tarafından ilk kez kalp kasından saflaştırılmış, kristal formu ise 1943'te Kubovitz ve Ott tarafından elde edilmiştir (Kopperschlager ve ark., 1996). Hayvan hücrelerinin LDH enzimi farklı izoenzimler halinde bulunan tetramerik bir moleküldür. Bu izoenzimler genetik olarak farklı iki alt birimin homo- ve hetero- tetramerlere bağlanmasıyla üretilir. Oligomerik enzim, dondurularak veya çözülerek, yüksek tuz derişimlerinde veya denatüre edici ajanlarla ayrıştırılabilir. Dizi benzerlikleri fonksiyonel tetramerler oluşturmak için *in vitro* olarak farklı türlerden alt birimlerin birleşmesine izin verir. En az iki gen dublikasyonu, omurgalılarda LDH-A veya M (kas) tipi, LDH-B veya H (kalp) tipi ve LDH-C veya X tipi olmak üzere üç genetik olarak farklı alt birimlere yol açmıştır. Her tür birbirinden fizikokimyasal özellikleriyle, biyolojik işlevleriyle ve gelişimsel düzenlemedeki görevleriyle birbirinden ayrılmıştır. LDH-A, LDH-B ve üç hibrit formu tüm omurgalılarda mevcuttur ve her birinin karakteristik dokuya özgü ifadesi evrimleri boyunca nispeten değişmeden kalmıştır. Her hücre tipindeki beş izoenzimin göreceli bolluğu tamamen birleştirilebilecek her tipin alt birimlerinin sayısına bağlıdır. Bu sayılar LDH-A ve LDH-B genlerine karşılık gelen aktiviteyi yansıtır (Kopperschlager ve Kirchberger, 1996).

Laktanın diğer enantiyomeri (D- (-) - laktat) birkaç hayvan türünde ve ayrıca bakterilerde başka bir stereoselektif LDH tarafından yükseltgenir (D- (-) -laktat: NAD^+ oksidoredüktaz; EC 1.1.1.28). D-Laktat dehidrogenaz pirüvik asidin D-laktik

aside dönüşümünü katalize eder. Laktik asit mikrobiyal fermantasyon, kimyasal sentez ve enzimatik reaksiyonlarla üretilir. Laktik asit fermantasyonu, gıda sanayinde, farklı tıbbi ve kimyasal uygulamalarda sıklıkla kullanılır (Cao ve ark., 2009; Zaboli ve ark., 2020). Günümüzde laktik asidin ana endüstriyel uygulaması, biyolojik olarak parçalanabilen bir polimer olan polilaktik asit üretmektir. Mikrobiyal fermantasyonla daha saf laktat üretilmesi nedeniyle son zamanlarda çokça tercih edilen bir kaynaktır. Laktik asit bakterileri uzun yıllardır çeşitli fermente gıdalarda kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin organik asitler ve diğer antimikrobiyal maddeler üretme kabiliyeti fermente gıdaların üretiminde sıklıkla kullanılır hale getirmiştir. Ayrıca, bitki üretiminde biyogübreler, biyokontrol ediciler, biyostimülanlar amaçları ile de kullanılmaktadır. Karbohidratların laktik asit bakterileri aracılı organik asitlere, özellikle laktik aside dönüştürülmesi endüstriyel uygulamalarda ilgi uyandırmıştır. Polilaktik asit tıptan tarıma ve ambalajlamaya kadar değişen uygulamalarla kullanılan termoplastik ve biyobozunur bir polyesterdir. Laktik asit, laktik asit bakterilerinin ana metabolitidir. Bu asit pH'yı düşürür ve istenmeyen mikroorganizmaların çoğalma riskini önler. Laktik asit kiraldir ve L (+) - laktik asit ve D (−) - laktik asit olmak üzere iki optik izomere sahiptir. İnsan vücudu sadece L (+) - laktik formunu özümseyebildiği için gıda endüstrisinde birçok şekilde kullanılmaktadır (Jia ve ark., 2018). D-LDH sağlıklı bireylerde üretilmez. Ancak akut apandisit, bakteriyel enfeksiyon ve böbrek hasarı gibi hastalıklarda D-LDH aktivitesi görülmekte ve bu durumda idrarda veya serumda artan D-LDH konsantrasyonu vaka teşhislerinin bir belirteci olarak kullanılmaktadır (Zaboli ve ark., 2021). D-LDH'ın immobilizasyonuyla amperometrik biyosensörler geliştirilmiştir ve tıp, beslenme ve gıda kalite kontrol alanlarında oldukça yaygın kullanım alanları bulunmaktadır (Dwevedi, 2016).

Bu yüksek lisans tez çalışmasının amacı;

1) *Leuconostoc mesenteroides* D-laktat dehidrogenaz'ının 3–aminopropil fonksiyonel grubu içeren silika jel desteğe glutaraldehit arakolu üzerinden kovalent immobilizasyonunun araştırılması,
2) Serbest ve immobilize D-LDH'ın karakterizasyonu ve kinetik parametrelerinin belirlenmesi,
3) Serbest ve immobilize D-LDH'ın depolanma ve termal kararlılığının belirlenmesi,
4) İmmobilize D-LDH'ın tekrar kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Chaubey ve ark., (2001), tarafından glutaraldehit varlığında çapraz bağlama yöntemiyle LDH immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal yöntemle sentezlenen PPY-PVS (polipirol-polivinilsulfonat) LDH filmi üzerine immobilize edilmiştir. CV ve FTIR analizleriyle karakterize edilen ve LDH immobilizasyonu ile geliştirilen biyosensörün 0,5 ile 6 mM laktat derişimleri arasında cevap verme süresi 40 saniye olarak belirlenmiştir. 4- 10 °C 'de depolanan immobilize LDH'ın 15 günün sonunda biyosensörün cevap verme süresinde değişiklik olmadığı rapor edilmiştir.

Ishida ve ark., (2006), Poli D-Laktik asidin, stereo kompleks oluşumu ile poli L-Laktik asidin termostabilitesini geliştirdiği, bu nedenle önemli bir polimer olduğu bildirilmiştir. Çalışmada D-Laktik asit üreten, metabolik mühendislik ile tasarlanmış rekombinant *Saccharomyces cerevisiae* üretmişlerdir. Bu rekombinantta, piruvat dekarboksilaz 1'in (PDC1) kodlama bölgesi tamamen çıkarılmış ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. suşu NBRC3426'nın D-LDH geninin iki kopyası *Saccharomyces cerevisiae* genomuna dahil edilmiştir. D-Laktat üretimini 61,5 g/L olarak belirlemişler ve D-Laktik aside dönüştürülen glukoz miktarı nötralize edici koşullarda % 61,2, nötralize olmayan koşullar altında D-Laktik asit veriminin de % 53 olduğunu bildirmişlerdir. Rekombinat enzim ile üretilen D-Laktik asidin optiksel saflığının çok yüksek (> % 99,9) olduğunu rapor etmişlerdir. Yaptıkları çalışmanın laktik asit bakterileri ve transgenik *E.coli* içeren diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, nötralize etme işlemi olmaksızın saf D-Laktik asit üretimi için yeni bir yaklaşım olduğunu bildirmişlerdir.

Rahman ve ark., (2009), karboksilik asit ile modifiye edilmiş poli-5,2'-5',2''-terttiyofen-3'karboksilik asit (PTTCA) ve çok duvarlı karbon nanotüp komposit altın elektrot üzerine L-LDH ve NAD^+'ın ko-immobilizasyonunu gerçekleştirerek laktik asit tespiti için biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensörle insan serumu ve ticari sütteki laktat konsantrasyonu ölçülmüş ve biyokimyasal analiz

yapan cihazla (Shimadzu 7200) sonuçlar karşılaştırılmıştır. Biyosensörden elde edilen sonuçlar insan serumu ve ticari süt için sırasıyla 0,22 ± 0,01 ve 0,18 ± 0,006 mM, cihazdan elde edilen sonuçların ise insan serumu için 0,24 ± 0,01 ve ticari süt için 0,174 ± 0,01 mM olduğunu rapor etmişlerdir. Geliştirilen biyosensörün laktat tespiti için çözelti aşamasında NAD^+ kullanımını önlemesi, hassasiyeti, ve tekrar kullanılabilir olması özellikleriyle başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Yusdy ve ark., (2009), tarafından silika kaplı manyetik nanotüpler üzerine immobilize edilen Laktat-Dehidrogenaz enziminin termal stabilitesinde artış sağlanmıştır. 45°C'de serbest LDH 20 saatin sonunda aktivitesinin % 50'sini korurken bu sürenin immobilize LDH için yaklaşık 60 saate uzadığını bildirmişlerdir.

Li ve ark., (2012), D-laktat dehidrogenaz kullanarak piruvatı D- Laktik aside dönüştüren bakteriden (*Leuconostoc mesenteroides* subsp.) ATCC 8293'ün D-laktik asit oluşumundan sorumlu geni (LDH) belirledikten sonra enzimi karakterize etmişlerdir. Enzim karakterizasyon çalışmalarında piruvat indirgeme reaksiyonu için optimum pH 8, sıcaklık 30 °C olarak belirlemişlerdir. Kinetik çalışmalarda enzimin K_m değeri 0,58 mM ve k_{cat} ise 2900 s^{-1} olarak bulunmuştur. Optimum koşullar belirlendikten sonra yapılan inhibisyon çalışmalarında; enzimin Ca^{+2}, Co^{+2}, Cu^{+2}, Mg^{+2}, ve Mn^{+2} tarafından inhibe olmadığı ancak 1mM Zn^{+2} ve 1 mM SDS tarafından inhibe olduğunu kaydetmişlerdir.

Djebbi ve ark. (2014), LDH'ın basit adsorpsiyon ve birlikte çökeltme ile immobilizasyonuna dayanan yöntemle katmanlı çift hidroksitler üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaları sonucunda enzimin LDH-Laktat etkileşiminden doğabilecek morfolojik varyasyonlara karşı konfigürasyonunun korunması sağlanmış olup laktat biyosensörü veya laktat biyo-yakıt hücreleri geliştirilmesi için immobilize enzimin konak hücre görevi üstlenebileceği gösterilmiştir.

Rishi ve ark. (2014), L-Laktat dehidrogenazın immobilizasyonuyla, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit varlığında tris(2,2'-bipiridil)

rutenyum(III) kemilüminans üzerindekiartışına dayalı olarak L-Laktat tayini için bir akış enjeksiyon prosedürü geliştirmişlerdir. İmmobilize L-LDH'ın 4 °C'de 10 hafta boyunca stabilitesini koruduğunu ve 37 °C'de 1 hafta boyunca aktivitesinde önemli bir değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemi kan serumuna uygulamış ve sonuçların geleneksel spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Bu yöntem sayesinde yüksek ürün verimi ve düşük reaktif tüketimi sağlandığını rapor etmişlerdir.

Saengdee ve **ark. (2014),** silikondioksit (SiO_2), silikonnitrit (Si_3N_4) ve titanyumoksinitrit (TiON) (3-aminopropil)trietoksisilan ve glutaraldehit ile modifiye edilen desteklere LDH'ı immobilize etmişlerdir. İmmobilize LDH'ların aktivitesinin uygulanan desteklerde serbest enzime göre sırasıyla % 68, % 49 ve % 67 oranlarında korudukları gözlenmiştir. Modifiye edilmiş SiO_2 yüzeyinde, TiON ve Si_3N_4 yüzeylerinden daha yüksek protein derişimi ve LDH aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Jackson ve ark., (2016), tavşan kasından saflaştırılan L-LDH'ın glioksil-agaroza immobilizasyonunu karakterize etmişlerdir. İmmobilize LDH'ın termal kararlılığının serbest enzime göre 1600 kat daha fazla olduğunu, aynı koşullar altında serbest enzimin 10 dakika sonra inaktive olduğnu ancak immobilize LDH'ın 48 saat sonra başlangıç aktivitesinin %75'ini koruduğunu, immobilize LDH ile laktik asit üretiminin kesikli reaktörde 15 kullanıma kadar aktivitesini koruduğunu rapor etmişlerdir. Bu verilerinin L-LDH'ın biyokatalitik işlemlerde kullanılmak üzere immobilizasyonunun önemli olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir.

Jia ve ark., (2018), çalışmalarında gıda işlemede yaygın olarak kullanılan *Leuconostoc mesenteroides*'den elde edilen üç D-LDH'dan major D-LDH (D-LDH)'ı tanımlamışlar ve karakterize etmişlerdir. D-LDH'in simülasyon çalışmasının, substrat bağlanma sırasında konformasyonunun değiştiğini bildirmişlerdir. Kataliz sırasında, Tyr101 ve Arg235, substratları hidrojen bağlarıyla bağladığını ve His296'nın proton transferi için genel bir asit/baz görevi gördüğünü rapor etmişlerdir.

Li ve ark., (2020), *Leuconostoc mesenteroides*'den D-laktik asit oluşumundan sorumlu geni (LDH) rekombine bir plazmit oluşturmak için klonlamışlar ve sonrasında enzimi karakterize etmişlerdir. D-LDH'ın moleküler kütlesini 37 kDa olarak ölçmüşler, optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7,0 ve 40 °C olarak rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmada k_{cat} 'ın 421 s^{-1} ve katalitik etkinliğin (k_{cat}/K_m) 3,31x10^5 L/mol.s olduğu bildirilmişlerdir.

