170562

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Gül ÖZYILMAZ

GLUKOZ OKSİDAZ VE KATALAZIN AYRI AYRI VE BİRLİKTE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2005

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUKOZ OKSİDAZ VE KATALAZIN AYRI AYRI VE BİRLİKTE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

GÜL ÖZYILMAZ

DOKTORA

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 04/03/2005 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....	İmza.....	İmza.....
Prof.Dr S.Seyhan TÜKEL	Prof.Dr Levent KAYRIN	Doç. Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

İmza.....	İmza.....
Doç.Dr Mahmut ÇALIŞKAN	Yrd. Doç.Dr.Ramazan BİLGİN
ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No : 886

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ 1823 FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi ve DPT Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No:FBE.2002.D.219 (Ç.Ü) ve 2003 K120 320 G (DPT)

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

GLUKOZ OKSİDAZ VE KATALAZIN AYRI AYRI VE BİRLİKTE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Gül ÖZYILMAZ

Çukurova Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof.Dr. S.Seyhan TÜKEL

Yıl : 2005 Sayfa : 158

Jüri : Prof.Dr. S.Seyhan TÜKEL

Prof. Dr. Levent KAYRIN

Doç.Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

Doç.Dr. Mahmut ÇALIŞKAN

Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN

Glukoz oksidaz (GOD), katalaz (CAT) ve glukoz oksidaz-katalaz (GOD-CAT) glutaraldehit ile aktifleştirilmiş florisil desteğine belirlenen en uygun koşullarda immobilize edilmiş, GOD-CAT ko-immobilizasyonunda birlikte ve sıralı immobilizasyon olmak üzere 2 farklı yöntem uygulanmıştır. İmmobilize GOD, immobilize CAT ve ko-immobilize GOD-CAT enzimlerinin katalitik etkinlikleri sırasıyla 2,2. 10^3, 4,8.10^4 ve 2,8.10^3 $s^{-1}.M^{-1}$olarak bulunmuş ve GOD'nin CAT ile ko-immobilize edilmesinin H_2O_2 inaktivasyonunun engellenmesinde etkili olduğu ve GOD aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca termal kararlılıkları, farklı ortamlarda depolama kararlılıkları ve tekrar kullanım kararlılıkları araştırılarak serbest enzim ile karşılaştırılmıştır. GOD-CAT'ın birlikte veya sıralı ko-immobilizasyonu katalitik etkinlik ve maliyet açısından karşılaştırıldığında sıralı immobilizasyonun daha etkin ve ekonomik olduğu saptanmıştır. İmmobilize GOD, immobilize GOD + immobilize CAT karışımı ve ko-immobilize GOD-CAT enzimleri kesikli, geri beslemeli ve sürekli dolgu yataklı kolon reaktörlerde kullanılmış ve her üç reaktör sisteminde de en yüksek etkinliği ko-immobilize GOD-CAT'ın gösterdiği, her üç enzim sistemi için en yüksek verimliliğin ise geri beslemeli dolgu yataklı kolon reaktöre ait olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glukoz oksidaz, katalaz, florisil, kovalent immobilizasyon, ko-immobilizasyon

ABSTRACT

PhD THESIS

CHARACTERIZATION OF IMMOBILIZED GLUCOSE OXIDASE, IMMOBILIZED CATALASE AND CO-IMMOBILIZED GLUCOSE OXİDASE-CATALASE

Gül ÖZYILMAZ

University Of Çukurova

Institute of Natural and Applied Sciences

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor: Prof.Dr. S.Seyhan TÜKEL

Year: 2005 Pages: 158

Jury : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL

Prof. Dr. Levent KAYRIN

Assoc. Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

Assoc. Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN

Assist. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN

Glucose oxidase (GOD), catalase (CAT) and glucose oxidase-catalase (GOD-CAT) were covalently immobilized onto florisil activated with glutaraldehyde at predetermined optimal immobilization conditions. GOD and CAT were co-immobilized either sequentially or simultaneously. Maximum catalytic efficiencies of the immobilized GOD, immobilized CAT and co-immobilized GOD-CAT were determined as 2.2x 10^3, 4.8x10^4 ve 2.8x10^3 $s^{-1}.M^{-1}$, respectively. The higher catalytic efficiency observed with the dual enzyme system shows the advantage and efficiency of the GOD-CAT co-immobilization indicating the protective role of CAT on GOD against H_2O_2 inhibition. Thermal stabilities, storage stabilities at different conditions and reusability of preparations were also investigated. The catalytical efficiencies and costs of sequentially or simultaneously co-immobilized GOD-CAT systems were compared, and sequential co-immobilization was found to be more effective and cheap. Immobilized GOD, the mixture of immobilized GOD + immobilized CAT and co-immobilized GOD-CAT enzyme samples were used at batch, recycled and continuous packed bed column reactors. It was determined that co-immobilized GOD-CAT had the highest catalytic efficiency at all reactors and recycled packed bed reactor was better then the others with the highest productivities obtained for the three enzyme systems.

Keywords: Glucose oxidase, catalase, florisil, covalent immobilization, co-Immobilization

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince sadece tez değil her konuda çok büyük destek gördüğüm, görüş ve bilgi birikiminden yararlandığım değerli Danışmanım Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL'e gösterdiği sabır ve iyi niyet için sonsuz teşekkür ederim. Tezim süresince yapıcı eleştrileri ve çok değerli önerileriyle bana katkıda bulunan tez izleme komitesi üyeleri sayın hocam Prof. Dr. Levent KAYRIN ve sayın hocam Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda hiçbir yardımı ve manevi desteği benden esirgemeyen sayın Prof. Dr. Birgül YAZICI'ya ve sayın Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince sabır, ilgi ve desteğini benden esirgemeyen eşim Tuncay Özyılmaz'a, tezimin her aşamasında yardımlarını ve dostluklarını gördüğüm Özlem Alptekin, Deniz Yıldırım, Dilek Alagöz, Işıl Sema Dinçkurt ve Hasan Karadağ'a teşekkür ederim.

Bir gülüşüyle bana bütün yorgunluğumu unutturan, hayatımın en tatlı parçası olan sevgili oğlum Polat'a, beni bugünlere getiren, tezim süresince çok büyük destek gördüğüm, oğlumu emanet ettiğim çok sevgili anneme, babama ve kardeşlerime şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I

ABSTRACT II

TEŞEKKÜR III

İÇİNDEKİLER IV

ÇİZELGELER DİZİNİ VIII

ŞEKİLLER DİZİNİ IX

SİMGELER VE KISALTMALAR XVI

1. GİRİŞ 1

1.1.Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri 2

1.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri 3

1.1.1.1. Bağlama 3

1.1.1.2. Tutuklama Yöntemleri 7

1.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon 8

1.1.3. İmmobilize Edilen Enzimden Beklenilen Özellikler 9

1.1.4.İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması 10

1.2. Glukoz oksidaz (GOD) 10

1.2.1.GOD'nin Genel Özellikleri 11

1.2.2. GOD'nin Reaksiyon Mekanizması 12

1.2.3. GOD'nin Kullanım Alanları 17

1.3. Katalaz (CAT) 20

1.3.1. CAT'ın Genel Özellikleri 21

1.3.2. CAT'ın Reaksiyon Mekanizması 21

1.3.3. CAT'ın Kullanım Alanları 23

1.4. GOD ve CAT Enzimlerinin Ko-immobilizasyonu 25

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 27

3. MATERYAL VE METOD 40

3.1. Materyal 40

3.2. Metod 40

3.2.1. Protein Tayini 40

3.2.2. Florisilin İmmobilizasyon İçin Hazırlanması 41
3.2.3. GOD veya CAT Enzimlerinin Florisil Desteğe Kovalent Olarak Bağlanması 42
3.2.4. Serbest ve İmmobilize GOD Aktivitesinin Belirlenmesi 43
3.2.5. Serbest ve İmmobilize CAT Aktivitesinin Belirlenmesi 48
3.2.6. GOD ve CAT Enzimlerinin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu 49
3.2.6.1. İmmobilizasyon pH'sı 49
3.2.6.2. İmmobilizasyon sıcaklığı 50
3.2.6.3. Başlangıç Enzim Derişimi ve İmmobilizasyon Süresi 50
3.2.7. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu 50
3.2.7.1. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum pH'larının Belirlenmesi 50
3.2.7.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Tampon Derişimlerinin Belirlenmesi 51
3.2.7.3. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi 51
3.2.7.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi 51
3.2.7.5. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi 51
3.2.7.6. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi 52
3.2.7.7. İmmobilize Enzimlerin Farklı Bağıl Nem Ortamlarındaki Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi 52
3.2.7.8. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi 53
3.2.8. GOD ve CAT Enzimlerinin Ko-immobilizasyonu 54
3.2.8.1.GOD ve CAT Enzimlerinin Birlikte

Ko-immobilizasyonu 55
3.2.8.2. GOD ve CAT Enzimlerinin Sıralı
Ko-immobilizasyonu 56
3.2.9. Ko-immobilize GOD-CAT'ın Karakterizasyonu 56
3.2.10. Serbest GOD, Serbest GOD + Serbest CAT, İmmobilize GOD, İmmobilize GOD + İmmobilize CAT ve Ko-immobilize GOD-CAT'ın Kesikli, Geri Beslemeli ve Sürekli Dolgu Yataklı Kolon Reaktörlerde Kullanımı 57
3.2.10.1. Kesikli Reaktör Kullanımı 57
3.2.10.2. Geri Beslemeli Dolgu Yataklı Kolon Reaktör Kullanımı 58
3.2.10.3.Sürekli Dolgu Yataklı Kolon Reaktör Kullanımı 60
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 61
4.1. Bulgular 61
4.1.1. GOD Enziminin Tek Başına İmmobilizasyonu 61
4.1.1.1. GOD Enziminin İmmobilizasyonu İçin Uygun Koşulların Belirlenmesi 61
4.1.1.2. Serbest ve İmmobilize GOD Enziminin Karakterizasyonu 66
4.1.2. CAT Enziminin Tek Başına İmmobilizasyonu 78
4.1.2.1. CAT Enziminin İmmobilizasyonu İçin Uygun Koşulların Belirlenmesi 78
4.1.2.2. Serbest ve İmmobilize CAT Enziminin Karakterizasyonu 83
4.1.3. GOD ve CAT Enzimlerinin Ko-immobilizasyonu 94
4.1.3.1. GOD ve CAT Enzimlerinin Birlikte Ko-immobilizasyonu 95
4.1.3.2. GOD ve CAT Enzimlerinin Sıralı Ko-immobilizasyonu 106
4.1.3.3. GOD ve CAT'ın Birlikte ve Sıralı Ko-

immobilizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması 112
4.1.3.4. Ko-immobilize GOD-CAT Enzim Sisteminin Karakterizasyonu 118
4.1.4. Serbest GOD, Serbest GOD + Serbest CAT, İmmobilize GOD, İmmobilize GOD + İmmobilize CAT ve Ko-immobilize GOD-CAT'ın Kesikli, Geri Beslemeli ve Sürekli Dolgu Yataklı Kolon Reaktörlerde Kullanımı 121
4.1.4.1. Kesikli Reaktör Kullanımı 122
4.1.4.2. Geri Beslemeli Dolgu Yataklı Kolon Reaktör Kullanımı 124
4.1.4.3. Sürekli Dolgu Yataklı Kolon Reaktör Kullanımı 125
4.2. Tartışma 128
4.2.1. GOD'nin Tek Başına İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu ... 128
4.2.2. CAT'ın Tek Başına İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu 133
4.2.3. GOD ve CAT'ın Ko-immobilizasyonu 136
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 143
5.1. Sonuçlar 143
5.2. Öneriler 145
KAYNAKLAR 147
ÖZGEÇMİŞ 158

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması 10

Çizelge 3.1. Ko-immobilizasyonda kullanılan GOD ve CAT enzimlerinin başlangıç derişimleri ve gram destek başına kullanılan protein miktarları 55

Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize GOD'nin kinetik parametreleri 72

Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize CAT'ın kinetik parametreleri 89

Çizelge 4.3. Birlikte ko-immobilizasyonda kullanılan GOD ve CAT enzim çözeltilerinin 280 ve 405 nm'deki deneysel ve teorik absorbansları 97

Çizelge 4.4. Farklı oranlarda GOD ve CAT içeren başlangıç enzim çözeltileri ile yapılan ko- immobilizasyon çalışmalarında desteğe bağlanan enzim miktarları 98

Çizelge 4.5. Birlikte ko-immobilizasyonda GOD ve CAT enzimlerinin gram destek başına bağlanan protein miktarları ve % bağlanma 100

Çizelge 4.6. GOD ve CAT'ın sıralı ko-immobilizasyonunda ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin desteğe bağlanan GOD ve CAT miktarları ve % bağlanma 106

Çizelge 4.7. Birlikte ve sıralı ko-immobilize edilmiş GOD-CAT örneklerinin birim maliyet başına gösterdiği aktivite değerlerinin karşılaştırılması 115

Çizelge 4.8. GOD ve CAT'ın birlikte ve sıralı ko-immobilizasyonunda elde edilen en etkin ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin karşılaştırılması..... 117

Çizelge 4.9. Serbest, immobilize ve ko-immobilize GOD-CAT enzim sistemlerinin karşılaştırılması 139

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1.	Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması	3
Şekil 1.2.	Amino asit yan zincirlerinin reaktif grupları	6
Şekil 1.3.	GOD'nin etki mekanizması	13
Şekil 1.4.	GOD enziminin yapısında bulunan FAD grubu	14
Şekil 1.5.	FAD bünyesindeki izoalloksazin halkasının oksitlenmiş ve yükseltgenmiş yapısı	15
Şekil 1.6.	İndirgenmiş izoalloksazin halkasının O_2 ile tekrar yükseltgenme mekanizması	16
Şekil 1.7.	CAT'ın prostetik grubu Protoporfirin IX Yapısı	22
Şekil 1.8.	CAT'ın etki mekanizması	23
Şekil 1.9.	GOD-CAT enzim sisteminin şematik gösterimi	25
Şekil 3.1.	GOD aktivitesinin belirlenmesinde oksijenmetrenin kullanımının şematik gösterimi	44
Şekil 3.2.	Glukozun DNSA ile verdiği reaksiyonun şematik gösterimi	46
Şekil 3.3.	İmmobilize enzimlerin depolandıkları farklı bağıl nem ortamlarının şematik gösterimi	52
Şekil 3.4.	İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıklarının belirlendiği kesikli ve karıştırmalı kolon reaktör	53
Şekil 3.5.	GOD'nin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı kesikli reaktörün şematik gösterimi	58
Şekil 3.6.	GOD'nin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı geri beslemeli dolgu yataklı kolon reaktörün şematik gösterimi	59
Şekil 3.7.	GOD'nin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı sürekli dolgu yataklı kolon reaktörün şematik gösterimi	60
Şekil 4.1.	İmmobilizasyon pH'sının bağlanan GOD miktarı ve immobilize GOD'nin Aktivitesi üzerine etkisi	61
Şekil 4.2.	İmmobilizasyon sıcaklığının bağlanan GOD miktarı ve immobilize GOD'nin aktivitesi üzerine etkisi etkisi	62

Şekil 4.3. Farklı başlangıç GOD derişimleri için immobilizasyon süresinin gram desteğe bağlanan GOD miktarı üzerine etkisi 63
Şekil 4.4. Farklı başlangıç GOD derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize GOD'nin aktivitesi üzerine etkisi 64
Şekil 4.5. Farklı başlangıç GOD derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize GOD'nin spesifik aktivitesi üzerine etkisi 65
Şekil 4.6. Farklı başlangıç GOD derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize GOD'nin (Aktivite / Başlangıç GOD miktarı) oranına etkisi 66
Şekil 4.7. Serbest ve immobilize GOD aktivitesinin pH'a bağlı olarak değişimi 67
Şekil 4.8. Serbest ve immobilize GOD aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi 68
Şekil 4.9. Serbest ve immobilize GOD aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi 69
Şekil 4.10. Serbest GOD enziminin Arrhenius grafiği 69
Şekil 4.11. İmmobilize GOD enziminin Arrhenius grafiği 70
Şekil 4.12. Serbest GOD için Lineweaver-Burk grafiği 71
Şekil 4.13. İmmobilize GOD için Lineweaver-Burk grafiği 71
Şekil 4.14. Serbest GOD enziminin termal kararlılık grafiği..... 73
Şekil 4.15. İmmobilize GOD enziminin termal kararlılık grafiği..... 73
Şekil 4.16. Serbest ve immobilize GOD'nin depolama kararlılığı..... 74
Şekil 4.17. İmmobilize GOD'nin farklı bağıl nem ortamlarındaki depolama kararlılıkları..... 75
Şekil 4.18. İmmobilize GOD'nin farklı bağıl nem ortamlardaki aktivitelerinin ortalaması..... 76
Şekil 4.19. Farklı bağıl nem ortamında depolanan immobilize GOD'nin 60 günlük çalışma süresi sonunda kalan aktivitesi (%)..... 76
Şekil 4.20. İmmobilize GOD'nin tekrar kullanım kararlılığı..... 77
Şekil 4.21. İmmobilizasyon pH'sının bağlanan CAT miktarı ve immobilize CAT'ın aktivitesi üzerine etkisi 78

Şekil 4.22. İmmobilizasyon sıcaklığının bağlanan CAT enzimi miktarı ve İmmobilize CAT'ın aktivitesi üzerine etkisi 79
Şekil 4.23. Farklı başlangıç CAT derişimleri için immobilizasyon süresinin bağlanan CAT miktarı üzerine etkisi 80
Şekil 4.24. Farklı başlangıç CAT derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize CAT aktivitesi üzerine etkisi 81
Şekil 4.25. Farklı başlangıç CAT derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize CAT'ın spesifik aktivitesi üzerine etkisi 82
Şekil 4.26. Farklı başlangıç CAT derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize CAT'ın (Aktivite / Başlangıç CAT miktarı) oranına etkisi 83
Şekil 4.27. Serbest ve immobilize CAT aktivitesinin pH'a bağlı olarak değişimi..... 84
Şekil 4.28. Serbest ve immobilize CAT aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi..... 85
Şekil 4.29. Serbest ve immobilize CAT aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi..... 86
Şekil 4.30. Serbest CAT enziminin Arrhenius grafiği..... 86
Şekil 4.31. İmmobilize CAT enziminin Arrhenius grafiği..... 87
Şekil 4.32. Serbest CAT için Lineweaver-Burk grafiği..... 88
Şekil 4.33. İmmobilize CAT için Lineweaver-Burk grafiği..... 88
Şekil 4.34. Serbest CAT enziminin termal kararlılık grafiği..... 89
Şekil 4.35. İmmobilize CAT enziminin termal kararlılık grafiği..... 90
Şekil 4.36. Serbest ve immobilize CAT'ın depolama kararlılığı..... 90
Şekil 4.37. İmmobilize CAT'ın farklı bağıl nem ortamlarındaki depolama kararlılıkları..... 91
Şekil 4.38. İmmobilize CAT'ın farklı bağıl nem ortamlardaki aktivitelerinin ortalaması..... 92
Şekil 4.39. Farklı bağıl nem ortamında depolanan immobilize CAT'ın 60 günlük çalışma süresi sonunda kalan aktivitesi 93
Şekil 4.40. İmmobilize CAT'ın tekrar kullanım kararlılığı 93

Şekil 4.41. GOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerinin immobilizasyon pH'sına bağlı olarak değişimi 94
Şekil 4.42. CAT enziminin 280 nm'de absorbansının derişime bağlı olarak değişimi 95
Şekil 4.43. CAT enziminin 405 nm'de absorbansının derişime bağlı olarak değişimi 95
Şekil 4.44. GOD enziminin 280 nm'de absorbansının derişime bağlı olarak değişimi 96
Şekil 4.45. GOD enziminin 405 nm'de absorbansının derişime bağlı olarak değişimi 96
Şekil 4.46. GOD ve CAT'ın birlikte ko-immobilizasyonu ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örnekleri için gram destek başına bağlanan toplam protein miktarları 99
Şekil 4.47. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin gram destek başına CAT aktiviteleri 101
Şekil 4.48. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin spesifik CAT aktiviteleri 101
Şekil 4.49. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin bağlanan toplam protein miktarı başına CAT aktiviteleri 102
Şekil 4.50. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin gram destek başına GOD aktiviteleri 103

Şekil 4.51. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin spesifik GOD aktiviteleri 104

Şekil 4.52. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin bağlanan toplam protein miktarı başına GOD aktiviteleri 105

Şekil 4.53. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin kullanılan toplam protein miktarı başına GOD aktiviteleri 105

Şekil 4.54. GOD ve CAT'ın sıralı ko-immobilizasyonu ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örnekleri için gram destek başına bağlanan toplam protein miktarları 107

Şekil 4.55. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin gram destek başına CAT aktiviteleri 108

Şekil 4.56. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin spesifik CAT aktiviteleri 109

Şekil 4.57. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin bağlanan toplam protein miktarı başına CAT aktiviteleri 109

Şekil 4.58. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin gram destek başına GOD aktiviteleri 110

Şekil 4.59. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin spesifik GOD aktiviteleri 111

Şekil 4.60. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin bağlanan toplam protein miktarı başına GOD aktiviteleri 111

Şekil 4.61. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD-CAT örneklerinin kullanılan toplam protein miktarı başına GOD aktiviteleri 112

Şekil 4.62. GOD ve CAT'ın birlikte veya sıralı immobilize edilmesi ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin gram destek başına GOD aktiviteleri 113

Şekil 4.63. GOD ve CAT'ın birlikte veya sıralı immobilize edilmesi ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin spesifik GOD aktiviteleri 113

Şekil 4.64. GOD ve CAT'ın birlikte veya sıralı immobilize edilmesi ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin bağlanan toplam protein miktarı başına GOD aktiviteleri 114

Şekil 4.65. GOD ve CAT'ın birlikte veya sıralı immobilize edilmesi ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin kullanılan toplam protein miktarı başına GOD aktiviteleri 114

Şekil 4.66. GOD ve CAT enzimlerinin ko-immobilizasyon işlemlerinin birlikte veya sıralı yapılmasına bağlı olarak ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin birim maliyet başına gösterdikleri GOD aktivitelerinin karşılaştırılması 116

Şekil 4.67. Ko-immobilize GOD-CAT'ın GOD aktivitesinin pH'a bağlı olarak değişimi 118

Şekil 4.68. Ko-immobilize GOD-CAT'ın GOD aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi 119
Şekil 4.69. Ko-immobilize GOD-CAT'ın GOD aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi 119
Şekil 4.70. Ko-immobilize enzim sisteminde GOD enzimi için Arrhenius grafiği 120
Şekil 4.71. Ko-immobilize GOD-CAT sisteminde GOD'nin Lineweaver-Burk grafiği 120
Şekil 4.72. Ko-immobilize GOD-CAT sisteminde GOD enziminin tekrar kullanım kararlılığı 121
Şekil 4.73. Serbest veya immobilize formdaki GOD'nin tek başına ya da serbest, immobilize veya ko-immobilize formdaki CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı kesikli reaktörde pH'nın zamana bağlı olarak değişimi 122
Şekil 4.74. Serbest veya immobilize formdaki GOD'ın tek başına ya da serbest, immobilize veya ko-immobilize formdaki CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı kesikli reaktörde O_2 derişiminin zamana bağlı olarak değişimi 123
Şekil 4.75. İmmobilize GOD enziminin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı geri beslemeli dolgu yataklı kolon reaktörde pH'nın zaman bağlı olarak değişimi 124
Şekil 4.76. İmmobilize GOD enziminin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı geri beslemeli dolgu yataklı kolon reaktörde O_2 derişiminin zamana bağlı olarak değişimi 125
Şekil 4.77. İmmobilize GOD enziminin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı geri beslemeli dolgu yataklı kolon reaktörde pH'nın zamana bağlı olarak değişimi 126
Şekil 4.78. İmmobilize GOD enziminin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı sürekli dolgu yataklı kolon reaktörde O_2 derişiminin zamana bağlı olarak değişimi 127

SİMGELER VE KISALTMALAR

GOD	: Glukoz oksidaz
CAT	: Katalaz
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
APTES	: 3-Aminopropil trietoksisilan
V	: Tepkime hızı (μmol. dk^{-1}. mg $protein^{-1}$)
[S]	: Substrat derişimi
K_M	: Michaelis-Menten hız sabiti (mM)
V_{max}	: Maksimum hız (μmol. dk^{-1}. mg $protein^{-1}$)
k_{cat}	: Geri dönüşüm sayısı (s^{-1})
k_{cat}/K_M	: Katalitik etkinlik ($s^{-1}M^{-1}$)
Ea	: Aktivasyon enerjisi ($J.mol^{-1}K^{-1}$)
P(HEMA)	: Poli (Hidroksietilmetakrilat)
poli (HEMA-ko-MMA)	: poli (2-hidroksietilmetakrilat-ko-metilmetakrilat)

1. GİRİŞ

Enzimler protein yapısında olan son derece spesifik biyokatalizörlerdir. Canlı organizmalarda gerçekleşen çok sayıda reaksiyon enzimlerle katalizlenir. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar katalizlenmemiş karşıtlarına göre 10^7-10^{16} kez daha hızlı gerçekleşir.

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar. Bununla beraber yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır. Enzimlerin teknik kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmalarının artmasına neden olmuştur.

Enzimler canlılar tarafından üretildiklerinden endüstriyel veya analitik amaçlı kullanımları için doku, kan, mikroorganizma gibi canlı veya canlı kökenli kaynaklardan saflaştırılırlar. Enzim üretiminde hammadde olarak canlıların kullanımı ekonomik açıdan sınırlayıcı bir durum olsa da bu sorun mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması çok zordur. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar. Bu nedenle saflaştırılan enzimlerden olabildiğince faydalanmak için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir.

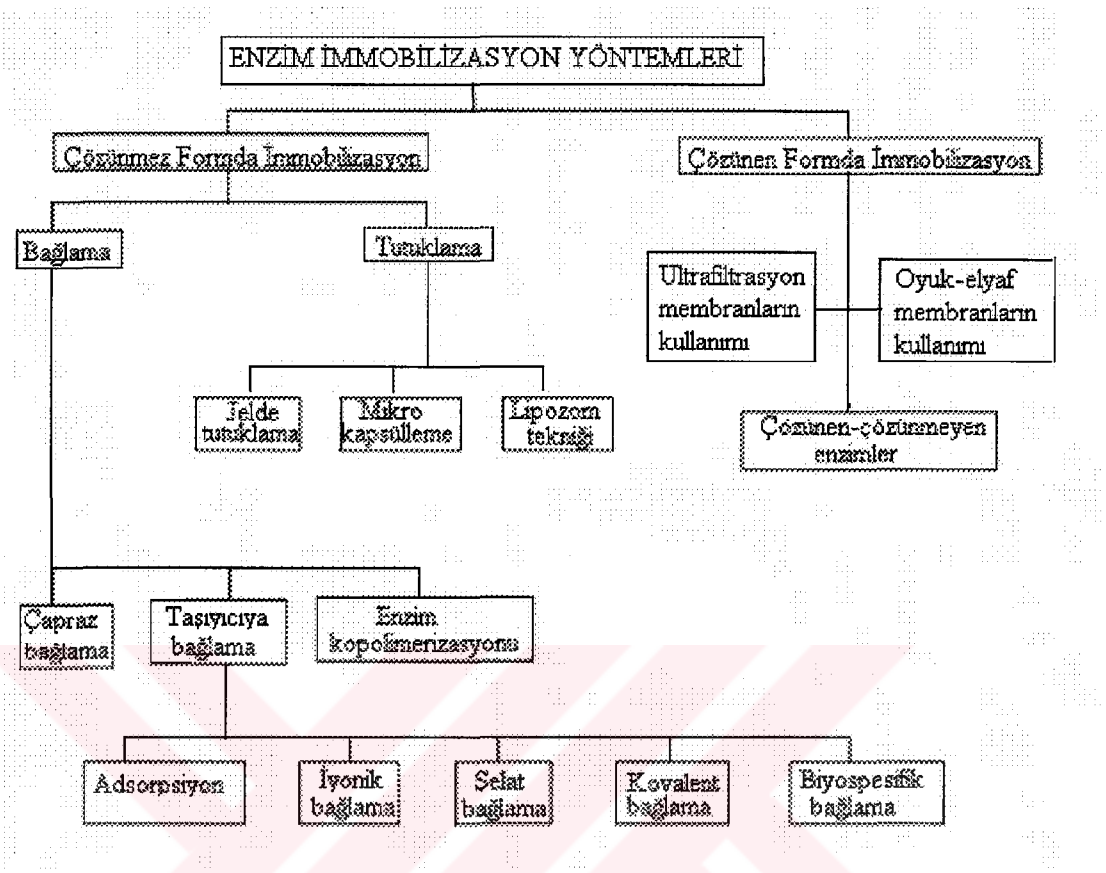
Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen bir kopolimerizasyona monomer olarak katılarak veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanarak immobilize edilebilirler.

İmmobilize enzimin serbest enzime göre bazı üstünlükleri aşağıda verilmiştir.

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

1.1.Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

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



Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

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

1.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

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

1.1.1.1. Bağlama

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

Çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminde, küçük moleküllü iki veya çoklu fonksiyonel grupları olan reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak

suda çözünmeyen kompleksler oluşmaktadır. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH'ya ve immobilize edilecek enzimin özelliklerine çok bağlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, klorformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsulfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorohidrinlerdir.

Enzim kopolimerizasyonunda enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmış olur. Yöntem polimer matrikse tutuklamaya benzemekle birlikte enzim kaçışının önlenmesi gibi üstünlüğü vardır.

Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanılır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar. Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler şunlardır:

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Mekanik stabilite
- Uygun partikül formu,
- Kimyasal ve termal kararlılık,
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar için yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel grupların varlığı
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik
- Rejenere olabilme

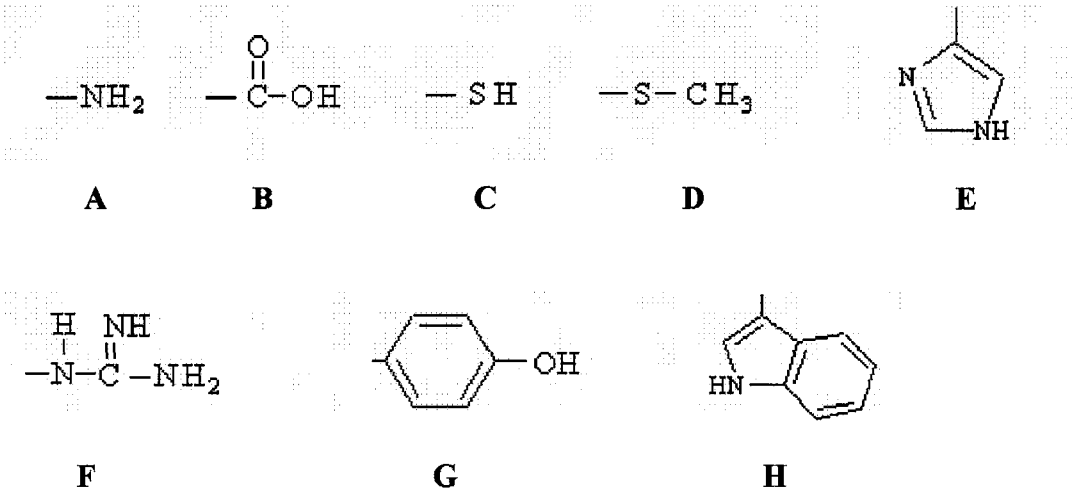
Taşıyıcıya bağlama yöntemleri; adsorpsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama olmak üzere beş gruba ayrılır.

Adsorpsiyon: Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Yöntem yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, $CaCO_3$, kül, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

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

Şelat Bağlama: Bu yöntemde, destek katısının yüzeyini aktifleştirmek ve enzimi destek materyaline bağlamak için geçiş elementleri Titan (III), Titan (IV), Zirkonyum (IV) kullanılır. Bu yöntemde cam, kitin, jelatin ve selüloz destek materyali olarak kullanılabilir.

Kovalent Bağlama: Kovalent bağlamada, enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması protein kimyasında genelde bilinen yöntemlerle ve çoğunlukla sulu ortamda gerçekleştirilir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzimin aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki amino asitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir. Şekil 1.2'de bu fonksiyonel gruplar gösterilmiştir.



Şekil 1.2 Amino asit yan zincirlerinin reaktif grupları

A : N-Terminal amino asitlerin amino grubu ve lizinin ε-amino gubu

B : C-Terminal amino asitlerinin ve aspartik asit ile glutamik asidin serbest karboksil grupları

C : Sisteinin sülfhidril grubu

D : Methioninin tiyoeter grubu

E : Histidinin imidazol grubu

F : Argininin guanidinil grubu

G : Tirozinin fenolik grubu

H : Triptofanın indolil grubu

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktifleştirilmeleri gerekir. İmmobilizasyon çok ılımlı koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir.

Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir.

Biyospesifik Bağlama: Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzim immobilize edilebilir. Lektinler spesifik karbohidrat artıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar.

1.1.1.2. Tutuklama Yöntemleri

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

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

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

Lipozom tekniği, sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır. Çapı 1-100 μ arasında değişen enzim çözeltisi damlacıklarını içeren hidrokarbon çözücü; çeşitli katkı maddeleri ve yüzey yapıcılarla enzim çözeltisi damlacıklarının çevresinde oluşturduğu suda çözünmeyen faza sıvı yüzey yapıcı membranlar adı verilmektedir. Yüzey yapıcı olarak en çok kullanılan Span 80'dir. Yöntemin en önemli üstünlüğü; süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel oluşudur. Aynı anda bir adımda birçok

enzimin immobilizasyonuna olanak sağlar ve oldukça büyük bir kontakt yüzeyine sahiptir. Önemli sakıncaları ise; substrat ve ürünün membranda geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin inaktive olması ve sıvı olan membrandan enzimin kaçma olasılığıdır.

1.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemlerinde enzim veya mikro çevresi bazı modifikasyonlara uğradığından pH ve sıcaklık profilleri, kinetik özellikleri değişir ve genel olarak serbest halde kullanımlarına göre aktivitelerinde düşme gözlenir. Oyuk elyaf membran veya ultrasantrifüj membranları enzimlerin sürekli reaktörlerde ve uzun sürelerle kullanımlarına olanak sağlayan yarı geçirgen zarlardır. Çözünür formda immobilize edilecek enzimler direkt veya modifiye edilerek kullanılırlar.

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin herhangi bir destekle fiziksel veya kimyasal etkileşime girmesinden çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir tekniktir. Yarı geçirgen özellik gösteren oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu immobilizasyon yöntemi hiçbir kimyasal bileşiğin veya tekniğinin kullanılmasının gerekmediği son derece kolay bir yöntemdir. Oyuk elyaf membranlar ile ultrafiltrasyon membranları enzimi geçirmezken substrat ve ürünün geçişine izin verir, ayrıca mikropların enzime ulaşmasını engelleyerek koruyucu etki gösterirler. Enzim desteğe herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmez ancak substratın membrandan geçip enzime ulaşmasındaki kısıtlamalar bu yöntemin en önemli dezavantajlarından birini oluşturur. Substrat molekülü ne kadar küçükse membrandan geçişi o denli kolay olacağından enzimin etkinliği de o oranda artacaktır.

Enzimler çözünür formda kullanılmadan önce düşük veya yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerle kimyasal olarak modifiye edilerek daha kullanışlı ve kararlı hale getirilebilirler. Örneğin bazı enzimlerin düşük molekül ağırlıklı bileşiklerle açillenmesi enzimin kararlılığını arttırmaktadır.

1.1.3. İmmobilize Edilen Enzimden Beklenilen Özellikler

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

- Yüksek kararlılık göstermesi
- Tekrar kullanılabilir olması
- Sürekli üretime olanak vermesi
- Reaksiyon kontrolüne olanak vermesi
- Yüksek saflık
- Katalitik etkinliğinin yüksek olması
- Ekonomik olması

1.1.4.İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

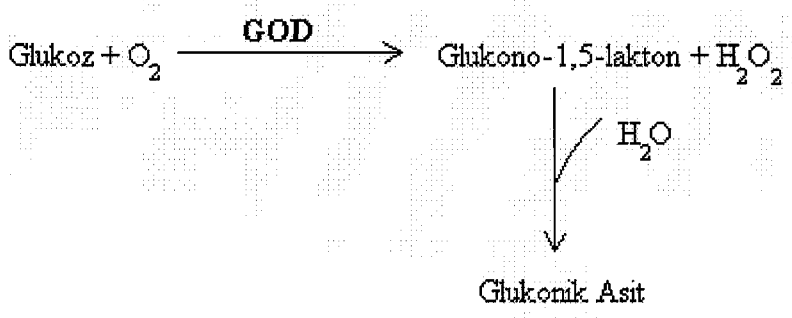
Enzimlerin çoğuna uygulanabilen çok sayıda immobilizasyon tekniği geliştirilmesine karşın, enzimlerin bileşenlerinin ve kimyasal özelliklerinin oldukça geniş, ürünlerin ve substratların farklı özelliklerde olmaları nedeniyle bütün enzimler veya uygulamalar için geçerli tek bir yöntem belirlemek mümkün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

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (Wiseman 1986)

Karakteristik	Karşı Bağlama	Fiziki Adsorpsiyon	İyonik Bağlanma	Şelat veya Metale Bağlama	Kovalent Bağlanma	Tutuklama
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. Glukoz Oksidaz (GOD)

Glukoz oksidaz (GOD) (EC 1.1.3.4, β-D-glukoz:oksijen oksidoredüktaz) glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono-δ-lakton (glukono-1,5-lakton) ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) oluştuğu reaksiyonu katalizler. Lakton sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşür. Reaksiyon aşağıdaki gibidir:



GOD aktivitesi ilk defa 1904 de Maksimow tarafından *Aspergillus Niger* (*A. Niger*) de saptanmıştır. Enzimin oksidatif etkisi olduğunu belirleyen Müller (1928), saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik gruptan (flavin adenin dinükleotid, FAD) kaynaklandığını öne sürmüştür. Keilin ve Hartree (1948) oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı H_2O_2 ile antimikrobiyel aktivite gösterip antibiyotik olarak davrandığını belirlemişlerdir. Enzim ticari olarak ilk kez 1952 yılında üretilmeye başlanmıştır. Önceleri enzim kaynağı olarak *Penicillum notatum* ve *Penicillum glaucum* kullanılmış olup, günümüzde *A. niger* veya *Penicullum amagasakienese* kullanılmaktadır [1].

1.2.1. GOD'nin Genel Özellikleri

Katalizledikleri reaksiyon aynı olsa da, değişik kaynaklardan saflaştırılan GOD molekülleri farklı kimyasal özellikler gösterir. Örneğin *A. Niger* GOD'ı molekül ağırlıkları 80 kD olan, birbirine disülfit köprüleri ile bağlı 2 eşdeğer alt üniteden meydana gelmiştir. Buna karşın *Penicillum* kaynaklı GOD, molekül ağırlığı 45 kD olan 4 alt üniteden oluşmuştur. Birbiri arasında disülfit köprüsü olan iki çift alt ünite birleşerek dördüncül yapıyı oluşturmaktadır. *A. Niger* GOD'ı 583 amino asitten oluşmuştur. Her iki kaynağa ait GOD'nin amino asit dizilişleri de farklı olmakla beraber benzer özelliklere sahiptirler. *A. Niger* GOD'sinin her alt ünite 1 mol FAD içermektedir. GOD molekülünde yaklaşık olarak % 74 protein, % 16 nötral şeker ve % 2 amino şekeri bulunmaktadır. Enzim yapısında bulunan karbohidratın % 80'ini mannoz oluşturmaktadır. Mannoz, enzimin protein kısmına Asn amino asit artığının R grubundaki amino azotu, Thr ve Ser amino asit artıklarının R gruplarındaki

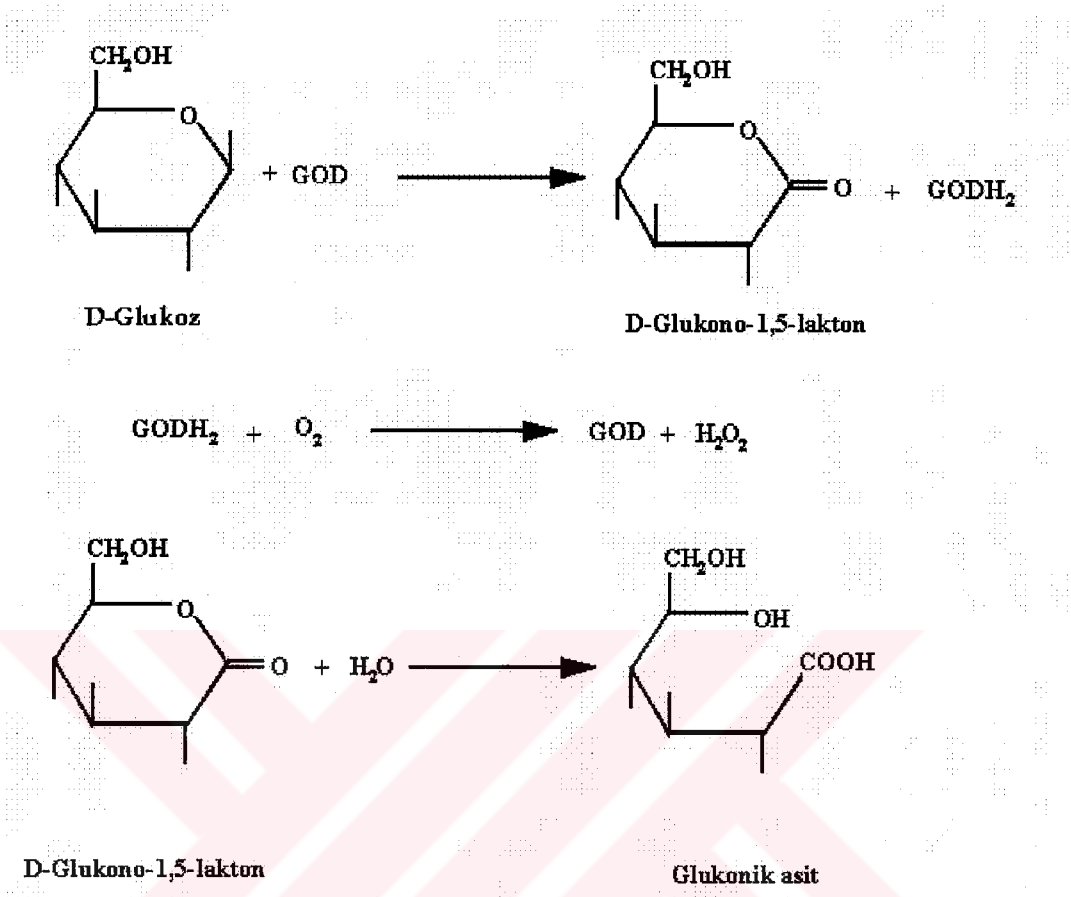
hidroksil oksijeni üzerinden glikozidik bağ ile bağlanmıştır. Ayrıca enzimdeki FAD molekülü flavin-hipoksantin dinükleotid ile yer değiştirdiğinde GOD aktivitesinde bir değişim gözlenmemektedir. FAD molekülü ile apoprotein arasında kovalent bağ bulunmadığından enzim tamamen denatüre edilerek FAD molekülü enzimden uzaklaştırılabilir. Enzimin yapısında bulunan karbohidrat tamamen uzaklaştırılsa bile aktive göstermeye devam eder; ancak termal stabilitesi azalır.

GOD β-D-glukoz için oldukça spesifik olup β-D-glukoz'u α-D-glukoza göre 157 kez daha hızlı okside eder. Ayrıca enzim 2-deoksi-D-glukoz, D-mannoz ve D-galaktoz için çok düşük de olsa aktivite göstermektedir [2].

GOD'nin başlıca inhibitörleri Ag^{+}, Hg^{+} ve Cu^{+2} olarak belirlenmiştir [2].

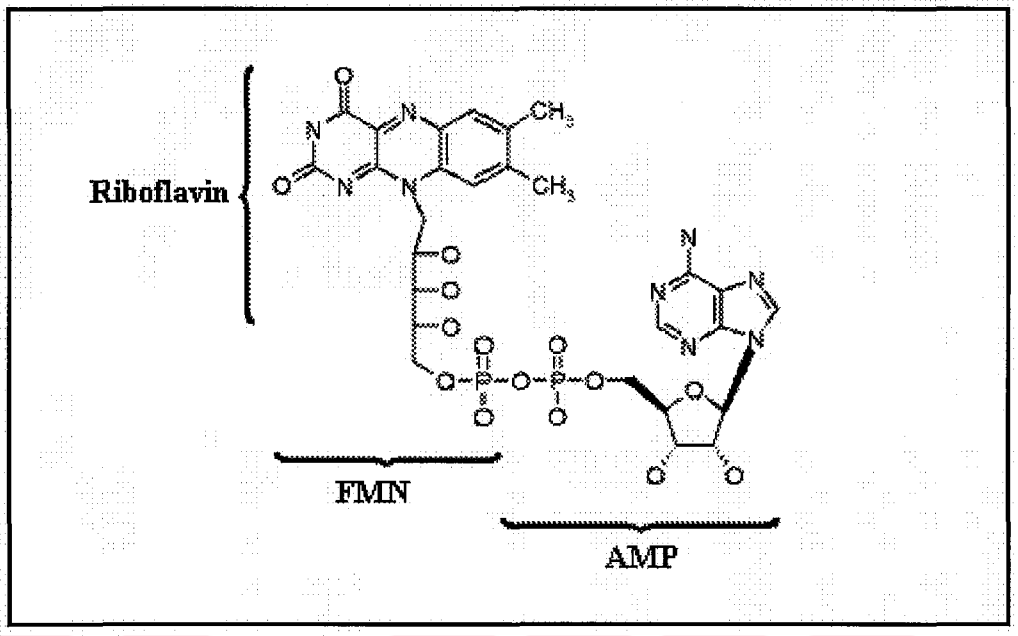
1.2.2. GOD'nin Reaksiyon Mekanizması

GOD'nin glukozu glukonik aside oksitlediği reaksiyonun mekanizması Şekil1.3'de görülmektedir. Reaksiyon flavoenzimin önce indirgendiği ve sonra da yükseltgenmesinin meydana geldiği iki basamak üzerinden yürür. İndirgenme yarı basamağında glukoz 2 proton ve elektronu enzime aktarıp glukonolaktona dönüşür. Yükseltgenme yarı basamağında ise enzim moleküler oksijen ile yükseltgenir ve hidrojen peroksit oluşur. Reaksiyon mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, aktif bölgede bulunan His516, His559 ve Glu412 amino asit artıklarının redoks reaksiyonda rol aldıkları bilinmektedir. Yarı empirik hesaplamalar sonunda, glukozdan FAD'ye 1 hidrür iyonunun verildiği, bunun yanında 1 protonun da aktif bölgedeki His amino asit atıklarından birine transfer edildiği bildirilmiştir. Yapılan kinetik çalışmalar deprotonasyon işleminin düşük pH'da gerçekleşebileceğini göstermektedir (Weibel 1971 (a)).



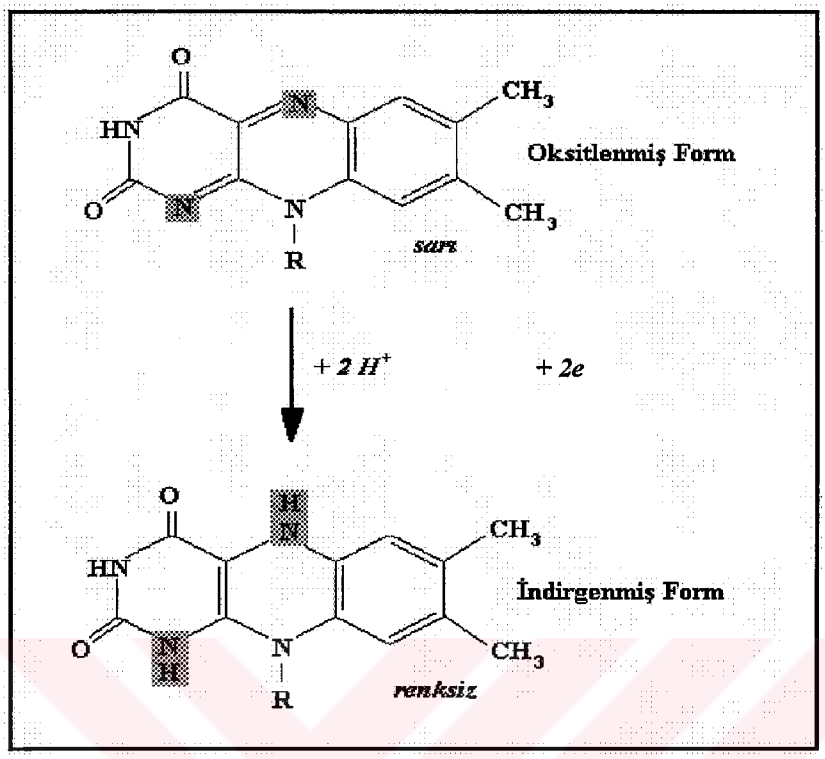
Şekil 1.3. GOD'nin etki mekanizması

Şekil 1.3'de verilen tepkime GOD'nin bünyesinde bulunan FAD grubu üzerinden yürümektedir. Şekil 1.4'de FAD molekülünün kimyasal yapısı verilmiştir.