Mahani ve ark., (2020), D-LDH enziminin immobilizasyonu için yeni bir metal-organik çerçeve Fe_3O_4NPs @Ni-MOF) sentezlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalarda immobilize enzimin serbest enzime göre termal stabilitesinin daha yüksek olduğunu bildirmişerdir. İmmobilize enzim 40 °C'de bir saatin sonunda aktivitesinin yaklaşık % 50'sini korurken serbest enzimin aktivitesinin % 7'ye kadar düştüğünü kaydetmişlerdir. Ayrıca serbest D-LDH'ın yarı ömrü 17,8 dakika iken immobilizasyon sonrası yarı ömrünün 65,2 dakikaya çıktığını rapor etmişlerdir.

Zaboli ve ark., (2020), D-laktat dehirogenazı karbon nano tüp (CNT) ve türevlendirilmiş karbon nano tüp (f/CNT) yüzeyine adsorplama ile immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucu serbest enzim ile immobilize enzim arasında optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerinde farkın olmadığı ancak immobilize enzimin yüksek sıcaklıkta denatürasyona karşı serbest enzime göre daha kararlı olduğu kaydetmişlerdir. 70°C'de serbest enzim aktivitesinin % 6'sını gösterirken immobilize enzimin aktivitesinin % 33'ünü koruduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada, immobilize enzimin katalitik etkinliğinin serbest enzime göre 2 kat arttığını bildirmişlerdir.

Zaboli ve ark., (2021), çalışmalarında trehalozun rekombinant D-Laktat dehidrogenaz'ın yapısal stabilitesi üzerinde etkisini araştırmışlar ve farklı proses değişkenlerini optimize etmek için yanıt yüzey metodolojisi (RSM) uygulamışlardır. Maksimum D-DLH aktivitesinin trehaloz konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi sırasıyla 1,25 M, 8,0, 30 °C ve 25 dakika olduğunu rapor etmişlerdir. D-LDH için NADH ve piruvatı substrat olarak kullandıklarında her bir substrat için ayrı ayrı kinetik parametreleri hesaplamışlardır. Piruvatı substrat

olarak kullandıklarında D-LDH ve trehaloz-DLH için sırasıyla K_m değerini 0,089 mM, 0,043 mM; V_{max} değerini 384,615 mmol/dk.mg, 555,556 mmol/dk.mg; K_{cat} değerini 320,513 s^{-1},462,963 s^{-1}; K_{cat}/K_m değerini ise 3599,606, 10802,469 olarak rapor etmişlerdir. NADH'ı substrat olarak kullandıklarında D-LDH ve trehaloz-DLH için sırasıyla K_m değerini 0,051 mM, 0,049 mM; V_{max} değerini 714,286 mmol/dk.mg, 909,091 mmol/dk.mg; K_{cat} değerini 595,238 s^{-1}, 757,576 s^{-1} ve K_{cat}/K_m değerini ise 11649,660, 15564,738 olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1.Materyal

Araştırmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma ve Merck firması tarafından sağlanmıştır.

3.1.1. Kimyasallar

D-Laktat Dehidrogenaz enzimi (rekombine-*Leuconostoc mesenteroides;* M_a: 36,5 kDa, spesifik aktivite: 1500 U/mg), sodyum piruvat, nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş hal), 3-aminopropil fonksiyonlu silika jel, glutaraldehit (% 50, w/w), amonyum sülfat, sodyum hidroksit, folin ciocalteu çözeltisi, bakır(II) sülfat, sodyum karbonat, sığır serum albümin, sodyum hidroksit, glasiyel asetik asit, fosforik asit (% 85,v/v), hidroklorik asit (% 37,v/v).

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

UV-Vis spektrofotometre (Thermo Scientific- Genesys 10S), FT-IR (Thermo Scientific – Nicolet iS10), pH metre (HANNA8417), magnetik karıştırıcı, inkübatör (ES 500), soğutmalı inkübatör (BINDER), santrifüj (Kendro Laboratory, Labofuge 200), elektrikli terazi, otomatik pipet (Eppendorf), girdap karıştırıcı, termostatlı çalkalayıcılı su banyosu (Memmert).

3.2. Metod

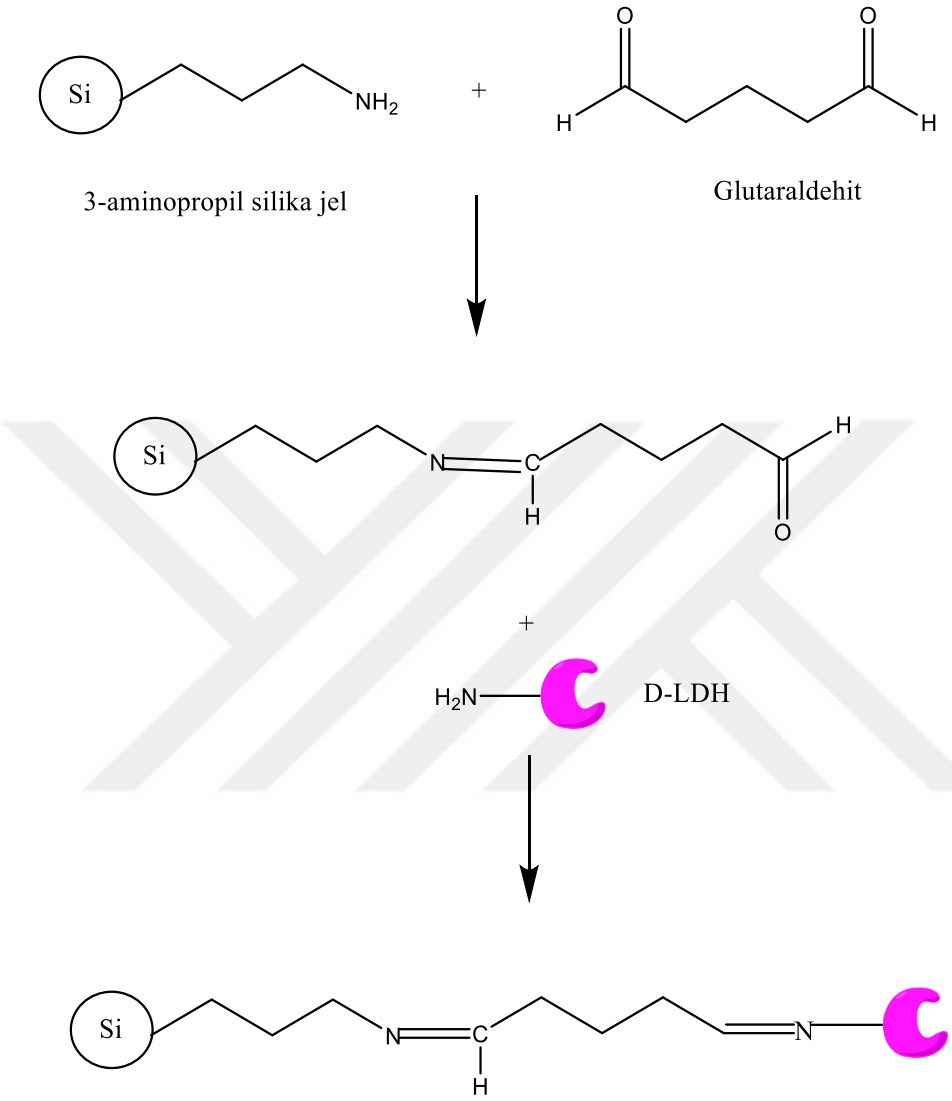
3.2.1. D-LDH'ın Kovalent İmmobilizasyonu

D-Laktat Dehidrogenaz enziminin kovalent immobilizasyonunda kullanılacak olan 3-aminopropil fonksiyonel grubu içeren silika jel desteğini glutaraldehit ile aktifleştirmek için Alptekin (2009) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Desteğe glutaraldehit ara kolunun bağlanması için 1 gram destek üzerine 0,1 M, pH 7,0 fosfat tamponuyla hazırlanan 25 mL % 2,5 glutaraldehit çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 2 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak

bekletilmiştir. Bekleme süresi sonrasında süzüntüde glutaraldehit kalmayıncaya kadar saf su ile yıkanmış ve ardından 60 °C'de 2 saat kurutulmuştur. Süzüntüdeki glutaraldehit tespit edilmiştir (Boratynski ve Zal, 1990). Süzüntüden alınan 500 µL'lik örnekler üzerine 2,5 mL fenol ayracı eklenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletildikten sonra köre karşı 479 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Aynı işlemler süzüntüden alınan örnekler için 479 nm'de absorbans gözlenmeyinceye kadar tekrar edilmiştir. Glutaraldehit ara kolu bağlanan destek, aktifleştirilmiş destek olarak ifade edilmektedir.

D-Laktat dehidrogenaz enziminin kovalent immobilizasyonu için 0,25 gram aktifleştirilmiş destek üzerine 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanan ve protein derişimi 1 mg/mL olan enzim çözeltisinden 1 mL eklenmiştir. İmmobilizasyon işlemine 4 °C'de 2 saat karıştırılarak devam edilmiştir. Sonrasında immobilizasyon karışımı süzüntüde protein kalmayıncaya kadar saf su ile süzülerek yıkanmış ve bir gece 4 °C'de soğutmalı inkübatörde kurutulmuştur. Süzüntüde protein tayini Lowry ve ark.(1951) tarafından önerilen yöntemle belirlenmiştir.

Glutaraldehit ile modifiye edilen 3-aminopropil silika desteğine D-LDH'ın kovalent immobilizasyonunda gerçekleşen reaksiyonlar Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Glutaraldehit ile modifiye edilen 3-aminopropil silikajel desteğine D-Laktat dehidrogenazın immobilizasyonu

3.2.2. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Aktivitesinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimin aktivite hesaplamalarında kulanılacak olan NADH'ın ekstinksiyon katsayısını belirlemek için 25 °C'de pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanan 20 mM standart NADH çözeltisinden derişimleri 0,5-17,5 mM aralığında olan çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 100 µL'si 2,9 mL pH 7,0 fosfat tamponuna eklenerek çözeltilerin 340 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Bulunan değerler derişime karşı absorbans grafiğine geçirilerek NADH için standart grafik çizilmiş ve ekstinksiyon katsayısı deneysel olarak belirlenmiştir.

Serbest enzimin aktivitesi 37 °C'de, NADH varlığında sodyum piruvatla etkileşen enzimin, 1 µmol D-Laktat üretmek için 2,5 dakika reaksiyon sonunda azalan NADH absorbansının 340 nm'de ölçülmesiyle belirlenmiştir. Kullanılan aktivite belirleme yönteminde reaksiyon karışımına 2,8 mL 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde son derişimi 0,33 mM olacak şekilde hazırlanan piruvat çözeltisinden 100 µL, 0,498 mM NADH çözeltisinden 100 µL ve 10 µL 0,551 mg/mL enzim proteini derişimindeki serbest enzim çözeltisi eklenmiştir. Enzimin aktivitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Aktivite} = \frac{\Delta\text{Absorbans}}{\varepsilon} \text{ x } \frac{Vt}{Ve} \text{ x} \frac{1}{t}$$

Vt: Toplam reaksiyon hacmi (mL)
Ve: Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (mL)
ε: Molar ekstinksiyon katsayısı (4,358 $mM^{-1}cm^{-1}$)
t: Reaksiyon zamanı (dk)

İmmobilize D-LDH enzimi aktivitesi için 5 mg immobilize enzim tartılmış, üzerine 2,8 mL 0,1 M pH 6,0 fosfat tamponu içerisinde son derişimi 0,33 mM olan piruvat çözeltisinden 100 µL ve son derişimi 0,831 mM olan NADH çözeltisinden 100 µL eklenmiştir. 15 dakika sonunda 340 nm'de NADH absorbans ölçümü

yapılarak aktivitesi belirlenmiştir. İmmobilize enzimin aktivitesi U/mg immobilize enzim cinsinden hesaplanmıştır. Spesifik aktivite ise U/mg enzim proteini cinsinden hesaplanmıştır.

Bir D-LDH enzimi ünitesi (U) bir dakikada 1 μmol piruvatı dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.3.Protein Tayini

Serbest enzimin aktivitesinin ölçülebilmesi için Lowry ve ark. (1951) tarafından önerilen protein tayini yöntemi kullanılarak standart protein grafiği çizilmiştir.

Bu yöntem için öncelikle A,B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

Çözelti A:

20 g Na_2CO_3 ve 4 g NaOH saf suda çözülerek 1 L'ye tamamlanmıştır.

Çözelti B:

0.5 g $CuSO_4.5H_2O$ % 1'lik sodyum sitrat çözeltisi içinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Çözelti C:

50 mL A çözeltisi ve 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.

Çözelti Folin Ciocalteu:

Folin-Ciocalteu saf su ile 1/1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

Standart Protein Çözeltisi

1 mL'de 1 mg sığır serum albumin (standart) protein olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.4. Standart Protein Grafiğinin Çizimi

0, 25, 50, 100, 150, 250, 350, 500,750 ve 1000 µL standart protein çözeltisi içeren 10 farklı deney tüpü hazırlanmıştır. Deney tüplerinin son hacimleri serum fizyolojik ile 1 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra her deney tüpüne 5 mL C çözeltisi eklenmiş 15 dk oda sıcaklığında tamamen homojen olabilmesi için beklenmiştir. Homojen olan deney tüplerine 0,5 mL seyreltilmiş olan Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 30 dk sonunda tüp içeriklerinin absorbansları standart protein içermeyen (kör) deney tüpüne karşı okutularak bu değerler derişime karşı absorbans grafiğine geçirilmiştir. Elde edilen standart protein grafiği kullanılarak enzimin protein derişimi hesaplanmıştır.