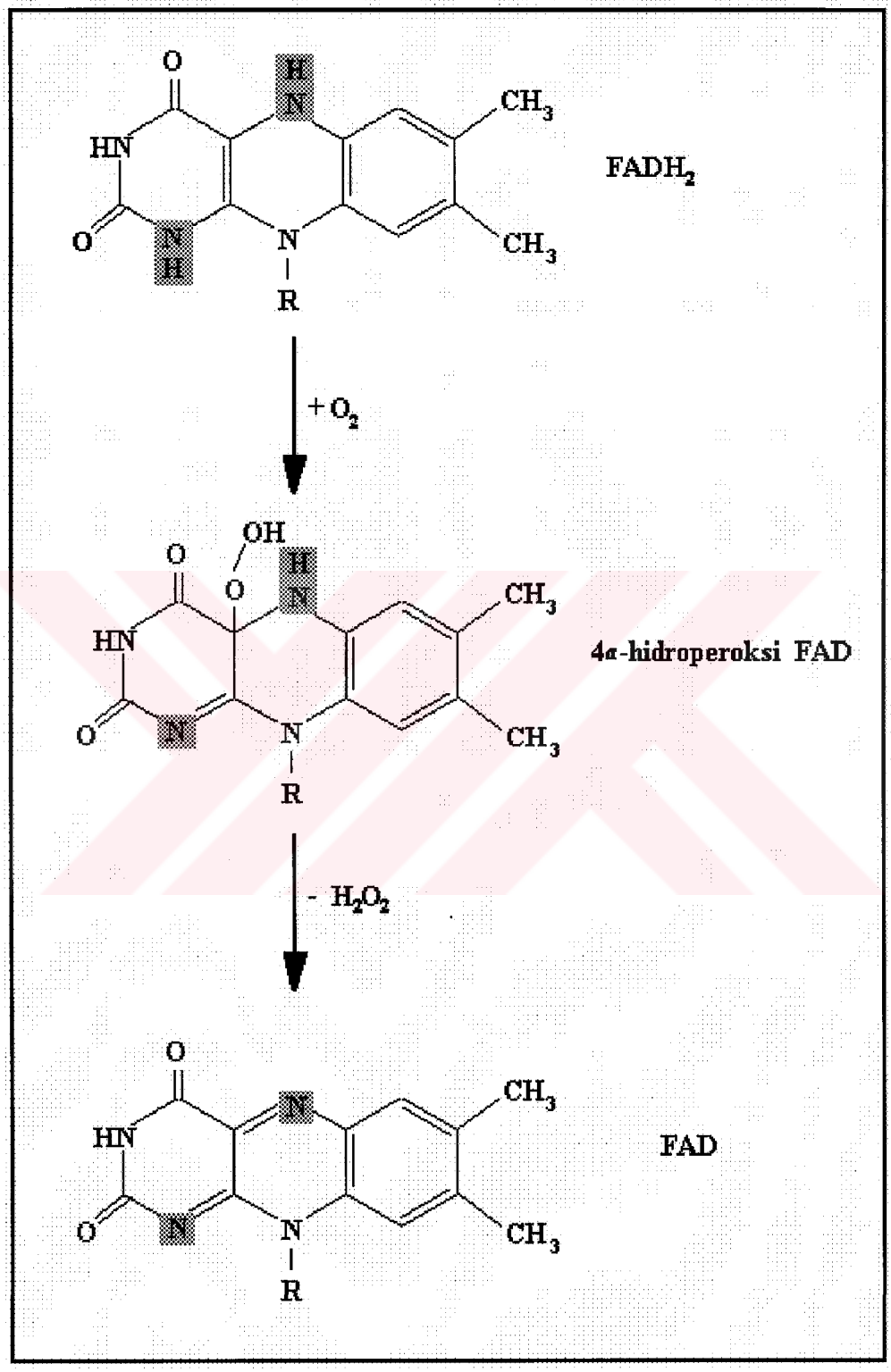


Şekil 1.4. GOD enziminin yapısında bulunan FAD grubu

FAD'nin indirgenme özelliği riboflavin molekülünün indirgenmesi esasına dayanır. FAD elektron akseptörü olarak davranarak glukozu yükseltger; ardından moleküler oksijeni indirgeyerek hidrojen perokside dönüştürür ve kendisi tekrar oksitlenmiş formuna dönüşür. Şekil 1.5'de FAD bünyesindeki izoalloksazin halkasının oksitlenmiş ve yükseltgenmiş yapısı, Şekil 1.6'da ise indirgenmiş FAD'nin yükseltgenme reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 1.5. FAD bünyesindeki izoalloksazin halkasının oksitlenmiş ve yükseltgenmiş yapısı



Şekil 1.6. İndirgenmiş izoalloksazin halkasının O_2 ile tekrar yükseltgenme mekanizması

1.2.3. GOD'nin Kullanım Alanları

Katalizlediği reaksiyon dikkate alındığında GOD herhangi bir çözeltide veya bir karışımda bulunan glukozun veya O_2'nin uzaklaştırılması, glukonik asit veya H_2O_2 üretimi gibi farklı amaçlar için kullanılabilir. GOD ayrıca kan, serum, idrar gibi fizyolojik sıvılar ile meyve suyu, kola, şarap, süt, meşrubat gibi gıdalarda glukoz derişimini belirlemek amacı ile biosensor yapımında oldukça yaygın kullanılan bir enzimdir. Aşağıda GOD'nin kullanım alanlarına bazı örnekler verilmiştir:

Ortamdan O_2'in uzaklaştırılması: Gıda işleme esnasında yiyeceklerin dayanıklılığının sağlanması için ortamdan oksijenin uzaklaştırılması gereklidir. Balık yağından yapılan mayonez O_2 ve ışık varlığında kuruyarak bozulur. Antioksidant içermeyen mayonezin raf ömrü sadece bir gün iken, yağ fazına sodyum sitrat ve pyrogallat, su fazına ise EDTA ve C vitamini eklendiğinde 89 gün saklanabildiği; GOD-CAT-Glukoz içeren mayonezin ise raf ömrünün 132 güne kadar uzadığı bildirilmiştir (Isaksen 1997). GOD'nin soya sosunun renginin giderilmesinde de kullanıldığı, 450-570 nm aralığında absorbans veren pigmentin enzimle muamele edildikten sonra oldukça azaldığı bildirilmektedir. Ayrıca sosun kendine has olan kokusu da GOD-CAT sistemi ile giderilmektedir.

Kızartılmadan önce GOD çözeltisine daldırılarak hazırlanan patates cipslerinin kahverengileşmeleri engellenmektedir.

GOD-CAT enzim sisteminin deniz ürünlerinde kullanılması durumunda mikroorganizma üremesini 5 gün boyunca durdurduğu, renk değişiminde % 80 azalma olduğu, NH_3 üretiminin inhibisyona uğradığı, balık yağını oksidasyondan koruduğu ve pH'da düşüşe neden olmadan antibakteriyel etki göstermeye devam ettiği belirtilmektedir.

GOD-CAT enzim sistemi konservelerde, içeceklerde antioksidant olarak da kullanılmaktadır. Konservelerde çözünmüş halde bulunan O_2, konserve kutusunun yapısında bulunan kalayı korozyona uğrattığı için yiyeceklerin tat ve kokusunda bozukluğa yol açmaktadır. O_2 ayrıca mikroorganizmaların üremesini de sağlayacağından, GOD-CAT ilave edilen konserveler uzun süre tazeliğini korurken, tat ve kokusunda bozunma meydana gelmediği bildirilmektedir. Limon suyu sıkıldıktan kısa bir süre sonra kendine has olan kokusunu ve besin değerini

kaybederken, GOD-CAT ile muamele edilmesi ile bu sorun giderilmektedir. Meyve suyu, şarap, bira, sos, salça gibi gıdalar ile hazır kek, çorba gibi kuru yiyeceklerde oksidasyonu engelleyerek tat ve koku kaybını engellemekte, tazeliğini uzun süre korumasını sağlamaktadır [3].

Yumurta beyazından glukozun uzaklaştırılması: Yumurta beyazı ve tozu pasta ve kek yapımında kabartma ve köpükleştirme amacı ile kullanılmaktadır. Taze yumurta akında az da olsa bulunan glukoz nedeniyle, bu yumurta akı ile hazırlanan yiyeceklerin renkleri kahverengileşmektedir. GOD ile muamele edilen yumurta akının kahverengileşmediği, tat kaybına uğramadığı ve raf ömrünün uzadığı belirtilmektedir [3].

Diş hekimliğinde Laktoperoksidaz (LPOD) ile birlikte kullanımı: LPOD enzimi başta süt olmak üzere tükrük ve gözyaşında bulunan ve antimikrobiyal etki gösteren bir enzimdir. H_2O_2 ve SCN^- varlığında asidik ortamda meydana gelen kısa ömürlü ara ürünler antibakteriyel etki göstermektedir. Başlıca ürün $OSCN^-$ olup bakterilerin sitoplazmik membrandaki –SH gruplarını oksitleyerek başta glukoz olmak üzere K^+, amino asit ve peptid transportunu engellemektedir. Böylece bakterilerin protein ve enzim üretimine etki etmeden organizmaların üremesini durdurmaktadır [3].

GOD-LPOD-Glukoz-SCN^- sistemi diş macunları ve gargaralarda plak oluşumunu engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca bu karışım oral mikroorganizmaların asit üretimini de durdurmaktadır. GOD-LPOD-I^- içeren preparatların ağız kokusunu engellediği bildirilmektedir.

Tıp alanında kullanımı: GOD glukozu oksitlerken H_2O_2 meydana geldiğinden, GOD, LPOD ve NaSCN içeren jel formülleri tıpta virusler üzerinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlarla birlikte tümör terapisinde uygulanmaktadır. Ayrıca HSV I ve HIV virüslerinin protein üretiminde transkripsiyonu yavaşlatıcı ve durudurucu etkisi olduğu belirtilmektedir [3].

Glukonik asit ve glukonat üretimi: Glukonik asit glukozun aerobic fermentasyonu ve elektrooksidasyonu ile üretilebildiği gibi GOD ile enzimatik olarak da elde edilebilmektedir (Bao 2001). Baz ile nötralleştirilerek Na^+, Ca^{+2}, K^+ tuzları elde edilir. Glukonat güçlü bir şelatör olduğundan, deterjanlara su sertliğini azaltıcı bir katkı maddesi olarak eklenir Ayrıca glukonatın emilimi çok yüksek olduğundan

Ca^{+2}, Na^{+} ve K^{+} gibi metallerin oral olarak alınması gerektiğinde bu ilaçlar glukonat tuzları şeklinde hazırlanırlar.

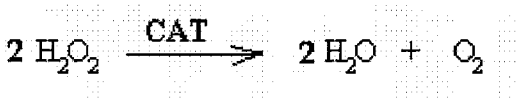
H_2O_2 üretimi: Tekstil endüstrisinde H_2O_2 ağartıcı olarak kullanılmaktadır. Dokuma öncesi nişasta ile muamele edilerek dayanıklılığı arttırılan iplik kumaş haline gelmesinin ardından boyanmadan önce amilaz ile muamele edilerek nişastanın hidrolizi sağlanır ve kumaştan uzaklaştırılır. Glukoz içeren atık çözelti substrat olarak kullanılarak immobilize GOD ile muamele edilir ve elde edilen H_2O_2 elyafı ağartmada kullanılır. Böylece atık ürün değerlendirilerek elyaf ekonomik şekilde beyazlaştırılmış olur. Yan ürün olan glukonik asit iyi bir şelatör olduğu için ortamdaki metallerle kompleks oluşturarak kumaşla etkileşmelerini de engeller. (Tzanov 2002)

Düşük alkollü şarap üretimi: Elma ve üzüm suyunun bazı maya ve bakteriler ile fermentasyonu sonucu glukoz etanol ve karbondiokside dönüşür. Fermantasyon öncesinde GOD-CAT ile muamele edilen üzüm/elma suyunun glukoz derişimi düşürülerek glukonik aside dönüştürülür. Glukonik asit fermentasyona uğramadığından elde edilecek şarabın alkol oranı düşürülmüş olur. Bu yöntem alkolsüz bira üretimi için de kullanılmaktadır (Pickering 1999).

Biosensör ve enzim elektrodu tasarımında kullanımı: Enzim elektrot, üzerine enzim immobilize edilmiş ince bir tabaka (10-200μ kalınlığında) ile herhangi bir elektrokimyasal probun (amperometrik, potansiyometrik veya konduktometrik) kombinasyonudur. Enzimin substratına olan spesifik ilgisi nedeni ile substrat derişimi ile orantılı bir sinyal üreten enzim elektrodları biosensör yapımında kullanılmaktadır. GOD enzim elektrodu yapımında kullanılan ilk enzimlerden biridir. Kan, serum, idrar gibi fizyolojik sıvılarda ve meyve suyu, meşrubat, süt, şarap gibi birçok gıdada glukoz derişiminin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Vianello 2002, Tinkılıç 2002, Eftekhari 2002, Portaccio 2002, Cosnier 2002, Reiter 2001, Zhang 2001, Yasuzawa 2000, Garjonyte 2000, Katz 1999, Yang 1998, Wu 2004).

1.3. Katalaz (CAT)

CAT enzimi (EC 1.11.1.6, hidrojen peroksit: hidrojen peroksit oksidoredüktaz) hidrojen peroksidi moleküler oksijen ve suya dönüştüren reaksiyonu katalizler. Bu enzimin yer almadığı canlı hatta doku türü yok gibidir. Katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir:



19. yüzyılın başlarından itibaren CAT ile ilgili araştırmalar başlamıştır. Thenarol 1811'de H_2O_2'i keşfetmiş ve canlıda kendi kendine parçalandığını belirtmiştir. Schönbein ise 1861'de H_2O_2'i bir maya ürünü olarak tanımlamıştır. İlk olarak Loew 1901 yılında H_2O_2'in CAT ile kendi kendine parçalandığını bulmuşsa da CAT'ın aktif merkezinde demir bulunduğu ve siyanür ile karakteristik olarak inhibisyona uğradığı ancak 22 yıl sonra Warburg tarafından ortaya çıkarılmıştır. Wieland 1927'de CAT'ın reaksiyon mekanizmasını ortaya çıkararak H_2O_2'in hem elektron akseptörü, hem de elektron donorü olduğunu belirtmiştir. Stern 1936'da CAT enziminin aktif bölgesinde protoporfirin IX aktif grubunun bulunduğunu gösterirken 1 yıl sonra Summer ve Dounca ilk sığır karaciğeri katalazını kristal olarak elde etmeyi başarmışlardır [4].

Uzun bir süre CAT'ın sadece H_2O_2'i parçalama etkisi biliniyordu. Keilin ve Hartree CAT'ın aynı zamanda peroksidaz olarak etki ettiğini de göstermişlerdir. CAT enzimini, H_2O_2'i O_2'e yükseltgerken başka H_2O_2'i H_2O'e indirgeyen özel bir peroksidaz olarak tanımlamışlardır. CAT kullanılarak H_2O_2 varlığında fenol, nitrit ve alkollerin oksidasyonu da mümkündür (Horozova 2000).

Günümüze kadar CAT ile ilgili yapılan çalışmalar ile molekül ağırlığı, amino asit bileşimi, elektroforetik hareketliliği, aktivitesi ve aktivitesini etkileyen faktörler açısından canlıdan canlıya, organdan organa, hücreden hücreye hatta organelden organele farklılık gösteren CAT türlerinin varlığı tespit edilmiştir. *Escherichia Coli*, *Proteus mirabilis*, *Penicillum vitale*, sığır karaciğeri, *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus stearothermophilus* CAT'ın izole edildiği başlıca kaynaklardır [4].

1.3.2. CAT'ın Genel Özellikleri

Üzerinde en çok araştırma yapılan enzimlerden biri olan CAT saflaştırıldığı kaynağa göre farklı özellikler göstermektedir. Sığır karaciğeri CAT'ı 250 kD molekül ağırlığına sahipken, *Micrococcus lysodeikticus* kaynaklı CAT'ın molekül ağırlığı 232 kD; *A. Niger* kaynaklı CAT'ın ise 323 kD olarak belirlenmiştir. *A. Niger* CAT'ının 3422 amino asit, sığır karaciğeri CAT'ının ise 1992 amino asitten meydana geldiği belirlenmiştir (Vasudevan 1994).

1 mol CAT 4 ferri-protohemin molekülü içerir. Hem grubu enzimin protein kısmına tirozin aminoasit artığı üzerinden bağlanmıştır. CAT enzimi, molekülü başına %1,1 protohem, %0,09 Fe içermektedir. Askorbat (tek başına veya Cu^{+2} ile birlikte) ve CN^- enzimin başlıca inhibitörleridir [4].

1.3.3. CAT'ın Reaksiyon Mekanizması

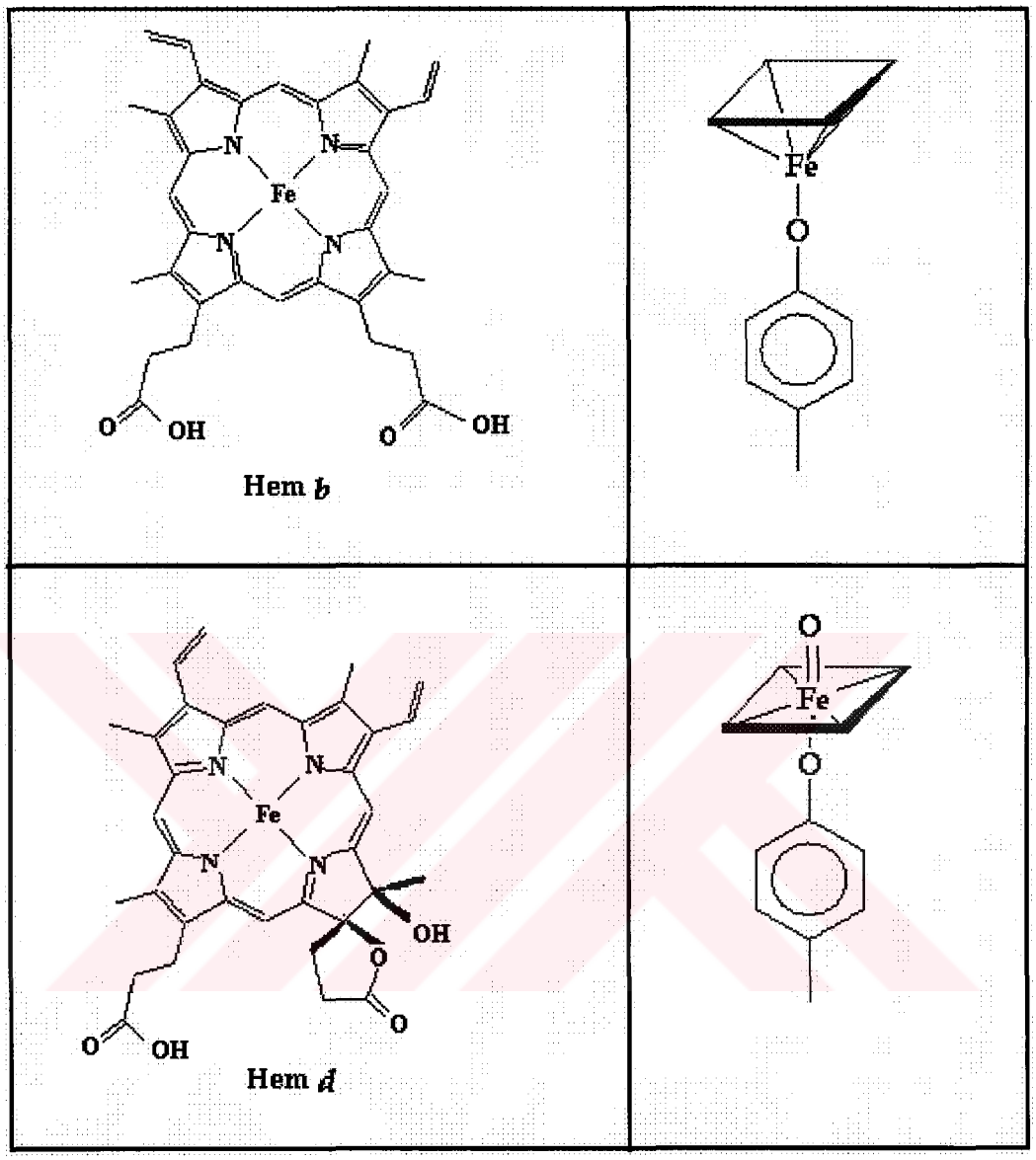
CAT'ın reaksiyon mekanizması aşağıda kısaca verilmiştir. Reaksiyon önce bir molekül H_2O_2' in indirgendiği, ardından da ikinci bir H_2O_2 molekülünün yükseltgendiği 2 basamak üzerinden yürür.

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

Porfirin katyon radikali

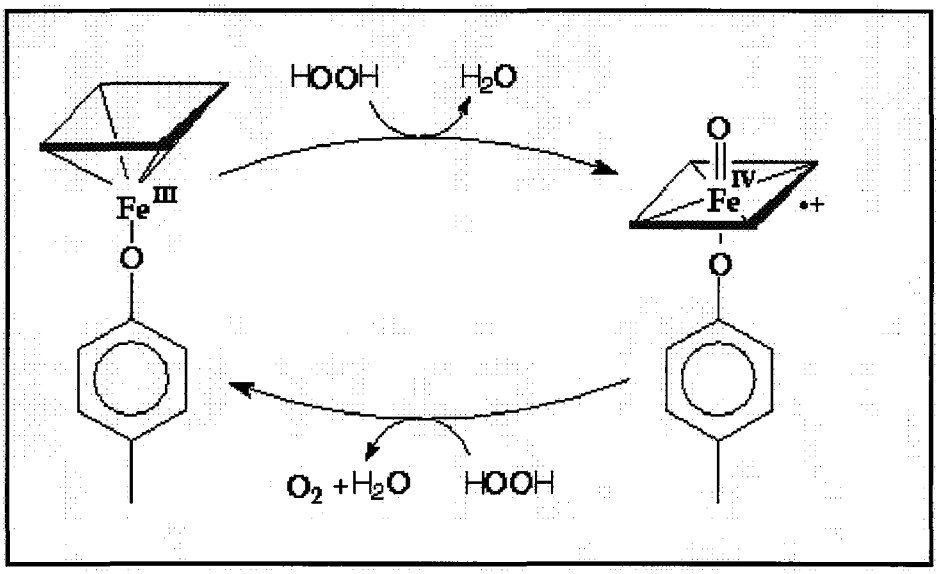
$$H_2O_2 + O{=}Fe^{+\bullet}(IV)\text{-}E \longrightarrow O_2 + H_2O + Fe(III)\text{-}E$$

Görüldüğü gibi reaksiyonda katalitik aktiviteyi Fe(III) göstermektedir. CAT enziminin *hem* molekülü ve enzime tirozin amino asit artığı üzerinden bağlanışı Şekil 1.7'de gösterilmektedir. Farklı kaynaklara ait CAT moleküllerinin çoğu *hem b* prostetik grubunu içerirken, az sayıda mantar ve bakteriyel CAT *hem d* grubunu içermektedir.



Şekil 1.7. CAT'ın prostetik grubu Protoporfirin IX Yapısı

Anderson ve Dawson 1991'de CAT enziminin reaksiyon mekanizmasının Şekil 1.8'deki gibi olduğunu öne sürmüşlerdir.



Şekil 1.8. CAT'ın etki mekanizması

1.3.4. CAT'ın Kullanım Alanları

CAT H_2O_2'i parçalayan bir enzim olduğundan, H_2O_2'in kullanıldığı ve aşırısının ortamdan uzaklaştırılmasının gerekli olduğu tüm proseslerde kullanılabilir. Ancak enzimin bu proses koşullarında aktivite gösterebilmesi gereklidir.

H_2O_2 $KMnO_4$ ve ClO_2^- gibi kuvvetli oksitleyicilerden biridir. Böylesine güçlü olmasına rağmen, doğada güneş ışığı ve su ile kendiliğinden oluşur, ayrıca doğal bir metabolittir. Bir çok inorganik (siyanür, NOx/SOx, nitrit, hidrazin) ve organik (formaldehit, karbondisülfit, karbohidrat, fenol, BTEX pestisit, çözücüler, plastikleştiriciler) bileşiği oksitleyebilmektedir. Mikroorganizmaları parçalayarak dezenfeksiyon sağlar. Büyük organik toksik maddeleri parçalayarak daha az zararlı hale getirir. Bu nedenle H_2O_2 endüstriyel işletmelerde atıkların zararlı etkilerinin giderilmesi, toksisitelerinin azaltılması, BOİ (Biyolojik Oksijen İhtiyacı)/KOİ (Kimyasal Oksijen İhtiyacı) oranının düşürülmesi, mikroorganizmaların çoğalmasının engellenmesi, kötü koku veren bileşiklerin parçalanarak odorizasyonun sağlanması, tekstil ve kağıt ağartıcı olarak kullanımı gibi pek çok uygulama alanı bulmaktadır. Ancak aşırısı istenmeyen oksidasyona neden olacağından, CAT kullanımı ile ortamdan uzaklaştırma yoluna gidilmektedir. CAT enziminin başlıca kullanım alanları aşağıda verilmiştir.

Süt Endüstrisinde kullanımı: Süt ve süt ürünleri endüstrisinin en temel problemi ham sütün kısa sürede dayanıklılığını yitirmesidir. Uzak mesafelerden işletme merkezlerine taşınması süresince ve peynir yapımı gibi ön pastörizasyon işleminin gerekmediği durumlarda süte koruyucu maddelerin katılması tercih edilen bir yoldur ve ideal yöntem olan soğukta korumaya göre de büyük bir maliyet düşüşü sağlar. Bu amaçla en çok kullanılan koruyucu madde H_2O_2'dir. Sütte doğal olarak bulunan ve antibakteriyel enzim olan laktoperoksidaz, aktivite gösterebilmek için H_2O_2'e ihtiyaç duymaktadır. Bu işlem *soğuk pastörizasyon* olarak adlandırılır. Ancak H_2O_2 bazı amino asitleri, özellikle metiyonini, yükseltgeyerek sütün besin değerinin azalttığı için işlenmeden önce sütteki aşırı H_2O_2'in uzaklaştırılması gerekir. Bu da serbest veya immobilize CAT kullanımı ile olur. Böylece H_2O_2 fazlası parçalanırken, süt enzimleri ve yararlı bakteriler korunur.

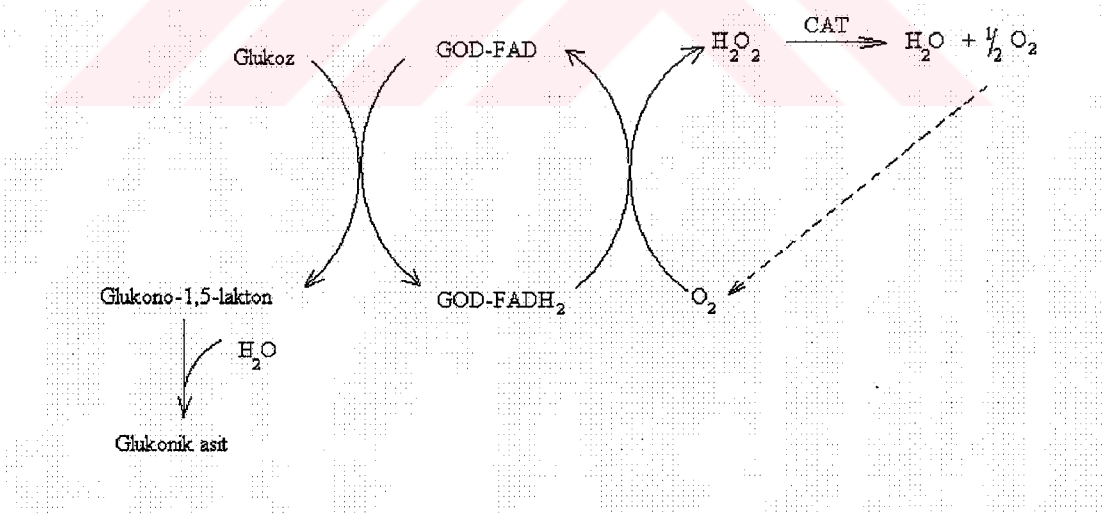
Oksidazlarla birlikte kullanımı: Oksidazların yer aldığı sistemlerde açığa çıkan H_2O_2 uzaklaştırılmak istendiğinde bu enzimler yanında CAT enzimi de kullanılır. Örneğin gıdaların konserve yapımı ve paketlenmesinde (Parpinello 2002), yumurta, şarap (Pickering 1999) gibi bazı gıdaların desakkarifikasyonunda (glukozun uzaklaştırılması) ve glukonik asit üretiminde kullanılan GOD yanında ortamda CAT da bulunmalıdır. Ayrıca CAT enzimi D-amino asit oksidaz (Fernandez-Lafuante 1998), L-α-Gliserofosfat Oksidaz (Kramer 1997) gibi enzimlerle de birlikte kullanılmaktadır.

Endüstride kullanımı: H_2O_2 reçine ve plastik üretiminde oksidasyon ve köpükleştirme amacı ile kullanılır. Sterilizasyon amaçlı kullanılabilir. H_2O_2'in aşırısı CAT ile muamele edilerek parçalanabilir. H_2O_2 kağıt ve tekstil endüstrisinde ağartıcı olarak çok kullanılır. Ancak ağartma işlemi sonrasında, boyama işleminden önce CAT ile parçalanarak H_2O_2'in kağıt/elyaf ve boyarmaddeye zarar vermesi engellenmiş olur.

Bazı organik bileşiklerin oksidasyonunda kullanımı: CAT peroksidaz aktivitesi gösterek H_2O_2 varlığında alkol, nitrit ve fenolü yükseltgemek amacıyla kullanılmaktadır.

1.4. GOD ve CAT Enzimlerinin Ko-immobilizasyonu

GOD enziminin glukozu oksitlemesi reaksiyonunda yan ürün olarak H_2O_2 meydana gelmektedir. Açığa çıkan H_2O_2, GOD bünyesinde bulunan metiyonin, sistein gibi amino asit artıklarını okside ederek enzimin deaktivasyonuna neden olmaktadır (Kleppe, 1966). Ayrıca H_2O_2'in GOD'ı yarışmalı olarak inhibisyona uğrattığı belirlenmiştir (Bao 2003). Özellikle gözenekli desteklere immobilize edildiğinde diffüzyon problemlerinden dolayı ortamdan uzaklaşamayan H_2O_2 GOD'nin çok daha hızlı bir şekilde inaktif hale gelmesine neden olacaktır. İstenmeyen bu durum H_2O_2'i H_2O ve O_2'e parçalayan CAT enziminin GOD ile beraber kullanımı ile giderilebilir. GOD ile CAT enzimlerinin birlikte immobilizasyonu (ko-immobilizasyon) ile GOD tarafından üretilen H_2O_2'in aynı ortamdaki CAT tarafından çabucak parçalanması sonucu enzimin deaktive olması engellenecektir. Şekil 1.9'da GOD-CAT enzim sistemi şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 1.9. GOD-CAT enzim sisteminin şematik gösterimi

Şekil 1.9'dan da görüldüğü gibi ko-immobilizasyonun GOD'ı korumak yanında reaksiyon sistemine O_2 sağlamak gibi bir başka katkısı daha bulunmaktadır. GOD-CAT enzim sistemi glukozun ortamdan uzaklaştırılması (Pickering 1999) veya glukonik asit üretimi (Bao 2001) gibi farklı amaçlar için kullanılmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tükel ve Alptekin (2004), sığır karaciğeri kaynaklı CAT enzimini glutaraldehit ile aktifleştirdikleri florisil desteğe doğrudan veya 3-aminopropiyonik arakolu üzerinden kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Serbest, glutaraldehit ve arakol üzerinden immobilize edilmiş enzimler için optimum pH'yı sırasıyla 7,5, 6,5 ve 7,5, optimum tampon derişimini her 3 enzim sistemi için 50 mM ve optimum sıcaklığı 25, 35 ve 25 °C olarak belirlemişlerdir. K_M ve V_{max} değerlerini serbest CAT için 28,6 mM ve 142800 U. mg protein^{-1}, glutaraldehit üzerinden immobilize CAT için 285,7 mM ve 1400 U. mg protein^{-1} ve arakol üzerinden immobilize CAT için 40,0 mM ve 400 U. mg protein^{-1} olarak bulmuşlardır. Serbest ve immobilize enzimlerin termal ve depolama kararlılıklarını incelemişler ve immobilize enzimlerin hem oda sıcaklığında hem de 4 °C'de depolama kararlılıklarının serbest enzimden yüksek olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıklarını incelediklerinde glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş CAT'ın 20 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 90'nını, arakol üzerinden immobilize edilmiş CAT'ın ise yine 20 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 30'unu koruduğunu rapor etmişlerdir.

Eberhardt A.M. ve ark. (2004), *Aspergillus niger* kaynaklı CAT enzimini inorganik (γ-Al_2O_3, $FeCl_2$ ile etkileştirilmiş γ-Al_2O_3) ve biyopolimerik (glutaraldehit ile etkileştirilmiş kitosan ve selüloz) desteklere immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzim örneklerini FTIR ile incelediklerinde alümina-enzim etkileşiminin kuvvetli olduğunu belirlemişlerdir. 6 ay depolama süresi sonunda ise en yüksek aktiviteyi glutaraldehit ile etkileştirilmiş selüloz desteğe immobilize ettikleri CAT enziminin gösterdiğini bildirmişlerdir.

Gulla K.C. ve ark. (2004), GOD'ı selofan membrana glutaraldehit ile çapraz bağlama yöntemi ile immobilize etmişler ve daha sonra immobilize enzimi β-merkaptoetanol ve *N*-etilmaleimid ile etkileştirerek disülfit köprülerinin indirgenmesini sağlamış ve serbest tiol grupları oluşturmuşlardır. Modifiye ettikleri immobilize GOD'nin kanamisin, K_2SO_4 ve NaCl varlığında termal ve tekrar

kullanım kararlılığını incelemişlerdir. K_2SO_4 varlığında enzimin termal ve kullanım kararlılığının diğer katkı maddelerine göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Wu B. ve ark. (2004), GOD'ı yumurta kabuğunun zarına glutaraldehit aracılığıyla kovalent olarak immobilize etmiş ve bu zarı oksijenmetre elektrodunun yüzeyine yerleştirmişlerdir. Elde ettikleri elektrodu glukoz tayininde kullanmış ve pH, sıcaklık, tampon derişimi ve sitrik asit, sükroz, C vitamini gibi bazı katkı maddelerinin ölçümler üzerine etkilerini araştırmışlardır. Elde ettikleri elektrodun $1,0x10^{-5}$ ve $1,3x10^{-3}$ M glukoz derişimi aralığı için lineer cevap verdiği ve 4 ay depolandığında elektrodun başlangıç aktivitesinin % 85,2'ini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Godjevargova T. ve ark. (2004) GOD ve CAT enzimlerini H_2O_2 ile modifiye edilmiş ultrafiltrasyon membranı akrilonitril kopolimerine immobilize etmişlerdir. Optimum GOD:CAT bağlanma oranını 1:5 olarak belirlemiş ve bu sistemin, sadece GOD'nin immobilize edildiği örneğin 2 katı aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ko-immobilize enzim sisteminin optimum pH, optimum sıcaklık, pH ve sıcaklık kararlılıkları, depolama kararlılıkları ve kinetik parametrelerini belirlemişler ve bu değerleri serbest ve tek başına immobilize edilmiş GOD sistemi ile kıyaslamışlardır. Çalışma sonunda tek başına immobilize edilen GOD'nin hızla inaktif hale geldiği ve CAT'ın GOD enzimini H_2O_2 inhibisyonundan koruduğu sonucuna varmışlardır.

Yavuz. H. ve ark. (2002), Mikrokürecik şeklinde sentezlenen poli(2-hidroksimetakrilat-co-metilmetakrilat) (poli(HEMA-co-MMA)) jeline önce kovalent olarak Congo Red (CR) boyası; ardından boyaya koordine kovalent bağla Fe^{+3} bağlamışlardır. Poli(HEMA-co-MMA)-CR ve poli(HEMA-co-MMA)-CR-Fe^{+3}'i destek olarak kullanmış ve GOD'ı adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Belirli derişimlerde glukoz çözeltisi ile etkileştrilen immobilize enzimin etkinliği açığa çıkan H_2O_2'in peroksidaz enzimi varlığında o-dianisidini yükseltgemesi sonucu oluşan rengin absorbansını 525 nm'de spektrofotometrik olarak ölçerek belirlemişlerdir. GOD miktarı, pH, CR ve Fe^{+3}'ün bağlanan enzim miktarına etkisi, immobilize enzimin aktivitesinin pH, sıcaklık ve kullanma ile değişimini belirlemişlerdir. Destek gözenekli yapıda olmadığından substrat ve enzimi deaktive

eden hidrojen peroksidin diffüzyon problemlerinin olmadığını ve Fe^{+3}'ün enzim immobilizasyonunu % 31 oranında arttırdığını tespit etmişlerdir.

Eftekhari A. (2002), Pt, Al ve pasifleştirilmiş Al (Al_2O_3 ile kaplanmış Al) elektrod üzerinde elektrokimyasal olarak polianilin sentezlemiştir. Elektrod üzerinde polianilin film oluşurken monomer çözeltisinde bulunan GOD'ı film içine hapsetme yöntemi ile immobilize etmiştir. Pt, Al ve pasifleştirilmiş Al için sırasıyla 5,0, 2,4 ve 7,0 olmak üzere 3 farklı pH değerinde çalışmış; bu şartlarda GOD'nin maksimum aktiviteyi pasifleştirilmiş Al elektrodda gösterdiğini belirlemiştir. Bunun nedenini ise pH 6'da enzimin maksimum aktivite göstermesine bağlamıştır.

Tzanov T. ve ark. (2002), İmmobilize GOD kullanarak H_2O_2 elde etmiş ve selüloz esaslı tekstil materyalinin daha düşük maliyetle ağartılmasını amaçlamışlardır . Destek olarak önce silanlanıp, sonra da gluteraldehit ile aktifleştirdikleri cam ve aluminayı kullanmış ve GOD'nin kovalent olarak bağlanmasını sağlamışlardır. Enzimin aktivitesini, açığa çıkan H_2O_2 miktarını ayarlı $KMnO_4$ ile titre ederek belirlemişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin aktivitelerini, kullandıkları desteklerin immobilizasyon etkinliklerini, kullanım stabilitelerini ve beyazlatma özelliklerini belirlemişler ve çalışma sonuçlarını standart ağartma prosesleri ile kıyaslamışlardır.

Costa S.A. ve Ark. (2002), bu çalışmada CAT enzimini, aluminyumoksit üzerine glutaraldehit aracılığıyla çapraz bağlayarak immobilize etmişlerdir. Kesikli ve karıştırmalı tank rektörde ve geri beslemeli kolon reaktörde enzim aktivitesinin pH, sıcaklık ve depolama kararlılığına bağlı olarak değişimini incelemişlerdir. Her iki reaktörde de substrat derişimi 1 M'ın üstünde olduğunda inhibisyon gözlemlemişlerdir. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH'yı 7,0 olarak belirlemişlerdir. İmmobilize enzimin pH 7,0 de 80 °C de başlangıç aktivitesinin % 90'nını, pH 11,0 de 30 °C de % 44'ünü koruduğunu rapor etmişlerdir. İmmobilize CAT'ın yarı ömrünün pH 12,0 de ve 60 °C'de 2 saat arttığını bildirmişlerdir.

Tinkılıç N. ve ark. (2002), Bakır tel üzerinde grafit-epoksi tabakası ve sonrasında bu tabakanın yüzeyinde oluşturulan PVC ve PVC-NH_2 membrana üreaz ve GOD'ı gluteraldehit aracılığıyla çapraz bağlama yöntemiyle immobilize etmiş, böylece glukoz ve üre biosensörü oluşturmuşlardır. İmmobilizasyon aşamasında glutaraldehit

enzimden önce ve enzimle birlikte olmak üzere iki farklı şekilde kullanmış ve ilk şekilde oluşturulan biosensörün daha hızlı cevap verdiğini belirlemişlerdir. Glukoz derişimine bağlı olarak amperometrik ölçüm yaptıklarında 0,1-50 mM aralığında lineer cevap almışlardır. Tasarlanan biosensörün yüksek hassaslık ve uzun ömür göstermesi, kolay ve düşük maliyette hazırlanabilmesi, küçük olması ve kısa sürede cevap vermesi gibi önemli özellikleri olduğunu rapor etmişlerdir.

Blandino A. ve ark. (2002) GOD ve CAT enzimlerini kalsiyum alginat jele enkapsülasyon yöntemi ile ko-immobilize etmişler ve karıştırmalı tank reaktörde kullanarak GOD ve CAT enzimlerinin deaktivasyon hızlarını belirlemişlerdir. Ayrıca GOD-CAT enzim sisteminin matemetiksel bir simülasyon modele uygulanabilirliğini araştırmışlardır.

Parpinello G.P. ve ark. (2002) Meyve pürelerinin kahverengileşmesinde anahtar rolü olan moleküler oksijenin uzaklaştırılmasında GOD-CAT enzim sistemini kullanmışlardır. Elma ve armut püresinin kahveringileşmesini engellemek amacıyla GOD-CAT enzim sistemi, askorbik asit ve peroksidazı kullanmışlar ve elde ettikleri sonuçları karşılaştırmışlardır. Çalışma sonunda en etkin korumanın moleküler oksijenin %99'unu uzaklaştıran GOD-CAT enzim sistemi tarafından gerçekleştirildiğini saptamışlardır.

Ramanathan K. ve ark. (2001), GOD ve CAT'ın ko-immobilize edildiği sol-jel esaslı termal glukoz biosensörü tasarlayarak karakterize etmişlerdir. Gözenekli camsı karbon elektrot su ile iyice ıslatıldıktan sonra yüzeyi tetraetoksisilandan hazırlanmış olan sol-jel ile muamele edip kuruttuktan sonra üzerine GOD+CAT karışımı dökülerek enzim karışımını jel içine immobilize etmişlerdir. Camsı karbon elektrodu mekanik destek; sol-jeli ise enzimin desteğe tutunmasını sağlayan yapıştırıcı olarak kullanmışlardır. Elde ettikleri elektrodu enzim termistörü içeren bir kolona yerleştirip, farklı derişimlerdeki glukoz enjeksiyonu ile kolondan geçen tampon çözeltinin sıcaklığındaki değişimi ölçmüşlerdir.

Bao J. ve ark. (2001), kalsiyum glukonat üretmek amacıyla GOD enzimini kalsiyum alginat jele hapsetme yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Reaksiyon sırasında açığa çıkan H_2O_2'in parçalanması amacıyla GOD ile birlikte MnO_2 tozunu da kullanmışlar ve GOD-MnO_2 karışım oranlarının etkisini incelemişlerdir.

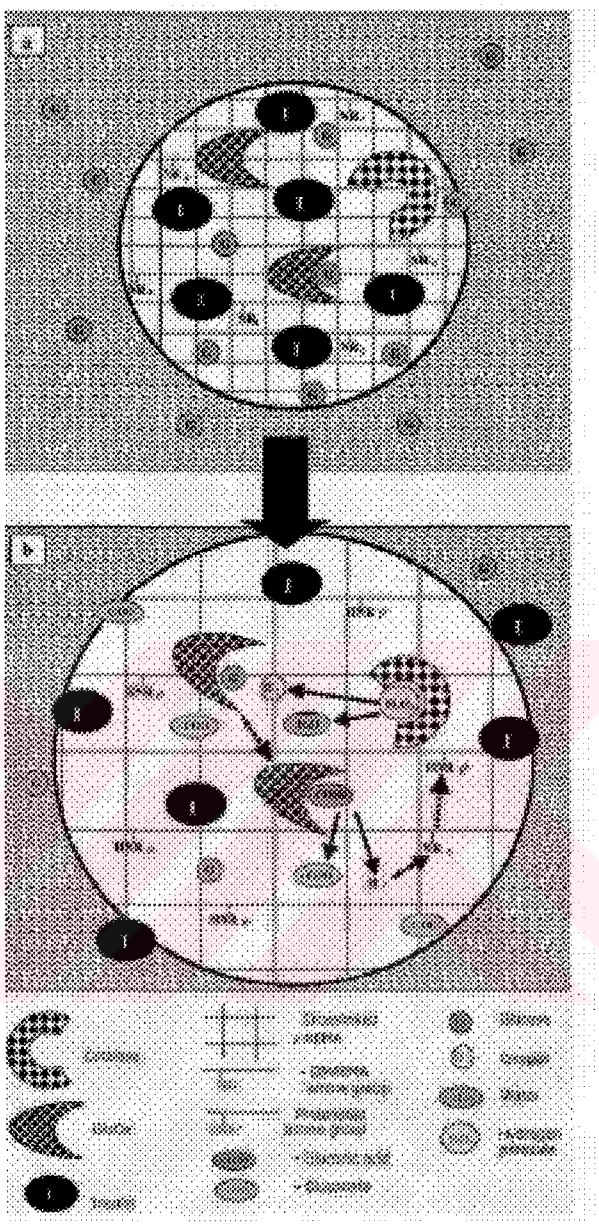
Horozova E. ve ark. (2000), Grafit elektroda CAT'ı immobilize ederek fenolün elektrooksidasyonunda kullanmışlar ve elektrodun elektrokatalitik özelliklerini araştırmışlardır. Grafit elektroda –0,20 ve +0,60 V (Ag/AgCl) potansiyel aralığında katod-anot siklizasyonu uygulayarak yüzeyi polarize etmişlerdir. Bu ön işlemi, yüzeyde enzimin adsorplanmasını sağlayacak oksijen içeren grupların oluşması için yapmışlardır. Grafit elektrodu 100 mM CAT içeren çözeltiye 30-60 dk daldırdıktan sonra 45 dk havada kurutarak enzimi immobilize etmişleridir. Enzim elektrodu, Ag/AgCl referans elektrodu ve Pt karşı elektrodunun da kullanıldığı sistemde farklı sıcaklık ve pH'da fenolün elektrooksidasyonunu incelemişler ve reaksiyonun iki basamakta gerçekleştiğini; 1. basamakta enzimin aktif bölgesinden elektroda; 2. basamakta ise substrat molekülünden enzim aktif bölgesine elektron transferi olduğunu belirlemişlerdir.

Akkuş Çetinus Ş. ve Öztop H.N. (2000), CAT'ı, doğal bir polimer olan kitosan üzerine immobilize etmişler; immobilize enzimin optimum sıcaklık, optimum pH, termal kararlılık, depolanma kararlılığı, kullanım stabilitesi ve kinetik parametrelerini araştırmışlardır. Hem serbest, hem de immobilize CAT için optimum pH ve sıcaklığı sırası ile 7,0 ve 25°C; Km ve Vm değerlerini ise serbest enzim için 25,16 mM ve 24042 μmol dk^{-1} mg^{-1} protein, immobilize CAT için ise 27,67 mM ve 1022 μmol dk^{-1} mg^{-1} protein olarak belirlemişlerdir. İmmobilize CAT'ın depolanma ve kullanım kararlılığının serbest CAT'dan daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Xue H. ve ark. (2000), İletken polianilin-poliizopren (PANI-PIP) kompozit filmine GOD'ı immobilize ederek H_2O_2 seçici geçirgen bir biosensör tasarlamışlardır. Pt elektrod önce poliizopren ile kaplandıktan sonra, 1M HCl içindeki 0,02 M anilin içeren çözeltiye daldırılarak 0,65V sabit potansiyel altında elektrokimyasal olarak polianilin sentezlemişlerdir. PANI-PIP filmi ile kaplı olan Pt elektrodu pH 4,5 olan 0,1M fosfat tamponuna daldırıp –0,5V potansiyel altında film bünyesinde bulunan Cl^- iyonlarını mümkün olduğunca uzaklaştırdıktan sonra 20 μM GOD içeren pH 6,52 olan fosfat tamponuna daldırmış ve bu ortamda 0,65V potansiyel fark uygulanarak (-) yüklü olan GOD'ı (pI değeri 4,2) PANI-PIP filminin içine immobilize etmişlerdir. Enzim sistemini glukoz çözeltisine daldırılarak oluşan

H_2O_2'in elektrokimyasal oksidasyonu sırasında açığa çıkan akımı ölçmüşlerdir. Film bileşimi ile biosesörün hassaslığını, H_2O_2 geçirgenliğini ve interferens özellik gösteren askorbik asidin etkisini inceleyerek biosensörü karakterize etmişlerdir.

Traitel T. ve ark. (2000), Poli(2-hidroksietil metakrilat-co-N,N-dimetilaminoetil metakrilat) (poli (HEMA-co-DMAEMA)) hidrojeline GOD, CAT ve insülini tutuklama yöntemiyle immobilize ederek oluşturdukları sistemde glukoz derişimine bağlı olarak insülinin kontrollü salınımını incelemişlerdir. İmmobilizasyonu, polimerleşme öncesinde monomer çözeltisine GOD, CAT ve insülin ilave ederek sağlamışlardır. pH'ya duyarlı olan jel glukoz içeren fizyolojik bir çözeltiye daldırıldığında, jel içine diffüzlenen glukozun GOD aracılığı ile glukonik aside dönüşmesi ve pH'nın düşmesi ile jelin şişmesi sonucu salınan insülin miktarını belirlemişlerdir.



Glukoz derişimi arttıkça şişme oranının ve insülinin dışarı salınımının arttığını gözlemişlerdir. İnsülin miktarını BioRad yöntemi ile belirlemişlerdir. Sistemin en büyük sınırlamasının O_2 diffuzyonu olması nedeni ile bu sorunu sisteme sürekli hava göndererek gidermeye çalışmışlardır. 1 mol glukozun GOD ile yükseltgenmesi için 1 mol O_2 gerekirken, açığa çıkan H_2O_2'in CAT etkisi ile parçalanması sonucu ½ mol

O_2 oluşmaktadır. Parçalanmayı hızlandırmak için 1 ünite GOD başına 9,4 ünite CAT immobilize etmiş; sistemin in vivo koşullarda incelenmesi için streptozotocin enjeksiyonu ile diyabetik hale getirilen sıçanları kullanmışlardır. Kan glukoz düzeyinin minimum 400 mg dL^{-1} olduğu sıçanlara immobilize enzimi cerrahi operasyonla mide bölgesine uygulamış ve periyodik olarak kan örneği alınarak glukoz derişimini belirlemiş ve sistemin glukoz seviyesini düşürmekte etkili olduğu gözlemişlerdir.

Blandino A. ve ark. (2000), GOD'ı kalsiyum alginat jele enkapsülasyon yöntemi ile immobilize etmişler, jel oluşum ve immobilizasyon şartlarının etkilerini incelemişlerdir. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde DNSA yöntemini kullanmışlar ve serbest ve immobilize enzimlerin V_{max} değerlerini sırasıyla 1,03 ve 0,09 mM dk^{-1}, K_M değerlerini ise sırayla 18 ve 30 mM olarak belirlemişlerdir.

Podual K. ve ark. (2000), Disk ve mikropartikül şeklinde sentezledikleri poli (DEAE-g-etilen glikol) jeline GOD ve CAT'ı ko-immobilize etmişlerdir. Enzim sistemini farklı derişimde glukoz çözeltilerinde kullanıp oluşan glukonik asit miktarının zamanla değişimini inceleyerek karakterize etmişlerdir. Polimerin çapraz bağ oranı ve enzim bileşiminin glukonik asit oluşum hızına etkisini incelemişlerdir. Çapraz bağ oranı arttırıldığında, glukozun diffüzyon problemleri nedeniyle glukonik asit oluşum hızında azalma gözlemişler, jele immobilize edilen enzim miktarını arttırdıklarında ise reaksiyon başlangıç hızının arttığını, ancak ürün dönüşümünün azaldığını belirlemişlerdir. Bunu da, yüksek hız nedeniyle fazla miktarda açığa çıkan H_2O_2'in CAT tarafından etkin bir şekilde parçalanmaması nedeni ile GOD'ı deaktivite etmesine bağlamışlardır.

Denizli A. ve Ark. (2000), gözeneksiz poli[2- hidroksimetakrilat-co- metakrilat] p[HEMA-co-MMA] kopolimer esaslı mikro partiküllere kongo kırmızısı boyası bağlanmış ve elde edilen destek Fe(III) iyonları ile etkileştirilmiştir. Ortamın pH'sı ve Fe(III) iyolarının derişimleri değiştirilerek farklı miktarlarda Fe(III) iyonları boya türevi mikro partiküllere yüklenmiştir. Kongo kırmızısı türevi ve Fe(III) ile kompleks oluşturmuş mikropartikülleri, GOD, sığır karaciğer CAT'ı, lizozim ve sığır serum

albumin adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Adsorpsiyon ortamında proteinlerin miktarı ve pH'nın değişimiyle bu mikro partiküllerin maksimum adsorpsiyon kapasitelerini belirlemişlerdir.