3.2.5. D-LDH'ın İmmobilizasyonu için Uygun Enzim Derişiminin Belirlenmesi

İmmobilizasyon için en uygun enzim derişimin belirlenmesinde100 mg destek üzerine immobilizasyon ortamındaki son derişimleri 0,5, 1,0 ve 2,0 mg/mL enzim proteini olacak şekilde hazırlanan enzim çözeltileri eklenmiştir. Süzüntüde yapılan protein tayini ile 100 mg desteğe bağlanan enzim proteini miktarı belirlenmiştir. Daha sonra spesifik aktivite (U/mg protein) hesaplanarak en yüksek spesifik aktivite elde edilen enzim proteini derişimi belirlenmiştir.

3.2.6. Nikotinamid Adenin Dinükleotid Derişiminin Aktiviteye Etkisi

Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi belirlendikten sonra en yüksek aktivite elde edilen NADH derişiminin belirlenmesi için reaksiyon ortamında piruvat derişimi 0,33 mM olarak sabit tutularak son derişimleri 0,016-0,667 mM aralığında olan NADH çözeltileri ile aktivite ölçülmüş ve en yüksek aktivitenin elde edildiği NADH derişimleri belirlenmiştir.

3.2.7. D-LDH'ın İmmobilizasyonu için Uygun Sürenin Belirlenmesi

En uygun immobilizasyon süresinin belirlenmesi için 0,5, 1, 2 ve 4 saat süreyle D-LDH immobilizasyon ortamında tutulmuş ve sonrasında bağlanmayan protein yıkama ile uzaklaştırılmıştır. Gram desteğe bağlanan D-LDH'ın immobilizasyon ortamına eklenen toplam D-LDH miktarına oranı (%) olarak ifade edilmiştir. Desteğe en fazla protein bağlanma süresi değerlendirilmiştir.

3.2.8. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Karakterizasyonu

3.2.8.1. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Optimum pH'sının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize D-LDH enzimi için pH'nın aktiviteye etkisinin belirlenmesinde reaksiyon karışımında yer alan 0,1 M tamponlar farklı pH değerlerinde hazırlanarak kullanılmıştır. Fosfat (pH 5,0-8,0) ve karbonat (9,0- 10,0) tampon çözeltileri içerisinde aktivite ölçümü yapılarak en yüksek aktivite görülen pH değerleri belirlenmiştir.

3.2.8.2. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize D-LDH aktiviteleri farklı sıcaklıklarda (25-60°C) ölçülerek optimum aktivite gösterdikleri sıcaklıklar belirlenmiştir.

3.2.8.3.Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize D-LDH'ın optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlendikten sonra bu pH ve sıcaklıklarda farklı substrat derişimlerinde aktiviteleri ölçülmüştür. Yapılan ölçümlerde reaksiyon ortamında NADH derişimi sabit tutulurken, derişimleri 1-20 mM olan piruvat çözeltilerinden reaksiyon ortamına 100 µL eklenmiştir. Reaksiyon sonunda Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır.

3.2.8.4. İmmobilize D-LDH'ın Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

İmmobilize D-LDH'ın kesikli reaktörde tekrar kullanılmasının belirlenmesi

çalışmalarında 1,5 cm çapında ve boyu 8 cm kesikli tip reaktör kullanılmıştır. İmmobilize D-LDH'tan 5 mg tartılarak kolon içerisine yerleştirilmiş ve üzerine 2,8 mL pH 6,0 fosfat tamponu eklenmiştir. 25 °C'de gerçekleşen reaksiyon ortamına derişimi 10 mM olan piruvat ve NADH çözeltilerinden 100 µL ilave edilerek 15 dk sonunda çözelti kolondan hızla uzaklaştırılarak 340 nm'de azalan NADH absorbansı ölçülerek belirlenmiştir. Tekrar kullanıma bağlı aktivite değişiminin hesaplanması için aynı işlemler 10 kez tekrar edilmiştir.

3.2.8.5.Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimlerin başlangıçtaki aktivitelerin belirlenmesinden sonra 4°C ve 25°C'de depolanmışlardır. Depolama kararlılıklarının belirlenmesi için 1, 3, 5, 10, 15,20, 25 ve 30. günlerde kalan aktiviteleri tekrar ölçülerek bağıl olarak hesaplanmıştır.

3.2.8.6. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest ve imobilize enzimler termal kararlılıklarının belirlenmesi için 24 saat boyunca 45°C ve 60°C'de inkübe edilmiş ve belirlenen zaman aralıklarında (1, 2, 4, 8, 16, 20 ve 24 saat) kalan aktiviteleri ölçülmüş ve bağıl olarak hesaplanmıştır. Aktivite ölçümlerinde daha önce belirlenen optimum pH değerleri ve NADH derişimleri kullanılmıştır.

Tüm deneysel çalışmalar özellikle belirtilmediği durumlarda en az üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.7. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi ile Analizi

FT-IR spektroskopisi, proteinlerin ve polipeptitlerin yapısal karakterizasyonu için kullanılan bir tekniktir. Polimerlerin IR spektral verileri genellikle yapısal bir tekrarın titreşimleri olarak yorumlanır. Proteinlerdeki tekrar birimleri, dokuz karakteristik IR absorpsiyon bandına yol açar (amidler A,B ve I-

VII) . Amid bandları (1700-1600 cm^{-1}) protein omurgasının en belirgin ve hassas titreşim bantlarıdır ve bunlar proteinlerin ikincil yapıları ile ilişkilidir. FTIR analizi sulu çözelti için uygulanacaksa protein derişimi 3 mg/mL'den büyük olmalıdır. Proteinlerin ikincil yapısının belirlenmesi için yapılan FTIR analizinde sulu çözeltiler kulanılırsa 1654 ve 1658 cm^{-1} bandında α-heliks, 1642, 1638, 1632, 1627 ve 1624 cm^{-1} bandında β-tabaka, 1688, 1680, 1672 ve 1666 cm^{-1} bandında β-dönüşü ve 1648 ± 2 cm^{-1} bandında ise proteinlerin düzensiz yapısı yer alır (Yang ve ark., 2015).

Serbest enzimin sulu çözeltisinden elde edilen spektrumların ikinci türevi alındaktan sonra 1700-1600 cm^{-1} IR absorpsiyon bandındaki pikleri belirlenmiştir. İmmobilize enzim için KBr pelet hazırlanarak spektrum elde edilmiş ve aynı işlemler tekrarlanmıştır.

D-LDH'ın immobilizasyonu öncesi ve sonrası serbest enzimin ikincil yapısının hangi yönde değiştiğini görmek amacıyla FT-IR spektroskopi ile analizi yapılmıştır.

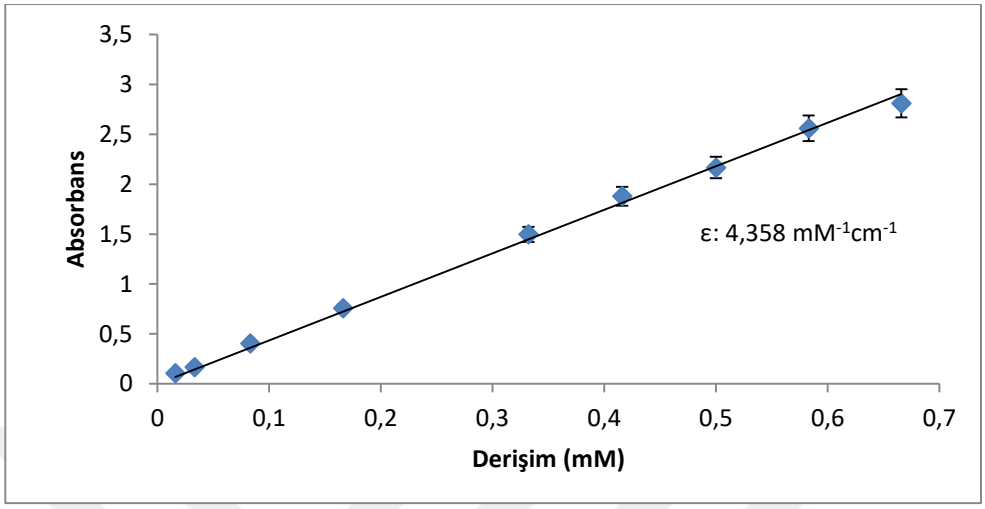
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada *Leuconostoc mesenteroides* D-Laktat Dehidrogenaz'ın (D-LDH) 3-aminopropil fonksiyonel grubu içeren silika jel desteğine glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonu araştırılmıştır. Literatürde *Leuconostoc mesenteroides* D-LDH'ın 3-aminopropil fonksiyonel grubu içeren silika jel desteği üzerine kovalent immobilizasyonu ile ilgili bulgulara rastlanmamıştır. Serbest ve immobilize D-LDH için optimum sıcaklık, pH, kinetik parametreler, termal ve depolama kararlılıkları ve immobilize enzimin tekrar kullanılabilirlik özelliği belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda aktivite ölçülmüş, spesifik aktiviteler belirlenmiştir. Serbest enzim ve immobilize enzimin FT-IR spektroskopisi analizi yapılarak ikincil yapıları belirlenmiştir. Yapılan araştırmaların sonuçları aşağıda verilen alt başlıklarda detaylı bir şekilde bildirilmiştir.

4.1. Bulgular

4.1.1.Serbest D-LDH'ınAktivitesi için NADH'ın Deneysel Olarak Ekstinksiyon Katsayısının Belirlenmesi

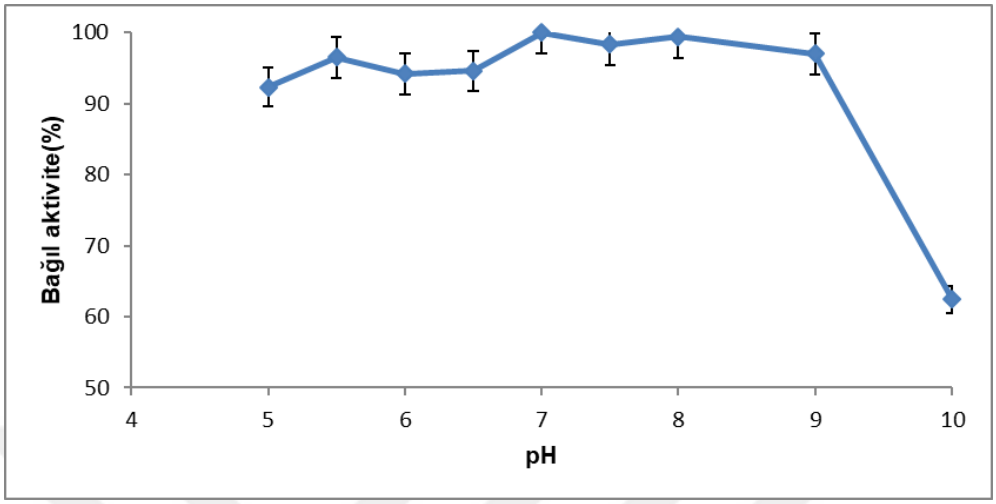
Serbest D-LDH'ın aktivite tayininde kullanılacak olan NADH'ın ekstinksiyon katsayısını belirlemek amacıyla pH 7,0 (0,1M) fosfat tamponunda hazırlanan 0,5 -1,0 - 2,5 -5,0 -10,0 – 12,5 – 15,0 – 17,5 ve 20,0 mM'lık NADH çözeltilerinden 100 µL 2,9 mL tampon içerisine eklenmiş ve 25 °C'de 340 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek derişime karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 4.1). Standart NADH grafiğinden ekstinksiyon katsayısı 4,358 mM^{-1} cm^{-1} olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. NADH'ın ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için kullanılan standart grafik

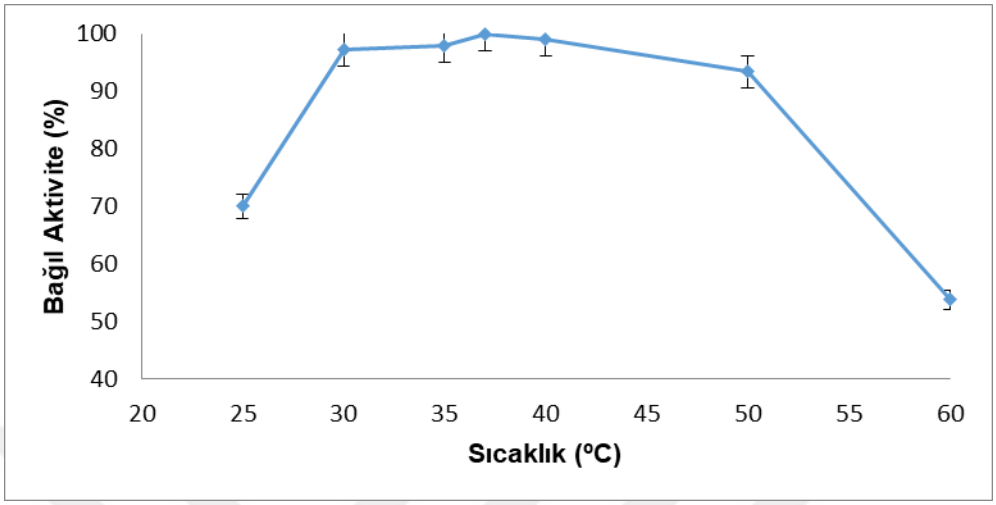
4.1.1.1. Serbest D-LDH'ınAktivitesi için Optimum pH, Sıcaklık ve NADH Derişimin Belirlenmesi

Serbest D-LDH örneklerinin aktivitelerine pH'nın etkisini incelemek için 0,1 M derişiminde, farklı pH'larda fosfat (5,0 - 5,5 - 6,0 - 6,5 - 7,0 - 7,5 - 8,0) ve karbonat (9,0 - 10,0) tamponları hazırlanarak 25 °C'de aktiviteleri ölçülmüş ve Şekil 4.2'de grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.2'den görüleceği gibi serbest enzimin pH 5,0-9,0 aralığında aktivitesi % 92 ile 98 aralığında (pH 5 - % 92; pH 5,5 - % 96; pH 6 - % 94; pH 6,5 - % 94; pH 7 – % 100, pH 7,5 % 98, pH 8 - % 98 ve pH 9 - % 97) olup pH 10,0'da aktivitesinin % 62'sini koruduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlardan anlaşıldığı gibi enzim geniş bir pH aralığında (pH 5,0 – 9,0) kullanılabilme özelliğine sahiptir. Serbest enzimin aktivitesinin en yüksek (% 100) olduğu pH 7,0 optimum pH değeri olarak belirlenmiştir.



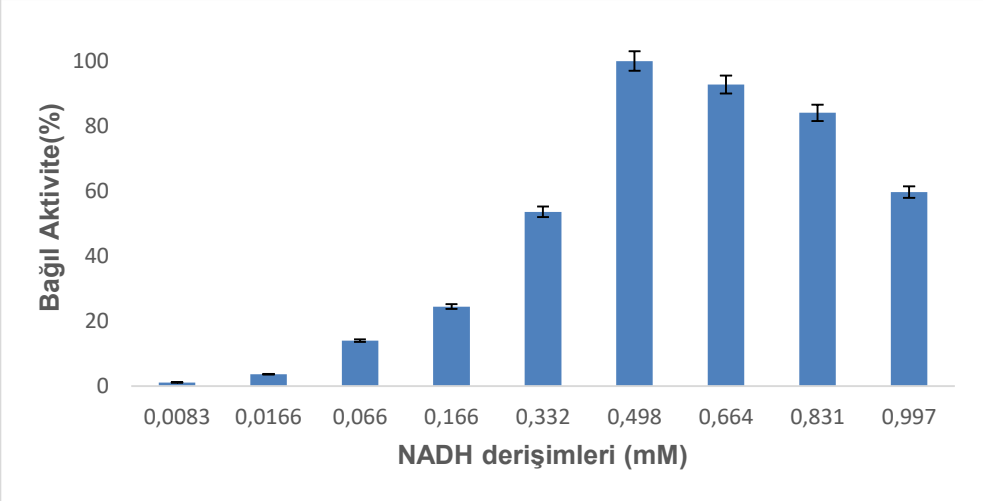
Şekil 4.2. Serbest D-LDH aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi

Serbest D-LDH örneklerinin aktivitelerine sıcaklığın etkisini incelemek için optimum aktivite gösterdiği 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu kullanılarak farklı sıcaklıklarda (25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 ve 60 °C) aktiviteleri ölçülerek belirlenmiştir. Şekil 4.3'ten görüleceği gibi serbest serbest enzimin 30 ile 50 °C aralığında aktivitesinde çok önemli bir fark görülmemiştir. Serbest enzimin aktivitesinin bağıl değerleri 30 °C'de % 97; 35 °C'de % 98; 37 °C'de % 100 ve 40 °C'de % 99; 50 °C'de % 93 olarak hesaplanmıştır. Ancak, serbest D-LDH aktivitesi 60 °C'de % 53'e kadar düşmüştür. Bu sonuçlara göre D-LDH'ın 30 ile 50 °C'de kullanılabilme özelliği vardır. Serbest enzimin aktivitesinin en yüksek (% 100) olduğu 37 °C optimum sıcaklık değeri olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Serbest D-LDH'ın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

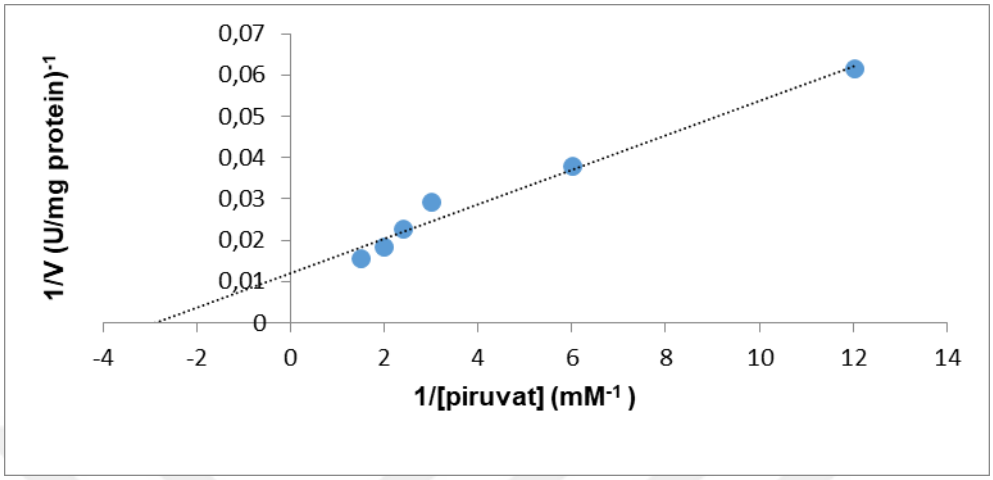
Serbest D-LDH aktivitesi için optimum pH 7,0 ve optimum sıcaklık 37 °C olarak belirlendikten sonra bu koşullarda NADH ve piruvatın reaksiyon oranlarını belirlemek için reaksiyon ortamındaki piruvat derişimi sabit tutularak (0,33 mM) farklı derişimlerde NADH varlığındaki aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bulgular NADH derişimlerine karşılık bağıl aktivite olarak Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Yapılan aktivite ölçümleri sonrasında en yüksek aktivite reaksiyon ortamındaki NADH'ın son derişiminin 0,498 mM olduğu zaman görülmüştür.



Şekil 4.4. Serbest D-LDH'ın aktivitesinin NADH derişime bağlı değişim grafiği

4.1.1.2. Serbest D-LDH'ın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

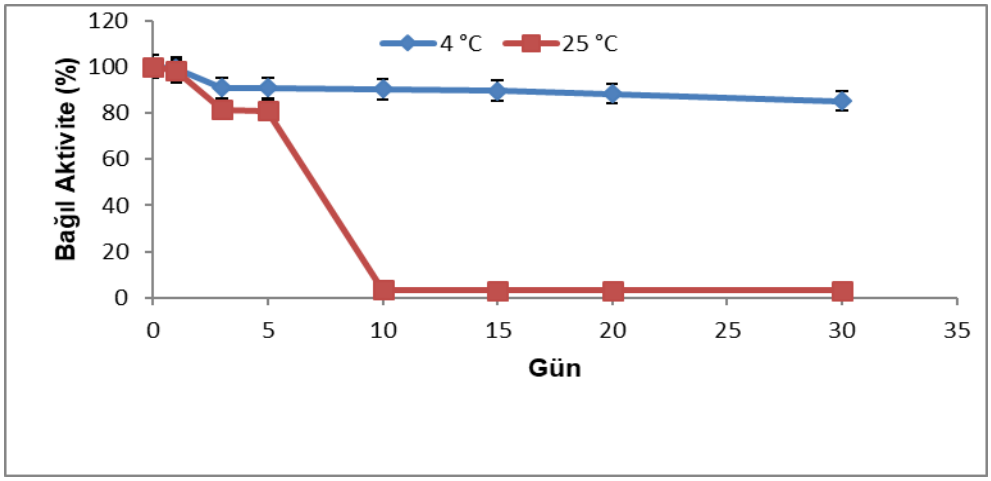
Serbest D-LDH enzimi için belirlenen optimum pH, sıcaklık ve NADH derişimlerinde enzimin aktivitesi 0,083, 0,332, 0,415, 0,498 ve 0,821 mM piruvat son derişimlerinde çözeltiler ile ölçülmüş ve aktivite değerleri Şekil 4.5'te Linewear-Burk grafiğinde gösterilmiştir. Serbest D-LDH için K_m 0,365 mM ve V_{max} ise 86,95 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Serbest enzimin geri dönüşüm sayısı (k_{cat}) 3173 dk^{-1}ve katalitik etkinliği (k_{cat}/K_m) 8693 $dk^{-1}.mM^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. Serbest D-LDH için Lineweaver- Burk grafiği

4.1.1.3. Serbest D-LDH'ın Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

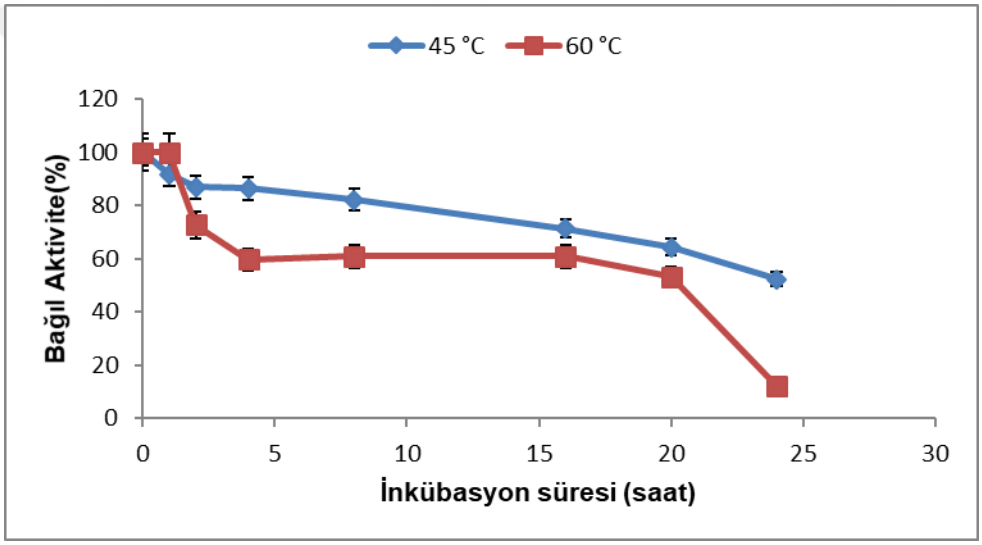
Serbest D-LDH, 0,1 M pH 7,0 tamponundaki çözeltisi 4 °C ve oda sıcaklığında depolanarak Şekil 4.6'da belirlenen günlerde depolama kararlılığının belirlenmesi için aktivitesi ölçülmüştür. Serbest D-LDH, 4 °C'de 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 85'ini korurken, 25 °C'de 10. gün sonunda aktivitesi %3'e düşmüştür.



Şekil 4.6. Serbest D-LDH'ın bağıl aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi

4.1.1.4.Serbest D-LDH'ın Termal Kararlılığının Belirlenmesi

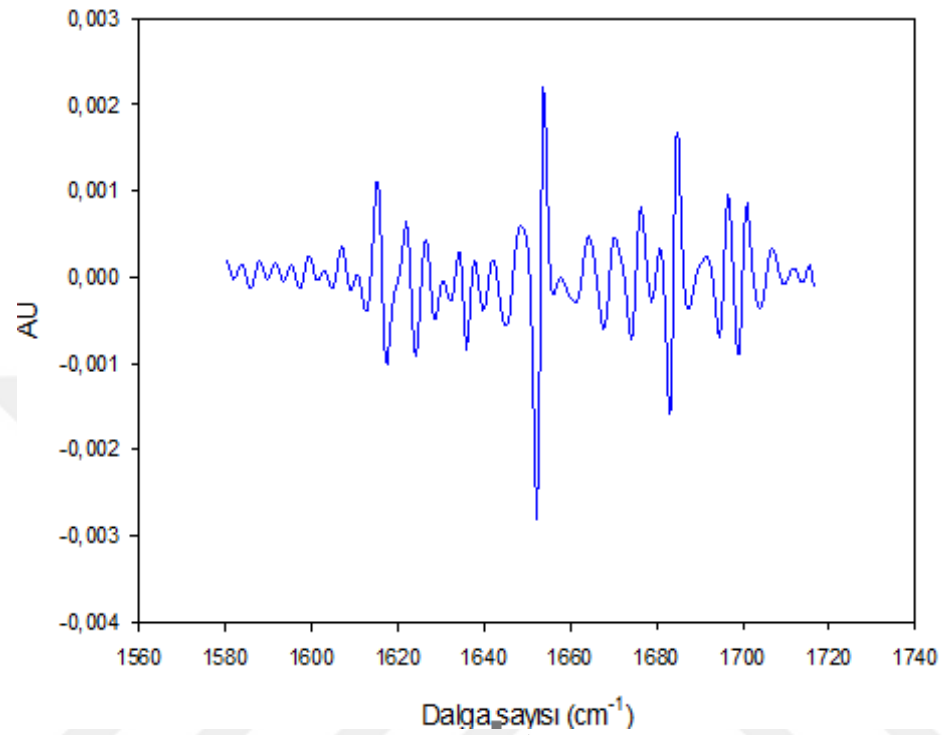
Serbest D-LDH'ın 0,1 M pH 7,0 tamponunda 45 °C ve 60 °C'de Şekil 4.7'de belirlenen zaman aralıklarında termal kararlılığının belirlenmesi için 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Serbest D-LDH, 45 °C'de ilk 4 saat aktivitesinin % 86'sını korurken, 24 saat sonunda bağıl aktivitesi % 52'ye düşmüştür. 60 °C'de ise ilk 4 saat aktivitesinin % 60'ını korurken, 24 saat sonunda bağıl aktivitesi % 12 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7.Serbest D-LDH'ın inkübasyon süresinin aktiviteye bağlı değişimi

4.1.1.5. Serbest D-LDH'ın İkincil Yapısının Analizi

Serbest D-LDH'ın FTIR spektroskopisiyle analizi yapılmış (Şekil 4.8) ve spektrumun ikinci türevi alınarak 1600-1700 cm^{-1}bandında aralığında ikincil yapısı belirlenmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.8. Serbest D-LDH'ın 1600-1700 cm^{-1} aralığındaalınan FT-IR spektrumunun 2.dereceden türevi

Serbest enzimin ikincil yapısında 1624, 1628, 1632, 1635, 1639, 1694 ve 1698 cm^{-1} dalga sayılarında β-tabaka; 1655 cm^{-1} dalga sayısında α-heliks ve 1667, 1674, 1678, 1683 ve 1687cm^{-1} dalga sayısında ise β –dönüşü yapılar olduğu analiz edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Serbest D-LDH için ikincil yapıların dalga sayıları

Dalga sayısı (cm^{-1})	İkincil yapı
-1624,23	β-tabaka
-1628,35	β-tabaka
-1632,24	β-tabaka
-1635,87	β-tabaka
-1639,70	β-tabaka
-1655,91	α-heliks
-1661,07	3_{10}-heliks
-1667,55	β-dönüşü
-1674,18	β-dönüşü
-1678,61	β-dönüşü
-1683,03	β-dönüşü
-1687,59	β-dönüşü
-1694,52	β-tabaka
-1698,94	β-tabaka

4.1.2. D-LDH'ın 3- Aminopropil Silika Jel Desteğe İmmobilizasyonu

Bu tez çalışmasında kullanılan silika jel destek materyali üzerinde 3-aminopropil fonksiyonel grupları bulunduğundan dolayı doğrudan glutaraldehit ile muamele edilmiştir. D-LDH'ın glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent bağlanması sağlanmıştır.