Lida T. ve Ark. (2000), *Micrococcus lyzodeikticus* kaynaklı CAT enzimini fotonla çapraz bağlanmış reçine kullanarak immobilize etmişler ve düşük derişimlerde hidrojen peroksit içeren atık sularda çalışmalar yapmışlardır. Fotonla çapraz bağlanmış reçine jelin uzun süreli hidrojen peroksit varlığında bile kararlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bazı prepolimerler (ENT-2000 polietilen glikol, ENTG-3800 polietilenglikol ve polipropilenglikol kombinasyonu) ve fonksiyonel monomerler (vinilpirolidonakrilolmorfolin, methakriloloksietilisosiyanik glukozid) ile taşıyıcı jelin modifiye edilmesi veya modifikasyon yapmadan stabilizör (Tween 80, polioksietilen, sorbitan monooleat, Triton X-100, polioksietilen,oktilfenileter) maddelerin eklenmesiyle immobilize edilmiş CAT'ın kararlılığını incelemişlerdir. Enzim hidrofilik fotonla çapraz bağlanmış reçineye immobilize edilirken, Tween 80, polioksietilen ve sorbitan monooleatın CAT'a eklenmesiyle önceki aktivitesinin % 80'nini gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Akgöl S. ve Dinçkaya, E. (1999), çözünmeyen oksijen prob ile CAT'ı birleştirerek H_2O_2'in belirlenmesi için bir biosensör geliştirmişlerdir. Biosensörün 1×10^{-5} - 3×10^{-3} M H_2O_2 içeren çözeltilerde doğrusal ölçüm yaptığını, ölçüm süresinin 30 s olduğunu, biosensörün 400 deneme ve 3 aydan uzun bir periyotta kararlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Cetinus Ş. ve Öztop H.N. (1999), CAT enzimini bir polisakkarit olan Sefadeks G-100 üzerine adsorbe ederek immobilize etmişlerdir. Serbest CAT ve immobilize CAT için optimum sıcaklığı 25 °C, optimum pH'yı 7,0 olarak bulmuşlardır. Serbest CAT için K_M'i 25,16 mM, V_{max}'ı 24042 μmol. dk^{-1}. mg $protein^{-1}$, immobilize CAT için ise K_M'i 28,03 mM, V_{max}'ı 6653 μmol. dk^{-1}. mg $protein^{-1}$ olarak rapor etmişlerdir.

Pickering G.J. ve ark. (1999), Düşük alkollü beyaz şarap üretimi için GOD-CAT enzim sisteminin kullanımını araştırmışlardır. Fermentasyon öncesinde üzüm

suyunun glukoz derişimini GOD ile düşürerek alkol içeriği düşük şarap üretmişlerdir. CAT enzimini ise glukozun glukonik aside dönüşümü esnasında moleküler oksijenin indirgenmesi ile açığa çıkan H_2O_2'in parçalanması amacıyla kullanılmştır. Üzüm suyunun 3,1 gibi düşük bir pH'ya sahip olması GOD'ın aktivitesini düşürdüğünden, üzüm suyuna önce 4,16 g $CaCO_3$/L eklemişler; böylece üzüm suyunun pH değerini GOD'nin yüksek aktivite gösterdiği pH:5'e yükseltmişlerdir. Glukozun % 87'sinin üzerindeki miktarının glukonik aside dönüşümesi sağlanacak şekilde optimizasyon yapılmış; fermentasyondan önce üzüm suyunu tekrar asitlendirmişlerdir. Enzimlerin serbest olarak kullanıldığı bu sistemde enzim dozajı, sıcaklık, havalandırma ve karıştırma hızının etkilerini incelemişlerdir. Glukoz ve glukonik asit miktarını HPLC; çözünmüş oksijen miktarını ise oksijenmetre kullanarak belirlemişlerdir.

Fernandez-Lafuante R. ve ark. (1998) D-amino asit oksidaz (DAAO) ve CAT enzimlerini glutaraldehit ile aktifleştirdikleri agaroz üzerine ko-immobilize ederek bu enzim sistemi ile D-fenil alananinden fenilpürivik asit üretimini araştırmışlardır. Böylece reaksiyon sistemine sürekli verilmesi gereken havanın oluşturduğu gaz kabarcıkları nedeniyle serbest DAAO enzimininin deaktivasyona uğraması poröz desteğe yapılan immobilizasyon ile engellenebilmiştir. İmmobilizasyonda kullanılan CAT enziminin reaksiyon sırasında açığa çıkan H_2O_2'in DAAO üzerindeki zararlı etkilerinin giderilmesinde etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Kramer L. ve ark. (1997) L-α-Gliserofosfattan dihidroksi aseton üretimi amacıyla L-α-Gliserofosfat Oksidaz (LGO) enzimini Eupergit C 250 L desteğine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Reaksiyon sırasında açığa çıkan H_2O_2'i parçalaması için CAT enzimi de LGO ile beraber ko-immobilize edilmiştir. İmmobilize edilen LGO:CAT oranlarını 100U:200 kU olarak belirlemişlerdir. Enzim sistemini akışkan yataklı ve karıştırmalı tank reaktörlerde kullanmış ve zamana bağlı olarak açığa çıkan dihidroksi aseton miktarını ölçmüşlerdir. Ko-immobilize edilmiş enzim sisteminin geri dönüşüm sayısının serbest enzimin % 90'ı kadar olduğunu saptamışlardır.

Campanella L. ve Ark. (1997), bu çalışmada, sığır karaciğer CAT'ını kappakarragenan jele tutuklama yöntemiyle immobilize ederek hem sulu hem de susuz çözücülerde çalışan bir biosensör geliştirmişlerdir. Kozmetikte kullanılan kremlerde, emulsiyonlarda ve dezenfektanlardaki H_2O_2 'in miktarını belirlemişlerdir.

Bulmuş V. ve ark. (1997), sentezledikleri polimetilmetakrilat desteğini farklı arakol bileşiklerle modifiye ederek GOD enzimini glutaraldehit aracılığı ile kovalent olarak bağlamışlardır. İmmobilizasyon şartlarını arakol türü, ortam pH'sı, ortam sıcaklığı, GOD başlangıç derişimi ve immobilizasyon süresi için optimize etmişlerdir. En yüksek etkinliği diaminohekzan arakolu üzerinden, pH 6,0'da ve 30 °C'de yapılan immobilizasyon çalışmaları sonucunda elde ettikleri immobilize GOD'nin gösterdiğini bildirmişlerdir. En uygun koşullarda elde ettikleri immobilize GOD enzimini karakterize ederek elde ettikleri sonuçları serbest enzim ile kıyaslamışlardır.

Harborn U. ve ark. (1997), Gözenek büyüklüğü kontrollü camı önce silanlayıp glutaraldehit ile etkileştirmişler; sonra da GOD ve CAT'ı immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimleri akışkan-enjeksiyon esaslı minyatür bir termal biosensör tasarımında kullanmışlardır. Hiçbir ön işlem uygulamaksızın tam kanda glukoz derişimini belirlemek amacı ile kullanılan biosensörde analizi yapılan kana ait hemotokrit değerinin sonuca etkisini incelemişlerdir. 5 dakikalık ölçüm peryodunda en az 100 tam kan örneğinin analizinin yapılabildiğini ve 0,5-16 mmol/L glukoz derişimi aralığı için lineer cevap alındığını bildirmişlerdir.

Naka K. ve Ark. (1996), bu çalışmada gözenek büyüklüğü 7 nm olan silika jele (Wakogel C-300) pH=7,0 de adsorplanan CAT miktarının poli[(N-asetilimino) ve poli(N-pentanilimino) etilen içeren blok kopolimerlerden oluşan polimer varlığında önemli oranda arttığını bildirmişlerdir. Gözenek büyüklüğü 80 nm olan silika jele (MB-800) poli[(N-asetilimino)etilen] ve poli[(nanonilimino)etilen] içeren blok kopolimerler varlığında çeşitli pH'larda CAT ve yaban turpu peroksidazının adsorplanan miktarlarını incelemişlerdir. Alkali koşullarda (pH=8,0) ikinci çalışmada silika yüzeyinde adsorplanan CAT miktarının, kopolimerin yokluğunda silika yüzeyinde adsorplanan CAT miktarından 10 kat fazla olduğunu, ilk yapılan çalışmada pH=7,0'de silika yüzeyinde adsorplanan CAT miktarının, kopolimer yokluğunda adsorplanan CAT miktrarından 7 kat fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Solas M.T. ve Ark. (1994), Sığır karaciğer kaynaklı CAT'ı bioskin adı verilen *Acetobacterxylium* ve bir kaç bakteri tarafından kültürde üretilen doğal bir polimer üzerine iyonik adsorpsiyon ile immobilize etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda düşük enzim derişimi kullanılarak elde edilen immobilize enzimin H_2O_2 'te karşı ilgisinin serbest enzimden % 30 daha az olduğu rapor edilmiştir. İmmobilize CAT'ın oda sıcaklığında depolama kararlılığını incelediklerinde 16 gün sonra aktivitesinin % 70'nin kaldığını, serbest CAT'ın ise 3 gün içinde inaktif hale geldiğini rapor etmişlerdir.

Vasudevan P.T. ve Weiland R. H. (1994), gözeneksiz cam destek üzerine tutturulmış Aspergillus ve sığır karaciğer CAT'ının elektron mikroskobu ile morfolojik çalışmalarını yapmişlardır. Aspergillus CAT'ının, sığır karaciğer CAT'ından daha yoğun, sık bir şekilde yüzeyde tutunduğu rapor etmişlerdir.

Tarhan, L., (1994), Süt sterilizasyonunda kullanılan H_2O_2'in aşırısının uzaklaştırılması amacıyla 2-amino-4,6-dikloro-s-triazin ile modifiye edilmiş DEAE-selüloz desteğe hekzametilendiamin ve glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş CAT'ı kullanmıştır. H_2O_2'in ham sütün sterilizasyonundaki kapasitesi araştırılırken H_2O_2 derişimi, süre ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. İmmobilize CAT'ın en yüksek aktivite gösterdiği pH ve sıcaklığı belirlemiş ve kinetik parametrelerini saptamıştır. Başlangıçta ham sütün bakteri ve koliform içeriği ölçülmüş ve H_2O_2 ilavesinden sonra sütün içerisindeki koliform ve bakteri miktarının zamana bağlı olarak değişimini izlemiştir.

Vrbová E. ve Marek M. (1990), HCl ile kısmi olarak hidrolizlenmiş naylon ağ üzerine Ugi reaksiyonu ile GOD ve CAT'ı ko-immobilize etmişlerdir. Enzimlerin immobilize edildiği naylon ağı oksijen sensörü ile birleştirerek D-glukoz için spesifik bir biosensor tasarlamışlardır. Karşılaştırma yapmak amacı ile GOD ve CAT'ı siklohekzil izosiyanür yokken ve sadece GOD'ı siklohekzil izosiyanür varlığı ve yokluğunda immobilize ederek sıcaklık ve pH'nın aktivite üzerine etkisini incelemişlerdir. Siklohekzil izosiyanür varlığında immobilize edilmiş GOD ve CAT sisteminin 6 ay sonrasında aktivitesini % 90 koruduğunu belirlemişlerdir.

Chatterjee U. Ve ark. (1990), keçi karaciğerinden saflaştırılmış CAT'ı alumina, poliakrilamid, jelatin ve tavuk yumurtası kabuğu gibi farklı desteklere immobilize

ederek katalitik aktivitelerini incelemişlerdir. Yumurta kabuğuna immobilize edilmiş enzimin daha yüksek depolama kararlılığı gösterdiğini ve H_2O_2'e karşı ilgisinin daha fazla olduğunu, ayrıca serbest enzim ile karşılaştırıldığında formaldehid ve azid inhibisyonundan daha az etkilendiğini belirlemişlerdir.

Tarhan L. ve Telefoncu A. (1989), Dietil amino etil-selüloz türevi olan 2-amino-4-kloro-s-triazin ve akrolein/stiren kopolimeri desteklerine GOD ve CAT'ı immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyonu diamino hekzan ve glutaraldehit kullanarak gerçekleştirmişlerdir. İki enzimin immobilizasyonunda aktivitedeki değişimleri sıcaklık ve pH'ya bağlı olarak araştırmışlardır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck, Darmstadt veya Sigma, St. Louis, MO. firmasından sağlanmıştır. Araştırmada kullanılan kimyasallar, araç ve gereçler şunlardır:

Kimyasallar: *Aspergillüs niger* kaynaklı glukoz oksidaz (Sigma G-0543, 429 U. mg^{-1}, 24 mg. ml^{-1}) sığır karaciğer CAT'ı (Sigma C-100, 51100 U. mg $prot.^{-1}$ 35 mg ml^{-1}), florisil (sodyum-magnezyum silikat içeren anorganik matriks, 60-100 mesh), aseton, glutaraldehit, 3-aminopropil trietoksisilan (APTES), glukoz, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA), fenol, sodyum sülfit, sodyum sitrat, hidrojen peroksit, aseton, karbonat, sodyum hidroksit, nitrik asit, bakır (II) sülfat, sodyum-potasyum tartarat, folin-ciocalteu çözeltisi, sığır albumini, sodyum klorür.

Araç ve gereçler: UV-Vis spektrofotometre, oksijenmetre, pH metre, peristaltik pompa, inkübatör, santrifüj, termostatlı çalkalayıcı, analitik terazi, girdap karıştırıcı, magnetik karıştırıcı, otomatik pipet.

3.2. Metod

3.2.1. Protein Tayini

Protein tayini Lowry (1951) yöntemiyle yapılmıştır. Bunun için içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1) Çözelti A: 20 g Na_2CO_3 ve 4 g NaOH saf suda birlikte çözülüp son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

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

3) Çözelti C: 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. (Kullanılacağı zaman hazırlanmasına dikkat edilmiştir).

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

5) Standart protein çözeltisi:100 mL'de 14 mg sığır albümini olacak şekilde 0,9'luk NaCl çözeltisi ile hazırlanmıştır.

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

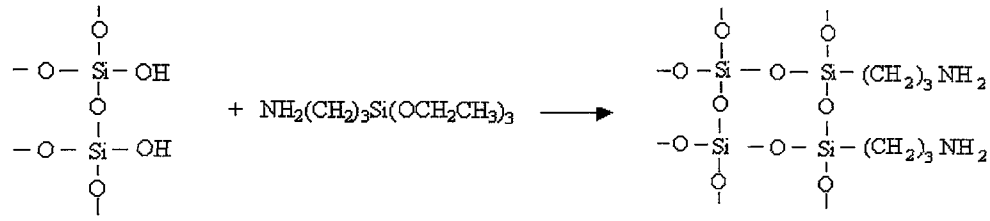
3.2.2. Florisilin İmmobilizasyon için Hazırlanması

Florisilin immobilizasyon için hazırlanması 3 aşamada gerçekleştirilmiştir.

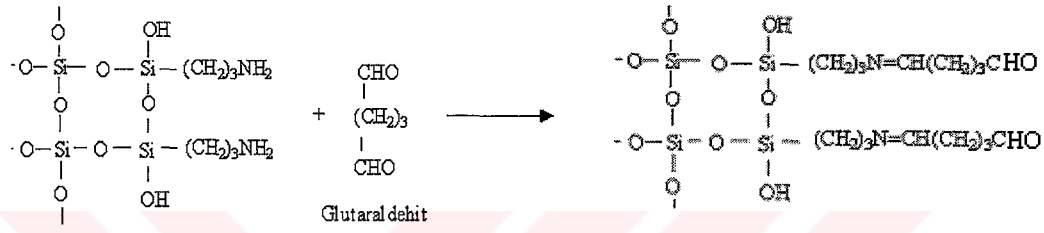
1. Florisilin HNO_3 çözeltisi ile yıkanması
2. APTES ile alkilamin türevinin hazırlanması
3. Silanlanmış desteğin glutaraldehit ile aktifleştirilmesi

Alkilamin türevinin hazırlanmasında (silanlama) Weetall H.H (1976) tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır. Yöntemde, destek materyali olarak seçilen florisilin 1 gramı 50 ml %5 (v/v)'lik nitrik asit ile 80-90 °C'de 60 dakika etkileştirilir ve sonrasında su ile yıkanıp 120 °C'de kurutulur. Kurutulmuş desteğin 1 gramı hacimce % 4'lük APTES'ın aseton içerisindeki çözeltisinin 25 ml'sine eklenerek 45 °C'de 24 saat bekletilir. Saf su ile yıkanarak bağlanmayan APTES uzaklaştırılır ve destek 115 °C'de etüvde 1 gece kurutulur. Alkilamin türevinin glutaraldehit ile aktifleştirilmesi için Costa (2001) ve Wco (1992) tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır. 1 gram silanlanmış desteğe 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış olan % 2,5 (v/v)'luk glutaraldehit çözeltisinin 25 mL'si eklenmiş ve çalkalayıcıda 120 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon sonunda reaksiyona girmemiş glutaraldehit saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve destek 60 °C'de 1 saat süreyle kurutulmuştur.

Florisilin silanlanması (alkilamin türevinin hazırlanması):



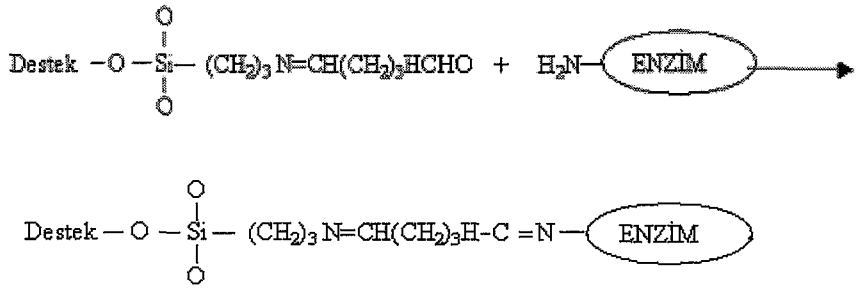
Glutaraldehitin desteğe bağlanması:



3.2.3. GOD veya CAT Enzimlerinin Florisil Desteğe Kovalent Olarak Bağlanması

GOD veya CAT enzimlerinin gluteraldehit üzerinden immobilizasyonunda kullanılan yöntemin esası literatürde Costa S.A.(2001) tarafından bildirilmiştir. GOD veya CAT enziminin desteğe kovalent olarak bağlandığı reaksiyon aşağıdaki gibidir:

Glutaraldehit üzerinden enzimin bağlanması:



İmmobilizasyon işlemlerinde protein içeriği bilinen enzim çözeltileri destek ile etkileştirildikten sonra bağlanmayan enzim immobilizasyon tamponuyla yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemine 280 nm'de süzüntüde absorbans görülmeyinceye

kadar devam edilmiştir. İmmobilize edilen enzim miktarının belirlenmesi için Lowry yöntemiyle süzüntüde protein tayini yapılmıştır. İmmobilizasyon işleminin başında ortamda bulunan protein miktarından süzüntüdeki protein miktarı çıkartılarak desteğe bağlanan enzim miktarı mg enzim. g destek^{-1} olarak hesaplanmıştır.

3.2.4. Serbest ve İmmobilize GOD Aktivitesinin Belirlenmesi

GOD enzimi β-D-glukoza spesifik olduğundan, mutarotasyon dengesine ulaşması için hazırlandıktan sonra en az 2 saat bekletilmiş ve tüm çalışmalarda kullanılmadan önce havayla doyurulmuştur.

GOD enziminin katalizlediği reaksiyon sisteminde glukoz ve O_2 derişimi zamana bağlı olarak azalırken H_2O_2 derişimi artmakta, açığa çıkan glukonik asit ise pH'nın sürekli düşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle literatürde bu özeliklere bağlı olarak aşağıda verilen yöntemlerle GOD aktivitesi belirlenmektedir.

Çözünmüş oksijen derişimindeki azalma

GOD ile ilgili çalışmaların başlangıcından itibaren ilk olarak çözünmüş oksijen derişimindeki azalmanın ölçülmesi ile enzim aktivitesi belirlenmiş olup bu yöntem günümüzde de kullanılmaktadır (Haouz 2001, Bao 2001, Vrbova 1993-1990, Tarhan 1992-1989, Bouin 1976, Weibel 1971(b), Rogers 1971, Okuda 1970, Gottlieb 1967, Kleppe 1966). Çözünmüş oksijen derişiminin belirlenmesi için ticari olarak satılan oksijenmetreler kullanılmaktadır.

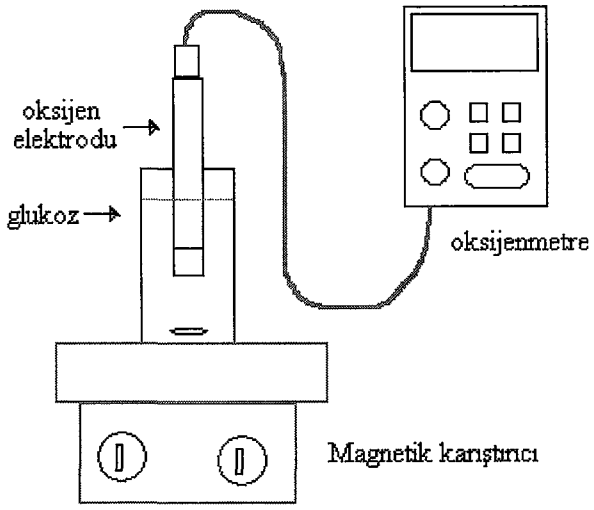
Oksijenmetrede yaygın olarak Clark oksijen elektrodu kullanılır. Bu elektrotda katot altın veya platin, anot gümüş veya Ag/AgCl, elektrolit çözeltisi ise KCl'dür. Metal elektrodlar elektrolit çözeltisi ile, elektrolit çözeltisi ise O_2 için seçici geçirgen olan teflon, polipropilen gibi organik bir membran ile çevrelenmiştir. Elektrot analiz çözeltisine daldırıldığında çözeltideki O_2 memrandan elektrolit çözeltisine diffüzlenir ve katot yüzeyinde indirgenir. Anot ve katotda aynı anda meydana gelen reaksiyonlar aşağıda verilmiştir [5]:

$$4\,Ag \longrightarrow 4\,Ag^{+} + 4\,e^{-} \quad \text{ve} \quad 4\,Ag^{+} + 4\,Cl^{-} \longrightarrow 4\,AgCl \qquad \textbf{(Anot)}$$

$$O_2 + 2\,H_2O + 4\,e^{-} \longrightarrow 4\,OH^{-} \qquad \textbf{(Katot)}$$

Her bir mol O_2'nin indirgenmesi için 4 mol e^- kullanıldığından devreden geçen akım O_2 derişimiyle orantılı olacaktır. Ortamda sadece O_2'nin indirgenmesi için katod ile anot arasındaki potansiyel fark -0,60 ile -0,80 V arasında tutulur. Reaksiyon sırasında O_2'nin sürekli olarak indirgenmesi nedeniyle membrana yakın bölgelerde O_2 gradiyenti oluşur. Bu nedenle O_2 derişiminin sabit tutulabilmesi için çözeltinin sürekli karıştırılması gerekir. Ayrıca katot yüzeyinde meydana gelen reaksiyon nedeniyle açığa çıkan OH^-'in dengelenebilmesi için elektrolit çözeltisinin tamponlanması ve belirli aralıklarla değiştirilmesi gereklidir [6].

Bu çalışmada 10 ml glukoz çözeltisi içeren reaksiyon kabına oksijenmetre elektrodu daldırılmış ve magnetik karıştırıcıda sürekli karıştırılarak sistemin dengeye ulaşması sağlanmıştır. Serbest veya immobilize GOD'nin eklenmesi ile reaksiyon başladıktan itibaren 5 dk boyunca oksijen derişimindeki azalma izlenmiştir. GOD enziminin tek başına immobilizasyonun optimizasyonu ve immobilize enzimin karakterizasyonunda kinetik parametreler dışındaki tüm çalışmalarda aktivite tayini bu yöntemle yapılmıştır. Oksijenmetre ile aktivite tayini Şekil 3.1'de verilen şemada gösterilmektedir.



Şekil 3.1. GOD aktivitesinin belirlenmesinde oksijenmetrenin kullanımının şematik gösterimi

Açığa çıkan H_2O_2 miktarının belirlenmesi

GOD aktivitesi belirlenirken H_2O_2 miktarının belirlenmesine dayalı yöntemler son yıllarda en fazla tercih edilen yöntemdir. Yöntemin esası, açığa çıkan H_2O_2 in peroksidaz enzimi varlığında kromojen bir bileşiği yükseltgemesi ile açığa çıkan renk şiddetinin UV-Vis spektrofotometrede belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Kromojen madde olarak literatürde başta o-dianisidin (Dai 2002, Li-Qun 2002, Yavuz 2002, Aken 2000, Frederick 1990) olmak üzere, 4-aminoantipirin (Brahim 2002, Heruyama 1998, Appleton 1997, D'Agnillo 1993), 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) (Portaccio 2002, Ukeda 1998), o-tolidin (Cosnier 2002), o-fenilendiamin (Lafuente 1998) gibi maddeler kullanılmıştır. H_2O_2 miktarının $KMnO_4$ ile titre edilerek (Tzanov 2001), 235-240 nm'de absorbansı okunarak (Bright 1969), KI ile mumele edilerek de (Hornby 1970) belirlendiği çalışmalar da bulunmaktadır.

Bu çalışmada immobilize GOD'nin tekrar kullanım kararlılığının belirlenmesinde, reaksiyon sonunda açığa çıkan H_2O_2 miktarının belirlenmesi için reaksiyon karışımının 240 nm'deki absorbansı belirlenmiştir.

Glukonik asit miktarının belirlenmesi

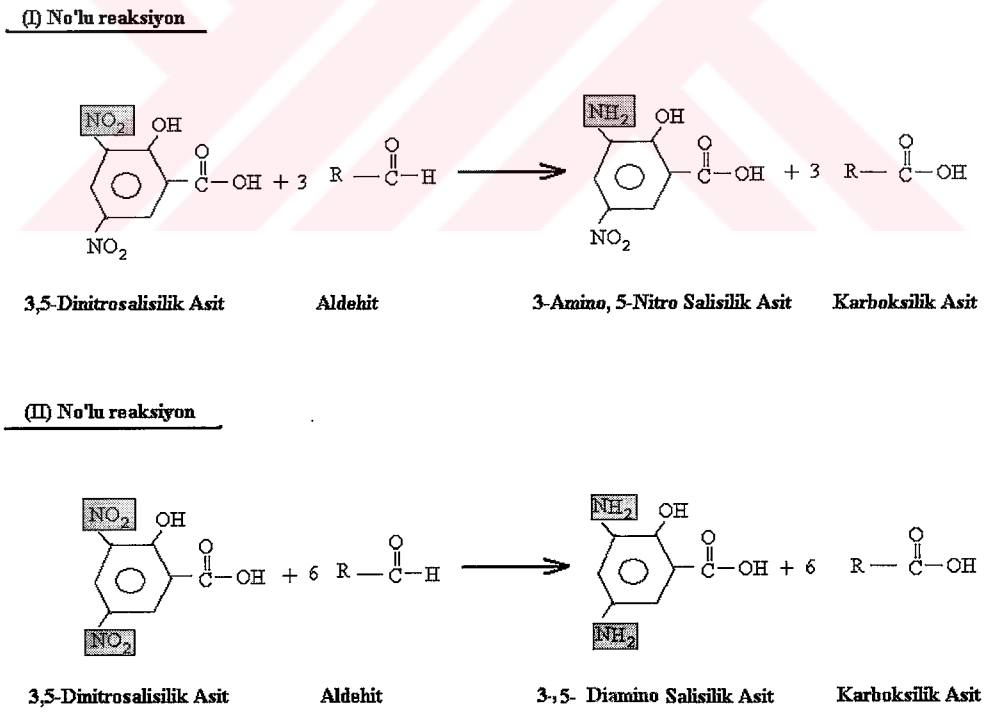
Literatürde glukonik asit miktarının belirlenmesine dayalı yöntemlerin başında pH değerindeki düşmenin zamana bağlı olarak izlenmesi gelmektedir (Zhang 2002, Podual 2000). Bir diğer yöntem ise açığa çıkan asit miktarının ayarlı NaOH ile otomatik veya elle titrasyonudur (Klein 2002, Zhao 2002, Bautista 2001, Lu 1996, Prenosil 1979). Glukonik asit miktarının HPLC ile belirlendiği (Klein 2002) çalışmalar da bulunmaktadır.

Bu çalışmada farklı reaktör sistemlerinde GOD enziminin tek başına veya CAT ile beraber kullanımındaki etkinliğinin belirlenmesi için reaksiyon sisteminde pH'nın zamana bağlı olarak değişimi ölçülmüştür.

Glukoz derişimindeki azalmanın belirlenmesi

Glukoz derişimindeki azalmaya bağlı olarak aktivite tayini için Dinitrosalisilik asit (DNSA) yöntemi kullanılmaktadır (Blandino 2002, Blandino 2001, Petruccioli 1995). Ayrıca titansülfat (Bao 2001) veya glukoz kiti kullanılarak azalan glukoz derişiminin belirlendiği çalışmalar da mevcuttur.

DNSA Yöntemi ilk kez Sumner ve arkadaşları tarafından (1921) geliştirilmiştir. Yöntem bir indirgen şekerin 3,5-Dinitrosalisilik asit ile alkali ortamda yükseltgenmesi esasına dayanmaktadır. İndirgen şekerdeki aldehit veya keton grubunun karboksilik aside yükseltgenip, DNSA'nın indirgendiği reaksiyonun stokiyometrisi karışıktır. DNSA yapısındaki nitro gruplarından birinin amino grubuna indirgenmesi için 6 elektrona ihtiyaç vardır. Bir aldehit grubu karboksilik aside yükseltgenirken 2 elektron verdiğine göre bir nitro grubu ile stokiyometrik olarak 3 indirgen şeker reaksiyona girmektedir. Miller (1959) reaksiyonda DNSA'nın 3 mol glukozu yükseltgeyerek 3-amino,5-nitrosalisilik aside indirgendiğini (I no'lu reaksiyon), Canizares-Macias (2001) ise 6 mol glukozu oksitleyerek DNSA'nın 3,5-Diaminosalisilik aside dönüştüğünü belirtmektedir. Şekil 3.2'de Glukozun DNSA ile verdiği reaksiyonun (I ve II) şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 3.2. Glukozun DNSA ile verdiği reaksiyonun şematik gösterimi

Yukarıda verilen reaksiyonlar ancak yüksek sıcaklık (en az 80 °C) ve alkali ortamda gerçekleşebilmektedir. Ancak alkali ortam ve yüksek sıcaklıkta O_2 yan reaksiyonlara neden olacağı için DNSA reaktifine eklenen sodyum-potasyum tartarat ile çözünmüş oksijenin istenmeyen etkileri ortadan kaldırılmıştır. Miller (1959) çalışmasında reaktif bileşenlerinin etkisini inceleyerek, özellikle tartarat derişimi için yöntemi optimize etmiştir. Reaktife eklenen fenol renk şiddetini, sülfit ise rengin kararlılığını arttırmaktadır. Sülfit, çözeltideki çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için yaygın olarak kullanılan bir kimyasal olmakla beraber DNSA reaktifinde bulunan tartarat ile girişim yaparak bu etkiyi göstermediği belirlenmiştir. Tartaratın eklenmemesi durumunda sülfit iyonu çözünmüş oksijeni uzaklaştırılmasında etkili olmuş, ancak oluşan rengin stabilitesinin düştüğü belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan reaktifin bileşimi (w/v) olarak aşağıda verilmiştir.

% 1 DNSA
% 0,2 Fenol
% 0,05 Sodyum Sülfit
% 1 Sodyum Hidroksit
% 30 Sodyum-Potasyum Tartarat

DNSA Yöntemi ile glukoz tayini yapmak için 0,5 ml glukoz çözeltisi ile 0,5 ml DNSA reaktifi bir tüpte karıştırılır, kaynar su banyosunda 10 dk tutulur. Tüm tüpler aynı anda kaynar su banyosundan alındıktan sonra buz banyosunda 1 dk soğutulur. Çözelti üzerine 7 ml damıtık su eklenerek seyreltilir ve girdap karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 575 nm'de absorbansı okunur.

Aktiviteyi belirlemek için 0,012 mg ml^{-1} derişimindeki serbest GOD çözeltisinin 10 µl'si veya immobilize GOD enziminin 5 mg'ı 10 ml glukoz çözeltisi ile etkileştirilmiştir. 10 dk sonra karışımdan 0,5 ml alınmış ve aynı hacimdeki DNSA reaktifine eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Azalan glukoz miktarı hesaplanarak aktivitenin belirlendiği bu yöntem ko-immobilize enzim sisteminde ve GOD'nin tek başına immobilize edildiği çalışmalarda sadece kinetik parametrelerin saptanmasında kullanılmıştır.

Diğer yöntemler

Enzim etkinliğinin elektrokimyasal olarak belirlendiği çalışmalar da mevcuttur. Özellikle enzim elektrodu ve biosensör tasarımında yaygın olarak kullanılan GOD enzimi için amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerin yapıldığı çok sayıda literatür mevcuttur (Vianello 2002, Tinkılıç 2002, Eftekhari 2002, Portaccio 2002, Cosnier 2002, Reiter 2001, Zhang 2001, Yasuzawa 2000, Garjonyte 2000, Katz 1999, Yang 1998).

Reaksiyon sonunda çözeltinin sıcaklık ve ısı kapasitesindeki değişimlerin veya (Ramanathan 2001, Harborn 1997) enzimin yapısında meydana gelen değişikliklerin, örneğin oksijensiz ortamda indirgenen FAD miktarının (Chudobova 1996), belirlendiği literatürler de mevcuttur.

3.2.5. Serbest ve İmmobilize CAT Aktivitesinin Belirlenmesi

CAT aktivitesi Aebi tarafından önerilen ve Lartillot, S. ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. Enzimatik aktivite tayini, hidrojen peroksidin 240 nm'deki absorbansının enzim ile etkileşmesinden sonra azalmasının zamana bağlı olarak ölçülmesiyle yapılmıştır. Hidrojen peroksit için molar ekstinksiyon katsayısı 0,0396 cm^2 μmol^{-1}'dır. Yöntemde, uygun derişim ve pH'daki tampon içinde 10 mM H_2O_2 olacak şekilde substrat çözeltisi hazırlanır. 20 µl test edilecek enzim çözeltisi üzerine 2,5 ml substrat çözeltisi eklenir ve 37 °C'de 2 dakika bekletilir. Reaksiyonu durdurmak için ortama 0,5 ml 1 M HCl çözeltisi ilave edilir. 240 nm'de absorbansı (Ar) ölçülür.

Kör olarak 2,5 ml tampon ve 0,5 ml 1 M HCl içeren çözelti kullanılarak aynı işlemler tekrarlanır.

H_2O_2'in başlangıçtaki absorbansını (As) belirlemek için; 2,5 ml substrat ve 0,5 ml 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülür.

Proteinin neden olacağı absorbansı (At) belirlemek için; 20 µl enzim çözeltisi, 2,5 ml tampon ve 0,5 ml 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülür.

Enzimatik aktiviteden dolayı absorbans (A) değişimi;

A=(As+At)-Ar

Enzim aktivitesinin $IUml^{-1}$ cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılır.

$$\text{Aktivite} = \frac{A.\ V_t}{\varepsilon.\ t.\ V_e}$$

V_t = Toplam reaksiyon hacmi (ml)

V_e = Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (ml)

ε = H_2O_2'nin molar ekstinksiyon katsayısı(0,0396 $cm^2\ \mu mol^{-1}$)

t = Reaksiyon zamanı (dakika)

Bu çalışmada her bir örnekteki protein miktarı belirlenerek aktivite µmol H_2O_2 mg $prot^{-1}$ dk^{-1} olarak hesaplanmıştır.

İmmobilize CAT aktivitesinin ölçümünde, immobilize CAT içeren 5 mg destek alınarak üzerine uygun derişim ve pH'daki tampon içinde hazırlanmış olan 10 mM H_2O_2 çözeltisinden 5 mL eklenir. 2 dakika sonunda reaksiyon 1 ml 1 M HCl çözeltisi eklenerek durdurulur. 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilir ve üst faz alınarak 240 nm'de absorbansı ölçülür (Ar). Başlagıçta H_2O_2 absorbansını (As) belirlemek için; 5,0 ml substrat ve 1,0 ml 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülür. Proteinin neden olacağı absorbansı belirlemek için (At); immobilize CAT içeren 5 mg destek, 5,0 ml tampon ve 1,0 ml 1 M HCl içeren karışım 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilir ve üst faz alınarak 240 nm'de absorbansı ölçülür. İmmobilize edilmiş CAT için aktivite iki şekilde µmol H_2O_2 mg $prot^{-1}$ dk^{-1} olarak veya µmol H_2O_2 g des^{-1} dk^{-1} olarak hesaplanmıştır.

3.2.6. GOD ve CAT Enzimlerinin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

3.2.6.1. İmmobilizasyon pH'sı

0,1 mg. ml^{-1} derişimindeki enzim (GOD veya CAT) çözeltisi 50 mM ve farklı pH'larda (3,5, 4,2, 5,4, 6,0, 7,0 ve 8,0) tampon içinde hazırlanmış ve bu çözeltinin 10 ml'si 1 gram destek ile 20 °C'de 1 saat süreyle etkileştirilmiştir. Daha sonra immobilizasyon tamponuyla 280 nm'de süzüntüde absorbans görülmeyinceye kadar yıkanmış, böylece bağlanmayan enzim uzaklaştırılmıştır. İmmobilize edilen enzim

miktarının belirlenmesi için Lowry yöntemiyle süzüntüde protein tayini yapılmıştır. İmmobilizasyon işleminin başında ortamda bulunan protein miktarından süzüntüdeki protein miktarı çıkartılarak gram destek başına tutuklanan mg enzim miktarı hesaplanmıştır. Farklı pH'larda immobilize edilen enzim örneklerinin aktiviteleri U. g destek^{-1} olarak belirlenmiştir.

3.2.6.2. İmmobilizasyon Sıcaklığı

İmmobilizasyon için en uygun sıcaklığın saptanması amacıyla bölüm 3.2.6.1'de anlatıldığı şekilde belirlenen pH'da ve farklı sıcaklıklarda immobilizasyon yapılmıştır. Bunun için 50 mM tampon çözeltilerinde derişimi 0,1 mg ml^{-1} olacak şekilde hazırlanmış GOD (veya CAT) enziminin 10 ml'si 1 gram destek ile 5- 10- 20 - 30- 40 ve 50 °C sıcaklıklarda 1 saat süreyle etkileştirilmiştir. İmmobilizasyon süresi sonunda tüm örnekler için gram destek başına bağlanan enzim miktarı ve aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.6.3. Başlangıç Enzim Derişimi ve İmmobilizasyon Süresi

GOD (veya CAT) enziminin immobilizasyonu 3 farklı başlangıç derişimi (0,5, 1,0 ve 2,0 mg. ml^{-1}) için 5 farklı sürede (60, 90, 120, 150 ve 180 dk) yapılmış ve her örneğin gram destek başına bağlanan enzim miktarı ve aktiviteleri ile spesifik aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.7. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

3.2.7.1. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum pH'larının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize GOD enziminin aktivitesi farklı pH'larda (4,5, 5,0, 5,5 asetat, 6,0, 6,5, 7,0, 8,0 fosfat ve 9,0 borat) 100 mM tampon içinde hazırlanmış 100 mM glukoz çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. 5 dakika sonunda azalan oksijen derişimi ölçülerek aktiviteler hesaplanmış ve sonuçlar % maksimum aktivite olarak pH'a karşı grafiğe geçirilmiştir.

Serbest ve immobilize CAT enziminin aktivitesi farklı pH'larda (5,5 asetat, 6,0, 6,5, 7,0, 8,0 fosfat ve 9,0 borat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 10 mM H_2O_2

çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar % maksimum aktivite olarak pH'a karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.2.7.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Tampon Derişimlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize GOD veya serbest ve immobilize CAT enzimlerinin aktiviteleri daha önce belirlenmiş olan optimum pH larda ve farklı tampon derişimlerinde (25, 50, 100, 150 ve 200 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.7.3.Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize GOD ve CAT aktiviteleri daha önce saptanmış olan optimum pH ve tampon derişimi için farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60 °C) belirlenmiştir. Her enzim sistemi için aktivitenin sıcaklıkla arttığı ve azaldığı bölgeler için Arrhenius bağıntısına göre 1/T'e karşılık ln aktivite değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen iki doğrunun ortak çözümü ile enzimin denatüre olmaya başladığı sıcaklık belirlenmiştir. Aktivitenin sıcaklıkla arttığı bölge için elde edilen grafiğin eğimi yardımıyla enzimin aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır.

3.2.7.4. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleri optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Ayrıca her enzim için geri dönüşüm sayısı ile katalitik etkinlik parametreleri hesaplanmıştır.

3.2.7.5. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize GOD (veya serbest ve immobilize CAT) enzimleri 8 farklı sıcaklıkta (10, 20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60 °C) 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 3, 6, 10 ve 24 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir. Aktiviteler belirlenirken serbest GOD (veya CAT) ile immobilize GOD (veya immobilize CAT)'nin aynı miktarda enzim proteini içermesine dikkat edilmiştir.

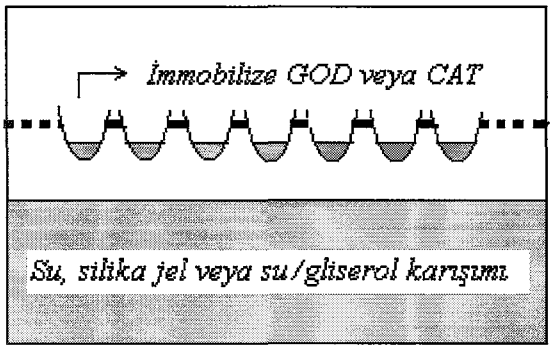
Serbest GOD enziminin 0,012 mg ml^{-1}, serbest CAT enziminin ise 0,0014 mg ml^{-1} derişimindeki çözeltilerinin termal kararlılığı belirlenirken, aynı çalışma immobilize enzimler için yapıldığında kuru haldeki preparatlar inkübe edilmiştir. Sonuçlar başlangıç aktivitesine göre % kalan aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.2.7.6. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

0,012 mg ml^{-1} derişimindeki serbest GOD, 0,0014 mg ml^{-1} derişimindeki serbest CAT ile immobilize GOD ve CAT enzimlerinin başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4 °C ve oda sıcaklığında (25 °C'de) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş; bu enzimlerin kalan aktiviteleri 2 ay boyunca belirli aralıklarla ölçülmüştür.

3.2.7.7. İmmobilize Enzimlerin Farklı Bağıl Nem Ortamlarındaki Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

İmmobilize GOD veya CAT enzimleri 5'er mg tartılarak 6x10 mm boyutlarındaki ağzı açık tüplere konmuş ve farklı bağıl nem ortamları (%0, 20, 40, 60, 80 ve 100) içeren kapalı kutulara yerleştirilmiştir (Şekil 3.3).



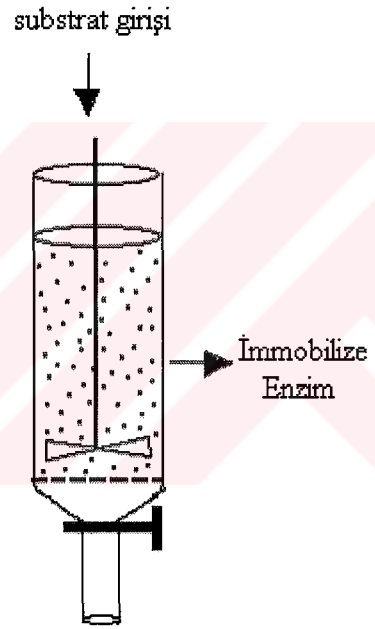
Şekil 3.3. İmmobilize enzimlerin depolandıkları farklı bağıl nem ortamlarının şematik gösterimi.

% 0 bağıl nem ortamı sağlamak için silika jel, % 20, 40, 60 ve 80 bağıl nem ortamı sağlamak için uygun oranlarda karıştırılmış su/gliserol çözeltileri ve son olarak %

100 bağıl nem ortamı sağlamak sadece su kullanılmıştır. Oda sıcaklığında bekletilen kutulardan 2 ay süreyle belirli aralıklarla 3 veya 4 örnek alınarak kalan aktiviteler belirlenmiştir. Su/gliserol çözeltileri her hafta hazırlanan aynı derişimdeki taze çözelti ile değiştirilmiştir.

3.2.7.8. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

İmmobilize GOD ve CAT enzimlerinin tekrar kullanım kararlılıkları belirlenirken kesikli ve karıştırmalı kolon reaktör kullanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıklarının belirlendiği kesikli ve karıştırmalı kolon reaktör.

50 mg immobilize GOD kolona eklendikten sonra üzerine 5 ml (100 mM ve optimum pH'da tampon içinde hazırlanmış) glukoz çözeltisi eklenmiş ve 5 dk sonunda alttaki musluğun açılması ile kolon boşaltılmıştır. Enzim aktivitesi, açığa çıkan H_2O_2'in absorbansının 240 nm'de ölçülmesi ile belirlenmiştir. Boşaltıldıktan 20 s sonra aynı kolona tekrar 5 ml substrat eklenerek aynı şekilde aktivite belirlenmiş

ve bu işlem 50 kez tekrarlanmıştır. Kalan aktivite 1. kullanımdaki aktivitenin %'si olarak hesaplanmıştır.

10 mg immobilize CAT enzimi kolona eklendikten sonra üzerine 5 ml 10 mM (50 mM ve optimum pH'da tampon içinde hazırlanmış) H_2O_2 eklenmiş ve 2 dk sonunda kolonun altındaki musluk açılarak reaksiyon karışımı bir tüpe aktarılmıştır. Enzim aktivitesi, reaksiyon çözeltisinin 240 nm'deki absorbanslarının ölçülmesi ile hesaplanmıştır. Boşaltıldıktan 20 s sonra aynı kolona tekrar 5 ml substrat eklenmiş ve bu işlem 50 kez tekrarlanmıştır. Kalan aktivite 1. kullanımdaki aktivitenin %'si olarak hesaplanmıştır.

3.2.8. GOD ve CAT Enzimlerinin Ko-immobilizasyonu

GOD ve CAT enzimlerinin ko-immobilizasyonunda, bu enzimlerin ayrı ayrı immobilizasyonu için belirlenen optimum koşullar dikkate alınarak ko-immobilizasyonun pH'sı, sıcaklığı ve süresi seçilmiştir. GOD ve CAT enzimlerinin ko-immobilizasyonu 2 farklı şekilde yapılmıştır. Birinci grup çalışmalarda her iki enzimi de farklı oranlarda içeren enzim çözeltisi destekle etkileştirilerek GOD ve CAT'ın birlikte ko-immobilizasyonu sağlanmıştır. İkinci grup çalışmalarda ise desteğe önce farklı başlangıç derişimlerinde GOD immobilize edilmiş ve gram destek başına bağlanan GOD miktarları belirlenmiştir. Daha sonra immobilize GOD farklı başlangıç derişimlerinde CAT çözeltileri ile etkileştirilmiş ve böylece sıralı ko-immobilizasyon yapılmıştır. Her iki grup çalışmada da 3 farklı GOD başlangıç derişimi (0,5, 1,0 ve 2,0 mg ml^{-1}) ve 4 farklı CAT başlangıç derişimi (0,1 0,5, 1,0 ve 2,0 mg ml^{-1}) seçilerek 12 ko-immobilizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmalarda farklı başlangıç derişimlerinde ko-immobilize edilen örneklerin bulgular ve tartışma kısmında kolaylıkla takip edilebilmesi için örnekler 2 rakamdan oluşan sayılarla sembolize edilmişlerdir. Bu sayılardan birincisi ko-immobilizasyonda kullanılan GOD'nin başlangıç derişimine, ikincisi ise ko-immobilizasyonda kullanılan CAT'ın başlangıç derişimine karşılık gelmektedir. Ko-immobilizasyonda kullanılan enzimlerin 0,1, 0,5, 1,0 ve 2,0 mg ml^{-1} başlangıç derişimleri ise sırasıyla 1, 2, 3 ve 4 rakamları ile gösterilmiştir. Örneğin **24** sayısı başlangıçta 0,5 mg ml^{-1} GOD ve 2,0 mg ml^{-1} CAT kullanılarak yapılan ko-immobilizasyon çalışmasını, **41** sayısı ise

başlangıçta 2,0 mg ml^{-1} GOD ve 0,1 mg ml^{-1} CAT kullanılarak yapılan ko-immobilizasyon çalışmasını sembolize etmekte olup diğer çalışmalar da benzer şekilde simgelenmiştir. Çizelge 3.1'de GOD ve CAT enzimlerinin ko-immobilizasyonunda kullanılan başlangıç derişimleri ve gram destek başına kullanılan protein miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.1. Ko-immobilizasyonda kullanılan GOD ve CAT enzimlerinin başlangıç derişimleri ve gram destek başına kullanılan protein miktarları

Örnek Sembolü	Başlangıç enzim derişimi (mg ml^{-1})		Başlangıç enzim miktarı (mg protein g $destek^{-1}$)		m_{toplam} (mg protein g $destek^{-1}$)
	C_{GOD}	C_{CAT}	m_{GOD}	m_{CAT}	
21	0,5	0,1	5	1	6
22	0,5	0,5	5	5	10
23	0,5	1,0	5	10	15
24	0,5	2,0	5	20	25
31	1,0	0,1	10	1	11
32	1,0	0,5	10	5	15
33	1,0	1,0	10	10	20
34	1,0	2,0	10	20	30
41	2,0	0,1	20	1	21
42	2,0	0,5	20	5	25
43	2,0	1,0	20	10	30
44	2,0	2,0	20	20	40

3.2.8.1. GOD ve CAT Enzimlerinin Birlikte Ko-immobilizasyonu

Belirli derişimde GOD ve CAT içeren başlangıç enzim çözeltisinin 10 ml'si 1 gram destekle etkileştirilmiş ve her iki enzimin florisile birlikte immobilizasyonu sağlanmıştır. Ko-immobilizasyon çalışmalarının her birinde toplam protein miktarı ve GOD-CAT enzim oranları farklı olan enzim çözeltileri kullanılmıştır. Bu nedenle enzimlerin hangi oranda bağlandığının belirlenmesi önemlidir. Bu amaçla GOD ve CAT enzimlerinin tek başlarına farklı derişimde hazırlanan çözeltilerinin 280 ve 405

nm'deki absorbansları ölçülerek her biri için ayrı ayrı standart grafikleri çizilmiştir. 280 nm'de tüm proteinlerin absorpsiyon yapması, 405 nm'de ise CAT'ın hem grubundan kaynaklanan Soret bandının bulunması nedeniyle bu dalga boyları seçilmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra elde edilen süzüntülerin 280 ve 405 nm'de absorbansları ölçülmüş ve daha önce çizilmiş olan standart eğrilerin yardımıyla gram desteğe bağlanan GOD ve CAT miktarları ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu değerlerin toplanmasıyla gram desteğe bağlanan toplam protein miktarı teorik olarak hesaplanmış ve süzüntülerin protein içeriklerinin Lowry yöntemiyle belirlenmesiyle hesaplanan gram desteğe bağlı deneysel toplam protein değerleri ile kıyaslanmıştır.