4.1.2.1.İmmobilizasyon için Uygun Enzim Derişimin ve Sürenin Belirlenmesi

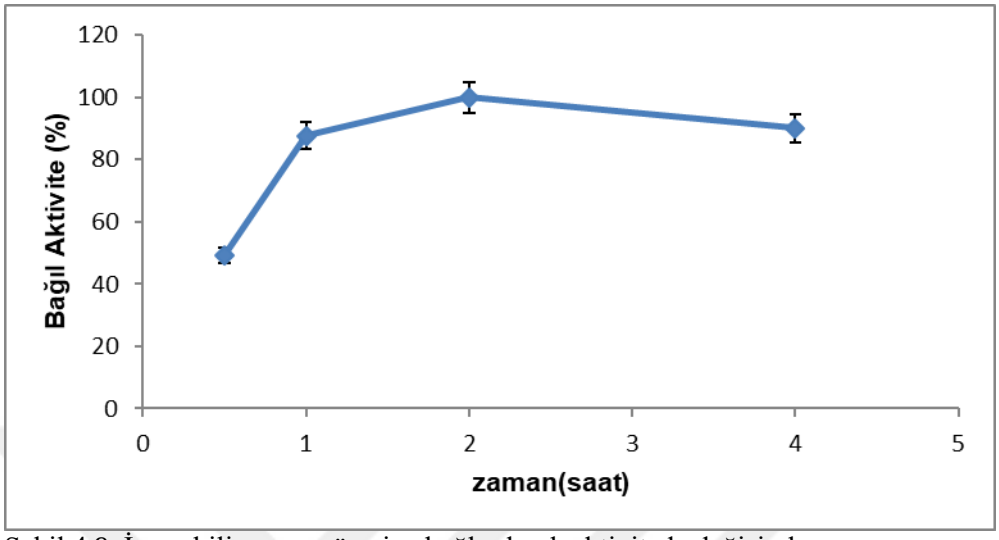
İmmobilizasyon için en uygun derişimin belirlenmesi için 0,5, 1,0 ve 2,0 mg/mLprotein derişimlerindeki enzim çözeltileri kullanılmıştır. Desteğe bağlanan D-LDH miktarı, 100 mg desteğe bağlanan enzim proteinin miktarının, başlangıçta ortama eklenen toplam enzim proteini miktarına oranı (%) olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2 'de gösterilmiştir. Çizelge 4.2'den de görüleceği gibi en yüksek

bağıl spesifik aktivite immobilizasyon ortamındaki toplam protein miktarının 1 mg olduğu enzim çözeltisi kullanıldığı zaman elde edilmiştir.

Çizelge 4.2.100 mg Silika jel desteğe immobilize edilen D-LDH'ın en uygun başlangıç enzim miktarının belirlenmesi

İmmobilizasyon Ortamındakı Toplam Protein Miktarı (**mg**)	100 mg Desteğe Bağlanan Protein Miktarı (**mg**)	Bağıl Spesifik Aktivite **(%)**
0,5	0,15	78
1,0	0,19	100
2,0	0,66	35

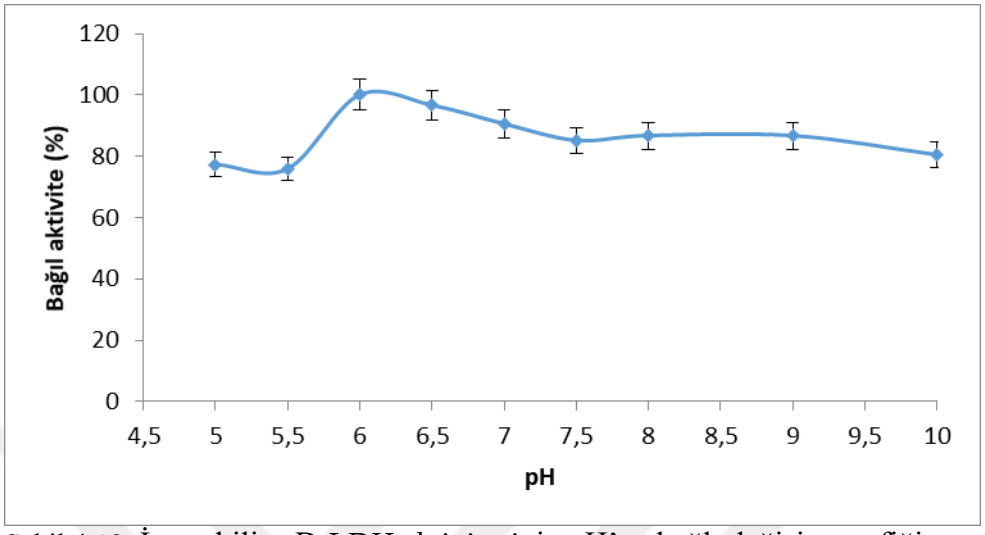
İmmobilizasyon için optimum enzim derişimi belirlendikten sonra serbest enzim 1, 2, 4 ve 6 saat süreyle immobilizasyon ortamında tutulmuş ve sonrasında 100 mg desteğe bağlanan D-LDH'ın immobilizasyon ortamına eklenen toplam D-LDH miktarına oranı bağıl olarak belirlenmiş ve aktiviteler bağıl olarak grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.9'dan görülebileceği gibi 30 dk'da spesifik aktivite % 49; 1 saate % 87; 2 saatte % 100 ve 4 saatte % 90 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre en uygun immobilizasyon süresi 2 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak aktivitede değişimler

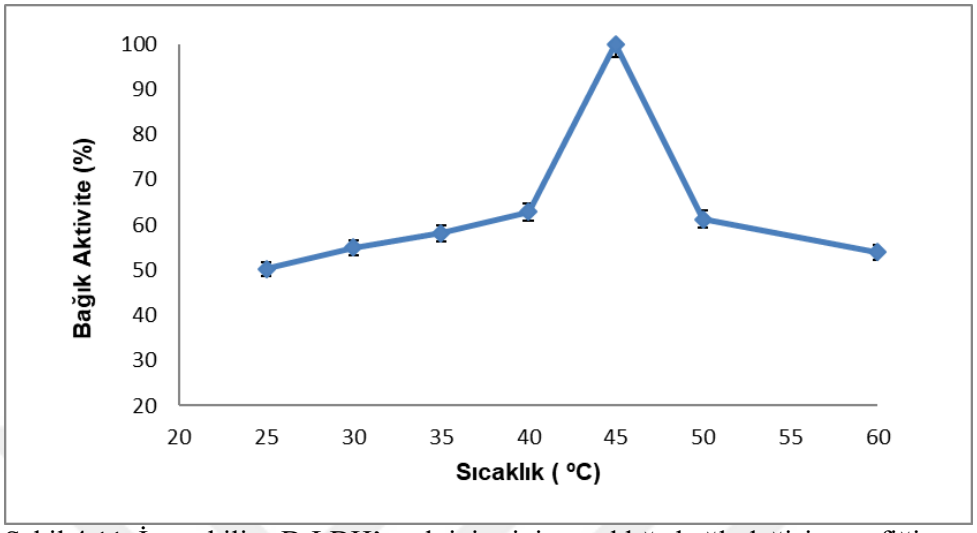
4.1.2.2. İmmobilizeD-LDH'ınAktivitesi için Optimum pH, Sıcaklık ve NADH Derişiminin Belirlenmesi

İmmobilize D-LDH'ın aktivitesine pH'nın etkisini araştırmak için 100 mM derişimindeki farklı pH'larda (5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat; 9,0 ve 10,0 karbonat) tamponlar hazırlanarak 25 °C'de 5 mg immobilize D-LDH kullanılarak aktivite ölçülmüştür. Şekil 4.10'dan görüldüğü gibi immobilize D-LDH'ın geniş bir pH aralığında (pH 5,0 - % 77; pH 5,5 - % 75; pH 6,0 -% 100; pH 6,5 - % 97; pH 7,0 - % 91; pH 7,5 - % 85; pH 8,0 - % 87; pH 9,0 - % 86; pH 10,0- % 80) kullanılabilme özelliği vardır. İmmobilize enzimin aktivitesinin en yüksek (% 100) olduğu pH 6,0 optimum pH değeri olarak belirlemiştir.



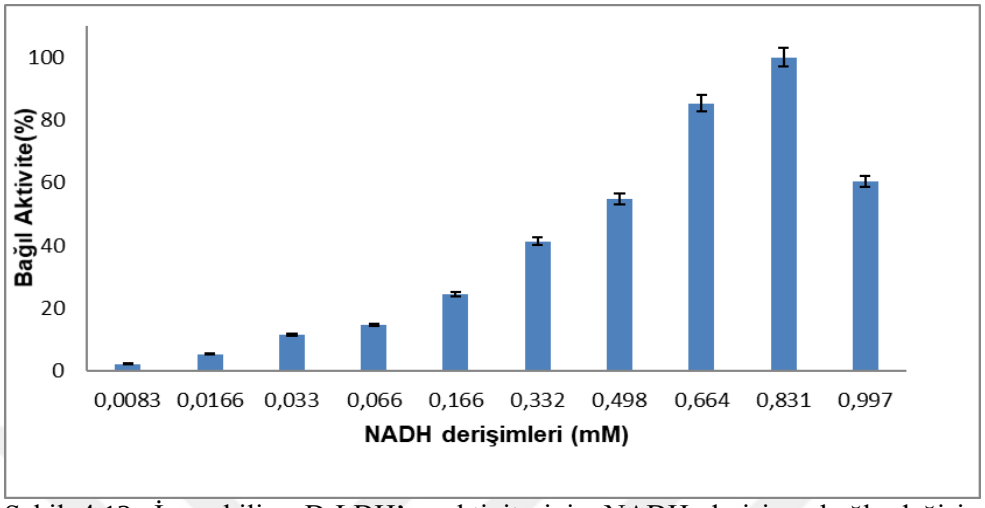
Şekil 4.10. İmmobilize D-LDH aktivitesinin pH'ya bağlı değişim grafiği

İmmobilize enzimin optimum pH değeri 6,0 olarak belirlendikten sonra bu pH değerinde immobilize D-LDH örneklerinin farklı sıcaklıklarda (25, 30, 35, 40, 45, 50 ve 60 °C) aktivitesi ölçülmüş ve Şekil 4.11'de grafiğe geçirilmiştir. İmmobilize enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 45 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. İmmobilize D-LDH'ın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişim grafiği

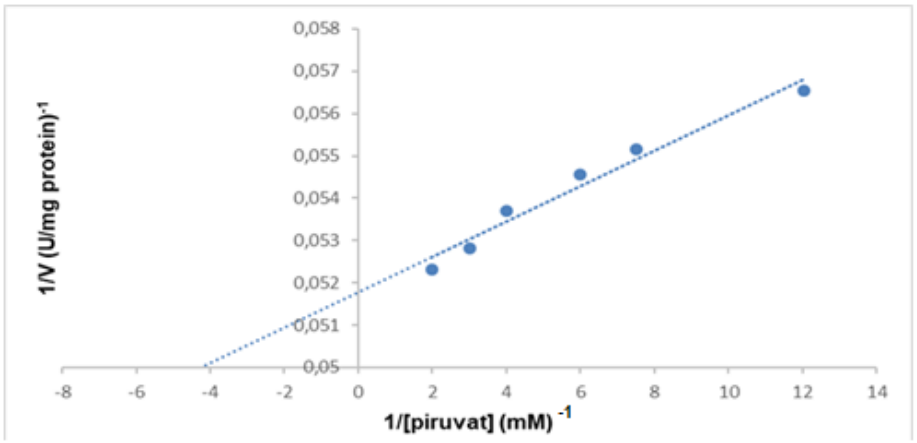
İmmobilize D-LDH'ın optimum pH'sı 6,0 ve optimum sıcaklığı 45 °C olarak belirlendikten sonra bu koşullarda immobilize enzimin aktivitesi için en uygun NADH derişimi belirlemek amacıyla reaksiyon içerisinde 0,33 mM piruvat çözeltisinin derişimi sabit tutularak, farklı derişimlerde (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 ve 30 mM) NADH çözeltileri kullanılmıştır. NADH çözeltilerinden reaksiyon ortamına 100 µL eklenerek aktiviteleri belirlenmiştir. Bulgular Şekil 4.12'deki grafiğe (reaksiyon ortamındaki NADH derişimlerine göre) geçirilmiştir. Optimum aktivite görülen NADH çözeltisinin reaksiyon ortamındaki son derişimi 0,831 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.12. İmmobilize D-LDH'ın aktivitesinin NADH derişime bağlı değişim grafiği