3.2.8.2. GOD ve CAT Enzimlerinin Sıralı Ko-immobilizasyonu

Bu çalışmada gram destek başına bağlı GOD miktarının sabit tutulup bağlı CAT miktarlarının değiştirilmesi ile GOD aktivitelerinde meydana gelen değişim belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için üç farklı başlangıç GOD derişimi (0,5, 1,0 ve 2,0 mg ml^{-1}) seçilmiş ve enzim çözeltileri 1 saat süreyle destekle etkileştirilmiştir. Her 3 çalışmada immobilizasyon süresi sonunda bağlanmayan enzim immobilizasyon tamponuyla yıkanarak uzaklaştırılmış ve süzüntünün GOD derişimi belirlenerek gram desteğe bağlanan GOD'nin miktarı hesaplanmıştır. Daha sonra immobilize GOD örneklerinin 1 gramı 0,1, 0,5, 1,0 veya 2,0 mg ml^{-1} başlangıç derişimlerinde 10 ml CAT çözeltisi ile etkileştirilerek yine 1 saat süreyle immobilizasyon yapılmıştır. Bağlanmayan enzim immobilizasyon tamponuyla yıkanarak uzaklaştırılmış ve süzüntünün CAT derişimi belirlenerek gram desteğe bağlanan CAT miktarı hesaplanmıştır.

3.2.9. Ko-immobilize GOD-CAT'ın Karakterizasyonu

GOD aktivitesi açısından en yüksek etkinliği gösteren ko-immobilize GOD-CAT örneği seçilerek en yüksek aktivite gösterdiği pH, tampon derişimi, sıcaklık ile kinetik parametreleri Bölüm 3.2.6.1-3.2.6.4'de verildiği şekilde belirlenerek karakterize edilmiştir. Ko-immobilize GOD-CAT sisteminin tekrar kullanım kararlılığının belirlenmesi için daha önceki çalışmalarda olduğu gibi Şekil 3.3'de

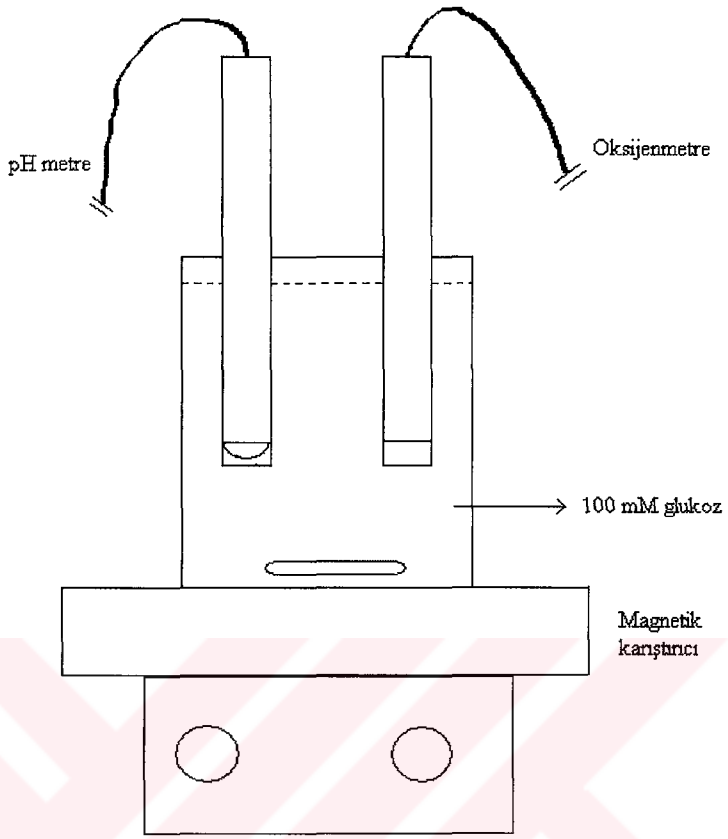
verilmiş olan kesikli ve karıştırmalı kolon reaktör kullanılmıştır. Bu çalışmalarda ko-immobilize GOD-CAT'ın toplam GOD miktarının immobilize GOD'nin karakterizasyonu sırasında kullanılan toplam GOD miktarıyla aynı olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.10. Serbest GOD, Serbest GOD + Serbest CAT, İmmobilize GOD, İmmobilize GOD + İmmobilize CAT ve Ko-immobilize GOD-CAT'ın Kesikli, Geri Beslemeli ve Sürekli Dolgu Yataklı Kolon Reaktörde Kullanımı

Bu çalışmada immobilize GOD, immobilize GOD + immobilize CAT ve ko-immobilize GOD-CAT enzim sistemleri kesikli ve sürekli reaktörlerde kullanılarak 2,5 saat süreyle belirli aralıklarla pH değişimi ve O_2 derişimleri izlenmiştir. Tüm çalışmalarda substrat olarak 100 mM glukozun sulu çözeltisi kullanılmış, enzim örneklerinin GOD ve CAT içeriklerinin aynı olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.10.1. Kesikli Reaktör Kullanımı

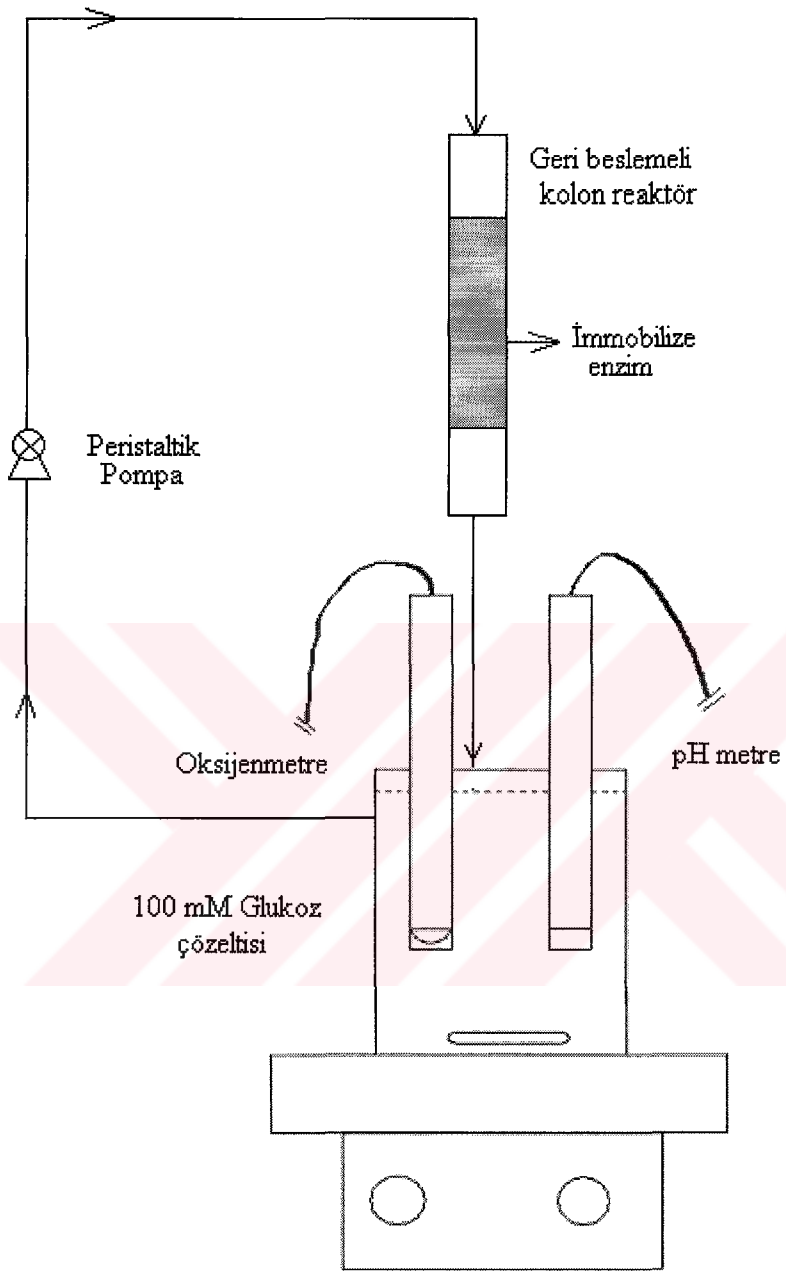
Şekil 3.5'de GOD enziminin tek başına veya CAT ile birlikte kullanıldığı kesikli reaktör şematik olarak gösterilmektedir. Sürekli reaktörlerde serbest enzim kullanılamayacağından serbest GOD ve serbest GOD + serbest CAT enzim sistemleri sadece kesikli reaktörde çalışılmıştır. Çalışmalarda çapı 7 cm ve boyu 10 cm olan kesikli reaktör modeli kullanılmıştır.



Şekil 3.5. GOD'nin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı kesikli reaktörün şematik gösterimi

3.2.10.2. Geri Beslemeli Dolgu Yataklı Kolon Reaktör Kullanımı

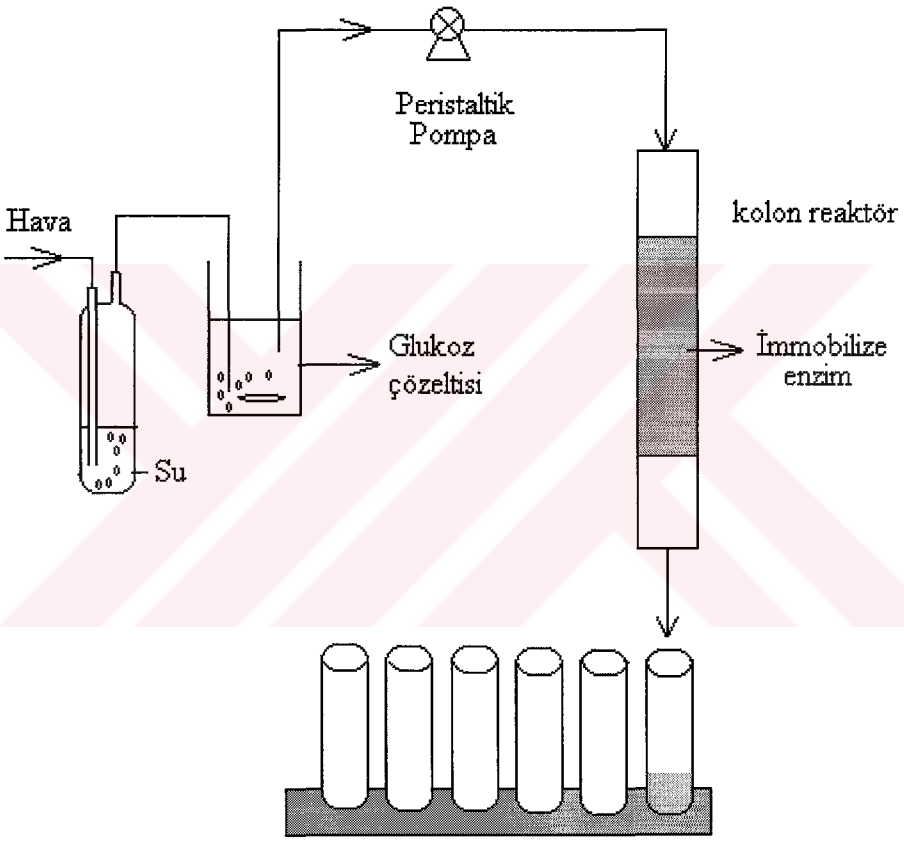
Şekil 3.6'da çapı 7 mm boyu 10 cm olan geri beslemeli kolon reaktörün şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 3.6. GOD'nin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı geri beslemeli dolgu yataklı kolon reaktörün şematik gösterimi

3.2.10.3. Sürekli Dolgu Yataklı Kolon Reaktör Kullanımı

Şekil 3.7'de çapı 7 mm ve boyu 10 cm olan sürekli kolon reaktör modelinin şematik gösterimi verilmiştir. Sürekli reaktör kullanımında 100 ml glukozun tamamı 150 dk içinde kullanılacak şekilde akış hızı 0,67 ml. dk^{-1} olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3.7. GOD'nin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı sürekli dolgu yataklı kolon reaktörün şematik gösterimi

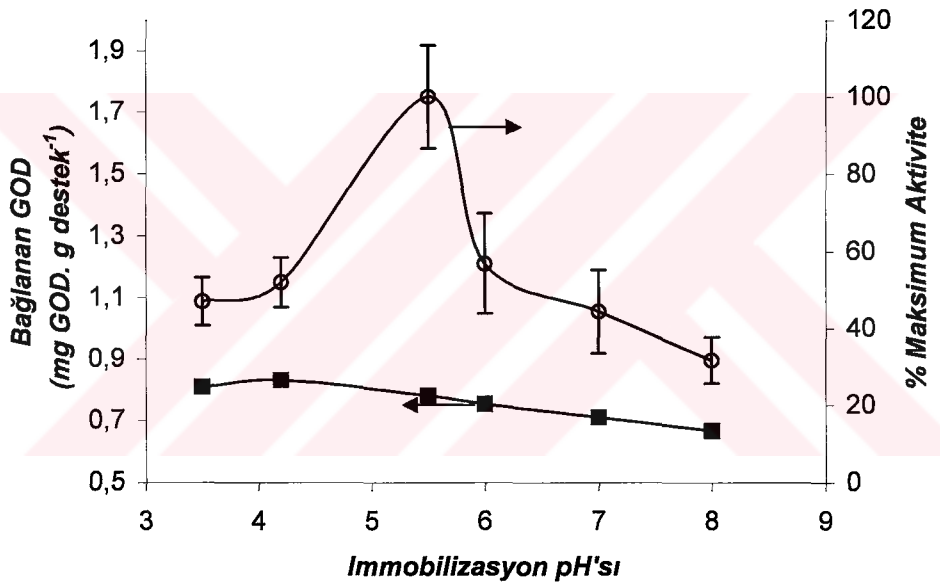
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. GOD Enziminin Tek Başına İmmobilizasyonu

4.1.1.1. GOD Enziminin İmmobilizasyonu İçin Uygun Koşulların Belirlenmesi

Farklı pH'larda yapılan immobilizasyon işlemlerinin sonunda 1 gram desteğe bağlanan GOD miktarının ve immobilize GOD aktivitesinin immobilizasyon pH'sına bağlı olarak değişimi Şekil 4.1'de verilmiştir.

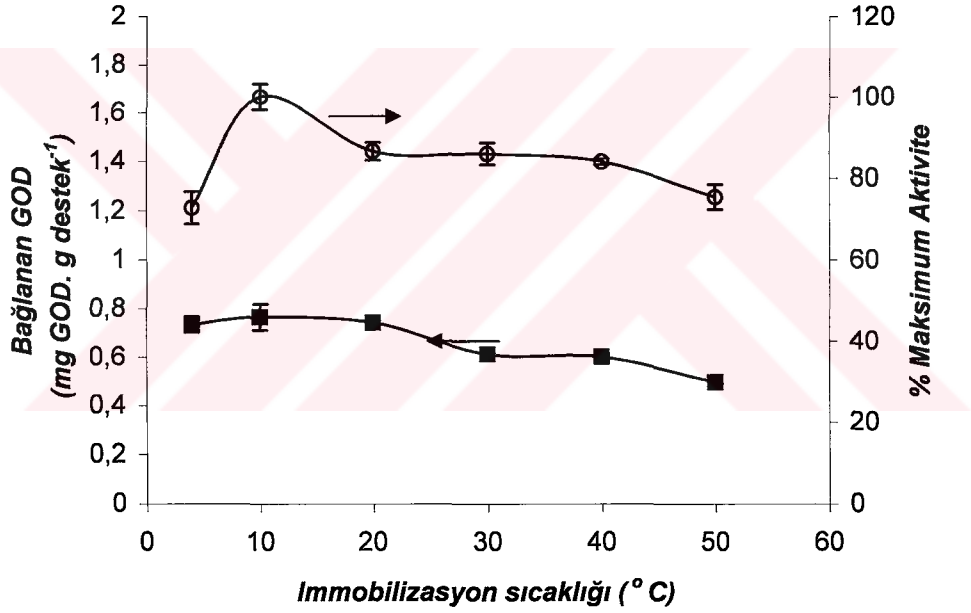


Şekil 4.1. İmmobilizasyon pH'sının bağlanan GOD miktarı ve immobilize GOD'nin aktivitesi üzerine etkisi, (o): % Maksimum Aktivite, (■): Bağlanan GOD (GOD başlangıç derişimi: 0,1 mg ml^{-1} İmmobilizasyon sıcaklığı: 20 °C, immobilizasyon süresi: 1 saat)

Şekil 4.1 den görüldüğü gibi GOD en fazla, enzimin net yükünün sıfır olduğu izoelektrik noktası olan pH 4,2'de bağlanmıştır. İmmobilizasyon pH'sının 4,2'den daha düşük veya daha yüksek olduğu bölgelerde gram desteğe bağlanan GOD miktarı azalmıştır.

Şekil 4.1'den de görüldüğü gibi en yüksek aktiviteyi, maksimum bağlanmanın olduğu pH 4,2'de immobilize edilmiş GOD değil, immobilizasyon pH'sının 5,4 olduğu immobilize GOD göstermektedir. Bu nedenle sonraki immobilizasyon çalışmalarında pH 5,4 tamponu kullanılmıştır.

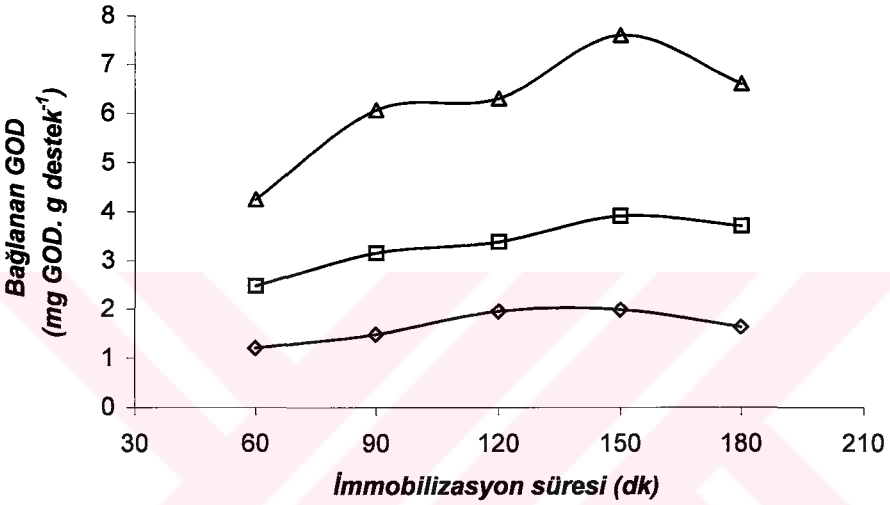
Sıcaklığın GOD immobilizasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla pH 5,4'de 4 - 50 °C aralığında farklı sıcaklıklarda yapılan immobilizasyon işlemlerinde gram desteğe bağlanan protein miktarı ve immobilize GOD aktiviteleri Şekil 4.2'de verilmiştir. Şekil 4.2 incelendiğinde maksimum bağlanmanın 4 ve 20 °C aralığında meydana geldiği ve daha yüksek sıcaklıklarda bağlanan protein miktarının çok olmamakla beraber azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.2. İmmobilizasyon sıcaklığının bağlanan GOD miktarı ve immobilize GOD'nin aktivitesi üzerine etkisi (o): % Maksimum Aktivite, (■): Bağlanan GOD (GOD başlangıç derişimi: 0,1mg ml^{-1}, İmmobilizasyon pH'sı: 5,4 ve immobilizasyon süresi: 1 saat)

Farklı sıcaklıklarda immobilize edilen GOD enziminin aktiviteleri belirlendiğinde en yüksek değeri 10 °C'de immobilize edilen örneğin gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle sonraki çalışmalarda immobilizasyon sıcaklığı 10 °C olarak seçilmiştir.

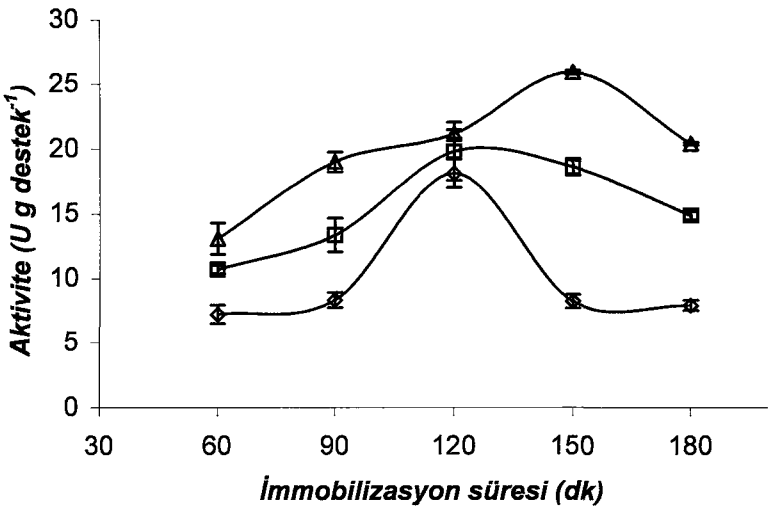
Başlangıç derişimleri 0,5, 1,0 ve 2,0 mg ml^{-1} olan GOD enzim çözeltisinin 10 ml'si 1 gram destek ile etkileştirilmiş her biri için 5 farklı immobilizasyon süresi (60, 90, 120, 150 ve 180 dk) denenmiştir. Şekil 4.3'de 3 farklı başlangıç GOD derişimi için immobilizasyon süresine bağlı olarak gram destek başına bağlanan GOD miktarları verilmiştir.



Şekil 4.3 Farklı başlangıç GOD derişimleri için immobilizasyon süresinin gram desteğe bağlanan GOD miktarı üzerine etkisi. Başlangıç GOD derişimleri: (◇): 0,5 mg ml^{-1}, (□): 1,0 mg ml^{-1}, (△): 2,0 mg ml^{-1}

Şekil 4.3'de görüldüğü gibi gram destek başına bağlanan enzim miktarı her 3 başlangıç enzim derişimi için immobilizasyon süresi 60 dakikadan 150 dakikaya kadar arttırıldığında immobilizasyon süresiyle orantılı olarak artmış ancak sonrasında 180. dakikada bağlanan GOD miktarında azalma gözlenmiştir.

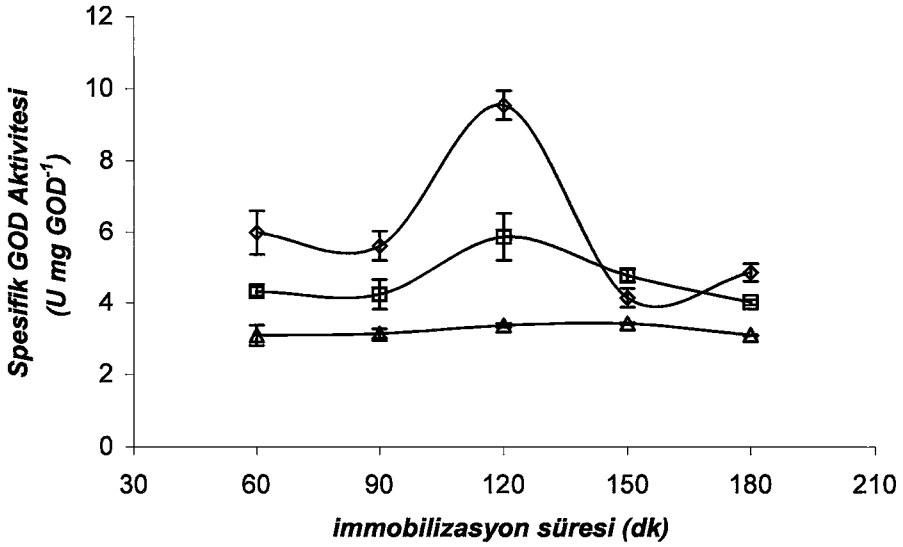
İmmobilize GOD'lerin gram destek başına aktivitelerinin başlangıç enzim derişimi ve immobilizasyon süresine bağlı olarak değişimi Şekil 4.4'de verilmektedir.



Şekil 4.4. Farklı başlangıç GOD derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize GOD'nin aktivitesi üzerine etkisi. Başlangıç GOD derişimleri: (◇): 0,5 mg ml^{-1}, (▫): 1,0 mg ml^{-1} (△): 2,0 mg ml^{-1}

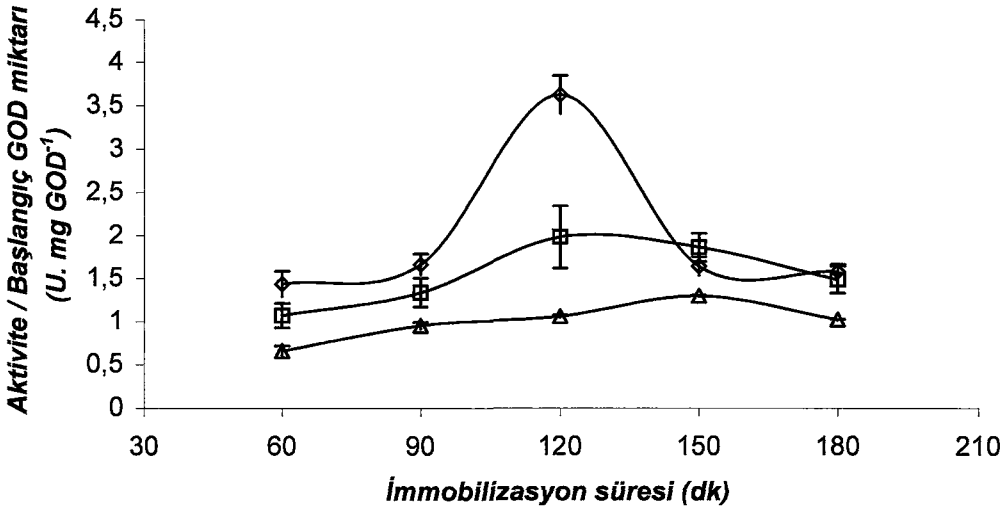
Şekil 4.4'den de görülebileceği gibi immobilizasyon süresi 120 dk iken her 3 GOD derişimi için gram destek başına ölçülen aktiviteler birbirine çok yakındır.

Üç farklı başlangıç enzim derişimi için, immobilize GOD'lerin spesifik aktivitelerinin immobilizasyon süresine bağlı olarak değişimi Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5 Farklı başlangıç GOD derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize GOD'nin spesifik aktivitesi üzerine etkisi. Başlangıç GOD derişimleri: (◇): 0,5 mg ml^{-1}, (▫): 1,0 mg ml^{-1} (△): 2,0 mg ml^{-1}

Şekil 4.5'den görüldüğü gibi başlangıç enzim derişimleri ile spesifik aktivite değerleri arasında ters bir ilişki bulunmaktadır. İmmobilizasyon süresi 120 dakika ve başlangıç enzim derişimi 0,5 mg ml^{-1} olan immobilize enzimin spesifik aktivitesi diğerlerine göre oldukça yüksektir. Aynı eğilim gram destek başına aktivitelerin başlangıç GOD miktarına oranlarını veren Şekil 4.6'dan da görülmektedir.

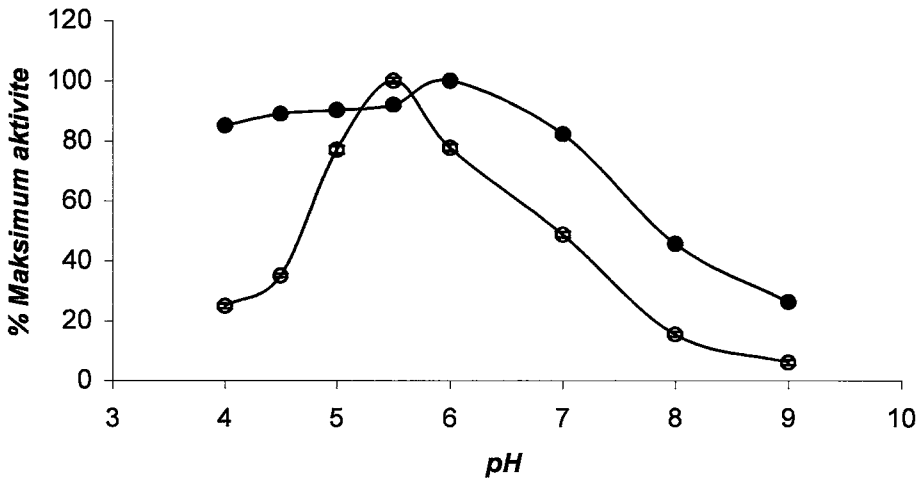


Şekil 4.6. Farklı başlangıç GOD derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize GOD'nin (Aktivite / Başlangıç GOD miktarı) oranına etkisi, başlangıç GOD derişimleri: (◇): 0,5 mg. ml^{-1}, (□): 1,0 mg. ml^{-1} (△): 2,0 mg ml^{-1}

0,5 mg ml^{-1} (5 mg. g $destek^{-1}$) ve 1,0 mg ml^{-1} (10 mg. g $destek^{-1}$) başlangıç GOD derişimi için en yüksek aktiviteler immobilizasyon süresi 120 dk olan immobilize GOD'ler için bulunmuştur, bu nedenle sonraki çalışmalarda 120 dk immobilizasyon süresi uygulanmıştır. Aktivite değerleri başlangıç enzim derişimi ile pek fazla değişmediğinden spesifik aktivite değerleri esas alınarak sonraki çalışmalarda 0,5 mg ml^{-1} GOD başlangıç derişimi kullanılmıştır.

4.1.1.2. Serbest ve İmmobilize GOD Enziminin Karakterizasyonu

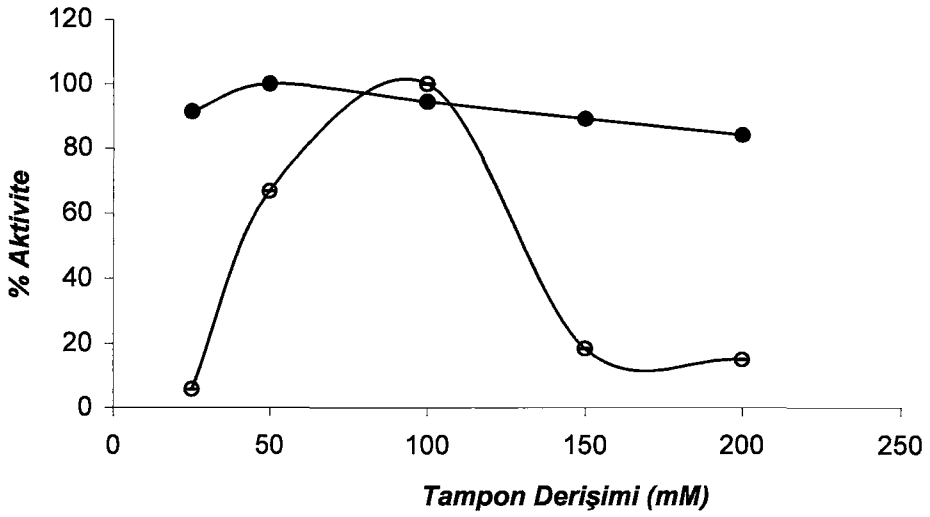
Serbest ve immobilize GOD enzimlerinin farklı pH'daki aktiviteleri % maksimum aktivite olarak Şekil 4.7'de verilmektedir.



Şekil 4.7. Serbest ve immobilize GOD aktivitesinin pH'a bağlı olarak değişimi (•): İmmobilize GOD, (o): Serbest GOD

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi immobilize GOD serbest GOD'a göre, özellikle düşük pH'larda daha yüksek aktivite göstermektedir. Serbest enzim en yüksek aktiviteyi pH 5,5'de gösterirken, immobilize enzim için bu değer pH 6,0 olarak bulunmuştur.

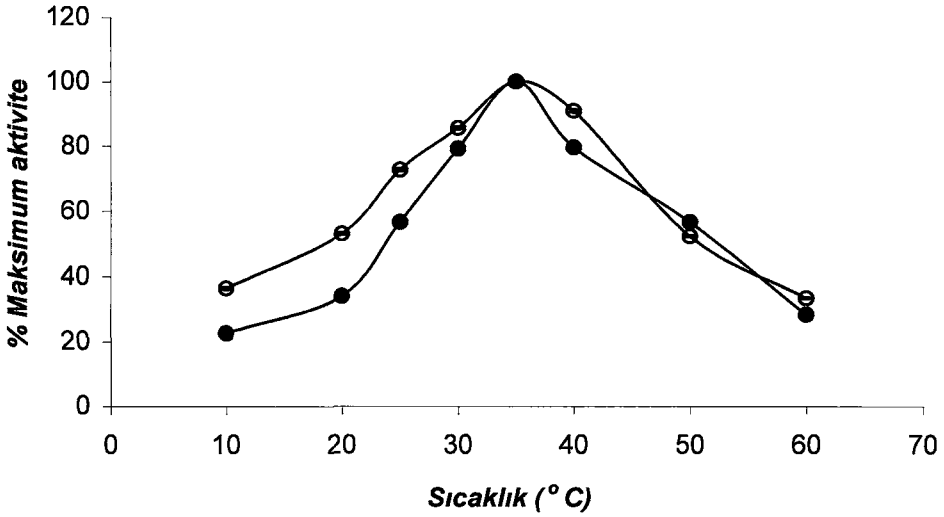
Serbest ve immobilize GOD enzimlerinin optimum pH'larında hazırlanmış olan farklı derişimdeki tampon çözeltileri kullanılarak aktiviteleri belirlenmiş ve sonuçlar % maksimum aktivite olarak Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Serbest ve immobilize GOD aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi. (•): İmmobilize GOD (pH: 6,0), (o): Serbest GOD (pH: 5,5)

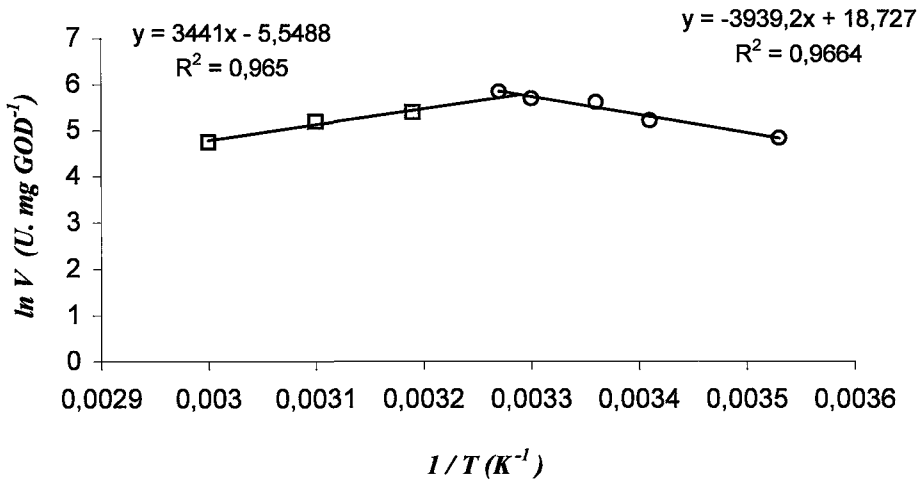
Şekil 4.8'de görüldüğü gibi immobilize enzimin tersine serbest GOD enzimi tampon derişiminden çok fazla etkilenmektedir. Serbest enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği tampon derişimi 100 mM (pH 5,5) olarak belirlenirken immobilize GOD için bu değer 50 mM (pH: 6,0) olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize GOD aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi Şekil 4.9'da verilmektedir. Her iki enzimin % maksimum aktivite-sıcaklık profili benzerlik göstermektedir ve de optimum sıcaklık 35 °C olarak belirlenmiştir.



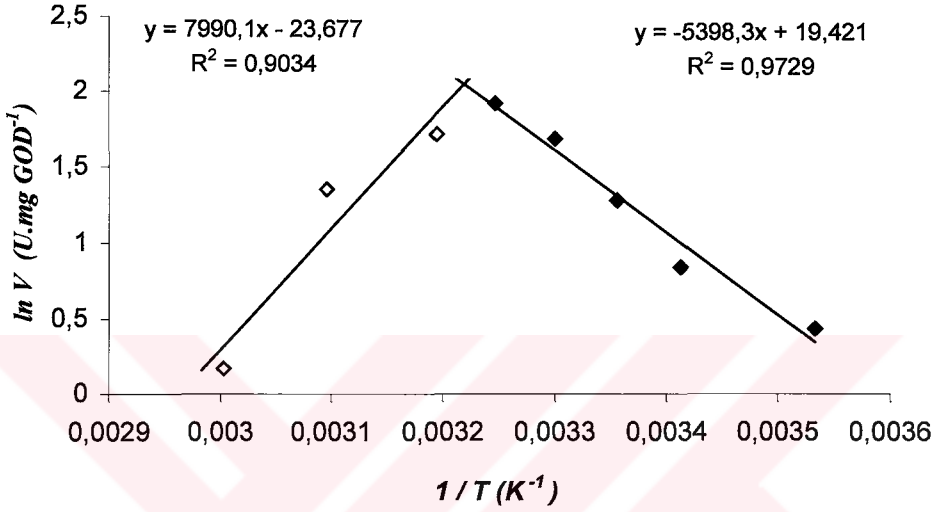
Şekil 4.9. Serbest ve immobilize GOD aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi (•): İmmobilize GOD, (o): Serbest GOD

Sıcaklığa bağlı olarak aktivite değerleri Arrhenius bağıntısına göre grafiğe geçirildiğinde serbest GOD için Şekil 4.10, immobilize GOD için ise Şekil 4.11 elde edilmiştir. Grafikte aktivitenin sıcaklık ile arttığı ve azaldığı bölgeler ayrı ayrı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.10. Serbest GOD enziminin Arrhenius grafiği

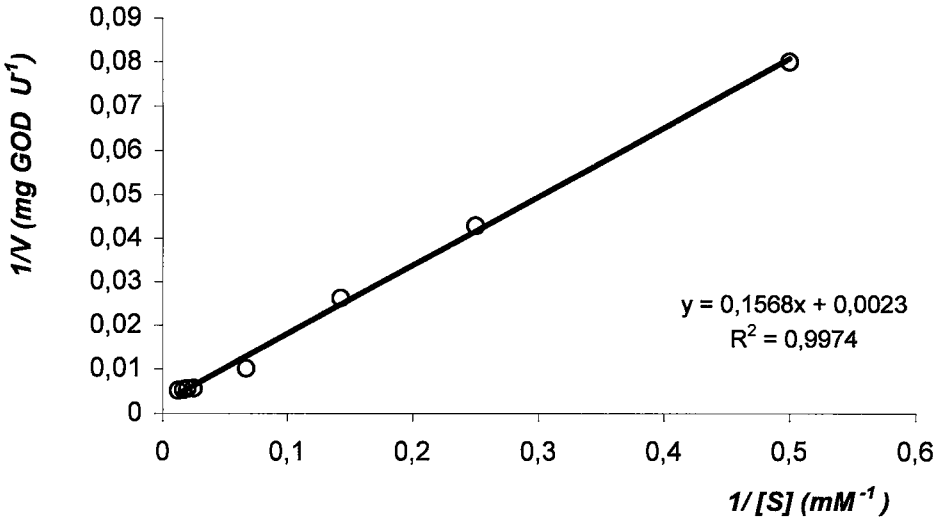
Aktivitenin sıcaklıkla arttığı değerlere ait doğru yardımı ile (eğim: -3939,2) serbest GOD enziminin aktivasyon enerjisi 32,8 kJ mol^{-1} K^{-1} olarak hesaplanmıştır. Her iki doğrunun ortak çözümü ile enzimin denatürasyona başladığı sıcaklık 304 K (31 °C) olarak belirlenmiştir.



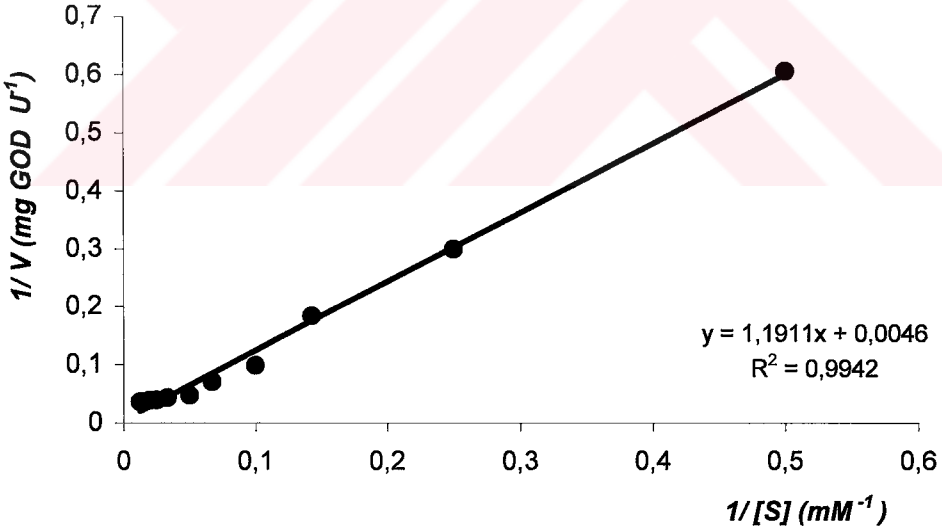
Şekil 4.11. İmmobilize GOD enziminin Arrhenius grafiği

Aynı şekilde immobilize GOD'nin Ea değeri 44,88 kJ mol^{-1} K^{-1}, denatürasyona başladığı sıcaklık ise 310,7 K (37,7 °C) olarak hesaplanmıştır.

Serbest ve immobilize GOD için farklı substrat derişimlerinde belirlenen aktivite değerleri kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri sırasıyla Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de verilmiştir. Serbest ve immobilize GOD için K_M, V_{max}, k_{cat} ve k_{cat}/K_M değerleri hesaplanarak Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Serbest GOD için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.13. İmmobilize GOD için Lineweaver-Burk grafiği

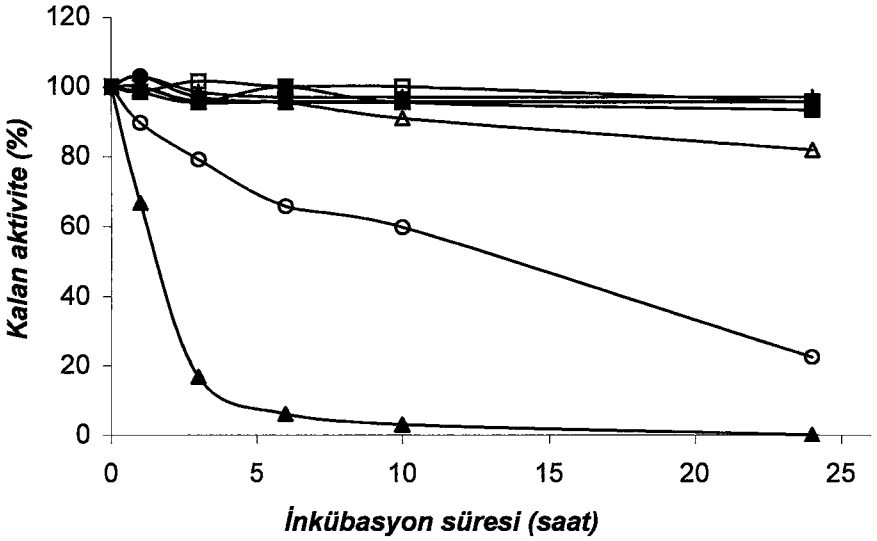
Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize GOD'nin kinetik parametreleri

GOD örnekleri	V_{max} (μmol glukoz dk^{-1} mg $protein^{-1}$)	K_M (mM)	K_{cat} (mol glukoz s^{-1} mol $protein^{-1}$)	K_{cat}/K_M (s^{-1} M^{-1})
Serbest	434,8	68,2	$1,16 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4$
Immobilize	217,4	258,9	$0,57 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi immobilize enzimin V_{max} değeri ve katalitik etkinliği serbest enzimin V_{max} değeri ve katalitik etkinliğinin sırasıyla % 50 ve % 13'ü kadardır. İmmobilizasyon işlemi sonunda GOD enziminin K_M değeri 3,8 kat artmıştır.

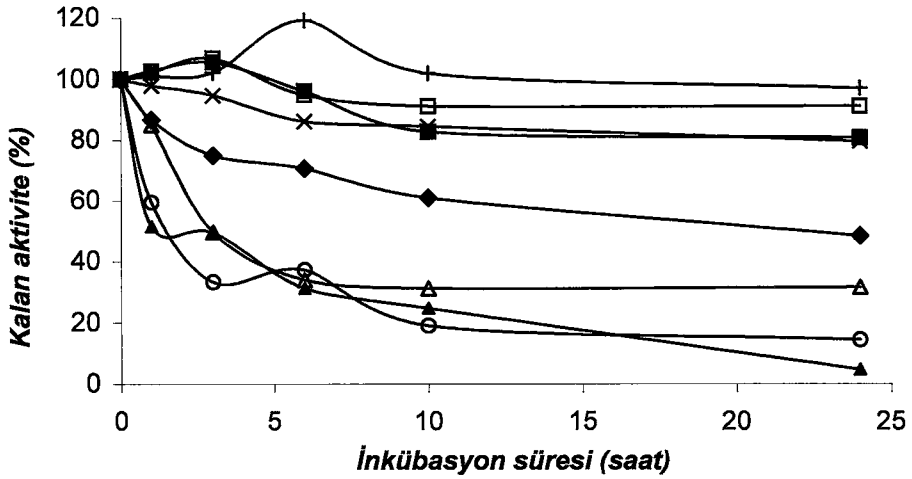
Şekil 4.14 ve 4.15'de sırasıyla serbest ve immobilize GOD için termal kararlılık grafiği verilmektedir.

Şekil 4.14'de görüldüğü gibi serbest GOD enziminin 10-35 °C sıcaklıkları arasındaki termal kararlılığı oldukça yüksek olup 24 saat boyunca başlangıç aktivitesinin tamamını korumaktadır. Ancak 40 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda zamanla aktivitelerde düşüş gözlenmiştir. 24 saat sonunda 40 ve 50 °C de inkübe edilen serbest GOD enzimi başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 82 ve % 22'sini korurken, 60 °C'de 10 saat sonunda aktivitesinin tamamını yitirmiştir.



Şekil 4.14. Serbest GOD enziminin termal kararlılık grafiği. (+): 10 °C, (□): 20 °C, (■): 25 °C, (x): 30 °C, (◆): 35 °C, (△): 40 °C, (o) : 50 °C ve (▲): 60 °C.

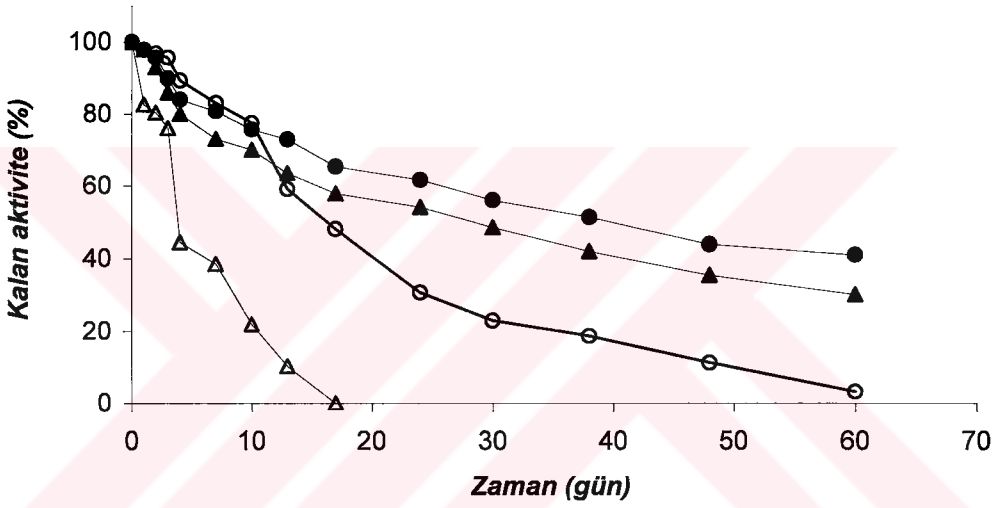
İmmobilize GOD'nin termal kararlılığını veren Şekil 4.15 incelendiğinde, 10 ve 20 °C'de inkübe edilen enzimlerin 24 saat sonunda başlangıç aktivitelerinin tamamını korudukları görülmektedir. Ancak 25-60 °C aralığındaki sıcaklıklarda yapılan çalışmalarda sıcaklık arttıkça termal kararlılığın azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.15. İmmobilize GOD enziminin termal kararlılık grafiği (+): 10 °C, (□): 20 °C, (■): 25 °C, (x): 30 °C, (◆): 35 °C, (△): 40 °C, (o) : 50 °C ve (▲): 60 °C.

10, 20 ve 50 °C sıcaklıklarda her iki enzimin termal kararlılığı birbirine yakın çıkarken 25-40 °C aralığındaki sıcaklıklarda serbest enzim, 60 °C'de ise immobilize enzim daha yüksek termal kararlılık göstermiştir. 60 °C'de inkübe edilen serbest enzim aktivitesini hızla kaybederken immobilize enzim 24 saat sonunda dahi az da olsa aktivite göstermeye devam etmektedir.

Serbest ve immobilize enzimlerin 4 °C ve oda sıcaklığındaki (yaklaşık 25 °C) depolama kararlılıkları Şekil 4.16'da verilmiştir.

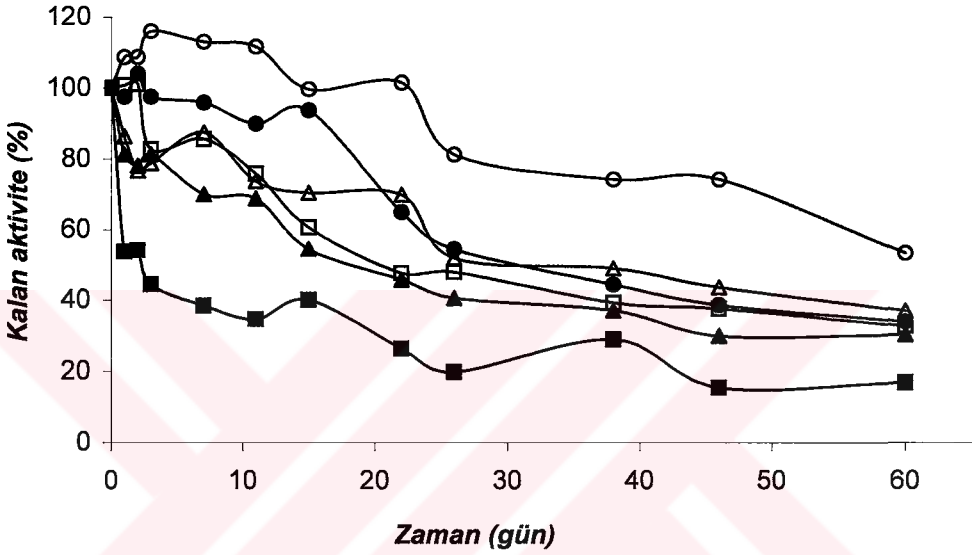


Şekil 4.16. Serbest ve immobilize GOD'nin depolama kararlılığı. (●) 4 °C'de immobilize GOD, (o) 4°C' de serbest GOD, (▲) Oda sıcaklığında immobilize GOD ve (△) Oda sıcaklığında serbest GOD.

Şekil 4.16'da görüldüğü gibi immobilize GOD'nin hem 4 °C hem de oda sıcaklığındaki depolama kararlılığı serbest enzime göre daha yüksek çıkmıştır. Serbest GOD oda sıcaklığında 17 gün içinde aktivitesinin tamamını kaybederken 4 °C'de 60 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 3,2'ini korumuştur. İmmobilize enzim ise 4 °C ve oda sıcaklığında depolandığında 60 gün sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 41,1 ve % 30,2'ini korumuştur.

Oda koşullarında bulunan immobilize GOD enziminin aktivitesi belirlenmiş ve oda sıcaklığında desikatörde bekletilerek farklı zaman aralıklarıyla aktiviteleri tekrar ölçüldüğünde önceki değere göre oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu

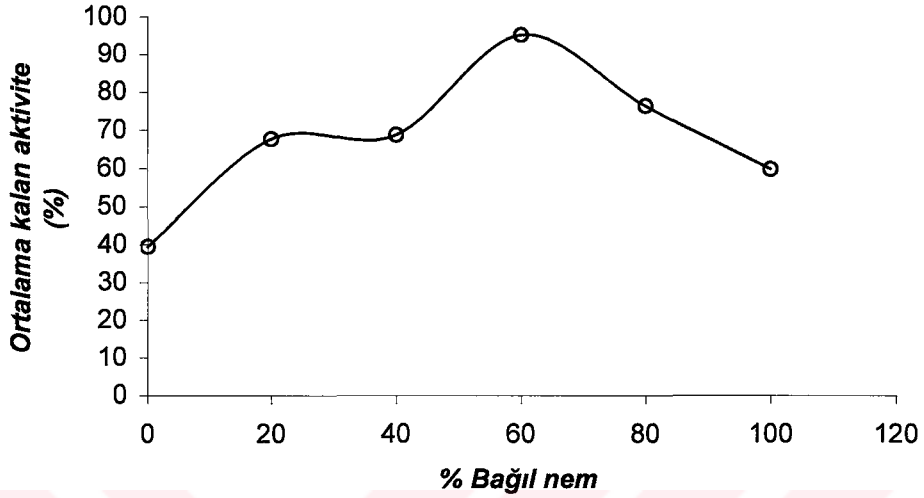
nedenle immobilize GOD'nin bünyesinde bulunan su miktarının aktivitesi üzerine etkisi olabileceği düşünülerek farklı bağıl nem ortamlarındaki kararlılıklarının incelenmesine karar verilmiştir. Bu çalışma sonunda, immobilize GOD'nin farklı bağıl nem ortamlarında depolama kararlılığı zamana bağlı olarak belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



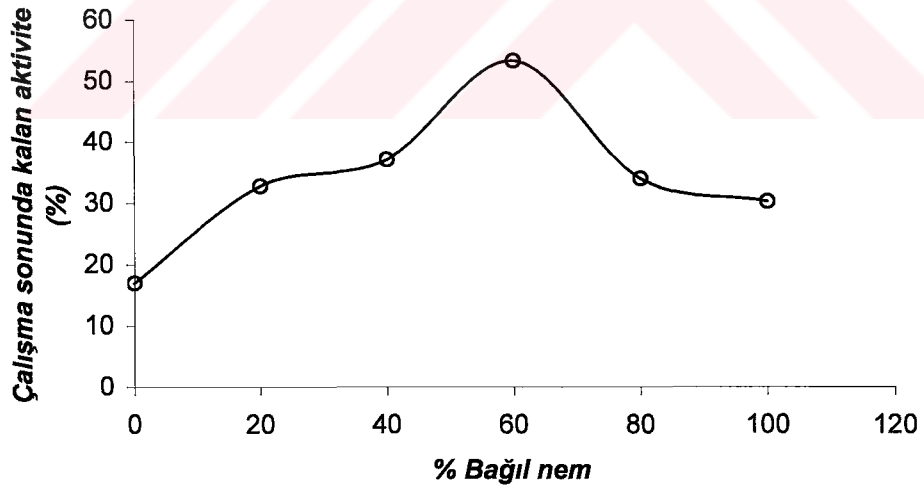
Şekil 4.17. İmmobilize GOD'nin farklı bağıl nem ortamlarındaki depolama kararlılıkları. (■): 0 %, (□): 20 %, (△): 40 %, (o): 60 %, (●): 80 % ve (▲): 100 %

Şekil 4.17. incelendiğinde, depolama ortamındaki bağıl nem oranının immobilize GOD'nin aktivitesi üzerine anlamlı etkileri bulunduğu görülmektedir. Farklı bağıl nem ortamlarında depolanan örnekler arasında 60 günlük çalışma süresi boyunca en yüksek aktiviteye % 60, en düşük aktiviteye ise % 0 bağıl nem ortamında depolanan örneklerin sahip olduğu açıkça görülmektedir. 60 gün sonunda % 60 ve % 0 bağıl nem ortamında depolanan enzimlerin kalan aktiviteleri sırasıyla % 53,4 ve % 17 olarak belirlenmiştir. Diğer bağıl nem ortamlarının kalan aktivite değerleri yaklaşık olarak % 30-37 arasında değişmektedir. Her bağıl nem ortamı için ölçülen % kalan aktivite değerlerinin ortalamasının bağıl nem ortamına karşı grafiğe geçirilmesi ile Şekil 4.18 elde edilmiştir. Şekil 4.19'da ise çalışma süresinin sonu

olan 60. günde immobilize enzimlerin kalan aktivitelerinin % bağıl neme bağlı olarak değişimi görülmektedir.



Şekil 4.18. İmmobilize GOD'nin farklı bağıl nem ortamlardaki aktivitelerinin ortalaması

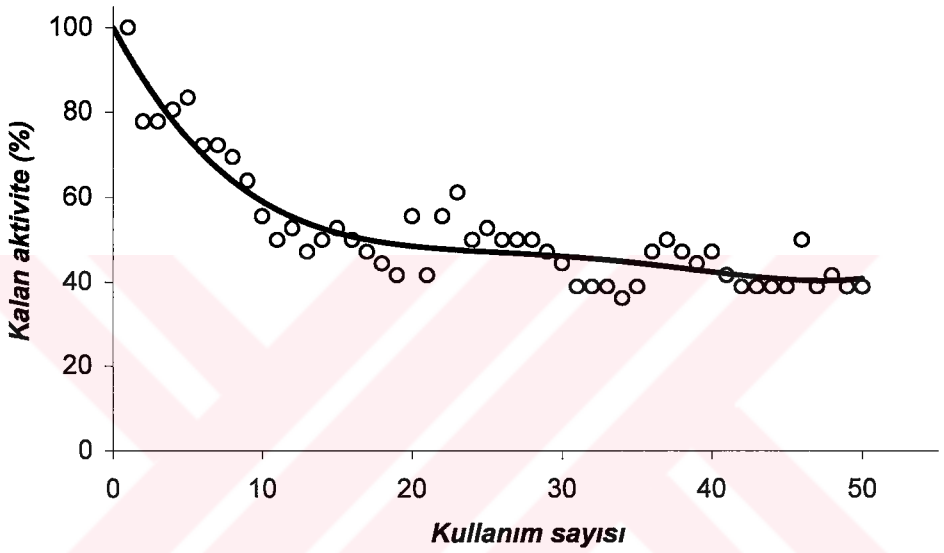


Şekil 4.19. Farklı bağıl nem ortamında depolanan immobilize GOD'nin 60 günlük çalışma süresi sonunda kalan aktivitesi (%)

Şekil 4.18 ve 4.19'da da görüldüğü gibi immobilize GOD'nin kararlılığı depolandığı ortamın bağıl neminden etkilenmiş ve % 60 bağıl neme kadar kararlılık bağıl nem %'si arttıkça artmıştır. % 60'ın üzerindeki bağıl nem ortamında depolanan

immobilize enzimin kararlılığında ise düşme gözlenmiştir. % 0 bağıl nem içeren ortamda bekletilen immobilize GOD enzimi aktivitesinin % 50'ye yakın kısmını ilk gün kaybetmiştir.

İmmobilize GOD'nin kullanım sayısına bağlı olarak aktivitesinin değişimi Şekil 4.20'de verilmektedir.



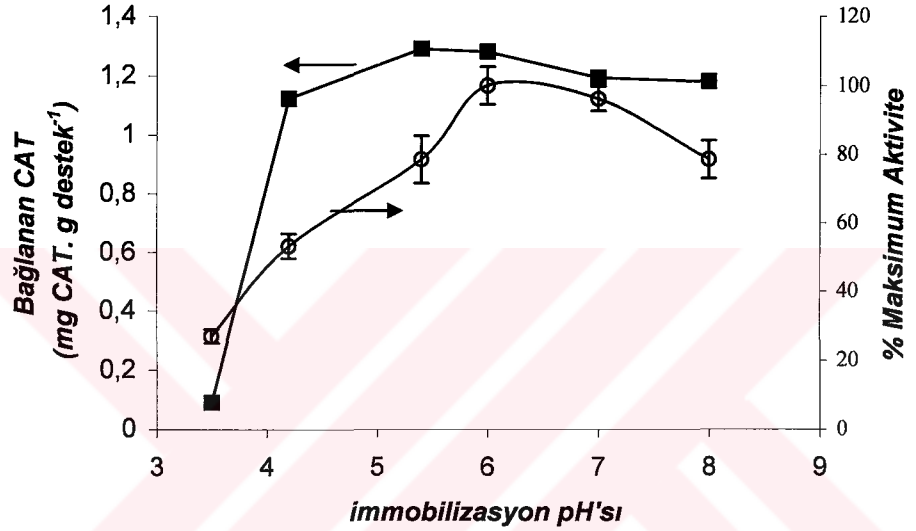
Şekil 4.20. İmmobilize GOD'nin tekrar kullanım kararlılığı

Başlangıçta kullanım sayısına bağlı olarak aktivite hızlı bir düşüş gösterirken 10. kullanım sonrasında (50. kullanıma kadar) kalan aktivitenin kullanım sayısına bağlı olarak pek değişmediği ve yatay bir eğilim gösterdiği saptanmıştır. İmmobilize GOD 5. kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 83,3'ünü, 14 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 50'ni korumaktadır. 50 kullanım sonrasında immobilize GOD'nin başlangıç aktivitesinin yaklaşık olarak % 40'ını göstermeye devam ettiği belirlenmiştir.

4.1.2. CAT Enziminin Tek Başına İmmobilizasyonu

4.1.2.1. CAT Enziminin İmmobilizasyonu için Uygun Koşulların Belirlenmesi

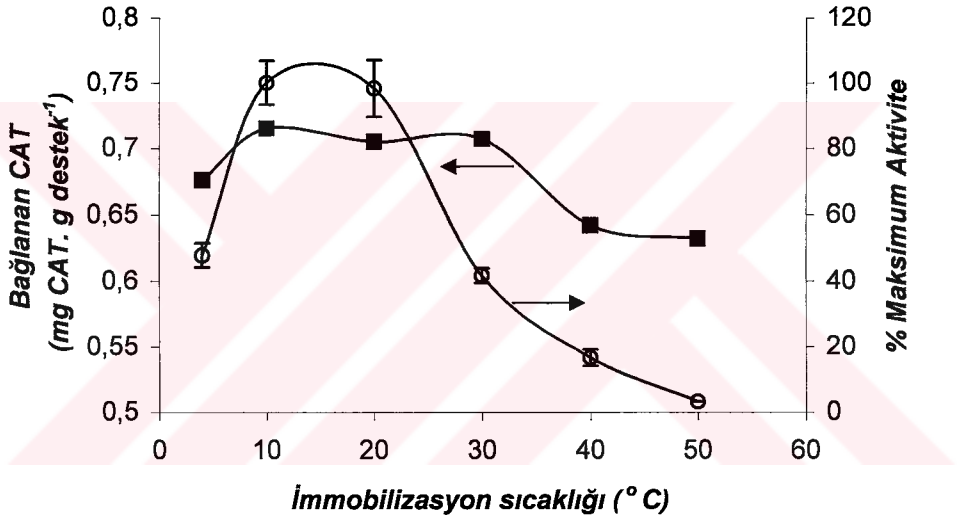
Farklı pH'larda yapılan immobilizasyon işlemlerinin sonunda 1 gram desteğe bağlanan CAT miktarının ve immobilize CAT aktivitesinin immobilizasyon pH'sına bağlı olarak değişimi Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.21. İmmobilizasyon pH'sının bağlanan CAT miktarı ve immobilize CAT'ın aktivitesi üzerine etkisi (o): % Maksimum Aktivite, (■): Bağlanan CAT (CAT başlangıç derişimi: 0,1 mg ml^{-1}, sıcaklık: 20 °C, immobilizasyon süresi: 1 saat)

Şekil 4.21'de görüldüğü gibi pH 3,5'da çok az miktarda CAT bağlanırken pH 4,2 de bağlanan CAT miktarında büyük bir artış gözlenmiştir. En fazla bağlanma CAT'ın izoelektrik noktası olan pH 5,4'de gerçekleşirken daha yüksek pH'larda yapılan immobilizasyon işlemlerinde bağlanan CAT miktarı hafifçe azalmıştır. Farklı pH'larda immobilize edilmiş CAT enzimlerinin gram destek başına aktiviteleri belirlendiğinde en yüksek aktiviteyi pH 6,0'da immobilize edilen enzim gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle sonraki immobilizasyon çalışmaları bu pH'da gerçekleştirilmiştir.

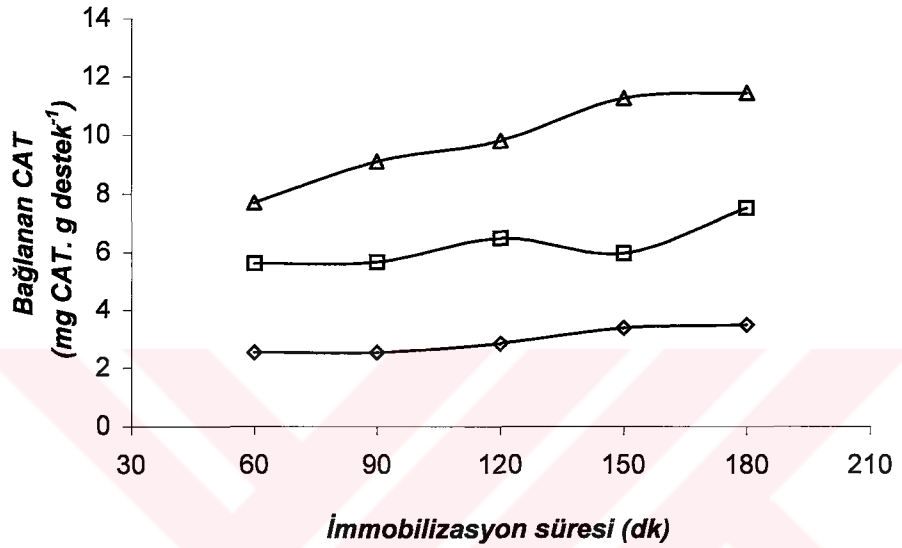
pH 6,0 tamponunda hazırlanmış olan CAT enzimi desteğe 4 - 50 °C aralığında olmak üzere 6 farklı sıcaklıkta 1 saat süreyle immobilize edilmiş ve immobilize enzimlerin gram destek başına bağlanan CAT miktarı ve aktiviteleri belirlenmiştir, Şekil 4.22. İmmobilizasyon sıcaklığının CAT immobilizasyonu üzerine etkisi incelendiğinde 10 ve 30 °C aralığında bağlanan CAT enzim miktarının 0,67 ile 0,71 mg. g destek^{-1} arasında olup yatay bir eğilim gösterdiği, ancak sonraki sıcaklıklarda bağlanan protein miktarının çok olmamakla beraber azaldığı 40 °C'de bağlanan CAT miktarının 0,64 mg. g destek^{-1}, 30 °C'de bağlanan CAT miktarının ise 0,63 mg.g destek^{-1} olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.22. İmmobilizasyon sıcaklığının bağlanan CAT miktarı ve immobilize CAT'ın aktivitesi üzerine etkisi (o): % Maksimum Aktivite, (■): Bağlanan CAT (CAT başlangıç derişimi: 0,1 mg ml^{-1} , İmmobilizasyon pH'sı: 6,0 ve immobilizasyon süresi: 1 saat)

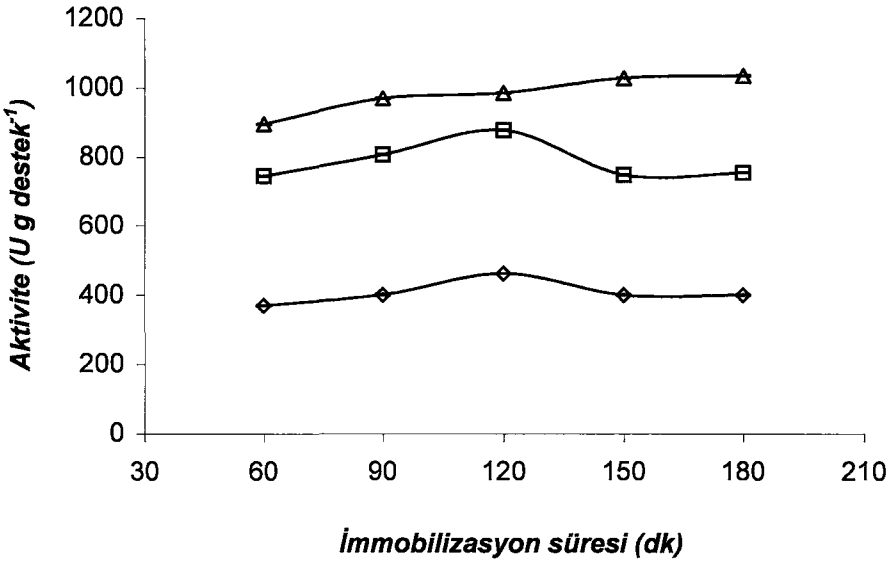
Şekil 4.22'den görüldüğü gibi farklı sıcaklıklarda immobilize edilen enzim örneklerinin aktiviteleri belirlendiğinde en yüksek değerler 10 ve 20 °C'de immobilize edilmiş olan örnekler için elde edilmiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda immobilize edilen örneklerin aktivitelerinin ise immobilizasyon sıcaklığındaki artışa bağlı olarak hızla azaldığı yine Şekil 4.22'de görülmektedir. En yüksek aktiviteyi 10 °C'de yapılan immobilizasyon sonunda elde edilen immobilize CAT enzimi gösterdiğinden sonraki immobilizasyon işlemleri bu sıcaklıkta yapılmıştır.

CAT enziminin 3 farklı başlangıç derişimdeki çözeltisinin 10 ml'si 1 gram destek ile optimum koşullarda ve 5 farklı immobilizasyon süresinde etkileştirilmiş ve Şekil 4.23'de bağlanan CAT miktarının immobilizasyon süresine bağlı olarak değişimi verilmiştir.



Şekil 4.23 Farklı başlangıç CAT derişimleri için immobilizasyon süresinin gram desteğe bağlanan CAT miktarı üzerine etkisi. CAT başlangıç derişimleri: (◇): 0,5 mg ml^{-1}, (▫): 1,0 mg ml^{-1} (△): 2,0 mg ml^{-1}

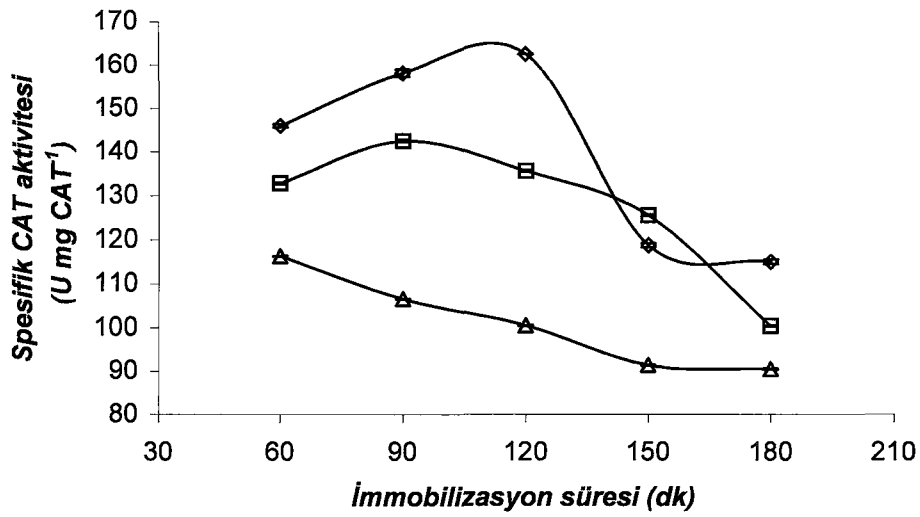
Şekil 4.23'de görüldüğü gibi bağlanan enzim miktarı her 3 başlangıç enzim derişimi için immobilizasyon süresindeki ve başlangıç enzim derişimindeki artışa bağlı olarak artmıştır. İmmobilize CAT aktivitesinin başlangıç enzim derişimi ve immobilizasyon süresine bağlı olarak değişimi Şekil 4.24'de verilmektedir.



Şekil 4.24. Farklı başlangıç CAT derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize CAT'ın aktivitesi üzerine etkisi. CAT başlangıç derişimleri: (◇): 0,5 mg ml^{-1}, (□): 1,0 mg ml^{-1}, (△): 2,0 mg ml^{-1}

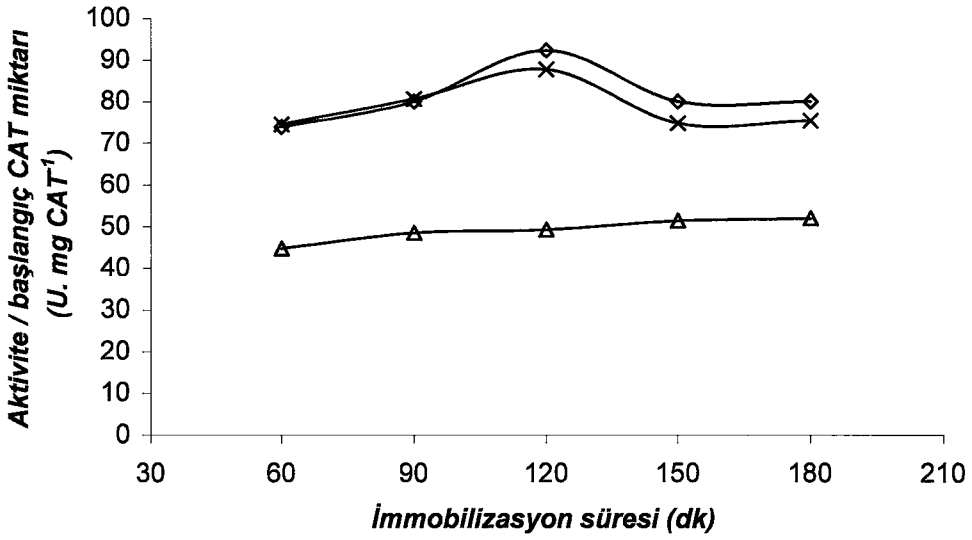
Şekil 4.24'den de görüleceği gibi 0,5 ve 1,0 mg ml^{-1} başlangıç CAT derişimlerinde immobilize edilen CAT enzimi aktiviteleri başlangıç CAT derişimleri ile orantılı olarak artmıştır, ancak 2,0 mg ml^{-1} başlangıç derişiminde immobilize edilen CAT için böyle bir eğilim gözlenmemiştir. Aktivitelerin immobilizasyon süresinden çok fazla etkilenmediği belirlenmiş olup 0,5 ve 1,0 mg ml^{-1} başlangıç derişimlerinde, 120 dakika immobilizasyon süresinden sonra aktivite değerlerinde hafifçe bir azalma gözlenmiştir. Şekil 4.24'den görüldüğü gibi 2 mg ml^{-1} başlangıç derişimi ile yapılan immobilizasyon çalışmalarında immobilize CAT aktivitesi immobilizasyon süresinin artmasıyla beraber artmıştır.

İmmobilize enzimlerin spesifik aktivitelerinin başlangıç CAT derişimi ve immobilizasyon süresine bağlı olarak değişimi Şekil 4.25'de verilmektedir.



Şekil 4.25 Farklı başlangıç CAT derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize CAT'ın spesifik aktivitesi üzerine etkisi. Başlangıç CAT derişimi: (◇): 0,5 mg ml^{-1}, (□): 1,0 mg ml^{-1}, (△): 2,0 mg ml^{-1}

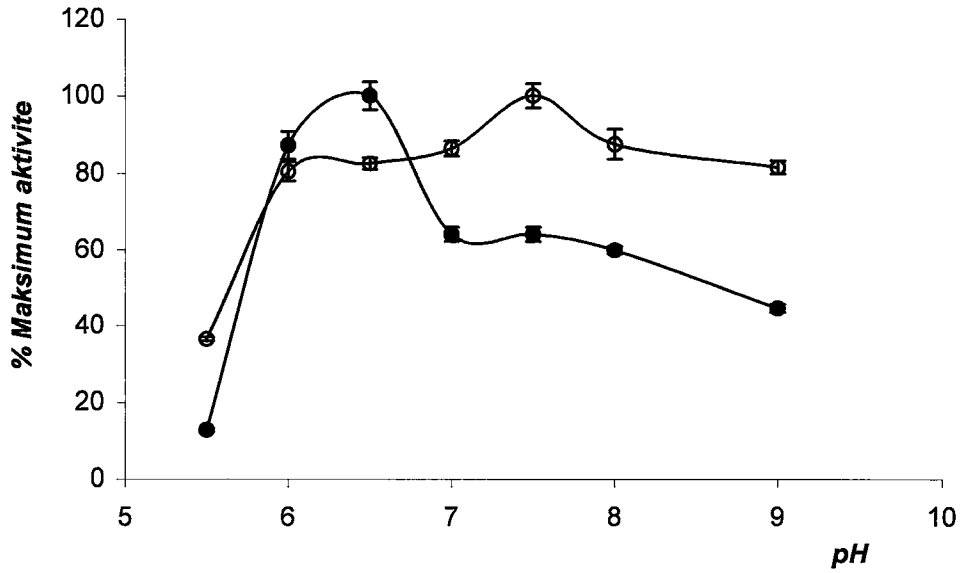
Şekil 4.25'den görüldüğü gibi başlangıç enzim derişimi arttıkça spesifik aktivite değerleri azalmaktadır. 0,5 mg ml^{-1} başlangıç derişiminde 120 dk immobilizasyon süresi uygulanan enzim oldukça yüksek spesifik aktivite göstermekte olup en düşük spesifik aktivite değerleri 2,0 mg ml^{-1} başlangıç derişiminde immobilize edilmiş örnekler için elde edilmiştir. İmmobilize enzimlerin gram destek başına aktivitelerinin immobilizasyonda kullanılan CAT enzimi miktarına oranları Şekil 4.26'da verilmektedir. Özellikle 0,5 mg. ml^{-1} (5 mg. g $destek^{-1}$) ve 1,0 mg. ml^{-1} (10 mg. g $destek^{-1}$) başlangıç enzim derişimleri için hesaplanan değerler birbirine oldukça yakın olmakla beraber en yüksek değer 0,5 mg ml^{-1} başlangıç enzim derişimi ve 120 dk immobilizasyon süresi için bulunmuştur. Bu nedenle sonraki immobilizasyon çalışmaları bu koşullarda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.26 Farklı başlangıç CAT derişimleri için immobilizasyon süresinin immobilize CAT'ın (Aktivite / Başlangıç CAT miktarı) oranına etkisi. CAT başlangıç derişimleri: (◇): 0,5 mg ml^{-1}, (□): 1,0 mg ml^{-1}, (△): 2,0 mg ml^{-1}

4.1.2.2. Serbest ve İmmobilize CAT Enziminin Karakterizasyonu

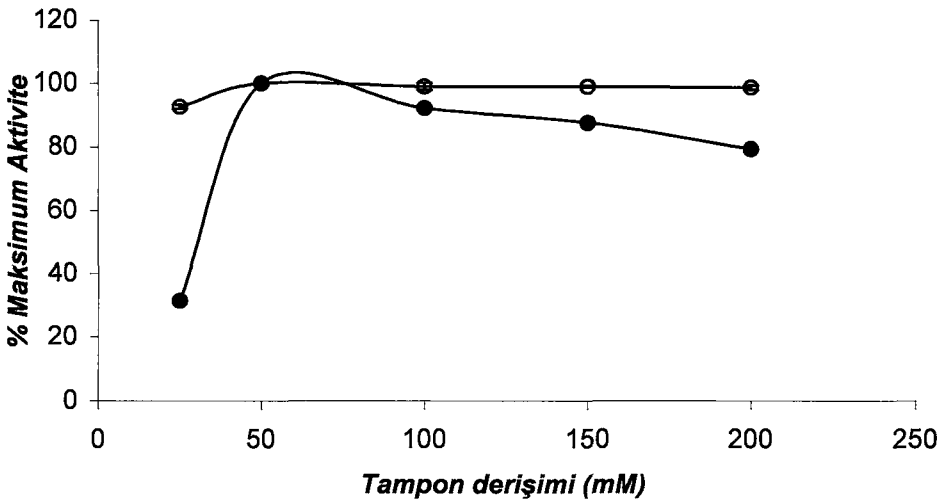
Serbest ve immobilize CAT enzimlerinin farklı pH'daki aktiviteleri % maksimum aktivite olarak Şekil 4.27'de verilmektedir.



Şekil 4.27. Serbest ve immobilize CAT aktivitesinin pH'a bağlı olarak değişimi (•): İmmobilize CAT (pH: 6,5), (o): Serbest CAT (pH: 7,5)

Şekil 4.27'den de görüldüğü gibi serbest CAT enzimi immobilize CAT'a göre daha geniş bir pH aralığında (6,0-9,0) oldukça yüksek aktivite göstermektedir. Serbest enzim en yüksek aktiviteyi pH 7,5'da gösterirken, immobilize enzim için bu değer pH 6,5 olarak belirlenmiştir.

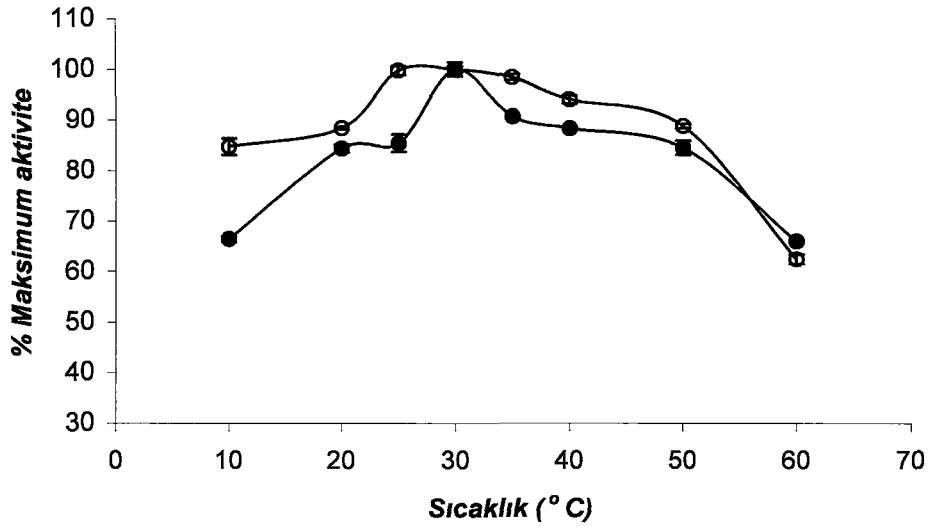
Serbest ve immobilize CAT enzimlerinin aktiviteleri optimum pH'da ancak farklı derişimlerde tampon çözeltilerde hazırlanan 10 mM H_2O_2 kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen bulgular Şekil 4.28'de verilmiştir.



Şekil 4.28. Serbest ve immobilize CAT aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi (•): İmmobilize CAT, (o): Serbest CAT

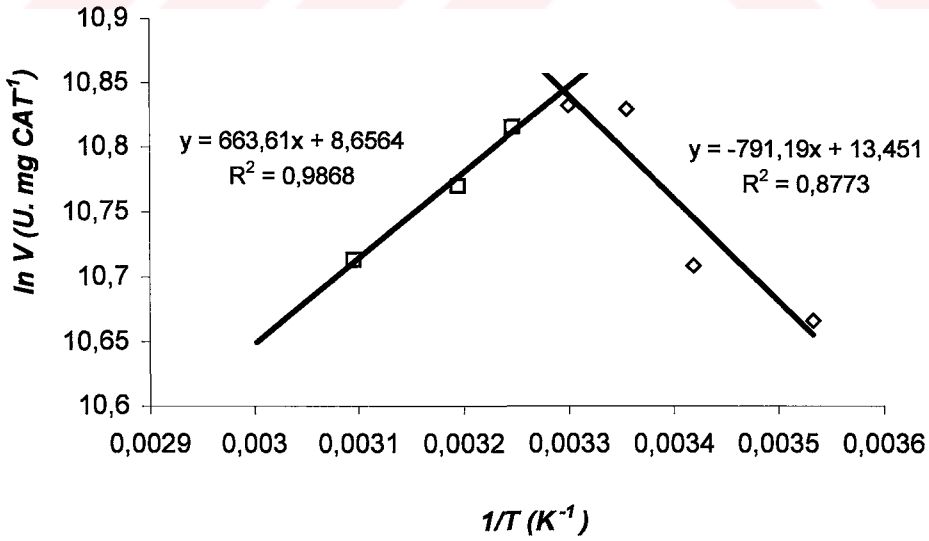
Şekil 4.28 incelendiğinde immobilize CAT'ın tersine serbest CAT'ın tampon derişiminden çok fazla etkilenmediği ve her iki enzim için en yüksek aktivitenin 50 mM tampon için elde edildiği görülmektedir.

Serbest ve immobilize CAT aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi Şekil 4.29'da verilmektedir. Her iki enzimin % maksimum aktivite-sıcaklık profili benzerlik göstermektedir. En yüksek aktiviteyi serbest CAT enzimi 25-35 °C aralığında, immobilize CAT ise 30 °C'de göstermektedir.



Şekil 4.29. Serbest ve immobilize CAT aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi (•): İmmobilize CAT, (o): Serbest CAT

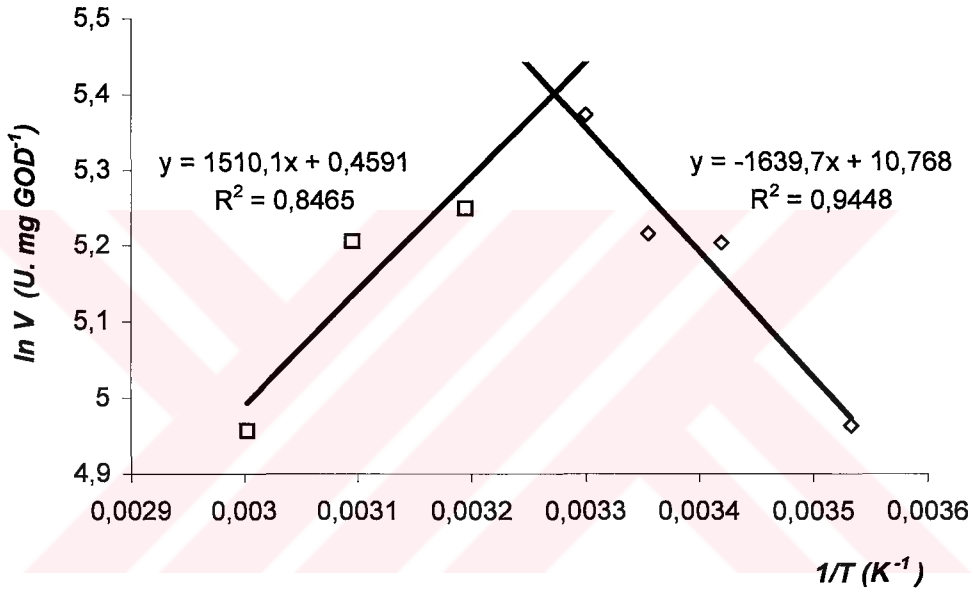
Farklı sıcaklıklarda çalışıldığında belirlenen aktivite değerleri Arrhenius bağıntısına göre grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.30 elde edilmiştir. Grafikte aktivitenin sıcaklık ile arttığı ve azaldığı bölgeler ayrı ayrı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.30. Serbest CAT enziminin Arrhenius grafiği

Aktivitenin sıcaklıkla arttığı değerlere ait doğru yardımı ile (eğim : -791,19) serbest CAT enziminin aktivasyon enerjisi 6,58 kJ mol^{-1} K^{-1} olarak hesaplanmıştır. Her iki doğrunun kesiştiği nokta (enzimin denatürasyona başladığı sıcaklık) 303,4 K (30,3 °C) olarak hesaplanmıştır.

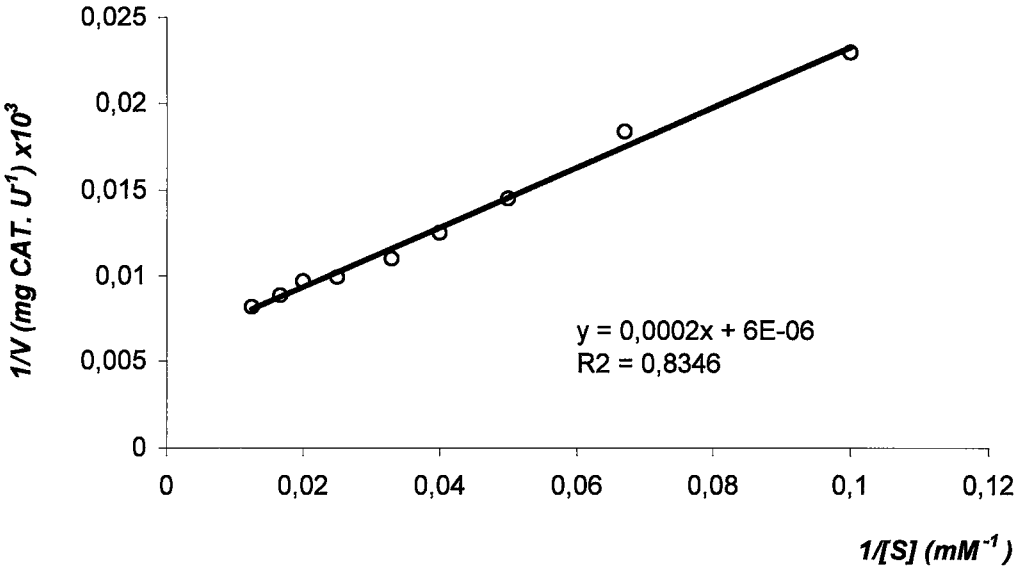
Aynı şekilde immobilize enzimin Arrhenius grafiği Şekil 4.31'de verilmektedir.



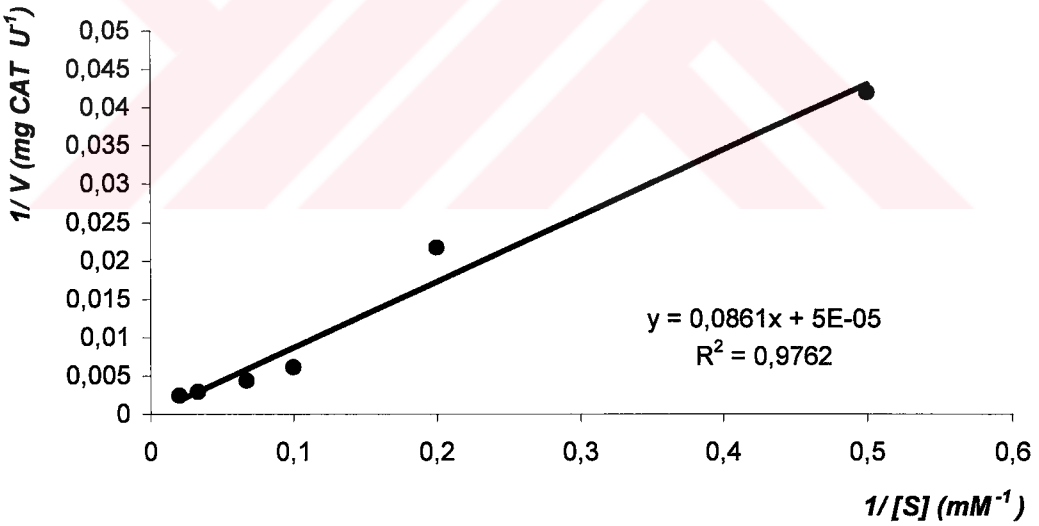
Şekil 4.31. İmmobilize CAT enziminin Arrhenius grafiği

İmmobilize GOD'nin Ea değeri 13,63 kJ mol^{-1} K^{-1}, denatürasyona başladığı sıcaklık ise 305,5 K (32,4 °C) olarak hesaplanmıştır.

Farklı substrat derişimleri için belirlenen aktivite değerleri kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33) yardımı ile serbest ve immobilize CAT'ın K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.32. Serbest CAT için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.33. İmmobilize CAT için Lineweaver-Burk grafiği

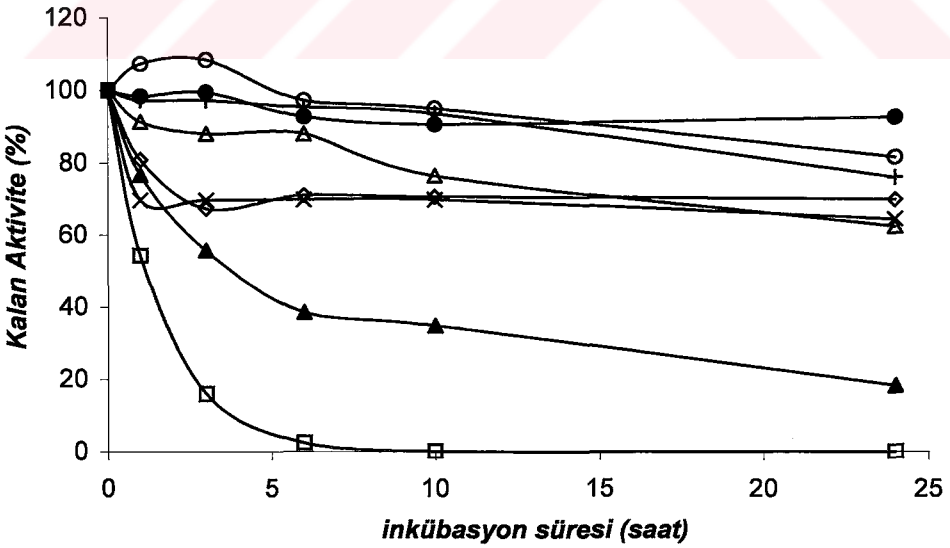
Ayrıca serbest ve immobilize enzimlerin geri dönüşüm sayıları ve katalitik etkinlikleri de Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize CAT'ın kinetik parametreleri

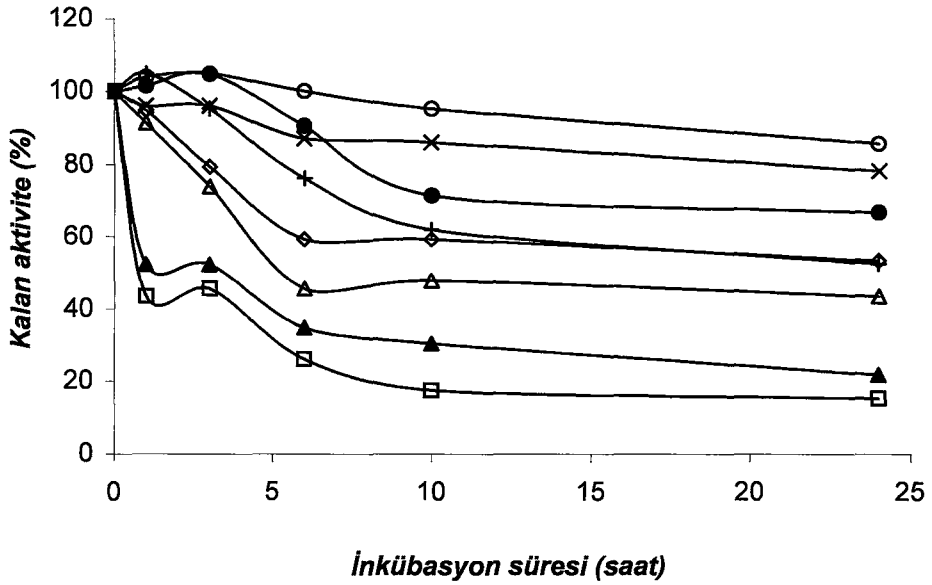
CAT örnekleri	V_{max} (µmol H_2O_2 dk^{-1} mg $protein^{-1}$)	K_M (mM)	K_{cat} (mol H_2O_2 s^{-1} mol $protein^{-1}$)	K_{cat}/K_M (s^{-1} M^{-1})
Serbest	$1,7 x10^5$	33,3	$6,9 x10^5$	$2,08x10^7$
Immobilize	$2,0 x10^4$	1722,0	$8,3x10^4$	$4,84x10^4$

İmmobilize CAT'ın maksimum hızı serbest enzimin maksimum hızının % 12'si olmakla beraber, K_M değeri çok yükseldiği için serbest CAT'ın ancak % 0,2'si kadar katalitik etkinlik göstrdiği saptanmıştır.

Şekil 4.34 ve 4.35'de sırasıyla serbest ve immobilize CAT için termal kararlılık grafiği verilmektedir. Görüldüğü gibi 20, 30, 35 ve 40 °C sıcaklıklarda serbest enzimin, 10, 25, 50 ve 60 °C'de ise immobilize enzimin termal kararlılığı daha yüksek bulunmuştur. Serbest enzim 60 °C'de 6 saat içinde aktivitesinin tamamını yitirirken immobilize enzim aynı koşullarda 24 saat sonunda başlangıçtaki aktivitesinin % 15,2'ini göstermeye devam etmektedir.

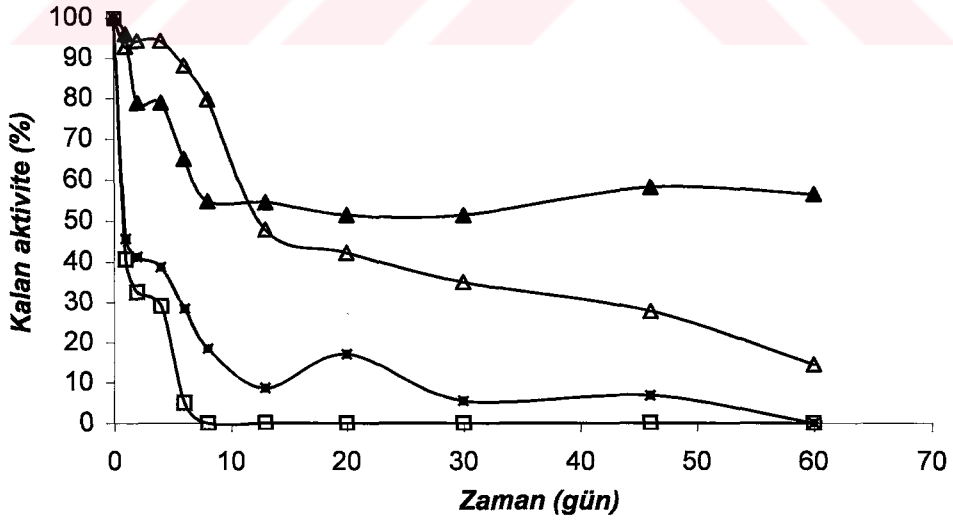


Şekil 4.34. Serbest CAT enziminin termal kararlılık grafiği. (x): 10 °C, (•): 20 °C, (o): 25 °C, (+): 30 °C, (◊): 35 °C, (△): 40 °C, (▲) : 50 °C ve (□): 60 °C.



Şekil 4.35. İmmobilize CAT enziminin termal kararlılık grafiği (x): 10 °C, (•): 20 °C, (o): 25 °C, (+): 30 °C, (◊): 35 °C, (△): 40 °C, (▲) : 50 °C ve (□): 60 °C.

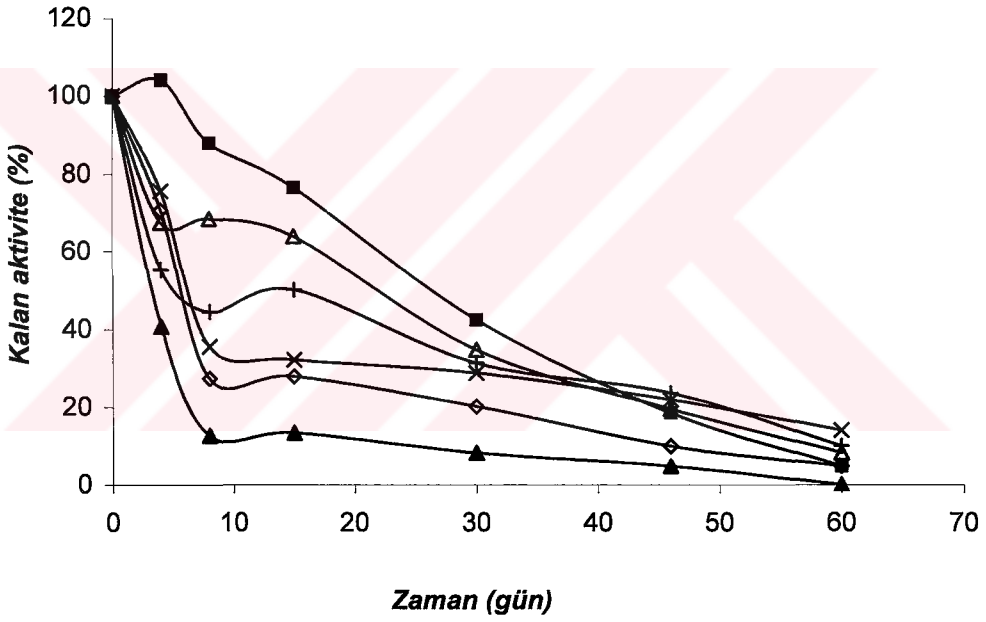
Serbest ve immobilize enzimlerin 4 °C ve oda sıcaklığındaki depolama kararlılıkları Şekil 4.36'da verilmiştir.



Şekil 4.36. Serbest ve immobilize CAT'ın depolama kararlılığı. (▲) 4 °C'de immobilize CAT, (△) 4°C'de serbest CAT, (■) Oda sıcaklığında immobilize CAT ve (□) oda sıcaklığında serbest CAT.