4.1.2.3. İmmobilize D-LDH'ın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

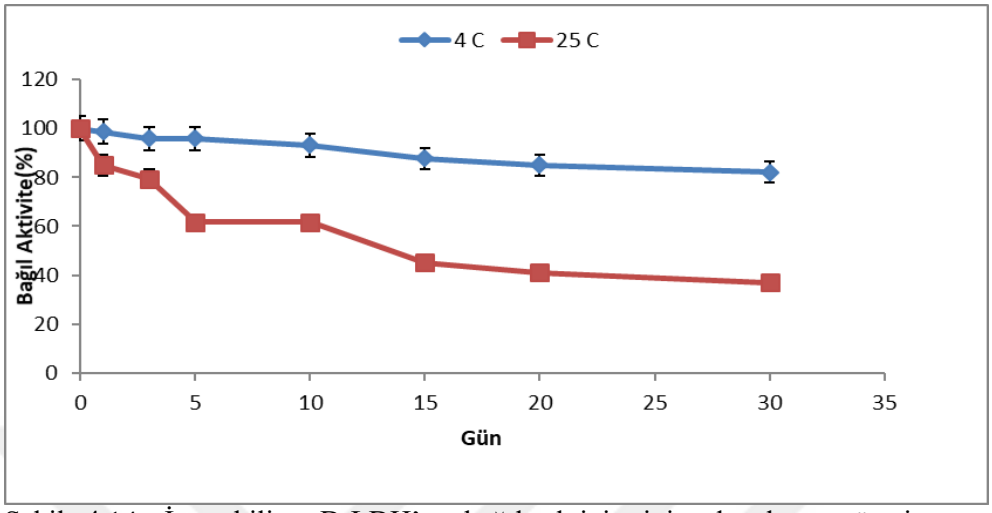
Belirlenen optimum koşullarda (pH 6,0 ve 45 °C), 0,831 mM NADH kullanılarak immobilize D-LDH'ın farklı substrat derişimlerindeki (0,083, 0,133, 0,167, 0,250, 0,333 ve 0,5 mM) piruvat çözeltileriyle aktivitesi ölçülmüş ve Linewear-Burk grafiğinde gösterilmiştir. (Şekil 4. 13). İmmobilize D-LDH için K_m ve V_{max} sonuçları sırasıyla 0,077 mM piruvat ve 19,16 U/mg protein olarak belirlenmiştir. k_{cat} 699 dk^{-1} ve katalitik etkinliği 9082 $dk^{-1}.mM^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.13. İmmobilize D-LDH için Lineweaver- Burk grafiği

4.1.2.4. İmmobilize D-LDH'ın Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

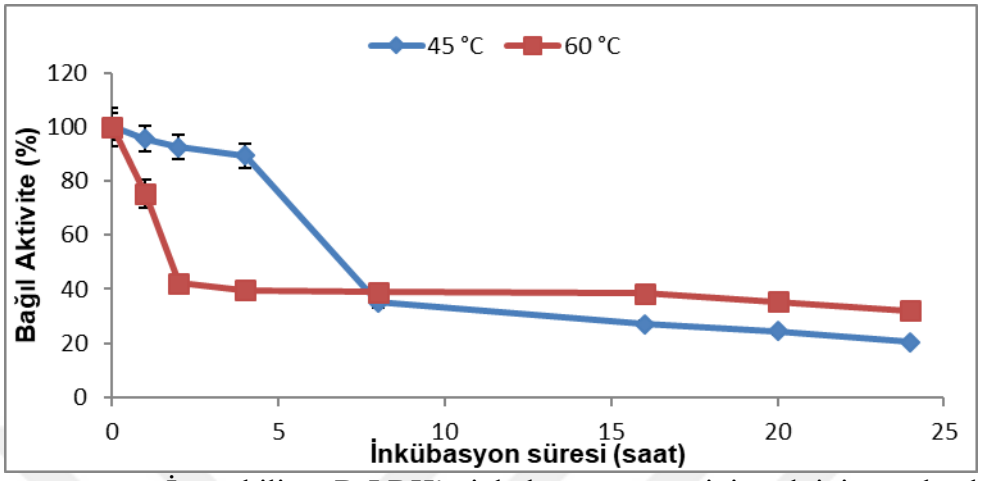
Depolama kararlılığının belirlenmesi için 4 °C ve oda sıcaklığında bekletilen immobilize enzimin belirli zaman aralıklarında aktivitesi ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.14). İmmobilize D-LDH 4 °C ve 25 °C'de 30 günün sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 82 ve % 37 'sini koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.14. İmmobilize D-LDH'ın bağıl aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi

4.1.2.5. İmmobilize D-LDH'ın Termal Kararlılığının Belirlenmesi

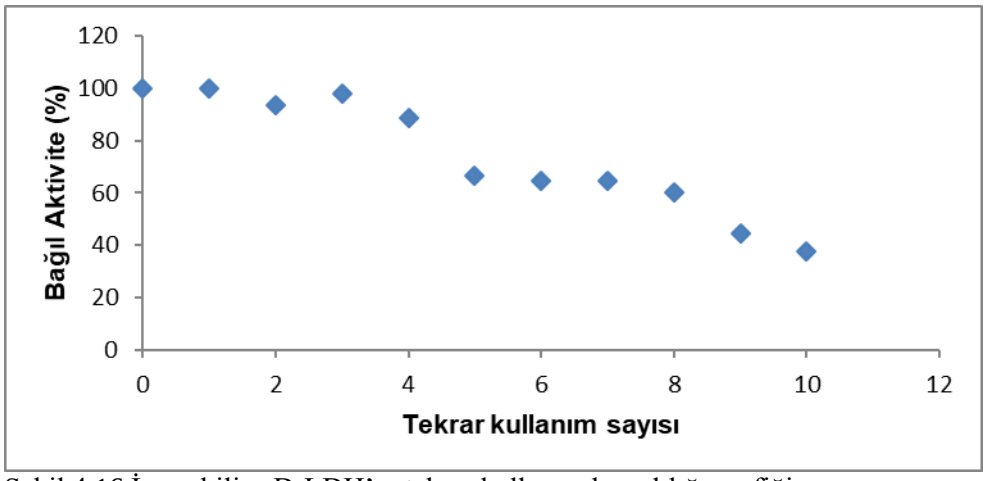
İmmobilize enzim (4 mg) 45 °C ve 60 °C'de Şekil 4.15'de belirlenen zaman aralıklarında termal kararlılığının belirlenmesi için 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve kalan aktiviteleri ölçülmüştür. 45 °C'de ilk 4 saat aktivitesinin % 89'unu korurken 24 saat sonunda bağıl aktivitesi % 20'ye düşmüştür (Şekil 4.15). 60 °C'de ise ilk 4 saat aktivitesinin % 40'ını korurken 24 saat sonunda bağıl aktivitesi % 32 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.15. İmmobilize D-LDH'ınınkübasyon süresinin aktiviteye bağlı değişimi

4.1.2.6. İmmobilize D-LDH'ın Tekrar Kullanım Kararlığının Belirlenmesi

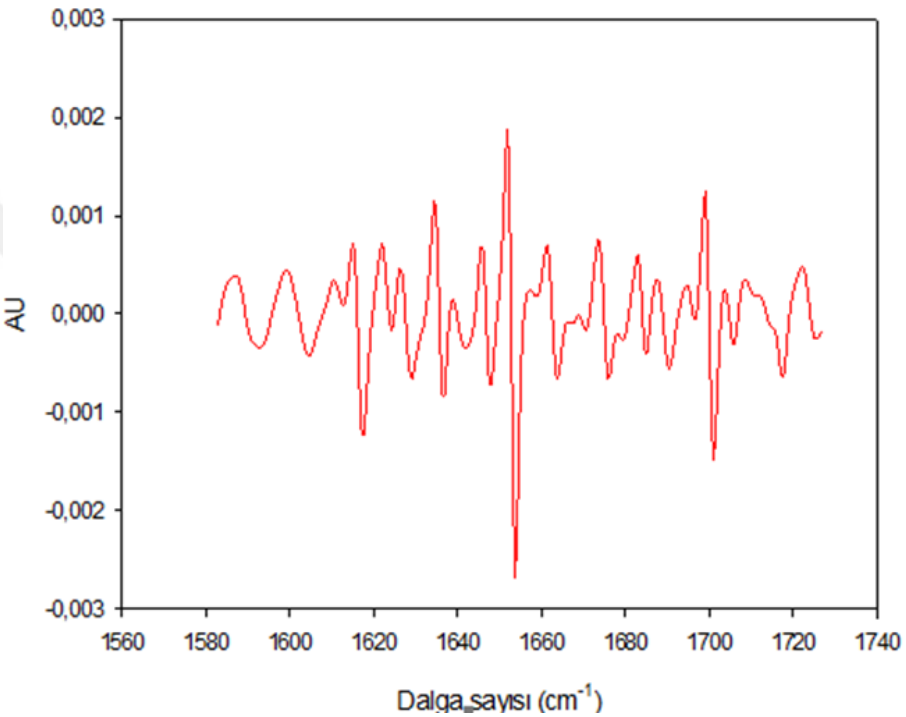
İmmobilize D-LDH'ın aktivitesi için tekrar kullanım kararlılığı kesikli reaktörde gerçekleştirilmiş ve 10 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 38'ini koruduğu belirlenmiştir (şekil 4.16).



Şekil 4.16.İmmobilize D-LDH'ın tekrar kullanım kararlılığı grafiği

4.1.2.7. İmmobilize D-LDH'ın İkincil Yapısının Analizi

İmmobilize D-LDH'ın FT-IR spektroskopisiyle analizi yapılmış (Şekil 4.17) ve spektrumun ikinci türevi alınarak 1600-1700 cm^{-1} dalga sayılarındaki ikincil yapısının pozisyonunu belirlenmiştir (Çizelge 4.3.)



Şekil 4.17. İmmobilize D-LDH'ın 1600-1700 cm^{-1} aralığında alınan FT-IR spektrumunun 2.dereceden türevi

İmmobilize D-LDH'ın ikincil yapısı 1624, 1628, 1636, 1642, 1690 ve 1696 cm^{-1} dalga sayılarında β-tabaka, 1647 cm^{-1}dalga sayısında düzensiz, 1658 cm^{-1} dalga sayısında α-heliks, 1668, 1676, 1679 ve 1684 cm^{-1} dalga sayılarında ise β-dönüşü olarak analiz edilmiştir.

Çizelge 4.3. İmmobilize D-LDH için ikincil yapıların dalga sayıları

Dalga sayısı (cm^{-1})	İkincil yapı
-1624,11	β-tabaka
-1628,96	β-tabaka
-1636,53	β-tabaka
-1642,09	β-tabaka
-1647,77	düzensiz
-1658,06	α-heliks
-1663,62	3_{10}-heliks
-1668,00	β-dönüşü
-1676,05	β-dönüşü
-1679,60	β-dönüşü
-1684,92	β-dönüşü
-1690,48	β-tabaka
-1696,28	β-tabaka

Çizelge 4.4. Serbest ve immobilize D-LDH'ın ikincil yapıları

Serbest D-LDH	İmmobilize D-LDH
β-tabaka	β-tabaka
β-tabaka	β-tabaka
β-tabaka	β-tabaka
β-tabaka	β-tabaka
β-tabaka	düzensiz
α-heliks	α-heliks
3_{10}-heliks	3_{10}-heliks
β-dönüşü	β-dönüşü
β-dönüşü	β-dönüşü
β-dönüşü	β-dönüşü
β-dönüşü	β-dönüşü
β-dönüşü	β-tabaka
β-tabaka	β-tabaka
β-tabaka	-

Çizelge 4.5. Serbest ve İmmobilize D-LDH'ın Karakterizasyonu

	Serbest D-LDH	**İmmobilize D-LDH**
Optimum pH	7,0	6,0
Optimum Sıcaklık (°C)	37	45
Optimum NADH derişimi (mM)	0,498	0,831
K_m (mM)	0,365	0,077
V_{max} (U/mg protein)	86,95	19,16
k_{cat} (dk^{-1})	3173	699
k_{cat}/K_m ($dk^{-1}.mM^{-1}$)	8693	9082
Termal kararlılık (%) (45 °C) (24 saat inkübasyon sonunda)	52	20
Termal kararlılık (%) (60 °C) (24 saat inkübasyon sonunda)	12	32
Depolama Kararlılığı (%) (4 °C) (30 gün sonunda)	85	82
Depolama Kararlılığı (%) (25 °C) (30 gün sonunda)	0	37

4.2. Tartışma

Silika destekler yüksek termal kararlılığı, kimyasal direnci ve iyi mekanik özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonu için en sık kullanılan inorganik destek malzemelerinden birisidir. Geniş yüzey alanı ve gözenekli yapısından dolayı enzim immobilizasyonunda difüzyon sınırlamalarını azaltır (Jesionowski, 2001; Jesionowski ve Krysztafkiewicz, 2002). Silika jel destek materyallerinin yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar enzim bağlanmasını kolaylaştırır. Ayrıca, yüzeyin glutaraldehit veya 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) ile muamele edilmesi desteğin işlevselliğini artırır. Bu tez çalışmasında kullanılan silika jel destek materyali üzerinde 3-aminopropil fonksiyonel grupları bulunduğundan dolayı APTES ile muamele edilmesine gerek duyulmadan glutaraldehit ile muamele edilmiştir. D-LDH'ın glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent bağlanması sağlanmıştır. Çizelge 4.2'den görüldüğü gibi immobilizasyon ortamına eklenen protein miktarı (mg) arttıkça 100 mg desteğe bağlanan protein miktarı da artmıştır. D-LDH'ın immobilizasyonunda en uygun enzim derişiminin seçiminde, sadece bağlanan protein miktarı değil enzimin spesifik aktivite değeri de dikkate alınmıştır.