Şekil 4.36'dan da görüldüğü gibi ilk 8 gün boyunca en yüksek kararlılığı 4 °C'de depolanan serbest CAT göstermiş, ancak daha sonra aktivite zamana bağlı olarak hızla düşmüştür. 4 °C'de depolanan immobilize CAT 60 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 56,5'ini gösterirken, serbest CAT başlangıç aktivitesinin ancak % 14,5'ini koruyabilmiştir. Oda sıcaklığında depolanan serbest CAT 8 gün, oda sıcaklığında depolanan immobilize CAT enzimi ise ancak 60 gün sonunda aktivitesinin tamamını kaybetmiştir.

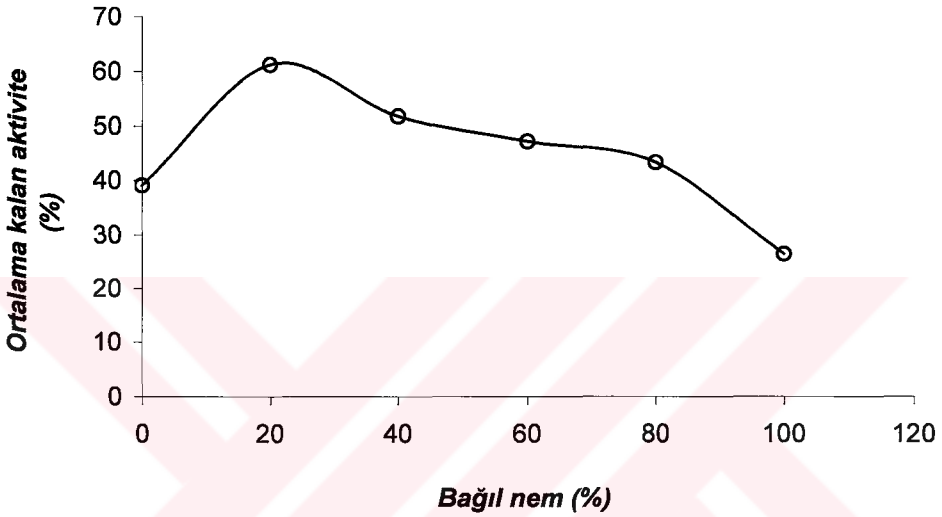
İmmobilize enzimin farklı bağıl nem ortamlarında depolama kararlılığının zamana bağlı olarak değişimi Şekil 4.37.'de verilmiştir.



Şekil 4.37. İmmobilize CAT'ın farklı bağıl nem ortamlarındaki depolama kararlılıkları. (◊): 0 %, (■): 20 %, (△): 40 %, (x): 60 %, (+): 80 % ve (▲): 100 %

Şekil 4.37. incelendiğinde, depolama ortamı bağıl nem miktarının immobilize CAT'ın aktivitesi üzerine özellikle ilk 30 gün için anlamlı etkileri olduğu görülmektedir. 30 günlük çalışma periyodu boyunca en yüksek kararlılığı % 20, en düşük kararlılığı ise % 100 bağıl nem ortamında depolanan örnekler göstermektedir. % 20 bağıl nem ortamında depolanan immobilize CAT'ın 30 gün sonrasındaki kalan

aktivitesi % 37 iken, 60. gün sonunda kalan aktivitesi % 5'dir. Çalışmanın başındaki 30 gün boyunca farklı bağıl nem ortamlarında depolanan enzimlerin kalan aktiviteleri birbirinden oldukça farklı iken çalışmanın sonuna doğru kararlılıklar azalarak birbirine yaklaşmıştır. Çalışma boyunca kalan aktivitelerin ortalama değerlerinin depolandıkları ortamların bağıl nemine göre değişimi Şekil 4.38'de verilmiştir.



Şekil 4.38 İmmobilize CAT'ın farklı bağıl nem ortamlardaki aktivitelerinin ortalaması

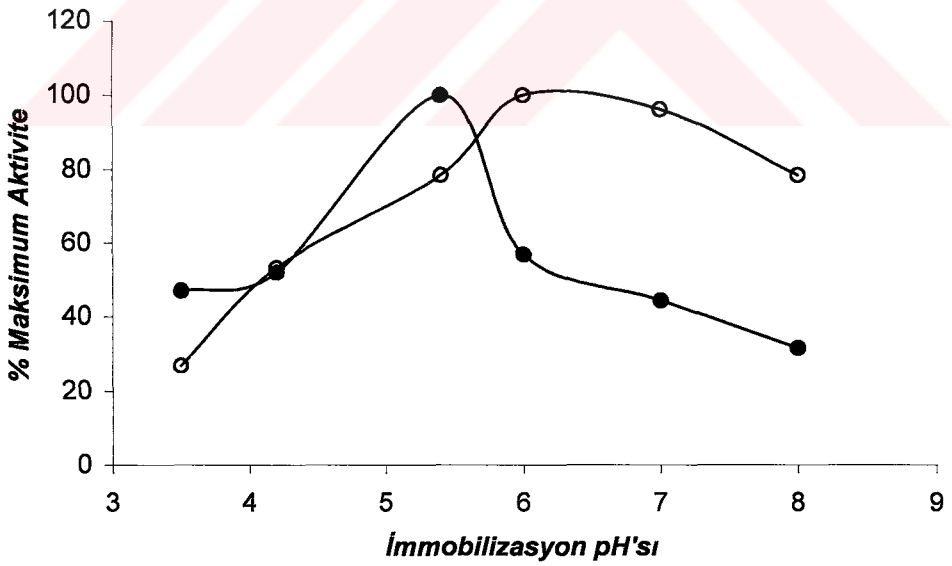
Şekil 4.38 de görüldüğü gibi immobilize CAT'ın kararlılığı depolandığı ortamın bağıl neminden etkilenmiş ve % 20 bağıl neme kadar kararlılık bağıl nem %'si ile artmıştır. % 20'nin üzerindeki bağıl nem ortamlarında depolanan immobilize enzim örneklerinin kararlılıkları ise bağıl nem arttıkça azalmıştır.

Çalışma sonunda kalan aktivitelerin ortamların bağıl nemine göre değişimi Şekil 4.39'da verilmiştir.

Şekil 4.40'da da görüldüğü gibi başlangıçta kullanım sayısına bağlı olarak aktivite hızlı bir düşüş gösterirken yaklaşık 20. kullanım sonrasında yatay bir eğilim gözlenmiştir. İmmobilize CAT 10. kullanım sonunda aktivitesinin yaklaşık % 89'unu korurken 20 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 50'ni kaybetmiştir. 50 kullanım sonrasında immobilize CAT'ın başlangıç aktivitesinin yaklaşık olarak % 36'ını göstermeye devam ettiği belirlenmiştir.

4.1.3. GOD ve CAT Enzimlerinin Ko-immobilizasyonu

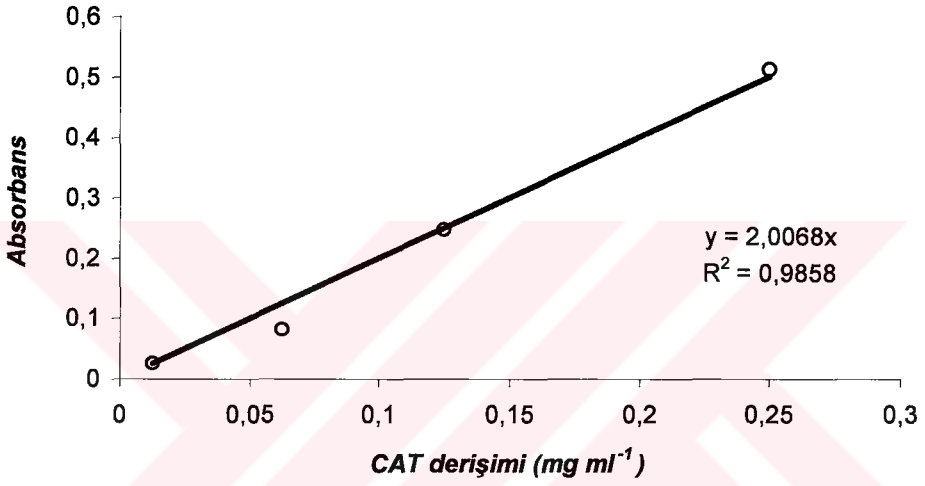
GOD ve CAT enzimlerinin her ikisinin de optimum immobilizasyon sıcaklığı (Şekil 4.2 ve Şekil 4.21) 10 °C ve optimum immobilizasyon süresi 120 dakika (Şekil 4.6 ve Şekil 4.24) olarak belirlenmiştir. Ancak optimum immobilizasyon pH'ları farklılık göstermektedir. Bu nedenle immobilizasyon pH'sına bağlı olarak her iki enzimin aktivitelerinin değişimini gösteren Şekil 4.41. değerlendirildiğinde, ko-immobilizasyon için en uygun pH, eğrilerin kesim noktası olan 5,7 olarak seçilmiştir.



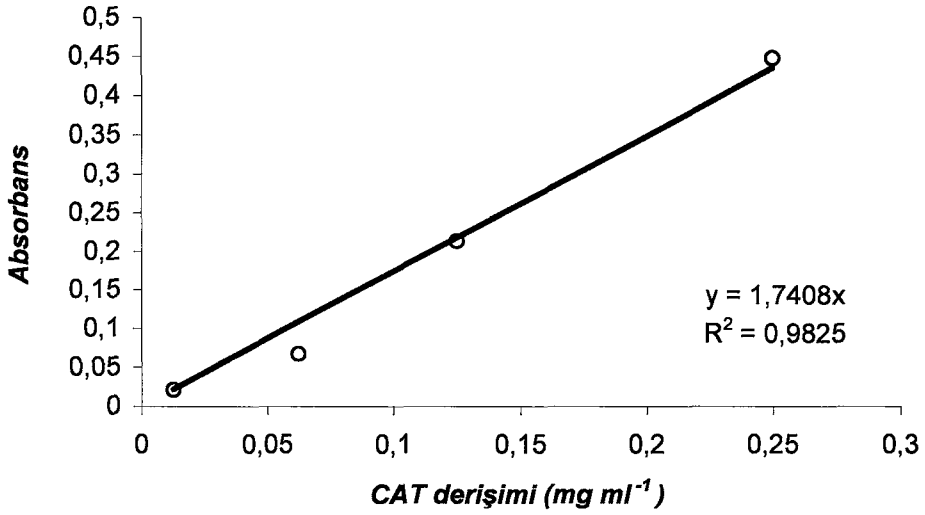
Şekil 4.41. GOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerinin immobilizasyon pH'sına bağlı olarak değişimi. (o) CAT enzimi, (•) GOD enzimi

4.1.3.1. GOD ve CAT Enzimlerinin Birlikte Ko-immobilizasyonu

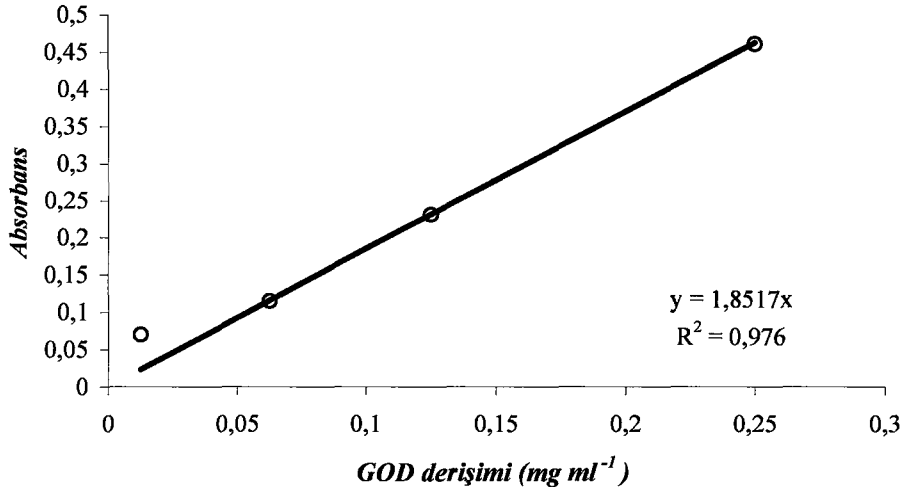
GOD ve CAT enzimlerinin birlikte ko-immobilizasyonunda her birinin gram desteğe bağlanan miktarlarını bulabilmek için CAT veya GOD enzimlerinin farklı derişimlerdeki çözeltilerinin 280 ve 405 nm dalga boylarındaki absorbansları ölçülerek standart grafikleri çizilmiştir. Şekil 4.42 ve 4.43'de CAT'ın, Şekil 4.44 ve 4.45'de ise GOD'nin sırasıyla 280 ve 405 nm'deki standart grafikleri verilmiştir.



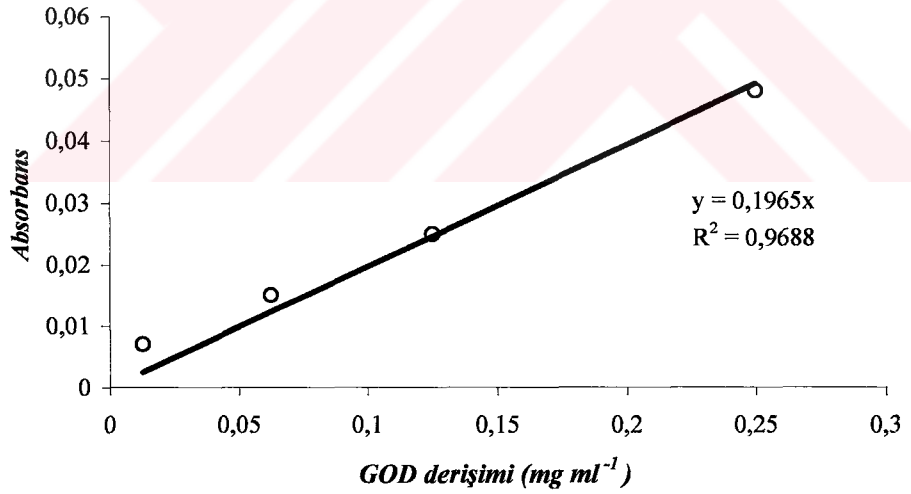
Şekil 4.42. CAT enziminin 280 nm'de absorbansının derişime bağlı olarak değişimi



Şekil 4.43. CAT enziminin 405 nm'de absorbansının derişime bağlı olarak değişimi



Şekil 4.44. GOD enziminin 280 nm'de absorbansının derişime bağlı olarak değişimi



Şekil 4.45. GOD enziminin 405 nm'de absorbansının derişime bağlı olarak değişimi

Yukarıda verilen bu grafiklerin eğimlerinden yararlanılarak immobilizasyon için farklı oranlarda ve bilinen derişimlerde GOD ve CAT içeren başlangıç çözeltilerinin 280 ve 405 nm'deki absorbansları teorik olarak eşitlik 4.1 ve 4.2'den hesaplanabilir:

$$A_{280} = 2{,}0068\ C_{CAT} + 1{,}8517\ C_{GOD} \quad (4.1)$$

$$A_{405} = 1{,}7408\ C_{CAT} + 0{,}1965\ C_{GOD} \quad (4.2)$$

Aynı eşitlikler kullanılarak GOD ve CAT içeren herhangi bir çözeltinin 280 nm ve 405 nm dalga boyunda ölçülen absorbansları ile GOD ve CAT derişimleri ayrı ayrı hesaplanabilir.

Bu yöntemin uygun olup olmadığını saptayabilmek amacıyla GOD ve CAT derişimleri bilinen çözeltilerin 280 ve 405 nm'deki absorbansları ($A_{Deneysel}$) ölçülmüş ve eşitlik 4.1 ve 4.2'den hesaplanan teorik absorbansları (A_{Teorik}) ile kıyaslanmıştır. $A_{Deneysel}$ değerlerinin belirlenmesinde GOD-CAT enzim çözeltileri 8 kez seyreltildiği için, A_{Teorik} değerleri de 8 kez seyrelme oranı dikkate alınarak hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Birlikte ko-immobilizasyonda kullanılan ve GOD ve CAT enzim çözeltilerinin 280 ve 405 nm'deki deneysel ve teorik absorbansları

Örnek Sembolü	280 nm'deki Absorbanslar			405 nm'deki Absorbanslar		
	$A_{Deneysel}$	A_{Teorik}	%*	$A_{Deneysel}$	A_{Teorik}	%*
21	0,137	0,141	**103**	0,029	0,034	**117**
22	0,237	0,241	**102**	0,110	0,121	**110**
23	0,361	0,367	**102**	0,217	0,230	**106**
24	0,595	0,617	**104**	0,423	0,448	**106**
31	0,254	0,257	**101**	0,042	0,046	**110**
32	0,350	0,357	**102**	0,124	0,133	**107**
33	0,468	0,463	**99**	0,228	0,242	**106**
34	0,716	0,733	**102**	0,439	0,460	**105**
41	0,488	0,488	**100**	0,073	0,071	**97**
42	0,590	0,588	**99**	0,157	0,158	**101**
43	0,728	0,714	**98**	0,26	0,267	**103**
44	0,954	0,960	**100**	0,485	0,484	**99**

*= Teorik absorbans / Deneysel absorbans *100

Çizelge 4.3 incelendiğinde GOD ve CAT içeren enzim çözeltilerinin tümü için 280 ve 405 nm'deki A_{Teorik} ve $A_{Deneysel}$ değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir.

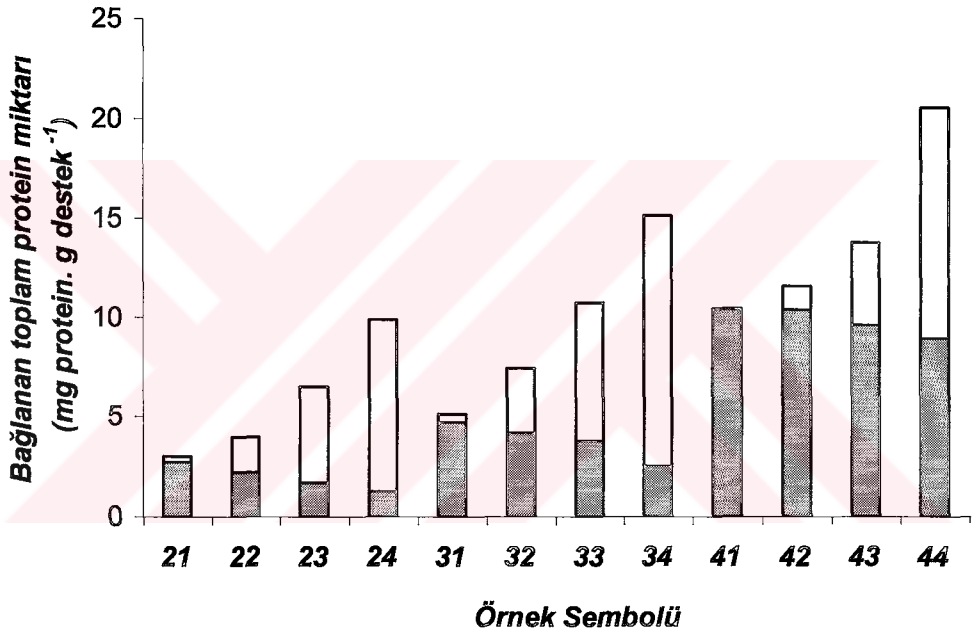
İmmobilizasyon süresi sonunda bağlanmayan enzim destekten yıkanarak uzaklaştırılmış ve süzüntülerin 280 ve 405 nm'deki absorbansları ölçülmüştür. Bu absorbans değerleri eşitlik 4.1 ve 4.2'nin ortak çözümü ile süzüntünün GOD ve CAT derişimlerinin belirlenmesinde kullanılmış, böylece yapılan her immobilizasyon işlemi sonrasında gram desteğe bağlanan GOD ve CAT miktarları mg protein olarak ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Her çalışma için 280 ve 405 nm'deki absorbanslar, süzüntülerin GOD ve CAT derişimleri, gram destek başına bağlanan enzim miktarları ve bağlanma yüzdeleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı oranlarda GOD ve CAT içeren başlangıç enzim çözeltileri ile yapılan ko- immobilizasyon çalışmalarında desteğe bağlanan enzim miktarları

Örnek Sembolü	*Süzüntü Absorbansları*		*Süzüntü Derişimi (mg ml^{-1})*		*Bağlanan Enzim Miktarları (mg g $destek^{-1}$)*		*Enzimlerin Bağlanma Oranları (%)*	
	A_{280}	A_{405}	C_{GOD}	C_{CAT}	m_{GOD}	m_{CAT}	CAT	GOD
21	0,078	0,022	0,26	0,07	2,41	0,28	28,0	48,2
22	0,146	0,077	0,29	0,32	2,18	1,78	35,6	43,6
23	0,207	0,121	0,33	0,52	1,68	4,81	48,1	33,6
24	0,372	0,256	0,38	1,13	1,22	8,66	43,3	24,4
31	0,138	0,026	0,53	0,06	4,68	0,41	41,0	46,8
32	0,179	0,052	0,59	0,17	4,14	3,27	65,4	41,4
33	0,220	0,081	0,62	0,30	3,77	6,98	69,8	37,7
34	0,210	0,032	0,85	0,64	2,49	12,62	68,0	15,0
41	0,246	0,048	0,94	0,11	10,44	0,012	1,2	52,2
42	0,359	0,129	1,04	0,48	10,4	1,20	4,8	48,3
43	0,387	0,152	1,04	0,58	9,58	4,20	42,0	47,9
44	0,467	0,210	1,11	0,84	8,93	11,60	58,0	49,5

Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi, başlangıç GOD derişimi aynı olan çalışmalarda CAT derişimi arttıkça gram destek başına bağlanan GOD miktarı azalmış, gram destek başına bağlanan CAT miktarı artmıştır. GOD derişiminin farklı olduğu 3 grup çalışmada da, başlangıç GOD derişimi arttıkça bağlanan GOD miktarının arttığı görülmektedir. Bu değişimin daha açık görüldüğü Şekil 4.46'da, yapılan her çalışma için gram desteğe bağlanan GOD ve CAT miktarları ve dolayısıyla bağlanan toplam protein miktarları verilmiştir.



Şekil 4.46 GOD ve CAT'ın birlikte ko-immobilizasyonu ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örnekleri için gram destek başına bağlanan toplam protein miktarı. (■): Toplam proteinin GOD içeriği ve (□): Toplam proteinin CAT içeriği.

Şekil 4.46'dan da görüldüğü gibi ko-immobilizasyonda kullanılan toplam enzim miktarı arttıkça gram desteğe bağlanan toplam enzim miktarı da artmıştır.

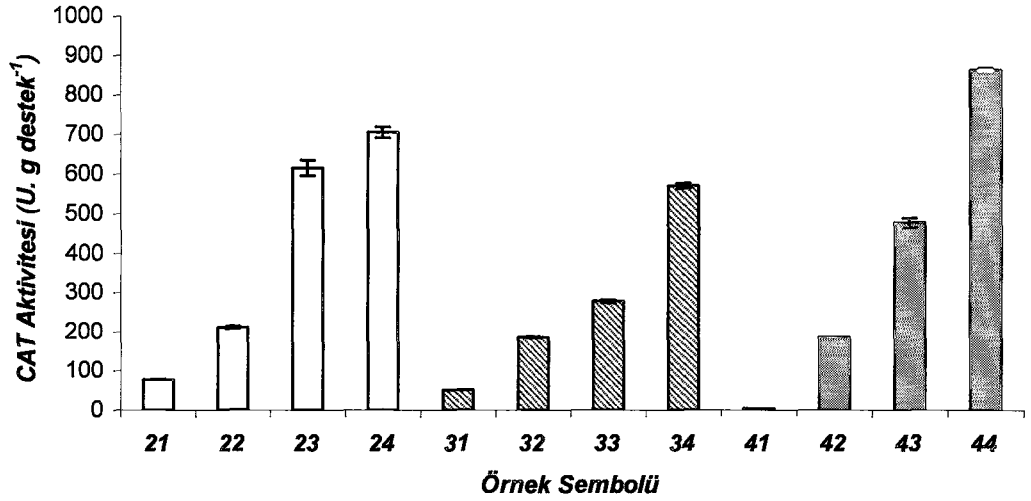
Ko-immobilizasyonda gram desteğe bağlanan GOD ve CAT miktarlarının toplamı (teorik toplam bağlanma) Çizelge 4.5'de verilmiştir. Ayrıca süzüntülerde Lowry yöntemi ile protein tayini yapılmış ve 1 gram desteğe bağlı olan enzim proteini değerleri de (deneysel toplam bağlanma) yine Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Birlikte ko-immobilizasyonda GOD ve CAT enzimlerinin gram destek başına bağlanan protein miktarları ve % bağlanma

Örnek Sembolü	Toplam bağlanma			
	Bağlanan protein miktarı		% Bağlanma	
	Teorik	Deneysel	Teorik	Deneysel
21	2,69	3,08	44,8	51,3
22	3,96	4,04	39,6	40,4
23	6,49	6,78	43,3	45,2
24	9,88	9,66	39,5	36,6
31	5,09	5,34	46,6	43,2
32	7,41	7,78	49,4	51,8
33	10,80	10,90	53,8	54,5
34	15,11	14,13	50,3	47,1
41	10,60	9,41	50,5	44,8
42	9,89	9,35	39,6	37,4
43	13,78	15,50	45,9	51,7
44	20,53	22,27	51,3	55,7

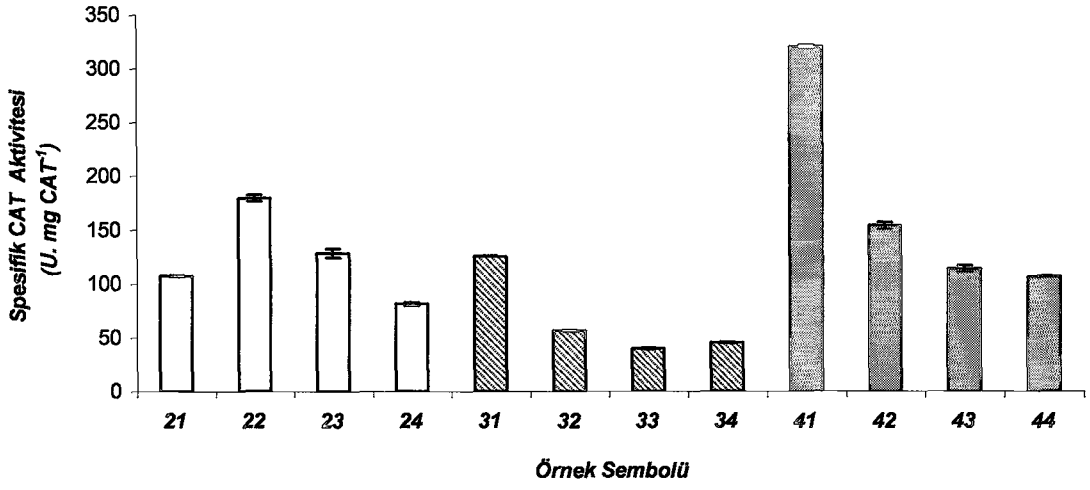
Çizelge 4.5'deki veriler incelendiğinde 280 ve 405 nm'deki absorbans değerleri ile yapılan hesaplamaların güvenilir olduğu görülmektedir.

Birlikte ko-immobilizasyon ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin CAT aktiviteleri (U g destek^{-1}) ve spesifik CAT aktiviteleri (U mg CAT^{-1} ve U mg toplam protein^{-1}) sırasıyla Şekil 4.47-49'da verilmiştir.



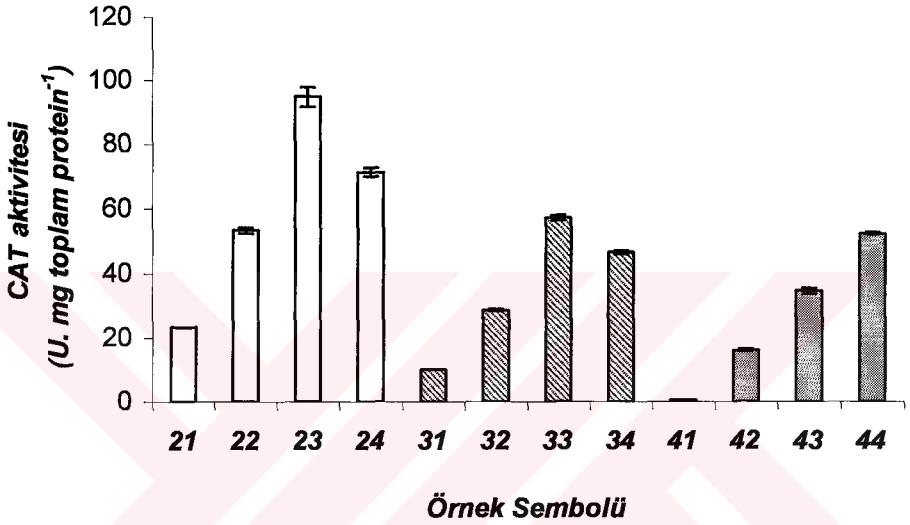
Şekil 4.47 Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin gram destek başına CAT aktiviteleri.

Şekil 4.47'de görüldüğü gibi aynı GOD başlangıç derişiminde immobilize edilen örneklerde başlangıç CAT derişimi arttıkça gram destek başına bağlanan CAT miktarıyla beraber CAT aktivitesinin de arttığı gözlenmektedir.



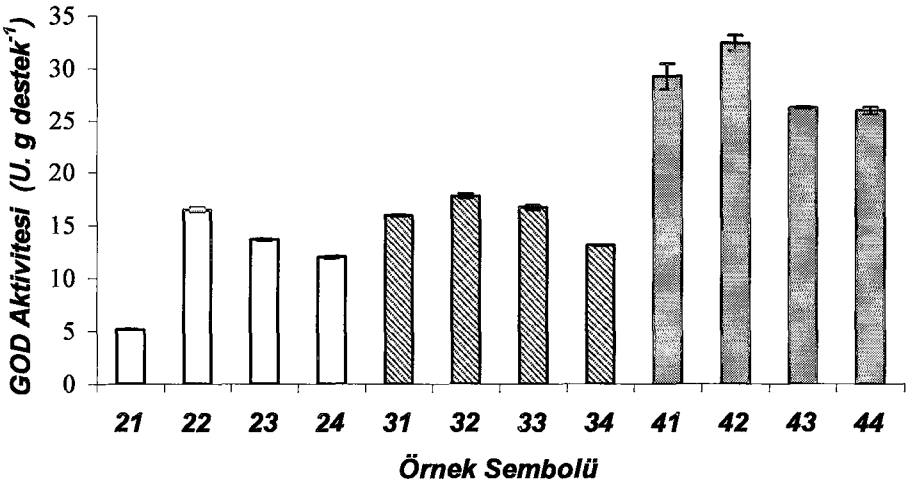
Şekil 4.48 Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin spesifik CAT aktiviteleri

Ko-immobilize GOD-CAT'ın spesifik CAT aktivitelerinin değişiminin verildiği Şekil 4.48 incelendiğinde, enzimlerin CAT aktivitelerinin bağlanan CAT miktarıyla orantılı olarak artmadığı çoğunlukla azaldığı görülmektedir. Şekil 4.49'da ise bağlanan toplam protein miktarı arttıkça CAT aktivitesinin, 24 ve 34 no'lu örnekler istisna olmakla beraber, arttığı görülmektedir.



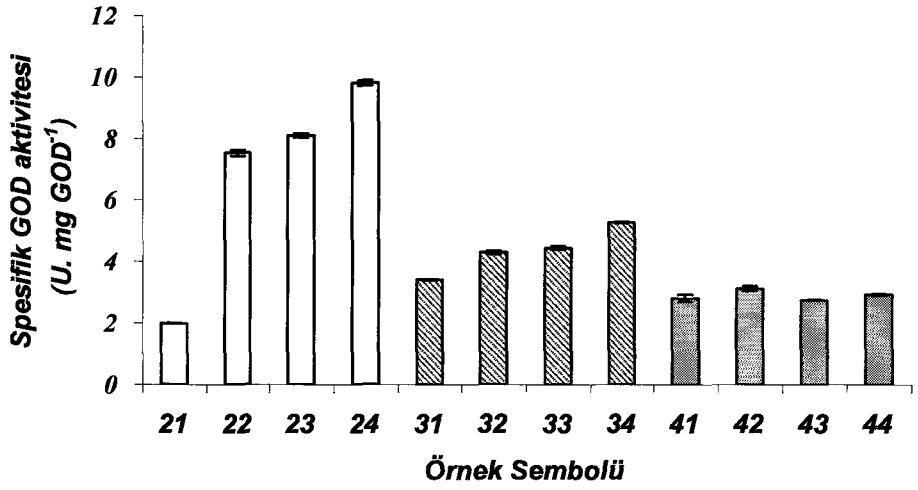
Şekil 4.49 Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin bağlanan toplam protein miktarı başına CAT aktiviteleri.

Şekil 4.50'de ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin gram destek başına GOD aktiviteleri verilmektedir.



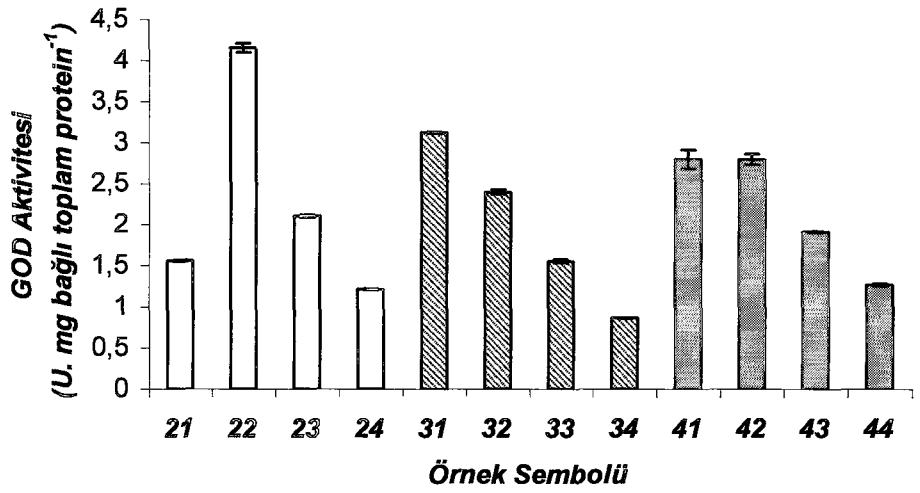
Şekil 4.50 Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin gram destek başına GOD aktiviteleri

Şekil 4.50'de görüldüğü gibi en yüksek aktiviteleri 2 mg ml^{-1} GOD başlangıç derişiminde ko-immobilize edilmiş örnekler göstermektedir. 0,5 ve 1,0 mg ml^{-1} GOD başlangıç derişiminde elde edilen örneklerin gram destek başına GOD aktiviteleri ise birbirine yakın çıkmıştır. GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin spesifik GOD aktiviteleri Şekil 4.51'de verilmiştir.

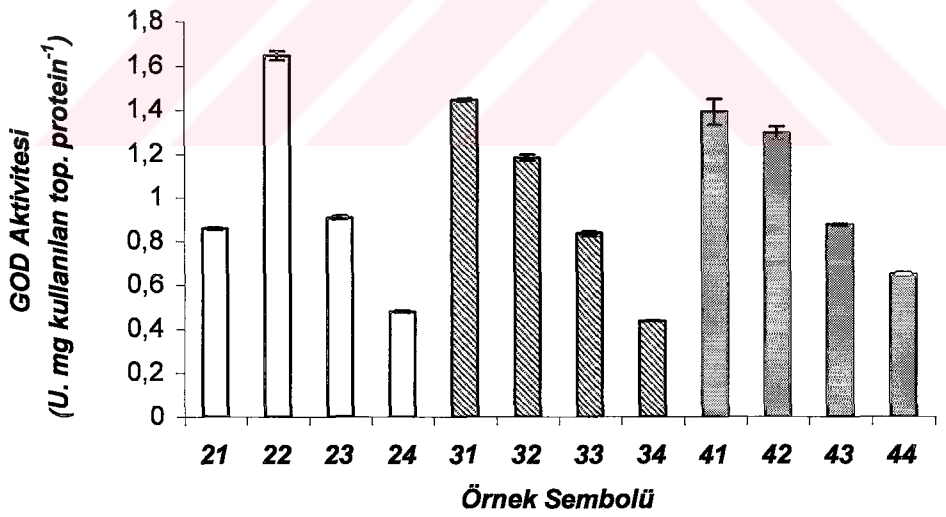


Şekil 4.51. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin spesifik GOD aktiviteleri

Şekil 4.51 incelendiğinde başlangıç GOD derişiminin farklı olduğu çalışmalarda başlangıç GOD derişimi dolayısıyla gram desteğe bağlanan GOD miktarı (Şekil 4.46) arttıkça ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin spesifik GOD aktivitelerinin azaldığı görülmektedir. 0,5 ve 1,0 mg ml^{-1} başlangıç GOD derişimi ile yapılan çalışmalarda gram destek başına bağlanan CAT miktarı arttıkça GOD miktarları azalmış olsa da (Şekil 4.46), GOD enziminin spesifik aktivitelerin arttığı görülmektedir. Ancak 2,0 mg ml^{-1} başlangıç derişiminde GOD ile yapılan çalışmalarda böyle bir eğilim gözlenmemiş olup değerler birbirine yakın çıkmıştır. Ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin GOD aktivitelerinin bağlanan toplam protein miktarına oranları ve kullanılan toplam protein miktarlarına oranları sırasıyla Şekil 4.52 ve 4.53'de verilmiştir.



Şekil 4.52. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin bağlanan toplam protein miktarı başına GOD aktiviteleri



Şekil 4.53. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin kullanılan toplam protein miktarı başına GOD aktiviteleri

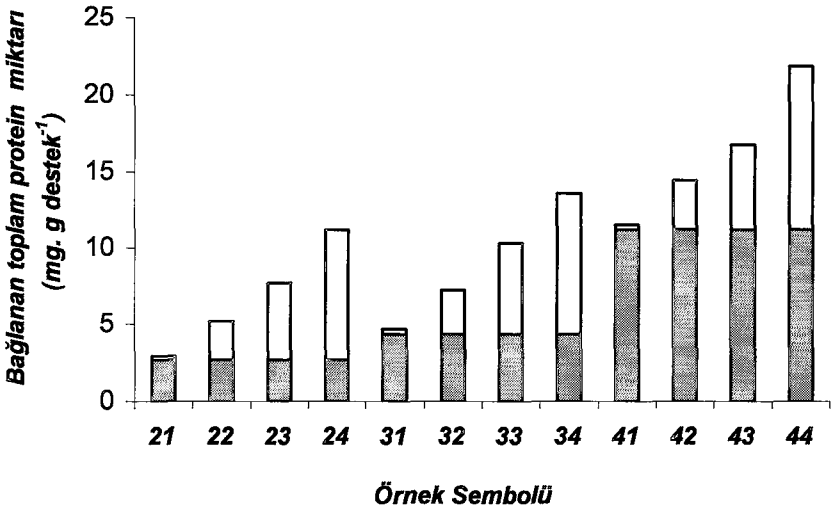
Şekil 4.52 ve 4.53 incelendiğinde her iki grafikte de birbirine oldukça benzeyen bir eğilim görülmektedir. Her iki grafikte de en yüksek aktivite 22 no'lu örnek için elde edilmiştir.

4.1.3.2. GOD ve CAT Enzimlerinin Sıralı Ko-immobilizasyonu

GOD ve CAT enzimlerinin birlikte ko-immobilizasyonunda elde edilen 12 ko-immobilize GOD-CAT örneğinin her birindeki gram destek başına bağlı GOD ve CAT miktarları birbirinden farklı bulunmuştu. Bu nedenle bu grup çalışmalarda ko-immobilize enzimlerde desteğe bağlı CAT enzim miktarının GOD aktivitesi üzerine etkisinin incelenip karşılaştırılabilmesi için bağlı GOD miktarları aynı, CAT miktarları farklı olan ko-immobilize GOD-CAT örnekleri hazırlanmıştır. Çizelge 4.6'da sıralı ko-immobilizasyon çalışmasında desteğe bağlanan GOD ve CAT miktarları ve bağlanma %'leri verilmiş ve Şekil 4.54'de veriler şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. GOD ve CAT'ın sıralı ko-immobilizasyonunda ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin desteğe bağlanan GOD ve CAT miktarları ve % bağlanma

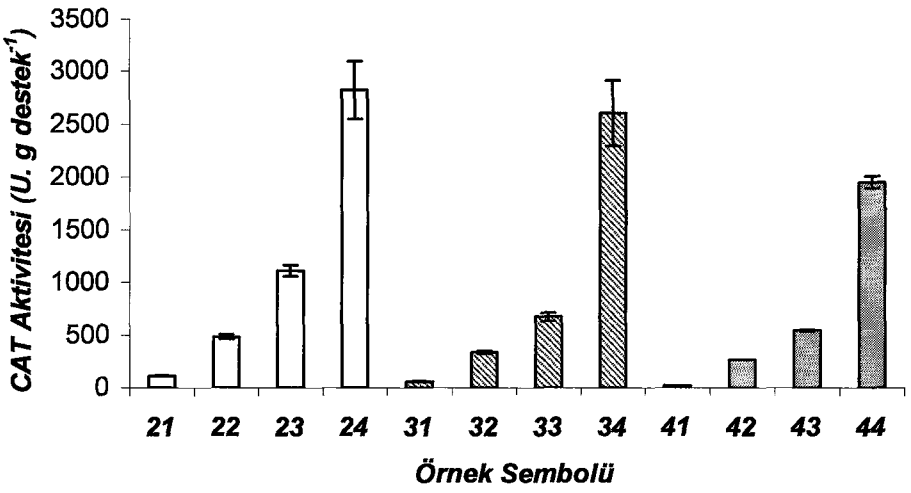
Örnek Sembolü	Bağlanan Miktar (mg g destek^{-1})			% Bağlanma		
	GOD	CAT	Toplam bağlanma	GOD	CAT	Toplam bağlanma
21	2,68	0,25	2,93	53,6	25,0	48,8
22	2,68	2,52	5,19	53,6	50,4	51,9
23	2,68	5,02	7,70	53,6	50,2	51,3
24	2,68	8,51	11,19	53,6	42,6	44,8
31	4,33	0,34	4,67	43,3	34,0	42,5
32	4,33	2,89	7,22	43,3	57,8	48,1
33	4,33	5,99	10,32	43,3	59,9	51,6
34	4,33	9,22	13,55	43,3	46,1	45,2
41	11,20	0,31	11,51	56,0	31,0	54,8
42	11,20	3,18	14,38	56,0	63,6	57,5
43	11,20	5,53	16,73	56,0	55,3	55,8
44	11,20	10,62	21,82	56,0	53,1	54,6



Şekil 4.54. GOD ve CAT'ın sıralı ko-immobilizasyonu ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örnekleri için gram destek başına bağlanan toplam protein miktarı. (■): Toplam proteinin GOD içeriği ve (□): Toplam proteinin CAT içeriği.

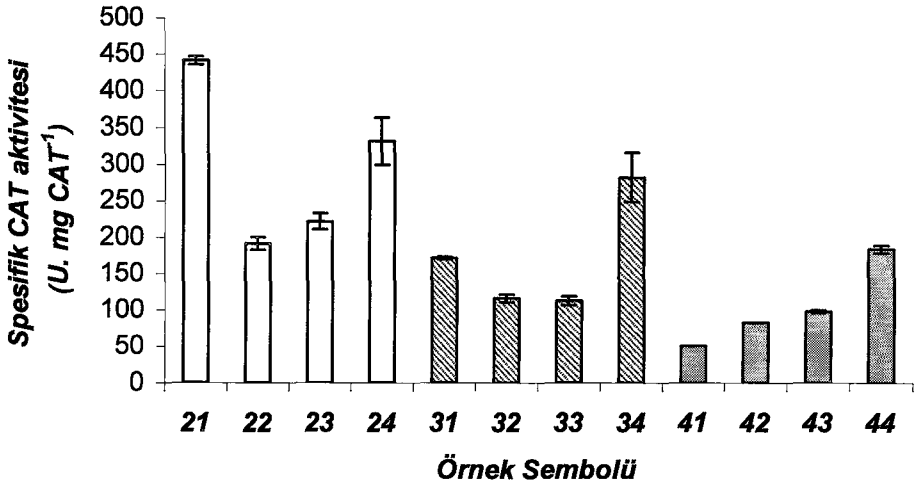
Şekil 4.54'den de görüldüğü gibi GOD ve CAT başlangıç derişimleri arttıkça gram desteğe bağlanan GOD ve CAT miktarları orantılı olarak artmıştır. Diğer bir dikkat çeken sonuç, farklı miktarlarda GOD bağlanmış olan desteklere aynı başlangıç derişiminde yapılan CAT immobilizasyonunda birbirine yakın miktarlarda CAT enziminin bağlanmış olmasıdır.

Ko-immobilize enzimlerin gram destek başına CAT aktiviteleri Şekil 4.55'de verilmektedir.

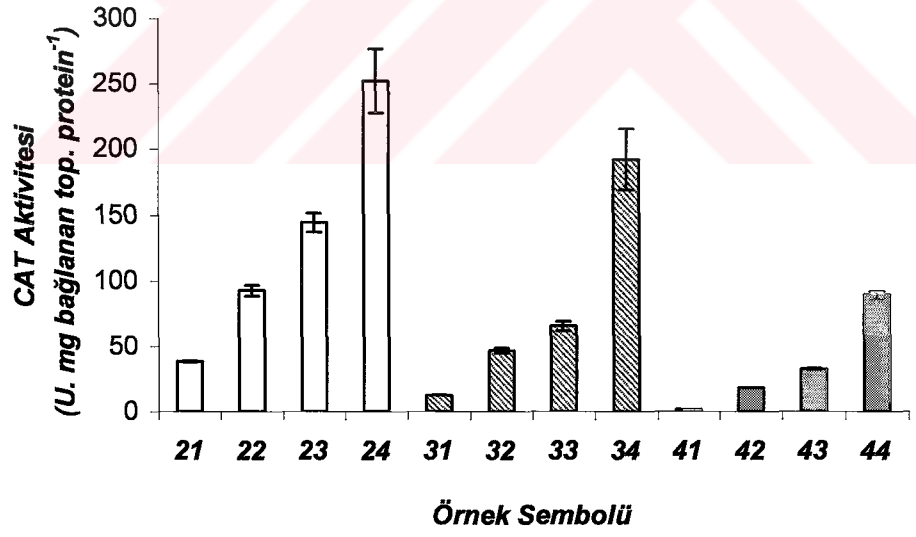


Şekil 4.55. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin gram destek başına CAT aktiviteleri

Şekil 4.55 incelendiğinde gram desteğe bağlı GOD miktarının aynı olduğu örneklerde CAT aktivitelerinin desteğe bağlı CAT miktarıyla orantılı olarak arttığı görülmektedir. Aynı başlangıç CAT derişimi ile yapılan çalışmalarda ise GOD miktarının artmasıyla CAT aktiviteleri azalmıştır. Ko-immobilize enzimlerin spesifik ve bağlanan toplam protein miktarı başına CAT aktiviteleri U mg CAT^{-1} ve U mg toplam $protein^{-1}$ olarak sırasıyla Şekil 4.56 ve 4.57'de verilmiştir.



Şekil 4.56. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin spesifik CAT aktiviteleri.

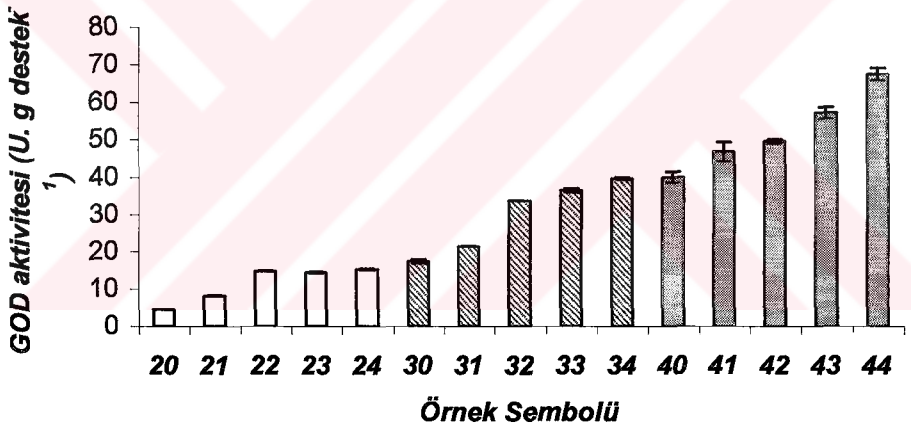


Şekil 4.57. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin bağlanan toplam protein miktarı başına CAT aktiviteleri

CAT enziminin spesifik aktiviteleri gram desteğe bağlı olan GOD miktarının artmasıyla beraber azalmıştır. Ancak aynı miktarda GOD'nin bağlı olduğu enzimlerde spesifik CAT aktiviteleri bağlı CAT miktarıyla orantılı bir değişim göstermemiştir.

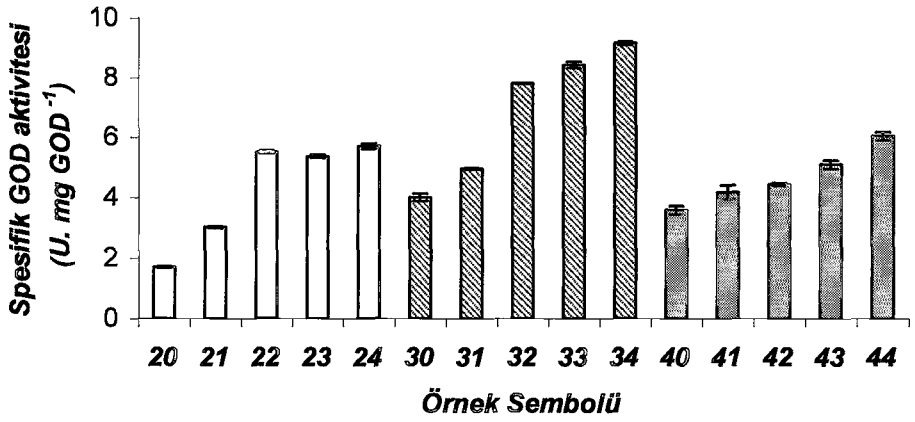
Şekil 4.57'de aynı GOD başlangıç derişimlerinde ko-immobilizasyon yapıldığında, CAT aktivitesinin bağlı protein miktarı ile orantılı olarak arttığı görülmektedir. Başlangıç CAT derişimi aynı olan ko-immobilize örneklerde ise GOD başlangıç derişiminin artmasıyla CAT aktivitelerinde azalma gözlenmiştir.

GOD ve CAT enzimlerinin sıralı immobilizasyonunda elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin gram destek başına GOD aktiviteleri (U. g destek^{-1}) Şekil 4.58'de verilmiştir.