İmmobilizasyon ortamına 0,5 mg protein eklendiğinde spesifik aktivite 1 mg protein eklendiği zaman elde edilen spesifik aktiviteden daha düşükken, 1 mg protein eklendiğinde elde edilen spesifik aktivite 2 mg protein eklendiğinde elde edilen spesifik aktiviteden daha yüksektir. Bu sonuçlara göre en yüksek spesifik aktivite immobilizasyon ortamına eklenen protein miktarı 1 mg olduğunda elde edilmiştir. Literatürde şimdiye kadar D-LDH'ın aktifleştirilmiş silika jel desteğe immobilizasyonu ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Alagöz ve ark., (2021) *Rhizomucormiehei* lipazı (RML) silika jel desteğe immobilizasyonu için immobilizasyon ortamına farklı miktarlarda RML proteini eklemişler (4, 8 ve 16 mg) ve en yüksek spesifik aktivitenin (% 90) immobilizasyon ortamındaki RML protein miktarının 4 mg olduğunda hesaplandığını bildirmişlerdir. Protein miktarı arttıkça hesaplanan spesifik aktivitenin azaldığını rapor etmişlerdir. Bu durumun, substratın difüzyon sınırlamasının artmasının neden olması olarak açıklamışlardır. (Alagöz ve ark., 2021). Şekil 4.9'dan de görüldüğü gibi D-LDH'ın silika jel desteğe immobilizasyonu için 2 saat sürenin yeterli olduğu hesaplanmıştır. İmmobilizasyon süresi iki katına (4 saat) çıkarıldığında bağıl aktivitenin hafif azaldığı (% 100'den % 90'a) görülmüştür.

Serbest ve immobilize D-LDH örneklerinin aktivitesine pH'nın etkisi incelendiğinde, serbest D-LDH'ın pH 5,0 - 9,0 arasında yüksek aktiviteye sahip olduğu ve pH 10'da aktivitesinin % 60'a düştüğü görülmüştür. Bu çalışmada immobilizasyonun bazik pH'da da (pH 10) aktivitesinin % 80'ini koruduğunu göstermiştir. Serbest D-LDH için optimum aktivitenin hesaplandığı pH 7,0 iken, immobilizasyon sonrasında D-LDH'ın optimum aktivite gösterdiği pH 6,0 olarak hesaplanmıştır. Bu durum glutaraldehit üzerinden kovalent bağlanan D-LDH'ın mikro çevresinin değişmesinin etkisi olarak açıklanabilir (Carlsson, 2014). Literatürde Zaboli ve ark. (2021) *Leuconostoc mesenteroides* kaynaklı D-LDH genini E.coli BL21 suşundan rekombine olarak elde etmişler ve optimum pH'sını 8,0 olarak hesaplamışlardır. Zaboli ve ark. 2019 yılında yayınladıkları başka bir çalışmada D-LDH'ı karbon nanotüp (CNT) üzerine immobilize ettikten sonra

optimum pH değerinin değişmediğini ve immobilize D-LDH için optimum pH değerinin 8,0 olduğunu bildirmişlerdir. Torkzadeh-Mahani ve ark. (2020), rekombine (E. coli BL21suşundan elde edilen) D-LDH'ı metal–organik framework (Fe_3O_4NPs@Ni-MOF) üzerine adsorbe ettikten sonra immobilize D-LDH'ın optimum pH'sını 7,0 ve serbest D-LDH'ın optimum pH'sını 8,0 olarak bildirmişlerdir.

Serbest ve immobilize D-LDH örneklerinin aktivitelerinin sıcaklıkla değişimini incelemek için elde edilen sonuçlarda serbest D-LDH için maksimum aktivite 37 ℃, immobilize D-LDH için ise 45 °C olarak bulunmuştur. Serbest enzimin 20 ile 50 °C aralığında aktivitesinde çok önemli bir fark görülmemiş olmasına karşılık 60 °C'de aktivitesi % 53'e kadar düşmüştür. Literatürde Torkzadeh-Mahani ve ark. (2020), rekombine (E. coli BL21suşundan elde edilen) D-LDH için optimum sıcaklığı 30 °C olarak bildirmişler ve metal–organik framework (Fe_3O_4NPs@Ni-MOF) üzerine adsorbe ettikten sonra immobilize D-LDH'ın 30 - 50 °C arasında enzim aktivitesini koruduğunu ve bu sıcaklık aralığında optimum aktivitesinin azalmadığını bildirmişlerdir. Literatürde Zaboli ve ark. (2021) *Leuconostoc mesenteroides* kaynaklı D-LDH genini E.coli BL21 suşundan rekombine olarak elde ettikleri D-LDH için optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklığı 30 °C olarak hesaplamışlardır. Zaboli ve ark. 2019 yılında yayınladıkları başka bir çalışmada hem serbest D-LDH hem de karbon nanotüp (CNT) üzerine immobilize ettikleri D-LDH için optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklığı 30 °C olarak bildirmişlerdir.

En uygun NADH derişimi serbest D-LDH için 0,498 mM ve immobilize D-LDH için 0,831 mM olarak belirlendikten sonra, farklı derişimlerde piruvat çözeltileri hazırlanarak, kinetik parametreler (K_m, V_{max}, k_{cat}, k_{cat}/K_m) belirlenmiştir. K_m değeri serbest ve immobilize D-LDH'lar için sırasıyla 0,365 mM ve 0,077 mM olarak belirlenirken V_{max} değerleri sırasıyla 86,95 U/mg protein ve 19,16 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. İmmobilizasyon sonrasında maksimum hız değeri

V_{max} yaklaşık 4,5 kat azalmıştır. k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri hesaplandığında serbest D-LDH için sırasıyla 3173 dk^{-1} ve 8693 $dk^{-1}mM^{-1}$ olarak hesaplanırken immobilizasyon sonrasında ise sırasıyla 699 dk^{-1}ve 9082 $dk^{-1}mM^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar literatürde verilen çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Zaboli ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada hem serbest D-LDH hem de karbon nanotüp (CNT) üzerine immobilize ettikleri D-LDH için NADH ve piruvatı substrat olarak kullandıklarında her bir substrat için ayrı ayrı kinetik parametreleri hesaplamışlardır. Belirledikleri optimum koşullarda serbest D-LDH'ın K_m değerinin 0,390 mM olduğunu, immobilizasyon ile birlikte piruvat için K_m değerinin yaklaşık 5 kat arttığını ve 1,92 mM olarak hesaplandığını bildirmişlerdir. A.Gu ve ark. (2014) *L. Coryniformis* subsp. *torquens* KCTC 3535 geninin E.Coli'de sentezlenmesi ile elde edilen D-LDH için Km değerini farklı NADH (10 mM sabit piruvat derişiminde) çözeltiler kullanarak hesaplamışlar ve 0,05 mM olarak bildirmişlerdir. Aynı enzim örneği için k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerini sırasıyla 370.8 s^{-1} ve 7.3×10^3 $mM^{-1}s^{-1}$ olarak hesaplamışlardır. Torkzadeh-Mahani ve ark. (2020), rekombine (*E. coli* BL21 suşundan elde edilen) D-LDH için substrat çözeltisi olarak piruvatın farklı derişimleri kullanılarak hesaplanan K_m ve k_{cat} değerlerini sırasıyla 0,44 mM ve 0,733 $\times$ 10^4 s^{-1} olarak hesaplamışlardır. D-LDH'ı metal–organik framework (Fe_3O_4NPs@Ni-MOF) üzerine adsorbe ettikten sonra immobilize D-LDH'ın piruvata ilgisinin yaklaşık 1,75 kat azaldığı ve 0,77 mM olduğunu, k_{cat}/K_m değerinin ise 0.76×10^4 s^{-1}olduğunu yayınlamışlardır.

Endüstriyel uygulamalarda enzimlerin termal kararlılıkları önemlidir. Şekil 4.7 ve Şekil 4.15'den de görüldüğü gibi serbest ve immobilize D-LDH örneklerinin termal kararlılıklarının 45 ve 60 °C sıcaklıklarda farklı inkübasyon sürelerinde hesaplanan bağıl aktiviteleri immobilize D-LDH'ın serbest D-LDH'a göre 60 °C'de daha yüksek termal kararlılığa sahip olduğunu göstermektedir. Hesaplanan bağıl aktivite değerlerine göre immobilize serbest ve immobilize D-LDH'ın 45 °C'de 4 saat inkübasyon süresinin sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 90 ve %

89'unu; 24 saat inkübasyon süresi sonunda ise % 52 ve % 20'sini koruduğu belirlenmiştir. 60 °C'de 24 saat inkübasyon süresinin sonunda sırasıyla serbest ve immobilize D-LDH başlangıç aktivitesinin% 12 ve % 32'sini koruduğu belirlenmiştir. Çalışmalarında Zaboli ve ark. (2019) serbest ve CNT üzerine immobilize D-LDH'ın 30-70 °C sıcaklık aralığındaki termal kararlılıklarını incelemişler ve herbir sıcaklık değerinde 10 dk beklettikten sonra bağıl aktivitelerini hesaplamışlardır. 70 °C'de 10 dk inkübasyon sonrasında serbest D-LDH başlangıç aktivitesinin sadece % 6'sını korurken CNT'ye immobilize edilen D-LDH ise % 24'ünü koruyabildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca sıcaklık artışı ile birlikte inkübe edilen serbest enzimin yapısının denature olduğunu ve aktivitesinin azaldığını belirtirken, sıcaklığın bu olumsuz etkisinin immobilizasyon ile azalabileceğini bildirmişlerdir. Torkzadeh-Mahani ve ark. (2020), rekombine (E. coli BL21 suşundan elde edilen) D-LDH'ı 40 °C'de inkübe etmişler ve 60 dakika sonunda başlangıç aktivitesinin sadece % 7'sini korurken, (Fe_3O_4NPs@Ni-MOF) üzerine adsorbe edilen D-LDH'ın ise % 50'sinden fazlasını koruduğunu hesaplamışlardır.

Şekil 4.6 ve 4.14'ten görüldüğü gibi serbest ve immobilize D-LDH'lar 4 °C ve 25 °C'de 30 gün inkübe edilerek depolama süresine ve koşullarına bağlı olarak aktivitelerindeki değişim verilmiştir. 10 gün depolamanın sonunda 25 °C'de serbest LDHaktivitesini tamamen kaybederken, immobilize D-LDH başlangıç aktivitesinin % 90'ından fazlasını korumuş ve 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 37'sini korumuştur. Zaboli ve ark. (2019) 25 °C'de depolanan CNT'ye immobilize D-LDH'ın 10 gün sonrasında başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 80'inin koruduğunu bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında immobilize D-LDH'ın kesikli reaktördeki tekrar kullanımı ile ilgili bulgular Şekil 4.18'de verilmiştir. Şekil 4.18'de de görüldüğü gibi silika jele immobilize D-LDH'ın ilk dört kullanımda başlangıç aktivitesinin 90'ını, 10 kullanım sonunda ise başlangıç aktivitesinin % 38'ini koruduğu görülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Serbest enzimin geniş bir pH aralığında (5,0 - 9,0) yüksek aktivite gösterdiği, pH 9'da % 97 oranında aktif olduğu belirlenmiştir. Enzimin en yüksek aktiviteye (%100) sahip olduğu pH 7,0 optimum pH olarak belirlenmiştir. Enzimin 20 – 50 °C arasında aktivitesinde çok önemli bir fark olmamakla beraber en yüksek (% 100) aktivitenin 37 °C'de ölçülmüş olması nedeniyle optimum sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiştir. Serbest enzimin K_m değeri 0,365 mM, V_{max} değeri 86,95 U/ mg protein, k_{cat} değeri 3173 dk^{-1} ve katalitik etkinliği 8693 $dk^{1}.mM^{-1}$ olarak belirlenmiştir.
2. D-laktat dehidrogenaz enziminin, 3-aminopropil fonksiyonel grubuna sahip silika jele glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon ortamına eklenen protein miktarı arttıkça 100 mg destek üzerine eklenen protein miktarı artmıştır. Ancak immobilize enzimin spesifik aktivitesi en yüksek (% 100) olduğu değer immobilizasyon ortamındaki protein miktarı 1 mg olduğunda elde edilmiştir. Optimum immobilizasyon süresi 2 saat olarak belirlenmiştir.
3. İmmobilize D-LDH'ın geniş bir pH (5,0 - 10,0) aralığında kullanılabilme özelliği vardır. İmmobilize enzimin aktivitesinin en yüksek (% 100) olduğu pH 6,0 optimum pH değeri olarak belirlemiştir. Optimum sıcaklık ise 45 °C olarak belirlenmiştir. K_m değeri 0,077 mM ve V_{max} değeri 19,16 U/ mg protein, k_{cat} değeri 699 dk^{-1} ve katalitik etkinliği 9082 $dk^{1}.mM^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre D-LDH'ın immobilizasyon sonrası katalitik etkinliği 1,05 katına çıkmıştır.