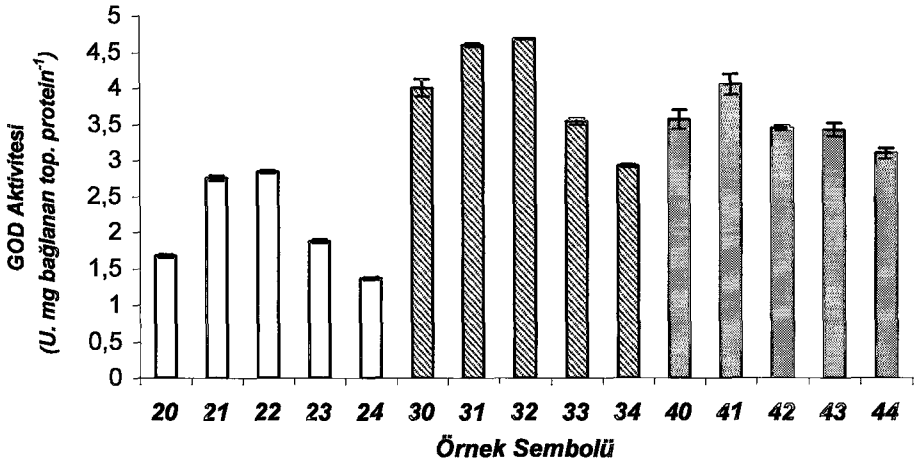
Şekil 4.58. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin gram destek başına GOD aktiviteleri

Şekil 4.58 incelendiğinde gram desteğe bağlı GOD miktarının aynı olduğu örneklerde bağlı CAT miktarı arttıkça GOD aktivitelerinin de arttığı gözlenmektedir. Ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin spesifik GOD aktivitesi Şekil 4.59'da gösterilmiştir.



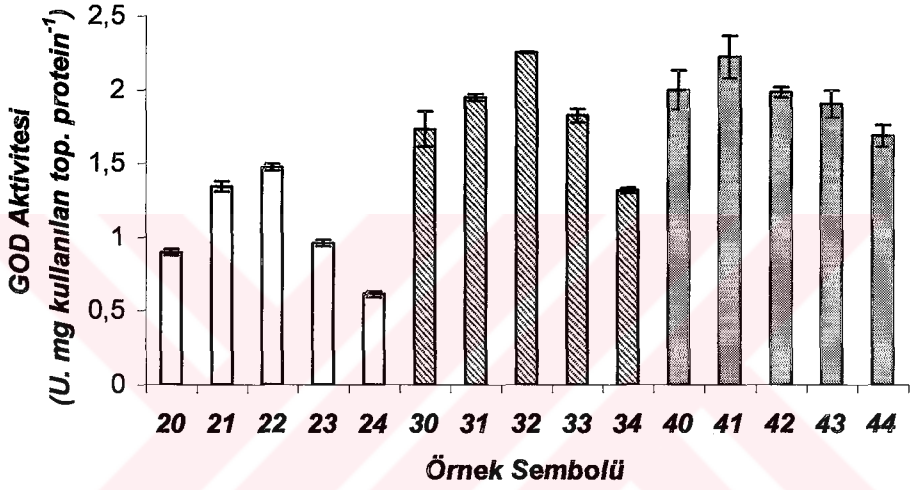
Şekil 4.59. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin spesifik GOD aktiviteleri

Şekil 4.59'dan da görüldüğü gibi başlangıç CAT derişimi aynı olan ko-immobilize GOD-CAT için en yüksek ve en düşük spesifik GOD aktivite değerleri başlangıç GOD derişiminin sırasıyla 1,0 mg ml^{-1} ve 2,0 mg ml^{-1} olduğu örneklere aittir.



Şekil 4.60. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın sıralı immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin gram desteğe bağlanan toplam protein miktarı başına GOD aktiviteleri.

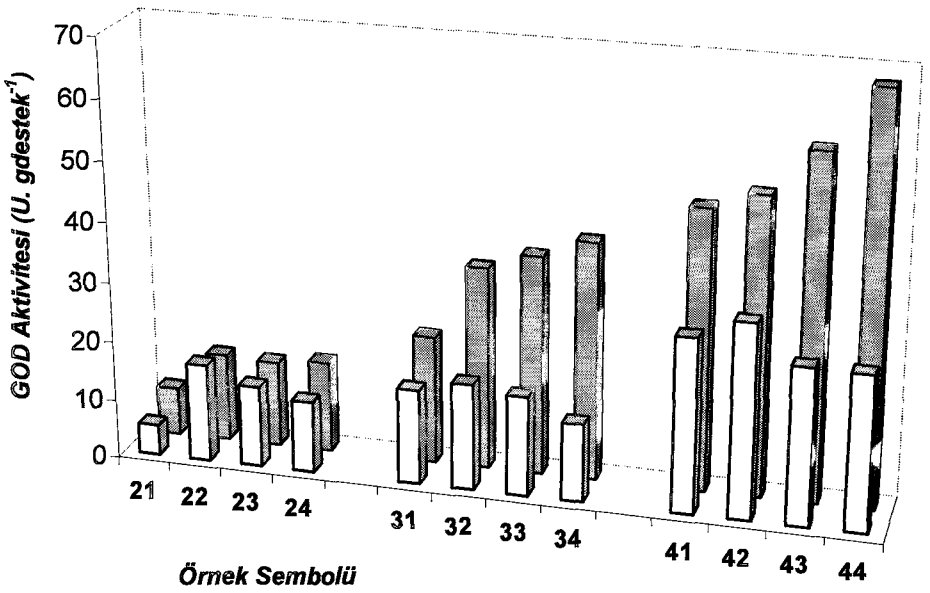
Şekil 4.60 ve 4.61, GOD ve CAT enzimlerinin sıralı immobilize edildiği ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin bağlanan toplam protein miktarı ve kullanılan toplam protein miktarı başına GOD aktivitelerinin değişimini göstermektedir. Şekil 4.60 ve 4.61 incelendiğinde başlangıç GOD derişiminin 1,0 ve 2,0 mg ml^{-1} olduğu örnekler için elde edilen değerler birbirine yakın olmakla beraber en yüksek aktivite başlangıç GOD derişiminin 1,0 mg ml^{-1} ve başlangıç CAT derişiminin 0,5 mg ml^{-1} olduğu 32 no'lu örnek için elde edilmiştir.



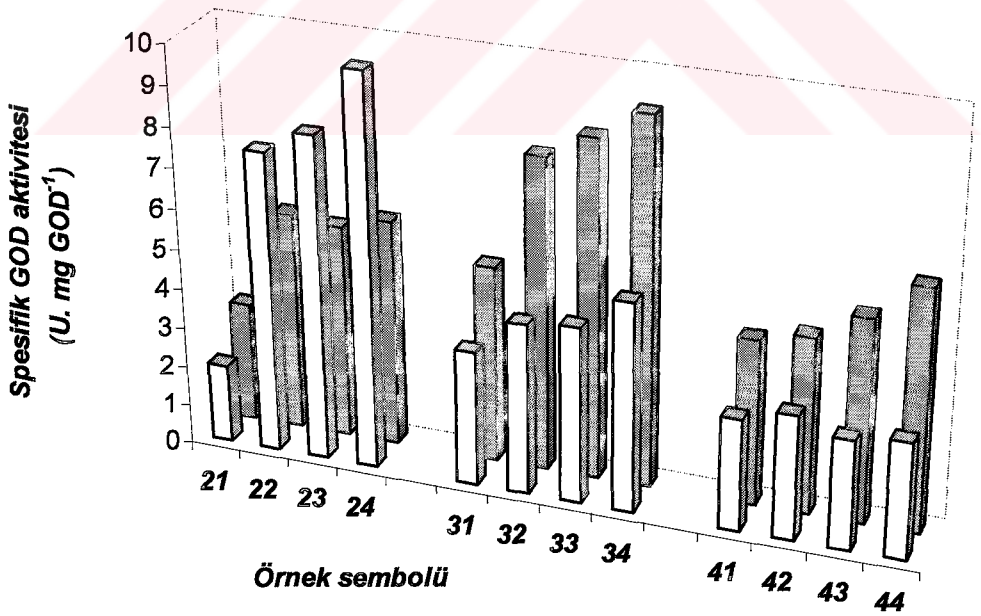
Şekil 4.61. Farklı başlangıç derişimlerinde GOD-CAT kullanılarak GOD-CAT'ın birlikte immobilize edildikleri çalışmalarda elde edilen ko- immobilize GOD- CAT örneklerinin kullanılan toplam protein miktarı başına GOD aktiviteleri

4.1.3.3. GOD ve CAT'ın Birlikte ve Sıralı Ko-immobilizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

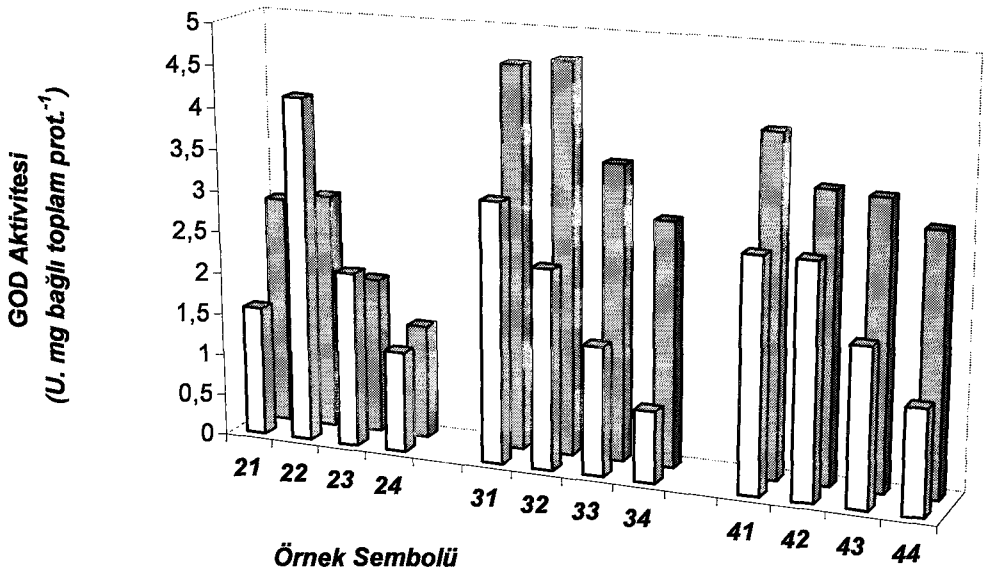
Çalışmalarımızda farklı başlangıç derişimindeki GOD ve CAT enzimlerinin birlikte veya sıralı ko-immobilize edilmeleri durumunda katalitik etkinliklerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Birlikte ve sıralı ko-immobilize edilmiş GOD-CAT'ın gram destek başına aktivitesi ve mg GOD, mg bağlı toplam protein ve mg kullanılan toplam protein miktarları başına spesifik GOD aktiviteleri sırasıyla Şekil 4.62-4.65'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



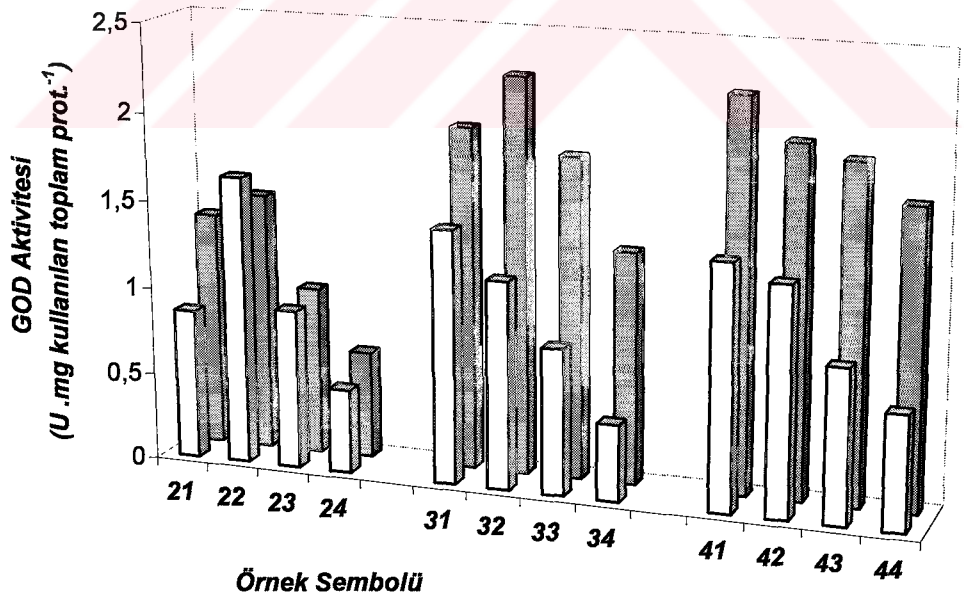
Şekil 4.62. GOD ve CAT'ın birlikte veya sıralı immobilize edilmesi ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin gram destek başına GOD aktiviteleri (□:GOD ve CAT'ın birlikte ko-immobilize edildiği örnekler ve ■: GOD ve CAT'ın sıralı ko- immobilize edildiği örnekler)



Şekil 4.63. GOD ve CAT'ın birlikte veya sıralı immobilize edilmesi ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin spesifik GOD aktiviteleri (□:GOD ve CAT'ın birlikte ko-immobilize edildiği örnekler ve ■: GOD ve CAT'ın sıralı ko- immobilize edildiği örnekler)



Şekil 4.64. GOD ve CAT'ın birlikte veya sıralı immobilize edilmesi ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin bağlı toplam protein miktarı başına GOD aktiviteleri (□:GOD ve CAT'ın birlikte ko-immobilize edildiği örnekler ve ■: GOD ve CAT'ın sıralı ko-immobilize edildiği örnekler)



Şekil 4.65. GOD ve CAT'ın birlikte veya sıralı immobilize edilmesi ile elde edilen ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin kullanılan toplam protein miktarları başına GOD aktiviteleri (□:GOD ve CAT'ın birlikte ko- immobilize edildiği ö rnekler ve ■: GOD ve CAT'ın sıralı ko- immobilize edildiği örnekler)

Şekil 4.62-4.65 incelendiğinde GOD ve CAT'ın sıralı ko-immobilize edildiği örneklerin etkinliklerinin ko-immobilizasyonun birlikte yapıldığı örneklere göre genel olarak daha yüksek olduğu görülmektedir.

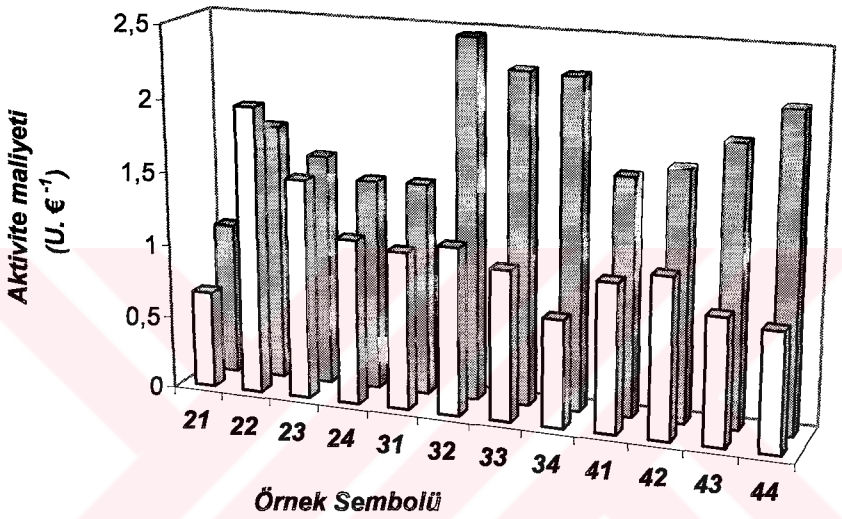
GOD ve CAT enzimlerinin birlikte ve sıralı ko-immobilize edilmeleri durumunda kullanılan enzimlerin fiyatı ve desteğin hazırlanması aşamaları dikkate alınarak maliyet hesabı yapılmıştır. Bu hesaplamalarda Sigma Firmasından sağladığımız GOD ve CAT enzimlerinin birim fiyatları (1,4 €. mg GOD^{-1} ve 0,15 €. mg CAT^{-1}) ve 1 gram desteğin ve desteğin aktifleştirilmesi için kullanılan kimyasalların maliyeti (0,61 €. g $destek^{-1}$) kullanılmıştır. Çizelge 4.7'de 1 gram ko-immobilize GOD-CAT enziminin toplam maliyeti (€. g $des.^{-1}$) ve ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin 1 €'luk maliyet başına gösterdiği GOD aktiviteleri (U. $€^{-1}$) verilmiştir.

Çizelge 4.7. Birlikte ve sıralı ko-immobilize edilmiş GOD-CAT örneklerinin birim maliyet başına gösterdiği aktivite değerlerinin karşılaştırılması

Örnek Semb.	Kullanılan enzim miktarı (mg. g $destek^{-1}$)		Kullanılan enzimlerin maliyeti	Ko-immobilize GOD-CAT'ın GOD aktivitesi (U. g $des.^{-1}$)		Ko-immobilize GOD-CAT'ın aktivite maliyeti (U. $€^{-1}$)	
	GOD	CAT	(€. g $des.^{-1}$)	B*	S*	B*	S*
20	5	-	7,61	-	4,47	-	0,60
21	5	1	7,76	5,14	8,07	0,66	1,04
22	5	5	8,36	16,45	14,76	1,97	1,76
23	5	10	9,11	13,63	14,40	1,50	1,58
24	5	20	10,61	11,98	15,27	1,13	1,44
30	10	-	14,61	-	17,33	-	1,18
31	10	1	14,76	15,89	21,44	1,08	1,45
32	10	5	15,36	17,74	37,78	1,15	2,46
33	10	10	16,11	16,66	36,5	1,03	2,26
34	10	20	17,61	13,06	39,60	0,74	2,25
40	20	-	28,61	-	39,95	-	1,4
41	20	1	28,76	29,21	46,68	1,02	1,62
42	20	5	29,36	32,40	49,56	1,10	1,70
43	20	10	30,11	26,22	57,17	0,87	1,90
44	20	20	31,61	25,96	67,56	0,82	2,14

B* :Birlikte ko-immobilize edilmiş ko-immobilize GOD-CAT
S* : Sıralı ko-immobilize edilmiş ko-immobilize GOD-CAT

Çizelge 4.7'den de görüldüğü gibi genel olarak sıralı ko-immobilize edilmiş GOD-CAT örneklerinin birlikte immobilize edilmiş karşıtlarına göre birim maliyetleri başına daha yüksek aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca GOD'nin tek başına immobilize edildiği 20, 30 ve 40 no'lu örneklerin birim maliyet başına aktivitelerinin CAT içeren ko-immobilize GOD-CAT örneklerine göre düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.66. GOD ve CAT enzimlerinin ko-immobilizasyon işlemlerinin birlikte veya sıralı yapılmasına bağlı olarak ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin birim maliyet başına gösterdikleri GOD aktivitelerinin karşılaştırılması. (□:GOD ve CAT'ın birlikte ko- immobilize edildiği örnekler ve ■: GOD ve CAT'ın sıralı ko- immobilize edildiği örnekler)

Şekil 4.66'da ko-immobilizasyonunun birlikte ve sıralı yapılmasına bağlı olarak birim maliyet başına gösterdikleri aktiviteleri karşılaştırılmış ve GOD ve CAT'ın birlikte immobilize edildiği 22 no'lu örnek dışındaki çalışmaların hepsinde de GOD ve CAT'ın sıralı immobilizasyonu ile elde edilen örneklerin birim maliyet başına gösterdikleri aktiviteleri daha yüksek çıkmıştır.

GOD aktivitesi açısından en yüksek etkinliği birlikte immobilizasyonda GOD ve CAT başlangıç derişimlerinin 0,5 mg ml^{-1} olduğu 22 no'lu örneğin, sıralı immobilizasyonda ise GOD ve CAT enzimlerinin başlangıç derişimlerinin sırasıyla 1,0 ve 0,5 mg ml^{-1} olduğu 32 no'lu örneğin göstermesi dikkate alınarak en uygun ko-

immobilizasyon yönteminin belirlenmesi için bu örneklerin GOD ve CAT içerikleri ile GOD aktiviteleri Çizelge 4.8'de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.8. GOD ve CAT'ın birlikte ve sıralı ko-immobilizasyonunda elde edilen en etkin ko-immobilize GOD-CAT örneklerinin karşılaştırılması.

Ko-immobilize GOD-CAT'ın bileşimi ve Aktiviteleri	**Birlikte ko-immobilizasyon (22 no'lu örnek)**	**Sıralı ko-immobilizasyon (32 no'lu örnek)**
GOD içeriği (mg GOD. g destek^{-1})	2,18	4,33
CAT içeriği (mg CAT. g destek^{-1})	1,78	2,89
U. g destek^{-1}	16,50	33,80
U.mg GOD^{-1}	7,50	7,80
U.mg bağlı toplam protein^{-1}	4,20	4,70
U.mg kullanılan toplam protein^{-1}	1,60	2,30
U. €$^{-1}$	1,97	2,46

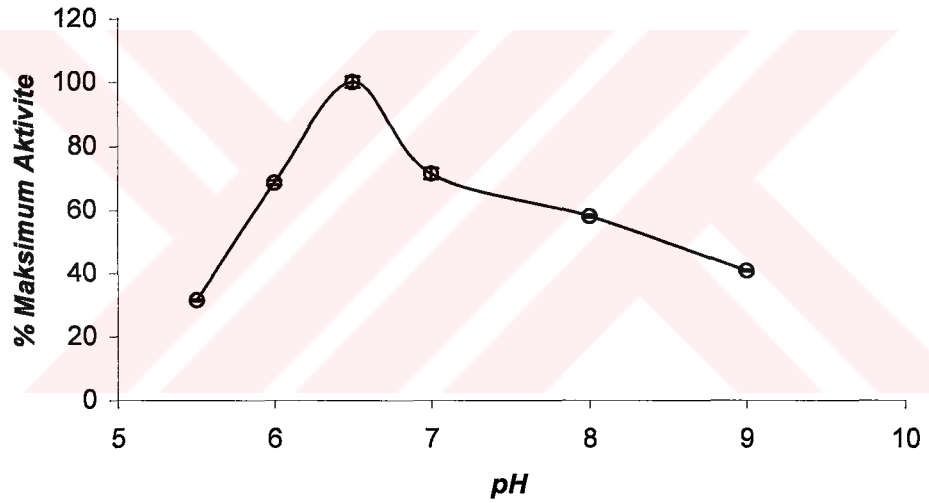
Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi sıralı ko-immobilize edilmiş GOD-CAT'ın gram destek başına GOD aktivitesi, birlikte ko-immobilize edilmiş GOD-CAT'ın GOD aktivitesinin 2 katıdır. Ancak sıralı ko-immobilizasyon yönteminde kullanılan GOD derişimi dolayısıyla gram desteğe bağlanan GOD miktarı da birlikte immobilizasyon çalışmasında gram desteğe bağlanan GOD miktarının 2 katı olduğundan her iki çalışma sonunda elde edilen ko-immobilize örneklerin etkinliklerinin birbirine eşdeğer olduğu söylenebilir. 22 ve 32 no'lu örneklerin mg GOD ve mg toplam protein miktarı başına spesifik aktiviteleri de birbirine yakın çıkmıştır. Aktivite değerlerini kullanılan toplam protein miktarına oranladığımızda sıralı ko-immobilizasyon ile elde edilen 32 no'lu örneğin birlikte ko-immobilizasyonla elde edilen 22 no'lu ko-immobilize GOD-CAT'a göre % 44 daha etkin olduğu görülmüştür. Benzer şekilde birim maliyet başına aktiviteleri karşılaştırdığımızda 32 no'lu örneğin 22 no'lu örneğe göre yaklaşık % 25 daha yüksek etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle ko-immobilize GOD-CAT'ın karakterizasyonu ve farklı reaktör sistemlere uygulanması için başlangıç derişimleri

sırasıyla 1,0 mg. ml $^{-1}$ ve 0,5 mg. ml^{-1} olan GOD ve CAT enzimleri sıralı ko-immobilize edilerek kullanılmıştır.

4.1.3.4. Ko-immobilize GOD-CAT Enzim Sisteminin Karakterizasyonu

Bu çalışmada ko-immobilize GOD-CAT enzim sisteminin karakterizasyonunda sadece GOD aktiviteleri değerlendirilmiş olup, aktiviteler DNSA yöntemi ile belirlenmiştir.

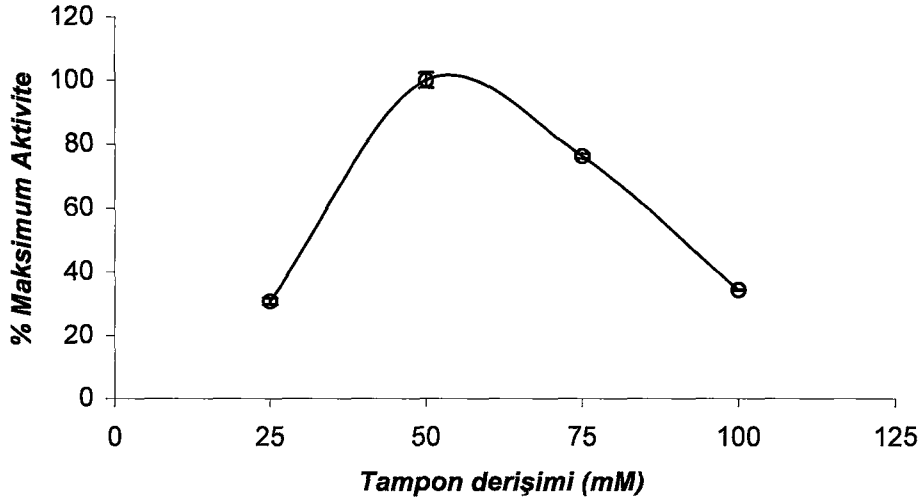
Ko-immobilize GOD-CAT'ın GOD aktivitesi farklı pH'larda (pH 5,5-9,0) hazırlanan ve derişimi 50 mM olan tampon çözeltiler kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen bulgular Şekil 4.67'de verilmiştir.



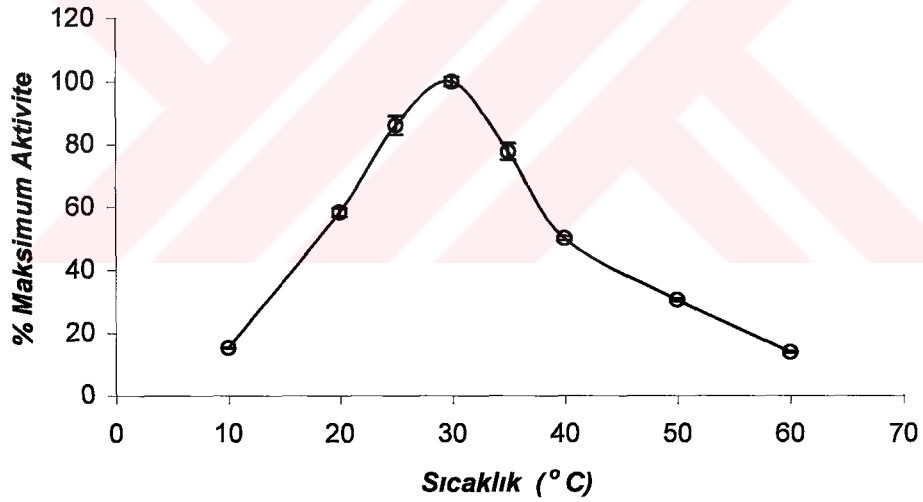
Şekil 4.67. Ko-immobilize GOD-CAT'ın GOD aktivitesinin pH'a bağlı olarak değişimi.

Şekil 4.67'den de görüldüğü gibi ko-immobilize GOD-CAT sisteminde en yüksek GOD aktivitesi pH 6,5'da gözlenmiştir.

Ko-immobilize GOD-CAT'ın GOD aktivitesi pH 6,5'da ve 25, 50, 75 ve 100 mM derişiminde tampon çözeltiler kullanılarak belirlenmiş olup en yüksek aktivite 50 mM tampon derişimi için elde edilmiştir, Şekil 4.68.



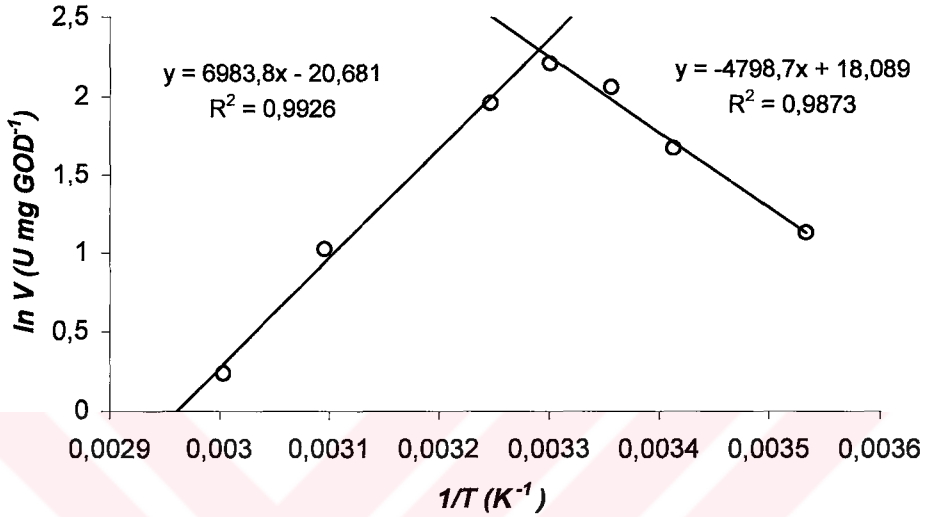
Şekil 4.68. Ko-immobilize GOD-CAT'ın GOD aktivitesinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi (pH: 6,5).



Şekil 4.69. Ko-immobilize GOD-CAT'ın GOD aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi.

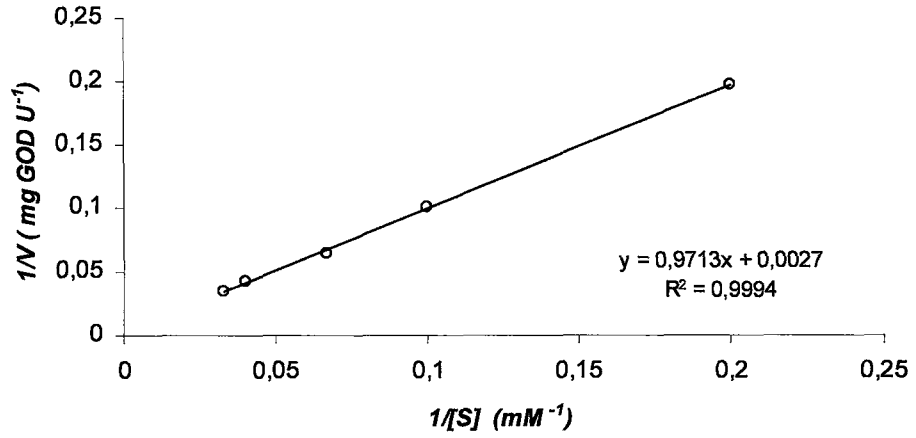
Ko-immobilize GOD-CAT'ın GOD aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişiminin verildiği Şekil 4.69 incelendiğinde en yüksek aktivite 30 °C için elde edilmiştir.

Ko-immobilize enzim sisteminde GOD enzimi için Arrhenius grafiği çizilmiş (Şekil 4.70) ve Ea değeri 39,9 kJ mol^{-1} K^{-1} olarak bulunmuş, denatüre olmaya başladığı sıcaklık ise 304 K (30,8 °C) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.70. Ko-immobilize GOD-CAT enzim sisteminde GOD enzimi için Arrhenius grafiği

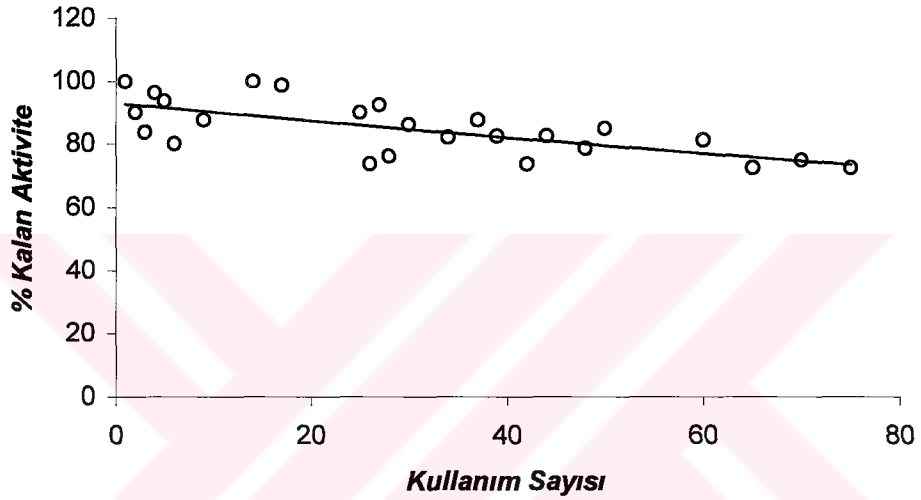
Ko-immobilize GOD-CAT'ın GOD aktivitesi farklı glukoz derişimleri için belirlenmiş ve ölçülen aktivite değerleri yardımıyla Şekil 4.71'de verilen Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir.



Şekil 4.71. Ko-immobilize GOD-CAT sisteminde GOD'nin Lineweaver-Burk grafiği

Ko-immobilize GOD-CAT sisteminde GOD enzimi için K_M, V_{max}, k_{cat} ve k_{cat}/K_M değerleri sırasıyla 359,7 mM, 370,4 μmol glukoz. dk^{-1} mg $protein^{-1}$, 990 mol glukoz. s^{-1} mol $protein^{-1}$ ve 2800 s^{-1} M^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Ko-immobilize GOD-CAT enzim sisteminde GOD enziminin tekrar kullanım kararlılığı belirlenirken Şekil 3.4'de verilmiş olan kesikli ve karıştırmalı kolon reaktör kullanılmış olup elde edilen bulgular Şekil 4.72'de gösterilmektedir.



Şekil 4.72. Ko-immobilize GOD-CAT sisteminde GOD enziminin tekrar kullanım kararlılığı

Şekil 4.72'den de görüldüğü gibi ko-immobilize enzim sisteminde GOD aktivitesi 50 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 85'ini, 75 kullanım sonrasında ise % 72,5'ini korumaktadır.

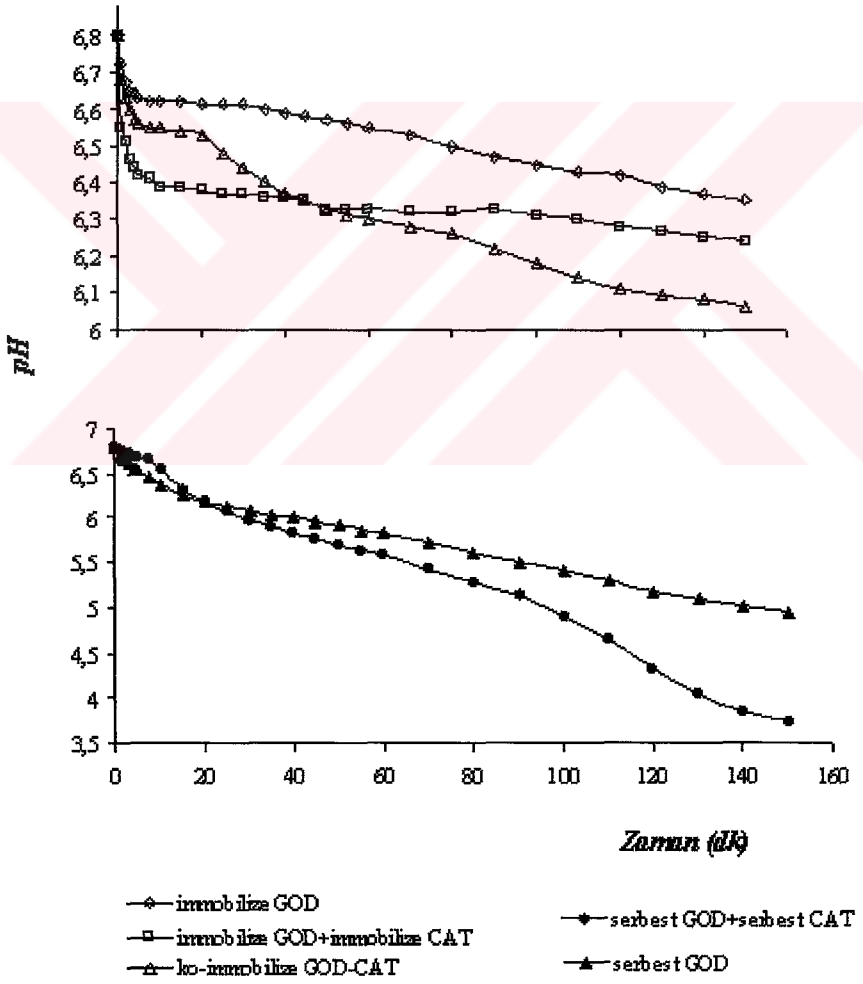
4.1.4. Serbest GOD, Serbest GOD + Serbest CAT, İmmobilize GOD, İmmobilize GOD + İmmobilize CAT ve Ko-immobilize GOD-CAT'ın Kesikli, Geri Beslemeli ve Sürekli Dolgu Yataklı Kolon Reaktörlerde Kullanımı

Bu çalışmada kesikli, geri beslemeli ve sürekli dolgu yataklı kolon reaktör olmak üzere 3 farklı reaktör sistemi denenmiştir. Her üç reaktör sisteminde de immobilize GOD, immobilize GOD + immobilize CAT karışımı ve ko-immobilize GOD-CAT olmak üzere 3 enzim sistemi kullanılmış ve zamana bağlı olarak pH ve O_2 derişimlerindeki değişimler izlenmiştir. Serbest GOD enziminin tek başına veya

serbest CAT varlığındaki etkinliği yine reaksiyon sisteminin pH ve O_2 derişimlerinin zamana bağlı olarak değişimi izlenerek belirlenmeye çalışılmış ancak serbest enzimlerin sürekli reaktörlerde kullanımı mümkün olmadığından bu çalışma sadece kesikli reaktör için yapılmıştır.

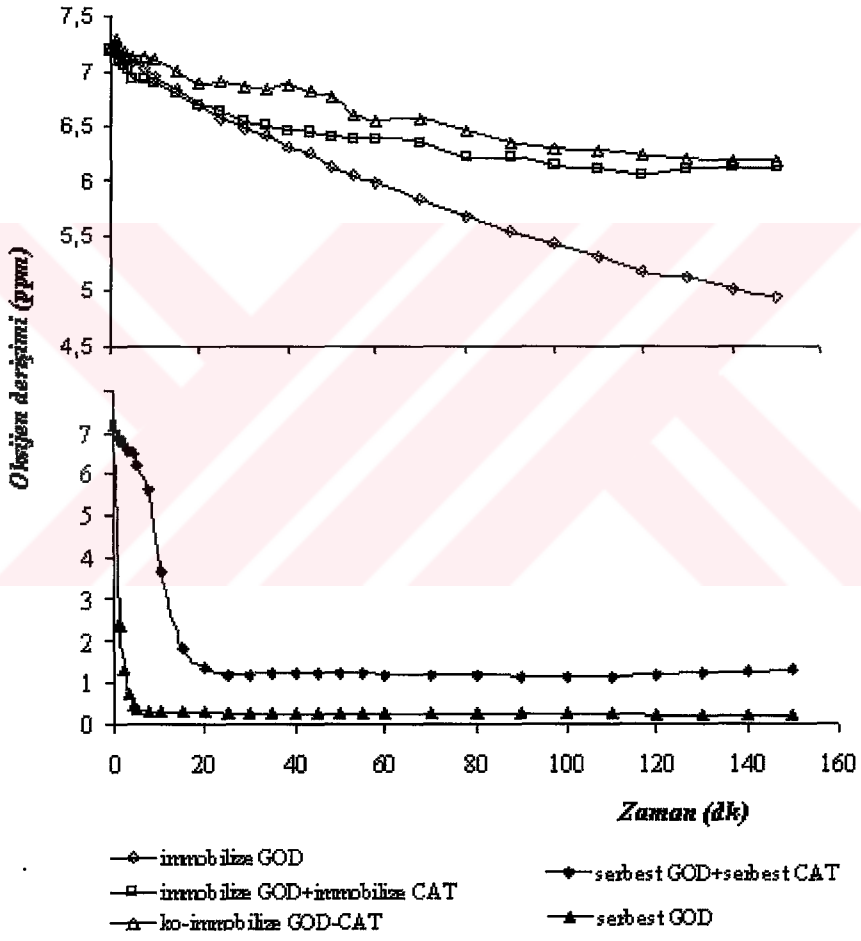
4.1.4.1. Kesikli Reaktör Kullanımı

GOD enziminin tek başına veya CAT ile beraber kullanıldığı kesikli reaktör şematik olarak Şekil 3.4'de verilmişti. Şekil 4.73'de kesikli reaktörde pH'nın zamana bağlı olarak değişimi verilmektedir.



Şekil 4.73. Serbest veya immobilize formdaki GOD'nin tek başına ya da serbest, immobilize veya ko- immobilize formdaki CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı kesikli reaktörde pH'nın zamana bağlı olarak değişimi.

Şekil 4.73'den de görüldüğü gibi aynı koşullarda yapılan çalışma sonunda pH'daki en hızlı düşüş serbest GOD + serbest CAT sisteminde gözlenmiştir. Sadece serbest GOD'nin kullanıldığı sitemde pH 6,8'den 4,94'e, serbest CAT varlığında ise pH 6,8'den 3,74'e düşmüştür. Ayrıca sadece immobilize GOD, immobilize GOD + immobilize CAT karışımı ve ko-immobilize GOD-CAT enziminin kullanıldığı durumlarda pH değerlerinin 6,8'den sırasıyla 6,35, 6,24 ve 6,06'a düştüğü görülmektedir.



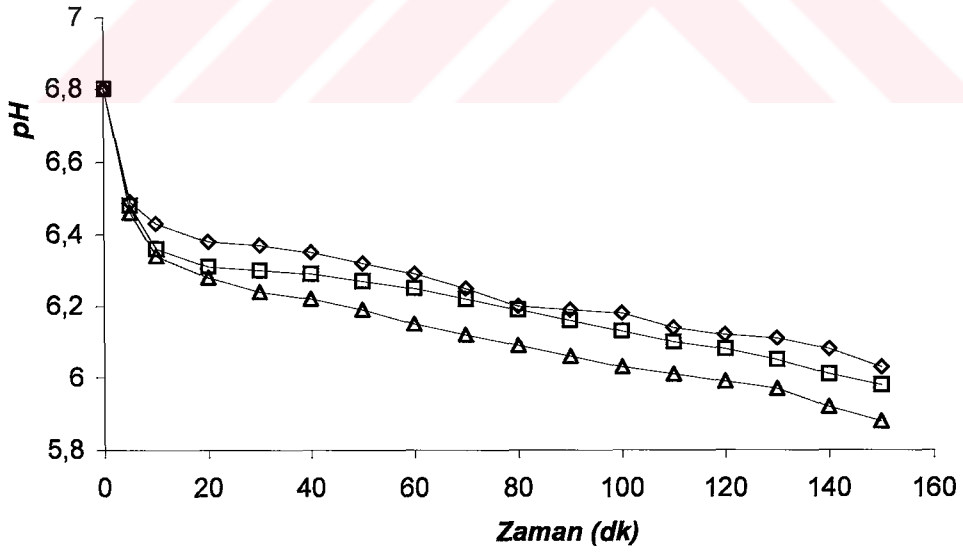
Şekil 4.74. Serbest veya immobilize formdaki GOD'nin tek başına ya da serbest, immobilize veya ko- immobilize formdaki CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı kesikli reaktörde O_2 derişiminin zamana bağlı olarak değişimi.

Şekil 4.74 kesikli reaktörde O_2 derişiminin zamana bağlı olarak değişimini vermekte olup serbest GOD'nin kullanıldığı sistemde O_2 derişiminin ilk 5 dakika içinde hızla azaldığı hatta neredeyse tamamen tükendiği görülmektedir. Reaksiyon sisteminde 5. dakikada O_2 derişimi 0,37 ppm, 150. dk sonunda ise 0,2 ppm olarak ölçülmüştür. CAT varlığında ise O_2 derişimi 25. dakikaya kadar hızla azalmış ve 150. dakikaya kadar hemen hemen sabit kalarak 1,28 ppm değerine ulaştığı saptanmıştır.

İmmobilize GOD, immobilize GOD + immobilize CAT karışımı ve ko-immobilize GOD-CAT'ın kullanılması durumunda O_2 derişimleri sırasıyla 4,94, 6,12 ve 6,18 ppm'e düşmüştür.

4.1.4.2. Geri Beslemeli Dolgu Yataklı Kolon Reaktör Kullanımı

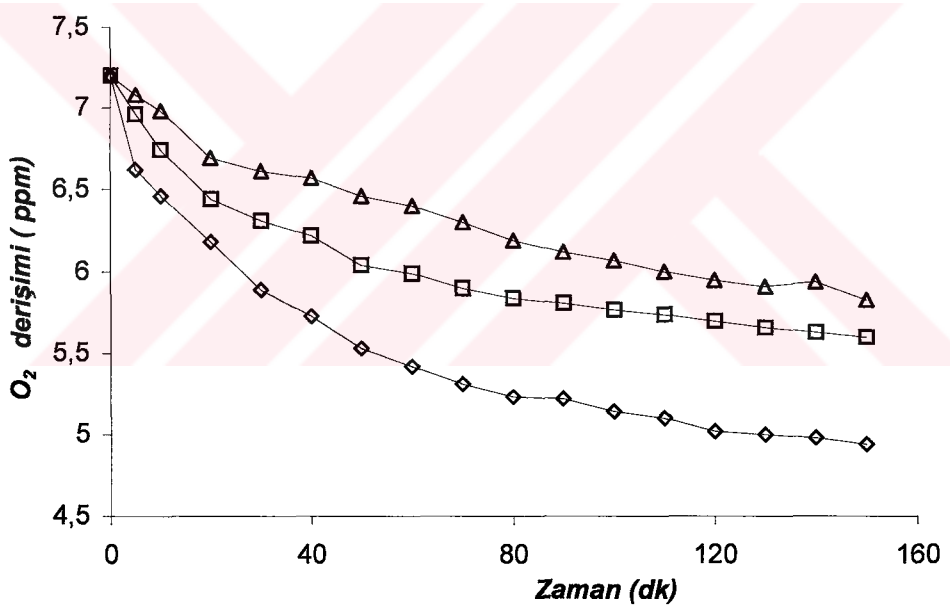
İmmobilize GOD, immobilize GOD + immobilize CAT ve ko-immobilize GOD-CAT enzim sistemlerinin geri beslemeli kolon reaktörde kullanımı sonucunda sistem pH'sı ve oksijen derişiminin zamana bağlı olarak değişimi sırasıyla Şekil 4.75 ve 4.76'da verilmiştir.



Şekil 4.75. İmmobilize GOD enziminin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı geri beslemeli dolgu yataklı kolon reaktörde pH'nın zaman bağlı olarak değişimi. (◇: immobilize GOD, □: immobilize GOD + immobilize CAT ve △: ko-immobilize GOD-CAT)

Şekil 4.75'de görüldüğü gibi geri beslemeli kolon reaktörde zamana bağlı olarak en fazla pH değişimi ko-immobilize GOD-CAT enzim sisteminde en az pH değişimi ise immobilize GOD'nin kullanıldığı sistemde gözlenmiştir. Geri beslemeli kolon reaktörde 150. dk sonunda pH değerleri immobilize GOD için 6,03, immobilize GOD + immobilize CAT karışımı için 5,98 ve ko-immobilize GOD-CAT için 5,88 olarak ölçülmüştür.

Aynı sistemde O_2 derişimindeki değişimin en çok immobilize GOD, en az ise ko-immobilize GOD-CAT enzim sisteminde olduğu görülmektedir, Şekil 4.76. Geri beslemeli kolon reaktörde 150. dk sonunda O_2 derişimi immobilize GOD için 4,94, immobilize GOD + immobilize CAT karışımı için 5,60 ve ko-immobilize GOD-CAT için 5,83 ppm olarak ölçülmüştür.

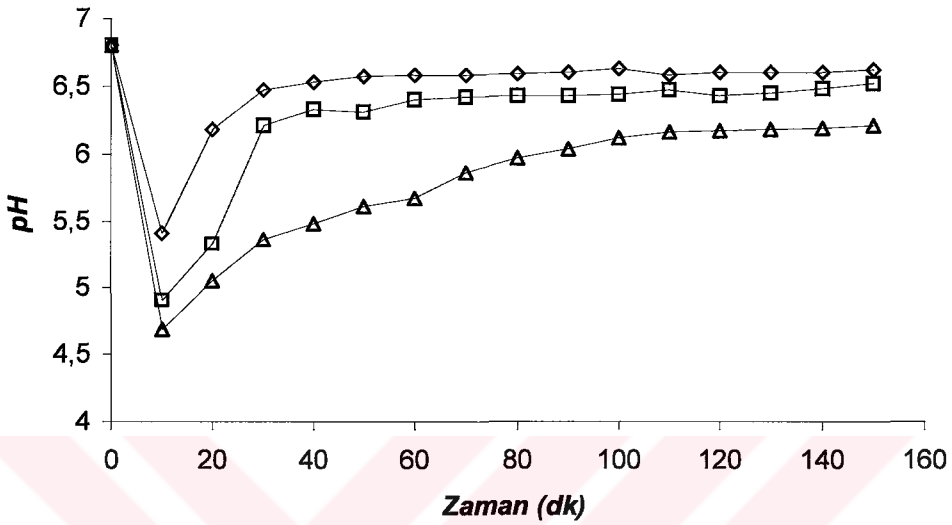


Şekil 4.76. İmmobilize GOD enziminin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı geri beslemeli dolgu yataklı kolon reaktörde O_2 derişiminin zamana bağlı olarak değişimi. (◇: immobilize GOD, □: immobilize GOD + immobilize CAT ve △: ko-immobilize GOD-CAT)

4.1.4.3. Sürekli Dolgu Yataklı Kolon Reaktör Kullanımı

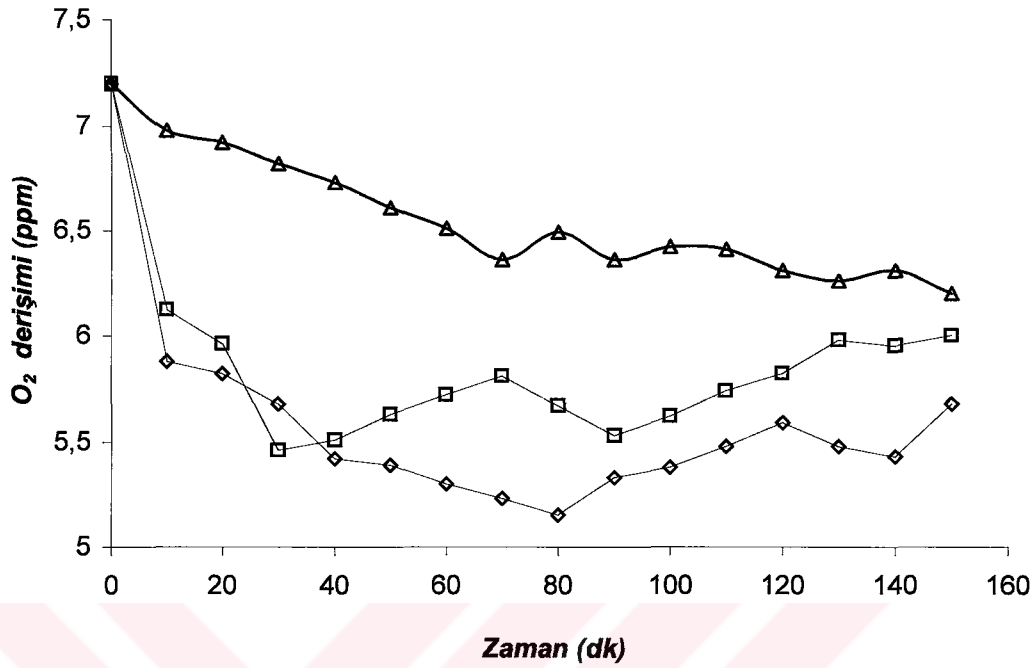
Bu çalışmada 10 dakikada bir reaktörden alınan ve hacmi 6,7 ml olan ürün çözeltisinin pH'sı ve O_2 derişimi ölçülmüştür. 10 dakika aralıklarla reaktörden alınan

çözeltilerin pH ve O_2 derişimlerinin çalışma süresine bağlı olarak değişimleri Şekil 4.77 ve 4.78'de verilmiştir.