4. Serbest enzimin depolama kararlılığı kalan aktivitesine göre 4 °C'de 30. gün sonunda % 85, 25 °C'de ise 10. gün sonunda % 3 olarak belirlenmiştir.
5. İmmobilize enzimin depolama kararlılığı kalan aktivitesine göre 4 °C'de 30 günün sonunda % 82, 25 °C'de ise % 37 olarak belirlenmiştir.
6. Serbest enzimin termal kararlığı kalan aktivitesine göre 45 °C'de 24 saat sonunda % 52 ve 60 °C'de % 12; immobilize enzimin ise 45 °C'de 24 saat sonunda % 32 ve 60 °C'de % 20 olarak belirlenmiştir.
7. İmmobilize enzimin kesikli reaktörde 10 tekrar kullanım sonrası aktivitesini % 38 oranında koruduğu belirlenmiştir.
8. Serbest ve immobilize D-LDH'ın FTIR spektrumlarından elde edilen sonuçlarda serbest enzimin ikincil yapısında 7 tane β-tabaka, 1 tane α-heliks, 1 tane 3_{10} heliks ve 5 tane β-dönüşü bulunmaktadır. İmmobilize enzimde ise 6 tane β-tabaka, 1 tane düzensiz, 1 tane α-heliks, 1 tane 3_{10} heliks ve 4 tane β-dönüşü bulunmaktadır. Bu da enzimin immobilizasyona bağlı olarak ikincil yapısında konformasyonel bir değişikliğin olduğunu göstermektedir.

5.2. Öneriler

1. İmmobilizasyon sonrası immobilize enzimin katalitik etkinliğinin serbest enzimin katalitik etkinliğine oranı 1,05 olduğundan D-LDH'ın 3-aminopropil fonksiyonel grubu içeren silika jele immobilizasyonu uygun bir yöntem olarak önerilebilir.
2. Aminopropil fonksiyonel grubu içeren silika jel desteğine immobilize edilen D-LDH enziminin enantiyo saf D-Laktat sentezlenmesindeki kullanımı araştırılabilir.

3. Serbest ve immobilize enzimlerin farklı pH'larda ve derişimlerde tampon çözeltileri, gliserol çözeltisi gibi farklı çözeltiler içerisindeki depolama kararlılıkları araştırılabilir.
4. NADH yerine NADPH kullanılarak koenzimin enzimin aktivitesine etkisi araştırılabilir.
5. D-LDH ve NADH'ın ko-immobilizasyonu denenebilir.

KAYNAKLAR

Alagöz, D., 2012. Hidroksilnitril Liyaz'ın Çeşitli Meyve Çekirdeklerinden Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1431.

Alagöz, D., Toprak, A., Yildirim, D., Tükel, S.S., Fernandez-Lafuente, R., 2021. Modified silicates and carbon nanotubes for immobilization of lipase from *Rhizomucor miehei*: Effect of support and immobilization technique on the catalytic performance of the immobilized biocatalysts. Enzyme and Microbial Technology, 144: 109739.

Alagöz, D., Tükel, S.S., Yildirim, D., 2016. Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity. International Journal of Biological Macromolecules, 87: 426-432.

Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J., Ballesteros, A., 2006. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. TRENDS in Biotechnology, 24: 281-287.

Aldhahri, M., Almulaiky, Y.Q., El-Shishtawy, R.M., Al-Shawafi, W.M., Salah, N., Alshahrie, A., Alzahrani, H.A., 2021. Ultra-thin 2D CuO nanosheet for HRP immobilization supported by encapsulation in a polymer matrix: characterization and dye degradation. Catalysis Letters, 151: 232-246.

Alptekin, Ö., 2009. Katalazın Eupergit, Florosil ve Cam desteklere Kovalent Olarak İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1225.

Alptekin, O., Tükel, S.S., Yıldırım, D., Alagöz, D., 2009. Characterization and properties of catalase immobilized onto controlled pore glass and its application in batch and plug-flow type reactors. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58: 124-131.

BM, B., LG, R., Porath, J., 1994. Immobilization of beta-galactosidase on metal-chelate-substituted gels. Biotechnology and Applied Biochemistry, 19: 217-231.

Boratyński, J., Żal, T., 1990. Colorimetric micromethods for glutaraldehyde determination by means of phenol and sulfuric acid or phenol and perchloric acid. Analytical Biochemistry, 184: 259-262.

Cabral, J., Kennedy, J., 1991. Covalent and coordination immobilization of proteins. Bioprocess Technology, 14: 73-138.

Cao, H., He, J., Deng, L., Gao, X., 2009. Fabrication of cyclodextrin-functionalized superparamagnetic Fe3O4/amino-silane core–shell nanoparticles via layer-by-layer method. Applied Surface Science, 255: 7974-7980.

Cao, L., 2005. Adsorption-based Immobilization. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany, Weinheim.

Carlsson, N., Gustafsson, H., Thörn, C., Olsson, L., Holmberg, K., Åkerman, B., 2014. Enzymes immobilized in mesoporous silica: a physical–chemical perspective. Advances in Colloid and Interface Science, 205: 339-360.

Chaubey, A., Gerard, M., Singhal, R., Singh, V., Malhotra, B., 2001. Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole–polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors. Electrochimica Acta, 46: 723-729.

Datta, R., Tsai, S.-P., Bonsignore, P., Moon, S.-H., Frank, J.R., 1995. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS Microbiology Reviews, 16:b221-231.

Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S., 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 Biotech 3, 1-9.

David, A.E., Yang, A.J., Wang, N.S., 2011. Enzyme stabilization and immobilization by sol-gel entrapment, In: Enzyme Stabilization and Immobilization. Springer,. 49-66.

Demircan, M., Cetin, S., Uguralp, S., Karaman, A., Sezgin, N., Gozukara, E.M., 2004. Plasma D-lactic acid level: a useful marker to distinguish perforated from acute simple appendicitis. Asian Journal of Surgery, 27: 303-305.

Djebbi, M., Charradi, K., Amara, A.B.H., Rhaiem, H.B., 2014. Immobilization of LDh enzyme on Layered Double Hydroxides: Structural and morphological modification, In: 2014 International Conference on Composite Materials & Renewable Energy Applications (ICCMREA), 1-7.

Dwevedi, A., 2016. Enzyme Iimmobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment. Springer.

Garvie, E.I., 1980. Bacterial lactate dehydrogenases. Microbiological Reviews, 44:106.

Govardhan, C.P., 1999. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. Current Opinion in Biotechnology, 10: 331-335.

Gu, S.-A., Jun, C., Joo, J.C., Kim, S., Lee, S.H., Kim, Y.H., 2014. Higher thermostability of l-lactate dehydrogenases is a key factor in decreasing the optical purity of d-lactic acid produced from *Lactobacillus coryniformis*. Enzyme and Microbial Technology, 58: 29-35.

Guardado, A.L.P., Druon-Bocquet, S., Belleville, M.P., Sanchez-Marcano, J., 2021. A novel process for the covalent immobilization of laccases on silica gel and its application for the elimination of pharmaceutical micropollutants. Environmental Science and Pollution Research International, 28: 25579-25593.

Guisan, J.M., 2006. Immobilization of Enzymes and Cells. Springer.

Ishida, N., Suzuki, T., Tokuhiro, K., Nagamori, E., Onishi, T., Saitoh, S., Kitamoto, K., Takahashi, H., 2006. D-Lactic acid production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101: 172-177.

Jackson, E., López-Gallego, F., Guisan, J., Betancor, L., 2016. Enhanced stability of L-lactate dehydrogenase through immobilization engineering. Process Biochemistry, 51: 1248-1255.

Jesionowski, T., 2001. Preparation of colloidal silica from sodium metasilicate solution and sulphuric acid in emulsion medium. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 190: 153-165.

Jesionowski, T., Krysztafkiewicz, A., 2002. Preparation of the hydrophilic/hydrophobic silica particles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 207: 49-58.

Jia, B., Pu, Z.J., Tang, K., Jia, X., Kim, K.H., Liu, X., Jeon, C.O., 2018. Catalytic, computational, and evolutionary analysis of the d-lactate dehydrogenases responsible for D-lactic acid production in lactic acid bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66: 8371-8381.

Kopperschläger, G., Kirchberger, J., 1996. Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 684: 25-49.

Li, L., Eom, H.-J., Park, J.-M., Seo, E., Ahn, J.E., Kim, T.-J., Kim, J.H., Han, N.S., 2012. Characterization of the major dehydrogenase related to D-lactic acid synthesis in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. mesenteroides ATCC 8293. Enzyme and Microbial Technology, 51,:274-279.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.

O'driscoll, K., 1976. Techniques of enzyme entrapment in gels, In: Methods in Enzymology. Elsevier, 169-183.

Patel, S.R., Yap, M.G., Wang, D.I., 2009. Immobilization of L-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds. Biochemical Engineering Journal, 48:13-21.

Rahman, M., Shiddiky, M.J., Rahman, M.A., Shim, Y.-B., 2009. A lactate biosensor based on lactate dehydrogenase/nictotinamide adenine dinucleotide (oxidized form) immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film. Analytical Biochemistry, 384: 159-165.

Rishi, L., Yaqoob, M., Asghar, M., Nabi, A., Munawar, N., 2016. Flow injection determination of lactate using immobilized lactate dehydrogenase enzyme with tris (2, 2′-Bipyridyl) Ruthenium (III) chemiluminescence detection. Analytical Letters, 49: 654-664.

Saengdee, P., Chaisriratanakul, W., Bunjongpru, W., Sripumkhai, W., Srisuwan, A., Jeamsaksiri, W., Hruanun, C., Poyai, A., Promptmas, C., 2015. Surface modification of silicon dioxide, silicon nitride and titanium oxynitride for lactate dehydrogenase immobilization. Biosensors and Bioelectronics, 67: 134-138.

Schoevaart, R., Wolbers, M., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A., Van Rantwijk, F., Van Der Wielen, L., Sheldon, R., 2004. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). Biotechnology and Bioengineering, 87: 754-762.

Sheldon, R., Schoevaart, R., Van Langen, L., 2005. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). Biocatalysis and Biotransformation, 23: 141-147.

Smutok, V., Dmytruk, K.V., Karkovska, M.I., Schuhmann, W., Gonchar, M.V., Sibirny, A.A., 2014. D-lactate-selective amperometric biosensor based on the cell debris of the recombinant yeast Hansenula polymorpha. Talanta, 125: 227-232.

Straub, F.B., 1940. Crystalline lactic dehydrogenase from heart muscle. Biochemical Journal, 34: 483.

Sulaiman, S., Mokhtar, M.N., Naim, M.N., Baharuddin, A.S., Sulaiman, A., 2015. A review: potential usage of cellulose nanofibers (CNF) for enzyme

immobilization via covalent interactions. Applied Biochemistry and Biotechnology, 175: 1817-1842.

Torkzadeh-Mahani, M., Zaboli, M., Barani, M., Torkzadeh-Mahani, M., 2020. A combined theoretical and experimental study to improve the thermal stability of recombinant D-lactate dehydrogenase immobilized on a novel superparamagnetic Fe3O4NPs@ metal–organic framework. Applied Organometallic Chemistry, 34.

Tran, D.N., Balkus Jr, K.J., 2011. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. ACS Catalysis, 1: 956-968.

Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., Yu, S., 2015. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. Nature Protocols, 10: 382-396.

Yıldırım, D., 2010.*MucorMiehei* ve *Pseudomonas* Sp. Lipazlarının Aktifleştirilmiş Florosil Desteğe Glutaraldehit ve Polisüksinimid Üzerinden Ayrı Aytı İmmobilizasyonu ve İmmobilize Lipazın Esterleşme Reaksiyonlarında Kullanımı. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana,1302

Zaboli, M., Raissi, H., Zaboli, M., Farzad, F., Torkzadeh-Mahani, M., 2019. Stabilization of D-lactate dehydrogenase diagnostic enzyme via immobilization on pristine and carboxyl-functionalized carbon nanotubes, a combined experimental and molecular dynamics simulation study. Archives of Biochemistry and Biophysics, 661: 178-186.

Zaboli, M., Saeidnia, F., Zaboli, M., Torkzadeh-Mahani, M., 2021. Stabilization of recombinant D-Lactate dehydrogenase enzyme with trehalose: Response surface methodology and molecular dynamics simulation study. Process Biochemistry, 101: 26-35.

Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowski, T., Pinelo, M., 2018. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. Catalysts, 8: 92.

Zhao, J., Wang, Y., Luo, G., Zhu, S., 2010. Covalent immobilization of penicillin G acylase on aminopropyl-functionalized mesostructured cellular foams. Bioresource Technology, 101: 7211-7217.

ÖZGEÇMİŞ

İlköğrenimini D.S.İ Baraj İlkoöğretim Okulu'na tamamladıktan sonra lise öğremine Adana Ticaret Odası Anadolu Lisesi'nde devam etti. 2010 yılında Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya bölümü'nde üniversite eğitimine başladı ve 2017 yılında mezun oldu. 2018 yılında Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimine, 2020 yılında ise Biyokimya Anabilim dalında araştırma görevliliğine başladı ve hala görevini sürdürmektedir.