Şekil 4.77. İmmobilize GOD enziminin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı sürekli dolgu yataklı kolon reaktörden alınan çözeltilerde pH'nın zamana bağlı olarak değişimi. (◇: immobilize GOD, □: immobilize GOD + immobilize CAT ve △: ko- immobilize GOD-CAT)

Şekil 4.77'den görüldüğü gibi immobilize GOD'nin kullanıldığı durumda ilk 10 dk boyunca reaktörden alınan ürün çözeltisinin pH'sı 5,41'e düşmüşken, sonraki toplanan ürün çözeltileri için ölçülen pH değerleri yükselmiş ve 150. dk sonunda pH 6,61 olarak ölçülmüştür. İmmobilize GOD ile immobilize CAT'ın kullanıldığı durumda ise pH önce 4,90'a düşmüş ama zamanla artarak 60. dakikada 6,4 değerine ulaşmış sonra da hemen hemen sabit kalmıştır. Aynı reaktörde ko-immobilize GOD-CAT sistemi kullanıldığında ise ilk 10 dk'da pH 4,68'e düşmüş olup sonraki zaman aralıklarında diğer enzim sistemlerine göre pH'daki artış daha yavaş olmuş, 150. dk'nın sonunda ise pH değeri 6,21'e ulaşmıştır.



Şekil 4.78. İmmobilize GOD enziminin tek başına veya CAT enzimi ile birlikte kullanıldığı sürekli dolgu yataklı kolon reaktörden alınan çözeltilerde O_2 derişiminin zamana bağlı olarak değişimi. (◇: immobilize GOD, □: immobilize GOD + immobilize CAT ve △: ko- immobilize GOD-CAT)

Şekil 4.78'de görüldüğü gibi immobilize enzimlerin O_2 derişimindeki azalmanın en fazla immobilize GOD, en az ise ko-immobilize GOD-CAT sisteminde olduğu görülmektedir.

4.2. Tartışma

4.2.1. GOD'nin Tek Başına İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu

GOD immobilizasyonun optimizasyonu için yapılan çalışmalarda başlangıç GOD derişimi sabit tutularak immobilizasyon pH'sı değiştirildiğinde birim desteğe bağlanan en yüksek GOD miktarının immobilizasyon pH'sı 4,2 olduğu zaman gerçekleştiği, ancak en yüksek aktiviteyi pH 5,4'de immobilize edilmiş olan immobilize GOD'nin gösterdiği belirlenmiştir.

GOD enziminin desteğe bağlanan miktarının GOD'nin izoelektrik noktası olan pH 4,2'de maksimum olmasının nedeni ortam pH'sının 4,2'den daha yüksek (veya düşük) olduğunda enzim molekülleri üzerindeki negatif (veya pozitif) yük miktarının artması ve aynı yükteki diğer enzim moleküllerini taşıdıkları yük miktarıyla orantılı olarak iterek desteğe yönlenmelerini engellemesi ile açıklanabilir. Desteğe bağlanan GOD miktarının en fazla olduğu pH'nın 4,2 olmasına rağmen en yüksek aktiviteyi pH 5,4'de immobilize edilmiş olan GOD göstermesi ise (Şekil 4.1) bu pH'da enzimin üç boyutlu yapısının en yüksek aktiviteyi göstermesini sağlayacak şekilde düzenlendiği ve desteğe bu en etkin formunda bağlandığı sonucu çıkmaktadır. Literatürde GOD'nin kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon pH'sının etkisinin incelendiği çalışmalara rastlanmamıştır. Sadece bir çalışmada GOD enzimi poli(metilmetakrilat) desteğe diaminohekzan ve glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş ve GOD enziminin en fazla pH 4,2'de bağlandığı ancak en yüksek aktiviteyi pH 6,0'da immobilize edilen enzimin gösterdiği bildirilmiştir (Bulmuş ve ark. 1997).

GOD'nin optimum immobilizasyon sıcaklığı belirlendiğinde, desteğe bağlanan GOD miktarı ve aktivite açısından en uygun olan immobilizasyon sıcaklığının 10 °C olduğu, sıcaklık arttıkça bağlanan enzim miktarının çok olmamakla beraber azaldığı saptanmıştır. İmmobilizasyon sıcaklığının artmasıyla beraber bağlanan enzim miktarının azalması enzim molekülleri ile ortamdaki iyonların kinetik enerjilerinin ve dolayısıyla hareketliliklerinin artmasına bağlanabilir.

Kovalent immobilizasyonda destek ile enzim çözeltisinin etkileşme süresi arttıkça bağlanan enzim miktarının artması beklenebilir. Bulgularımıza göre 150. dakikaya kadar her 3 başlangıç GOD derişimi için bağlanan enzim miktarı zamana bağlı olarak artmış, ancak immobilizasyon süresi 180 dk iken gram desteğe bağlanan enzim miktarının immobilizasyon süresinin 150 dk olduğu immobilize GOD'a göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu da bize destek ile GOD arasındaki imin bağının (Schiff bazı) bir kısmının hidroliz olarak bozulduğunu göstermektedir. Literatürde Schiff bazının kararsız olduğu, su varlığında ve özellikle pH 3,5'in altındaki pH'larda karbinolamin arabasamağı üzerinden yürüyen bir tepkime ile tekrar aldehit ve amin oluşturmak üzere imin bağının bozulduğu, ancak sodyumborhidrür veya sodumsiyanoborhidrür gibi indirgen bileşiklerle etkileştirildiğinde Schiff bazının sekonder aminlere dönüştürülerek kararlılığının arttırılabileceği bildirilmiştir (Hermanson 1992, Park 2002). Ancak bu kimyasalların kullanımı desteğe bağlı olan enzimin aktivitesinin bir kısmını kaybetmesine neden olacağından çalışmada böyle bir modifikasyon yapılamamıştır. GOD enziminin desteğe kovalent olarak bağlandığı göz önüne alınırsa immobilizasyon süresi 150 dk üzerinde olduğunda bağlanan GOD miktarında gözlenen azalmanın nedeni Schiff bazının kararsızlığına bağlanabilir.

Enzim derişiminin immobilizasyon etkinliği üzerine etkisini araştırmak için diğer immobilizasyon koşulları sabit tutulmuş ve başlangıç enzim derişimi değiştirilerek immobilizasyon yapılmıştır. Yüksek derişimde enzim çözeltisi kullanılarak yapılan immobilizasyon çalışmalarında gram destek başına bağlanan GOD miktarı yüksek olmakla beraber (Şekil 4.3) düşük derişimde enzim kullanılarak yapılan immobilizasyon işlemlerinde katalitik etkinliği daha yüksek olan immobilize GOD (Şekil 4.5) elde edilmiştir.

Sonuç olarak denenen koşullar içinde, pH 5,4'de 0,5 mg. ml^{-1} başlangıç derişiminde GOD kullanılarak 10 °C'de 2 sa süreyle yapılan immobilizasyon çalışması sonunda en yüksek etkiliğe sahip immobilize GOD elde edildiği saptanmıştır.

Serbest ve immobilize GOD enzimlerinin aktiviteleri farklı ortam pH'larında ölçülmüş ve optimum pH'ları sırasıyla 5,5 ve 6,0 olarak bulunmuştur. Optimum pH'nın immobilize enzim için daha bazik bölgeye kayması şöyle açıklanabilir:

GOD'nin glukozu glukonik aside oksidasyonu nedeniyle enzimin bulunduğu mikro çevrede hidrojen iyonu derişimi yükseleceğinden yığın çözeltiye göre mikro çevrenin pH'sı daha düşük olur. Hidrojen iyonu derişimindeki bu artış ancak yığın çözeltinin bazik olması ile dengelenebilir. İmmobilize GOD'nin optimum pH'sının serbest enzime göre sadece 0,5 pH birim alkali bölgeye kayması desteğin bazik karakterde olması ve açığa çıkan hidrojen iyonlarının bir kısmını nötralleştirebilmesi ile açıklanabilir. Destek bazik değil de nötral özellikte olsaydı immobilize enzim için optimum pH'nın daha da alkali bölgeye kayması beklenebilirdi.

Literatürde serbest GOD'nin optimum pH'sı 5,5-6,0 aralığında bildirilmiş olup bizim belirlediğimiz değer de bu verileri doğrulamaktadır. Ancak farklı desteklere değişik yöntemlerle immobilize edilmiş olan GOD enzimi için 4,0-8,0 aralığında değişen farklı optimum pH değerleri rapor edilmiştir (Bulmuş 1997, Li 1998, Godjevargova 2000, Portaccio 2002, Ying 2002, Vasileva 2004, Arıca 2004). Optimum pH'daki bu kaymaların büyüklüğü ve yönü enzimin immobilize edildiği desteğin özelliklerine, desteğin aktifleştirilmesi için kullanılan metoda ve immobilizasyon yöntemine bağlı olarak değişmektedir.

Enzimatik reaksiyonlarda reaksiyon ortamında bulunan iyonlar enzim stabilizasyonunun sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Düşük iyon derişimine sahip tampon çözeltiler enzim stabilizasyonunu sağlamada yetersiz kalırken yüksek tampon derişimi de enzimle substrat etkileşimini azaltacağı için aktivitenin düşmesine neden olabilmektedir. Ancak diğer enzimlerden farklı olarak GOD enziminin aktivitesi tampon derişiminden sadece bu nedenle etkilenmemekte, reaksiyon ürününün glukonik asit olması nedeniyle tampon çözeltilerin tamponlama kapasitesi daha da önem kazanmaktadır. Bulgularımız serbest GOD aktivitesinin tampon derişiminden oldukça fazla etkilendiğini, immobilize GOD aktivitesinin ise tampon derişiminden fazla etkilenmediğini göstermektedir. Serbest GOD enziminin katalitik etkinliği immobilize GOD'den daha yüksek olduğundan reaksiyon ortamında açığa çıkacak glukonik asit, dolayısıyla H^+ iyonu derişimi daha yüksek olacaktır. Bu durumda reaksiyon ortamındaki tampon çözeltinin dengelemesi gereken H^+ miktarı yüksek olacaktır. Özellikle 25 mM derişimindeki tampon çözeltinin tamponlama kapasitesi çok düşük olacağından reaksiyon ortamında

pH'nın hızlı bir şekilde düştüğü ve enzimin denatüre olarak aktivitesinin büyük bir kısmını kaybettiğini söyleyebiliriz (Şekil.4.8). Serbest enzimin en yüksek aktivite gösterdiği tampon derişimi 100 mM olarak belirlenmiştir. Daha yüksek tampon derişimlerinde ise serbest GOD aktivitesinin düşmesini, tampon çözeltisindeki iyonların enzim ile substrat etkileşimini azaltmasına bağlayabiliriz. İmmobilize GOD enzimi en yüksek aktiviteyi 50 mM tampon çözelti için göstermiştir. Bunun nedeni immobilize GOD sisteminde daha az H^+ iyonu oluşacağı için tamponlama kapasitesi daha düşük olan bir tampon çözeltinin ortam pH'sını dengelemesine bağlayabiliriz.

Şekil 4.9'dan da görüldüğü gibi immobilizasyon işleminin GOD'nin % maksimum aktivite-sıcaklık profilini değiştirmediği ancak immobilize enzimin Ea değerinde serbest enzimin Ea değerine göre % 36,8 oranında bir artış olduğu saptanmıştır.

İmmobilize GOD enziminin V_{max} değeri serbest enzimin V_{max} değerinin % 50'si kadardır ve K_M değeri de 3,8 kat artmıştır. İmmobilize GOD'nin daha düşük aktivite göstermesi diffüzyon problemleri, kovalent bağlı enzimin hareketliliğinin kısıtlanmış olması, GOD'nin reaksiyon sırasında açığa çıkan H_2O_2 tarafından inaktivasyonu gibi nedenlere bağlanarak açıklanabilir. Literatürde farklı desteklere farklı yöntemler kullanılarak immobilize edilen GOD enzimi için genellikle V_{max} değerinde azalma, K_M değerinde ise artma olduğu rapor edilmiştir (Arıca 2004, Ying 2002, Blandino 2001, Li 1998 ve Bulmuş 1997).

Bulgularımız immobilize GOD'nin hem 4 °C'de hem de oda koşullarında (~25 °C) serbest GOD'a göre daha yüksek depolama kararlılığına sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.16). Depolama kararlılıklarının serbest enzimlere göre daha yüksek olması immobilize enzimlerin en büyük avantajlarından biridir. Literatürde farklı desteklere, çeşitli yöntemlerle immobilize edilmiş GOD'nin depolama kararlılığının arttığını bildiren sonuçlar verilmiştir. Polietilenimin ile aşı ko-polimerizasyonuyla elde edilmiş poli(hidroksietil metakrilat-ko-glisidil metakrilat) membrana GOD'ı adsorpsiyon yöntemiyle immobilize eden Arıca ve ark. (2004) serbest ve immobilize enzimleri 4 °C'de 3 ay süreyle kuru olarak veya tampon içerisinde depolamışlar ve kuru preparatın 3 ay sonunda başlangıç aktivitesinin sadece % 7'sini, tampon içerisindeki immobilize GOD'nin ise başlangıç aktivitesinin

% 34'ünü gösterdiğini, serbest enzimin ise 3. hafta sonunda aktivitesinin tamamını kaybettiğini bildirmişlerdir. Vasileva ve ark. (2004), serbest ve poliamid-6 mikrofiltrasyon membranına kovalent olarak immobilize ettikleri GOD enziminin 4 °C'deki depolama kararlılıklarını 60 gün süreyle izlemişler ve bu süre sonunda immobilize enzimin aktivitesini hemen hemen hiç kaybetmediğini, serbest enzimin ise başlangıç aktivitesinin % 92'sini koruduğunu rapor etmişlerdir. Akrilik asit ile modifiye ettikleri poli (vinil florür) desteğe GOD'ı kovalent olarak immobilize eden Ying ve ark. (2002) pH 7,4 fosfat tamponunda 4 °C'de ve karanlık bir ortamda serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılığını incelediklerinde immobilize enzimin aktivitesini daha yavaş kaybettiğini belirlemişler, 2 ay depolama süresi sonunda serbest ve immobilize GOD'nin başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 35 ve % 55'ini koruduğunu bildirmişlerdir. Li ve ark. (1998) akrilik asit ile aşı ko-polimerizasyon yöntemiyle elde ettikleri ettikleri polianilin üzerine GOD'ı kovalent olarak immobilize etmişler ve 4 °C'de depolandığında 2 ay sonunda başlangıç aktivitesinin % 65'ini koruduğunu, buna karşın serbest enzimin bu koşullarda başlangıç aktivitesinin % 40'ını koruduğunu belirlemişlerdir.

Literatürde GOD veya herhangi bir enzimin immobilize formunun farklı bağıl nem ortamlarındaki depolama kararlılıklarını bildiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmalarda deneysel bulgularımız immobilize GOD'nin depolanması için en uygun ortamın % 60 bağıl nem içeren ortam olduğunu göstermektedir.

İmmobilize GOD enziminin 50 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 40'ını koruduğu belirlenmiştir. İmmobilize GOD'nin başlangıç aktivitesinin büyük bir kısmını kaybetmesinin en önemli nedeni literatürdeki gibi reaksiyon sırasında açığa çıkan H_2O_2'in enzimi inaktif hale getirmesi ile açıklanabilir (Kleppe 1966, Prenosil 1979, Malikkides 1982). İmmobilizasyonda destek olarak kullanılan florisilin gözenekli yapıda olması nedeniyle H_2O_2'in yığın çözeltiye diffüzleninceye kadar gözeneklerde bulunan GOD'ı deaktive etmektedir.

Polietilenimin ile aşılanmış poli(hidroksietil metakrilat-ko-glisidil metakrilat) membrana GOD'ı adsorpsiyon yöntemiyle immobilize eden Arıca ve ark. (2004) immobilize GOD'nin tekrar kullanım kararlılığını belirlemek amacıyla sürekli bir reaktör sistemi kullanmışlar ve 40 saat boyunca immobilize enzimin etkinliğini

izlemişlerdir. Çalışma sonunda 16 saat boyunca enzimin aktivitesinin tamamını koruduğunu, 40 saat sonunda ise başlangıç aktivitesinin % 23'ünü kaybettiğini bildirmişlerdir.

4.2.2. CAT'ın Tek Başına İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu

CAT enziminin immobilizasyonuna pH'nın etkisi incelendiğinde en fazla bağlanmanın CAT'ın izoelektrik noktası olan pH 5,4'de gerçekleştiği ancak en yüksek aktiviteyi pH 6,0'da immobilize edilmiş olan enzimin gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum GOD'nin tek başına immobilizasyonunda açıklandığı gibi CAT'ın izoelektrik noktasınını üzerindeki (veya altındaki) pH'larda negatif (veya pozitif) yüklü olmasına ve desteğe bağlı olan yüklü CAT moleküllerinin aynı yükteki diğer CAT moleküllerini iterek desteğe yönlenmelerini engellemelerine bağlayabiliriz.

Farklı sıcaklıklarda immobilize edilmiş CAT örneklerinin aktivitelerini veren Şekil 4.22 incelendiğinde 20 °C'nin üzerinde immobilize edilen örneklerin aktivitelerinin immobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak hızla azalması immobilizasyon sırasında enzimin artan sıcaklığa bağlı olarak denatüre olması ve/veya etkin bağlanmaların azalması ile açıklanabilir.

CAT immobilizasyonunda 60-180 dk aralığında, immobilizasyon süresi arttırıldıkça gram desteğe bağlanan CAT miktarı artmıştır. GOD immobilizasyonunda ise 150. dakidan sonra gram desteğe bağlanan GOD miktarı azalmaktaydı. Bu farklılığın nedeni her iki enzimin de desteğe bağlanmasını sağlayan lizin aminoasit artıklarının sayısındaki fark olabilir. CAT enziminde 108 adet lizin amino asit artığı bulunmaktayken, GOD enzimindeki lizin amino asit artığının sayısı 16'dır [7]. Bu durumda CAT enziminin desteğe bağlanma olasılığının daha yüksek olduğu, CAT enziminin desteğe birden fazla noktadan bağlanabileceği ve bu nedenle destek ile CAT arasında daha kararlı bir etkileşim bulunduğu söylenebilir. Bu çalışmada GOD ve CAT enzimlerinin tek başlarına immobilizasyonlarında aynı başlangıç derişimleri için genel olarak birim desteğe bağlanan CAT miktarının GOD'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum yine CAT enziminde bulunan lizin amino asit artığının GOD'a göre yaklaşık 7 kat daha fazla olması ile

açıklanabilir. Ancak Podual ve ark. (2000) GOD ve CAT enzimlerini DEAE-g-EG ile kopolimerizasyon yöntemiyle immobilize ettiklerinde GOD'nin daha yüksek oranda bağlandığını bildirmişler ve bu durumu GOD'nin CAT'a göre daha küçük bir molekül olması ile açıklamışlardır.

Serbest ve immobilize CAT enzimlerinin pH'a bağlı olarak aktivitelerinin değişimi incelendiğinde en yüksek aktiviteyi sırasıyla pH 7,5 ve 6,5'da gösterdikleri saptanmıştır. İmmobilizasyonda kullanılan destek daha önce de belirtildiği gibi bazik özelliktedir. Bu nedenle immobilize enzimin mikro çevresindeki hidrojen iyonlarının bir kısmı destek tarafından nötralleştirileceği için o bölge yığın çözeltide ölçülen pH'ya göre daha bazik olacaktır. Bu nedenle enzimin bulunduğu mikro çevrede pH'nın optimum değere ulaşması için yığın çözeltinin asitliği biraz arttırılmalıdır. Elde ettiğimiz bulgulara göre yığın çözeltinin pH'sının 6,5 olduğu durumda enzimin mikro çevresinde pH'nın 7,5 olduğunu söyleyebiliriz. Literatürde sığır karaciğeri kaynaklı serbest CAT'ın optimum pH'sı 7,0-7,5 olarak bildirilmiştir. Ancak farklı desteklere değişik yöntemlerle immobilize edilmiş CAT enzimleri için optimum pH'nın 6,0-7,5 aralığında gözlendiği rapor edilmiştir (Tükel 2004, Hidalgo 2003, Godjevargova 2003, Akgöl 2001, Çetinus 2000, Arıca 1997).

İmmobilize CAT'ın katalitik etkinliğinin serbest enzime göre oldukça düşük bulunmasının iki temel nedeni olabilir. Bunlardan birisi florisilin gözenekli olması diğeri de CAT'ın desteğe birden fazla lizin amino asit artığından bağlanma olasılığıdır. H_2O_2'in CAT ile parçalanması sonucu desteğin gözenekli bölgelerinde oluşan O_2 desteğe kovalent bağlı CAT'ın sıvı fazdaki H_2O_2 ile etkileşimini engellemekte ve dolayısıyla gözlenen K_M değeri artmaktadır. CAT enziminin desteğe birkaç bölgesinden bağlanması ise enzimin esnekliğini kaybetmesine ve H_2O_2 ile daha zor etkileşmesine neden olabilir. Tukel ve Alptekin (2004) glutaraldehit ile aktifleştirdikleri florisile başlangıç derişimi 3,33 mg. ml^{-1} olan CAT enzimini oda sıcaklığında 2 sa süreyle kovalent olarak immobilize etmiş ve elde ettikleri immobilize CAT'ın V_{max} değerinin serbest enzimin V_{max} değerinin % 1'i kadar olduğunu rapor etmişlerdir. İmmobilizasyon koşullarımızdaki farklılıklardan dolayı bizim çalışmamızda bu oran % 12 olarak bulunmuştur. CAT enzimi ile yapılan diğer çalışmalarda da immobilize enzimin K_M değerinin arttığı ve V_{max} değerinin azaldığı

rapor edilmiştir (Eberhardt 2004, Kubal 2004, Akgöl 2001, Çetinus 2000, Arıca 1997).

İmmobilize CAT enziminin 4 °C'deki ve oda koşullarındaki depolama kararlılığının serbest enzimden yüksek olduğu bulunmuştur. Akgöl ve Denizli (2004), *N*-metakriloil-(L)-histidin metil ester desteğe metal-şelat ilgi yöntemiyle CAT'ı adsorbe etmişler ve serbest enzimle beraber 4 °C'de depolama kararlılıklarını incelemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonunda serbest enzimin 18 gün içinde aktivitesinin tamamını, immobilize enzimin ise 50 gün içinde aktivitesinin yaklaşık % 70'ini kaybettiğini bildirmişlerdir. Tükel ve Alptekin (2004) CAT enzimini glutaraldehit ve 3-aminopropiyonik asit arakolu üzerinden immobilize etmişler ve 5 °C ve oda koşullarındaki yarılanma ömürlerini sırasıyla serbest CAT için 4 ve 2 gün, glutaraldehit üzerinden immobilize ettikleri CAT için 85 ve 55 gün ve arakol üzerinden immobilize ettikleri CAT için 107 ve 10 gün olarak belirlemişlerdir.

Bu çalışmada, immobilize CAT enziminin en yüksek kararlılığı % 20 bağıl nem içeren ortamda gösterdiği bulunmuştur. Bu değer immobilize GOD için % 60 bağıl nem olarak bulunmuş olduğundan immobilize GOD veya CAT'ın bünyesindeki su moleküllerinin bu enzimlerin stabilizasyonları için önemli olduklarını göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada 19 kullanım sonrasında immobilize CAT'ın başlangıç aktivitesinin % 50'sini, 50 kullanım sonrasında ise başlangıç aktivitesinin % 36'sını göstermeye devam ettiği belirlenmiştir. Akgöl ve ark (2001), L-histidin ile aşı ko-polimerizasyonu yöntemiyle elde edilmiş poli hidroksietilmetakrilat esaslı zara CAT enzimini adsorpsiyon yöntemi ile immobilize ederek kesikli reaktörde tekrar kullanım kararlılığını ölçmüşlerdir. İmmobilize CAT'ı kesikli reaktörde 60 dakikalık döngü boyunca kullanmışlar ve 10 döngü sonunda enzimin başlangıç aktivitesinin % 58'ini, 16. döngü sonunda ise % 36'sını koruduğunu bildirmişlerdir.

Çetinus ve Öztop (2000), CAT'ı kitozan filme glutaraldehit üzerinden immobilize etmişler ve sürekli bir reaktörde 40 dk boyunca kullandıklarında aktivitenin % 50'sinin azaldığını bildirmişlerdir.

Tükel ve Alptekin (2004) CAT enzimini florisil desteğe glutaraldehit üzerinden kovalent bağla immobilize etmişler ve 20 kullanım sonrasında başlangıç

aktivitesinin % 90'nını, 199 kullanım sonrasında ise başlangıç aktivitesinin % 10'unu koruduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada CAT florisile 3-aminopropiyonik arakolu üzerinden de immobilize edilmiş ve bu enzimin 20 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 30'unu gösterdiği bildirilmiştir.

4.3. GOD ve CAT'ın Ko-immobilizasyonu

Ko-immobilizasyon çalışmalarında en önemli kısıtlayıcı faktörlerden biri immobilizasyon koşullarının ko-immobilize edilecek enzimlerin her ikisi için de uygunluk göstermemesidir. Literatürde farklı desteklere her iki enzimin de birlikte ko-immobilize edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin GOD ve CAT enzimini Tarhan ve Telefoncu (1992) glutaraldehit ile aktifleştirdekleri perlite pH 7,0'de ve 4 °C'de gece boyunca, Godjevargova ve ark. (2004) poliakrilonitril membrana pH 5,8'de 4 °C'de 24 sa süreyle, Ramanathan ve ark. (2001) pH 7,4'de oda sıcaklığında ve 24 sa süreyle, Vrbova ve ark. (1990) GOD ve CAT enzimlerini polinaylon ağ üzerine 4 °C'de 2-8 gün immobilizasyon süresi uygulayarak, Podual ve ark. (2000) poli (DEAE-g-etilen glikol) jeline pH 7,4'de 4 °C'de 1 sa boyunca ko-immobilize etmişlerdir. Bu literatürlerde çalışma koşullarının nasıl belirlendiği konusunda bir bilgiye rastlanılmamıştır. Yaptığımız çalışmada GOD ve CAT'ın tek başlarına immobilizasyonları için belirlenen en uygun immobilizasyon koşulları kıyaslandığında ve optimum immobilizasyon pH'ları dışındaki immobilizasyon şartlarının aynı olduğu görülmüştür. Bu nedenle her iki enzimin ko-immobilizasyonu için uygun olabilecek immobilizasyon pH'sı belirlenirken Şekil 4.41'den yararlanılmış ve ko-immobilizasyon pH'sı 5,7 olarak seçilip diğer immobilizasyon koşulları değiştirilmemiştir.

Bu çalışmada GOD ve CAT enzimlerinin ko-immobilizasyonu birlikte ve sıralı ko-immobilizasyon olmak üzere iki farklı şekilde yapılmıştır. Literatürde GOD ve CAT'ın birlikte ko-immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar bulunmakla beraber GOD ve CAT'ın sıralı ko-immobilizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Literatürde GOD-CAT'ın ko-immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar incelendiğinde ko-immobilizasyon için ya tek bir GOD-CAT derişimi oranı (Podual

2000, Ramanathan 2001, Vrbova 1990, Vrbova 1993, Blandino 2002) ya da farklı GOD-CAT derişim oranı seçilerek GOD ve CAT'ın birlikte ko-immobilize edildiği görülmüştür (Traitel 2000, Tarhan 1989, Tarhan 1992, Godjevargova 2003). Bu çalışmalarda birim desteğe enzimlerin hangi miktarda bağlandığına dair bir bilgiye rastlanılmamıştır. Sadece Podual ve ark. (2000) immobilizasyon sonunda elde ettikleri protein süzüntülerinin 280 ve 450 nm'deki absorbanslarını toplam protein miktarı ve GOD bileşimini belirlemek amacıyla ölçmüş ve enzimlerin bağlanma oranını GOD için 0,83 ve CAT için 0,70 olarak belirlediklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, birlikte ko-immobilizasyon deneylerinde değişik oranlarda GOD ve CAT içeren 12 farklı ko-immobilizasyon çalışması yapılmıştır. Ko-immobilizasyon sonucunda desteğin birim miktarına enzimlerin hangi oranda bağlandığının belirlenmesi için immobilizasyon sonunda elde edilen protein süzüntülerinin 280 ve 405 nm'deki absorbanslarından yararlanılmıştır. 280 nm'de tüm proteinlerin absorbans vermesi, 405 nm'de ise CAT'ın hem grubundan kaynaklanan soret bandının bulunması nedeniyle bu dalga boyları seçilmiştir.

Bulgularımıza göre GOD ve CAT enzimlerinin birlikte veya sıralı ko-immobilize edilmiş olmaları birim destek başına bağlanmış olan toplam protein miktarlarını değiştirmemektedir. GOD ve CAT enzimlerinin sıralı immobilize edildiği denemelerde, gram desteğe bağlı GOD miktarları farklı olan örneklere aynı başlangıç derişiminde CAT enzimi ko-immobilize edildiğinde bağlanan CAT miktarlarının birbirine yakın olduğu bulunmuştur. Bu durum florisil desteğin birim miktarı başına yüzey alanının dolayısıyla enzim bağlama kapasitesinin yüksek olması ile açıklanabilir. Florisil desteğin 1 gramına 100 mg CAT proteinin kovalent olarak bağlanabiliyor olması bu görüşü desteklemektedir (Tükel, 2004)

GOD ve CAT'ın ko-immobilizasyonunda amaç GOD'nin inaktivasyonunun engellenmesi ve GOD'dan maksimum etkinlik sağlanması olduğundan ko-immobilize enzimler GOD aktiviteleri esas alınarak karşılaştırılmıştır. GOD ve CAT enzimlerinin birlikte ko-immobilize edilmeleri durumunda en yüksek etkinliği başlangıç derişimleri 0,5 mg. ml^{-1} olan GOD ve CAT'ın kullanımı ile elde edilen ko-immobilize enzimin gösterdiği saptanmıştır. GOD ve CAT'ın sıralı ko-immobilize edilmeleri durumunda ise 1,0 $mg.ml^{-1}$ başlangıç derişiminde GOD ve 0,5 $mg.ml^{-1}$

başlangıç derişiminde CAT kullanılarak elde edilen ko-immobilize GOD-CAT'ın en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir.

Farklı başlangıç derişimindeki GOD ve CAT enzimlerinin sıralı immobilize edilmeleri durumunda elde edilen ko-immobilize enzimlerin katalitik etkinliklerinin birlikte ko-immobilize edilmiş örneklere göre daha yüksek olmasının nedeni, birlikte ko-immobilizasyonda enzimlerin desteğe gelişigüzel bağlanması, sıralı ko-immobilizasyonda ise önce GOD'nin desteğe homojen olarak bağlanması ve sonrasında CAT enziminin GOD molekülleri arasına yine homojen olarak dağılmış olmasıyla açıklanabilir.

Birlikte ko-immobilizasyonda, bağlı protein miktarı başına en yüksek aktiviteyi 22 no'lu ko-immobilize GOD-CAT gösterirken ko-immobilizasyonun sıralı yapıldığı çalışmalarda birim maliyet başına en yüksek aktivite 32 no'lu örneğe aittir. Çalışmalarımızda sıralı ko-immobilize edilmiş GOD-CAT örneklerinin birlikte immobilize edilmiş karşıtlarına göre birim maliyetleri başına daha yüksek aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Çizelge 4.8). CAT'ın birim fiyatı GOD'nin birim fiyatının yaklaşık % 10'u kadar olduğundan, CAT enziminin kullanılan miktarı çok olsa da ko-immobilize enzimlerin birim maliyetini daha çok GOD enzimi belirlemektedir. Yapılan tüm ko-immobilizasyon işlemlerinde kullanılan toplam protein miktarı ve birim maliyet başına en yüksek aktiviteyi ko-immobilizasyonun sıralı yapıldığı ve GOD ve CAT başlangıç derişimlerinin sırasıyla 1,0 ve 0,5 mg. ml^{-1} olduğu 32 no'lu örnek göstermiştir.

Ko-immobilize GOD-CAT sistemi karakterize edildiğinde tek başına immobilize edilmiş GOD'dan daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.9. Serbest, immobilize ve ko-immobilize GOD-CAT enzim sistemlerinin karşılaştırılması

Belirlenen Parametreler	Serbest GOD	İmmobilize GOD	Ko-immobilize GOD-CAT
Optimum pH	5,5	6,0	6,5
Optimum Tampon Derişimi (mM)	100	50	50
Optimum Sıcaklık (°C)	35	35	30
Aktivasyon Enerjisi (kJ $mol^{-1}K^{-1}$)	32,8	44,8	39,9
Denatürasyonun Başladığı Sıcaklık (°C)	31,0	37,7	30,8
K_M (mM)	68,2	258,9	359,7
V_{MAX} (U mg GOD^{-1})	434,8	217,4	374,4
k_{CAT} (mol glukoz mol $GOD^{-1}s^{-1}$)	$1,2 \times 10^3$	$0,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
k_{CAT}/K_M (s^{-1})	$1,7 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$

Serbest GOD, immobilize GOD ve ko-immobilize GOD-CAT sistemleri kıyaslandığında (Çizelge 4.9) ko-immobilize GOD-CAT sisteminin V_{MAX} ve k_{cat}/K_M değerleri tek başına immobilize edilmiş GOD'nin sisteminin V_{MAX} ve k_{cat}/K_M değerlerine göre sırasıyla % 72 ve % 27 oranında daha yüksek, Ea değeri ise % 11 oranında daha düşük bulunmuştur.

Bu veriler CAT ile beraber ko-immobilize edilen GOD'nin etkinliğinin arttığını göstermektedir. Ancak ko-immobilize GOD-CAT'ın K_M değerinin tek başına immobilize edilmiş formuna göre % 39 daha yüksek çıkmış olması desteğe bağlı CAT enziminin diffüzyon ve/veya sterik engellemeler nedeniyle glukoz ile GOD arasındaki etkileşimi azaltmasına bağlanılabilir. Godjevargova ve ark. (2003) kimyasal olarak modifiye ettikleri akrilonitril kopolimerine GOD enzimini tek başına ve CAT enzimi ile birlikte immobilize etmişler ve serbest, immobilize GOD ve ko-immobilize GOD-CAT için V_{max} değerlerini sırasıyla 149,1, 29,65 ve 85,11 U. mg^{-1}; K_M değerlerini ise sırasıyla 31, 160 ve 306 mM olarak bildirmişlerdir. Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi immobilize GOD ile karşılaştırıldığında, ko-immobilize GOD-CAT'ın hem V_{max}, hem de K_M değerleri artmış olup bizim bulgularımızla benzerlik göstermektedir.

Ko-immobilize GOD-CAT'ın katalitik etkinliğinin tek başına immobilize formdaki GOD'nin katalitik etkinliğinden daha yüksek çıkmasının yanında tekrar kullanım kararlılığının önemli ölçüde artmış olması (Şekil 4. 20 ve Şekil 4.72) ko-immobilize GOD-CAT sisteminin en büyük avantajlardan biri olmuştur. Ko-immobilize GOD-CAT'ın V_{max} değerinin serbest GOD'nin V_{max} değerinin % 86'sı kadar olduğu ve 50 ve 75 kez tekrar kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 85 ve % 72,5'ini koruyor olması göz önüne alındığında ko-immobilize GOD-CAT'ın kullanımının serbest GOD'a göre çok daha ekonomik olduğu görülmektedir. Örneğin, ko-immobilize GOD-CAT sisteminin 75 kullanım boyunca başlangıç aktivitesinin ortalama % 80'ini gösterdiği kabul edilip serbest GOD'nin V_{max} değerinin % 86'sına sahip olduğu göz önüne alınarak kabaca bir hesap ile ko-immobilize GOD-CAT'ın aynı miktardaki serbest GOD'a göre 52 kez daha aynı etkinlikle kullanılabileceği söylenebilir. Böylece CAT enziminin birim fiyatı GOD'nin birim fiyatının % 10 olduğuna göre, pahalı olan GOD'nin kendisinden daha ucuz olan CAT ile ko-immobilize edilmesi ile ekonomik yönden etkinliğinin büyük oranda arttırılabileceği sonucuna ulaşılabilir.

İmmobilize GOD, immobilize GOD + immobilize CAT karışımı ve ko-immobilize GOD-CAT enzimleri kesikli, geri beslemeli ve sürekli dolgu yataklı kolon reaktörlerde kullanıldığında zamana bağlı olarak pH değişimlerine göre her üç reaktör sisteminde de en yüksek etkinliği ko-immobilize GOD-CAT gösterirken en düşük etkinlik tek başına immobilize GOD kullanımında elde edilmiştir (Şekil 4.73, 4.75 ve 4.77). Ko-immobilize sistemde GOD'nin açığa çıkardığı H_2O_2 enzimle aynı ortamda bulunan CAT tarafından parçalandığından hem GOD inaktivasyonu engellenmiş hem de ortama O_2 sağlandığı için enzimin katalitik etkinliği artmıştır. İmmobilize GOD ve immobilize CAT karışımının kullanıldığı durumda pH'daki zamana bağlı değişimin daha az olmasının nedeninin GOD bağlı destekte oluşan H_2O_2'in önce yığın çözeltiye, sonra da yığın çözeltiden CAT'ın bağlı olduğu desteğe diffüzyonundaki kısıtlamalar olabileceği düşünülmektedir.

Her üç reaktör sisteminde de O_2 derişimindeki zamana bağlı değişimin en fazla immobilize GOD en az ise ko-immobilize GOD-CAT'ın kullanımında olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.74, 4.76 ve 4.78). Bu durum ko-immobilize GOD-CAT'ın

H_2O_2'in parçalanmasında etkili olduğunu ve GOD tarafından tüketilen O_2'nin bir kısmının CAT yardımı ile sisteme geri kazandırıldığını göstermektedir.

Kesikli reaktörde serbest GOD enzimi tek başına veya serbest CAT ile beraber kullanıldığında pH ve O_2 değişimlerinin immobilize enzimlerin kullanıldığı duruma göre çok daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.73 ve 4.74). Sadece GOD'nin kullanıldığı durumda O_2 derişimi ilk 5 dk içinde hızla azalarak hemen hemen tamamı tükenmiş, buna karşılık aynı sistemde pH'nın 150 dk boyunca sürekli olarak azaldığı gözlenmiştir. Bu verilerin birbiri ile uyum içinde olmaması şöyle açıklanabilir: Bilindiği gibi reaksiyon sisteminde glukoz GOD varlığında önce 1,5-glukonolaktona dönüşüp sonra da su ile glukonik aside hidroliz olmaktadır. Hidroliz reaksiyonu herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın gerçekleşir ancak ortam pH'sı hidroliz hızını çok etkilemektedir (Rakotozafy 1999). Glukonolaktonun nötral ve alkali pH'lardaki hidroliz hızı asidik ortamdaki hidroliz hızından daha yüksektir (Dijken 2002). Ortamda O_2 kalmadığı halde ve özellikle 5. dakikadan sonra O_2 derişimindeki değişim yok denecek kadar az olduğuna göre pH değerinin sürekli azalmasının nedeni reaksiyonun başlangıcında açığa çıkan 1,5-glukonolaktonun glukonik aside hidroliz hızının düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

Podual ve ark. (2000), ko-immobilize GOD-CAT ile serbest formdaki GOD-CAT karışımını kesikli reaktörde 200 mg glukoz.dl^{-1} varlığında kullandıklarında, serbest enzim karışımı için 400 dk sonunda pH'nın 5,5'den 2,3'e, ko-immobilize GOD-CAT sistemi için ise 600 dk sonunda pH'nın 5,5'den 3,4'e düştüğünü rapor etmişlerdir. Blandino ve ark. (2002) GOD enzimini tek başına ve CAT ile birlikte kalsiyum alginat jele enkapsülasyon yöntemiyle immobilize etmişler ve immobilize GOD ve ko-immobilize GOD-CAT enzimlerini kesikli ve karıştırmalı tank reaktörde kullanarak glukoz derişimindeki azalma ve H_2O_2 derişimindeki artışın zamana bağlı olarak değişimini izlemişlerdir. Başlangıç glukoz derişimi 14 mM olarak seçilmiş ve 6 saat sonunda ko-immobilize GOD-CAT sisteminde glukozun tamamının tükendiğini, buna karşın immobilize GOD'nin kullanılması durumunda glukozun tamamının 12 saat sonunda tükendiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca immobilize GOD kullanıldığında zamana bağlı olarak H_2O_2 derişimindeki artışın ko-immobilize GOD-CAT kullanıldığı duruma göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

İmmobilize GOD, immobilize GOD + immobilize CAT karışımı ve ko-immobilize GOD-CAT'ın farklı reaktör modellerinde kullanımında en yüksek etkinliğin geri beslemeli reaktör için elde edildiği sonucuna ulaşılmıştır. Kesikli reaktör için elde edilen sonuçlar geri beslemeli reaktör için elde edilen sonuçlara yakın olsa da endüstriyel uygulama kolaylığı açısından geri beslemeli reaktörler tercih edilebilir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. İmmobilize GOD ve immobilize CAT'ın katalitik etkinlikleri ayrı ayrı incelendiğinde, denenen immobilizasyon koşulları arasında en uygun immobilizasyon sıcaklığı, immobilizasyon süresi ve başlangıç enzim derişimi her iki enzim için de aynı bulunmuş olup sırasıyla 10 °C, 2 saat ve 0,5 mg. ml^{-1} dir, ancak en uygun immobilizasyon pH'ları GOD için 5,4 ve CAT için 6,0 olarak saptanmıştır.
2. Birim miktardaki florisil desteği için aynı başlangıç derişiminde GOD veya CAT kullanılarak yapılan immobilizasyon çalışmalarında CAT enziminin GOD'a göre daha yüksek oranda bağlandığı görülmüştür.
3. Serbest GOD ve CAT enzimlerinin en yüksek aktivite gösterdikleri pH değerleri birbirinden farklı olup sırasıyla 5,5 ve 7,5 olarak bulunmuştur. Ancak immobilize edildiklerinde en yüksek aktivite gösterdikleri pH değerleri arasındaki farkın azaldığı görülmüş ve optimum pH'ları immobilize GOD ve immobilize CAT için sırasıyla 6,0 ve 6,5 olarak bulunmuştur.
4. Serbest ve immobilize GOD'nin en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklık 30 °C, serbest ve immobilize CAT'ın en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklık ise 35 °C olarak saptanmış olup immobilizasyon işleminin enzimlerin % aktivite-sıcaklık profilini etkilemediği belirlenmiştir.
5. İmmobilize GOD'nin Vmax değeri serbest GOD'nin Vmax değerinin % 50'si olarak bulunurken, CAT için bu oran % 12 olarak saptanmıştır. İmmobilizasyon sonunda GOD ve CAT enzimlerinin serbest formlarına göre sırasıyla % 13 ve % 0,2 oranında katalitik etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak kullanılan immobilizasyon tekniğinin GOD için daha uygun olduğu söylenebilir.
6. İmmobilize CAT'ın katalitik etkinliğinin serbest CAT'dan düşük çıkmış olması 2 nedenden kaynaklanmış olabilir. Bunlardan birincisi florisilin gözenekli bir destek oluşu ve bu gözeneklerde reaksiyon sonucu oluşan O_2'in destek yüzeyindeki CAT ile çözeltideki H_2O_2 etkileşimini azaltmasıdır. İkinci neden

ise, CAT'ın bünyesinde bulunan lizin amino asit artığının çok olmasından dolayı enzimin desteğe birden fazla bölgesinden bağlanabilmesi, dolayısıyla enzimin esnekliğini kaybetme olasılığıdır.

7. GOD ve CAT enzimlerinin immobilize formlarının depolama kararlıkları hem oda sıcaklığında hem de 4 °C'de serbest formlarının depolama kararlılıklarından daha yüksek olduğu bulunmuştur. Oda sıcaklığında immobilize GOD'nin CAT'a göre daha yüksek depolama kararlılığı gösterdiği saptanmıştır.
8. İmmobilize GOD ve immobilize CAT enzimlerinin depolama kararlılıkları depolandıkları ortamın bağıl neminden etkilenmektedir. GOD enzimi % 0, CAT enzimi ise % 100 bağıl nem ortamlarında depolandıklarında aktivitelerinin büyük bir kısmını hızla kaybetmiş olup bu ortamların depolanmaları için uygun olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. İmmobilize GOD ve immobilize CAT enzimleri en yüksek kararlılığı ise sırayla % 60 ve % 20 bağıl nem ortamlarında depolandıklarında göstermişlerdir.
9. Immobilize CAT ve immobilize GOD enzimleri 50 kullanım sonunda başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 36 ve % 40'ını göstermişlerdir.
10. GOD ve CAT'ın sıralı ko-immobilizasyon yönteminin birlikte ko-imobilizasyon yöntemine göre daha uygun olduğu, bu şekilde elde edilen ko-immobilize GOD- CAT'ın kullanılan protein miktarı ve maliyeti göz önüne alındığında daha yüksek katalitik etkinlik gösterdiği saptanmıştır.
11. Ko-immobilize GOD-CAT'ın en yüksek aktiviteyi gösterdiği optimum pH 6,5, tampon derişimi 50 mM ve optimum sıcaklık 30 °C olarak bulunmuştur.
12. Ko-immobilize GOD-CAT'ın serbest GOD Vmax değerinin % 86'sı kadar maksimum hız gösterdiği, dolayısıyla CAT ile ko-immobilize edilmiş GOD'nin tek başına immobilize edilmiş GOD'a göre daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca ko- immobilize GOD-CAT'ın 50 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 85'ini, 75 kullanım sonrasında ise başlangıç aktivitesinin % 72,5'ini koruyor olması H_2O_2'in istenmeyen etkisinin büyük oranda azaltıldığını göstermektedir.

13. İmmobilize GOD, immobilize GOD + immobilize CAT karışımı ve ko-immobilize GOD-CAT sistemlerinin her birinin kesikli, geri beslemeli ve sürekli dolgu yataklı kolon reaktörlerde kullanımı sonunda en yüksek etkinliği ko-immobilize GOD-CAT'ın gösterdiği; immobilize GOD'nin ise H_2O_2 inaktivasyonu nedeniyle en düşük etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Ko-immobilize GOD-CAT kullanımında CAT enzimi H_2O_2'i parçalayarak GOD inaktivasyonunu engellemekle kalmayıp sisteme tekrar O_2 sağlayarak tek başına immobilize edilmiş GOD'a göre daha yüksek aktivite göstermesine neden olduğu belirlenmiştir.
14. Çalışılan reaktörlerde immobilize GOD, immobilize GOD + immobilize CAT karışımı ve ko-immobilize GOD-CAT sistemlerinin her üçü için de en yüksek etkinlik geri beslemeli reaktör için elde edilmiştir.

5.2. Öneriler

1. Katalitik etkinliklerinin yüksek oluşu nedeniyle GOD ve CAT enzimlerinin düşük derişimlerde ve düşük sıcaklıklarda immobilize edilmesi önerilmektedir.
2. İmmobilize CAT'ın katalitik etkinliğinin yükseltilebilmesi için 2 yol denenebilir. Bunlardan 1. si CAT'ın gözeneksiz bir desteğe immobilizasyonu ile O_2'nin destek yüzeyinden uzaklaştırılması kolaylaştırılabilir. Böylece destek yüzeyindeki CAT ile çözeltideki H_2O_2 arasındaki etkileşim arttırılabilir. 2. yol ise CAT enziminin inert bir protein veya amino asit ile beraber ko-immobilizasyonuyla CAT'ın desteğe birden fazla bölgesinden bağlanma olasılığı azaltılarak immobilize CAT'ın katalitik etkinliğinin değişimi araştırılabilir.
3. GOD ve CAT enzimlerinin florisile polariteleri farklı olan ara kollar üzerinden imobilizasyonları yapılarak immobilize enzimlerin katalitik özellikleri ve kararlılıkları araştırılabilir.
4. Serbest veya immobilize enzimlerin farklı pH'larda ve derişimlerde tampon çözeltileri, gliserol çözeltisi, glukonat çözeltisi gibi farklı bileşiklerin içindeki depolama kararlılıkları araştırılabilir.

5. Enzimler substratları varlığında immobilize edildiklerinde aktif bölgeleri substratları ile bloke olacağından o bölgelerden bağlanmalar azaltılabilir, dolayısıyla immobilize enzimlerin katalitik etkinlikleri arttırılabilir. GOD ve CAT enzimlerinin ko-immobilizasyonu glukoz varlığında yapıldığında glukoz GOD'nin substratı, immobilizasyon ortamında açığa çıkacak olan H2O2 ise CAT'ın substratı olacağından bu çalışma ile katalitik etkinliği yüksek ko-immobilize GOD-CAT sistemi elde edilebilir. Bu işlem farklı glukoz çözeltileri varlığında yapılarak glukoz derişiminin bağlanan protein miktarı ve immobilize enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi incelenebilir.
6. GOD ve CAT enzimleri farklı reaktörlerde ve farklı çalışma koşullarında kullanılarak verimlilikleri ve kinetik özellikleri araştırılabilir.

KAYNAKLAR

AKEN, B.V., LEDENT, P., NAVEAU,H., AGATHOS, S.N., 2000. Co-immobilization of Manganese Peroxidase from *Phlebia radiata* and Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* on Porous Silica Beads. Biotechnology Letters, 22: 641-646

AKGÖL, S., DENİZLİ, A., 2004. Novel Metal-Chelate Affinity Sorbent for Reversible Use in Catalase Adsorbtion. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 28: 7-14

AKGÖL, S., YAVUZ, H., ŞENEL, S., DENİZLİ, A., 2003. Glucose Oxidase and Catalase Adsorption onto Cibacron Blue F3GA-attached Microporous Polyamid Hollow-fibres. Reactive & Functional Polymers, 55: 45-51

AKGÖL, S., KAÇAR, Y., ÖZKARA, S., YAVUZ, H., DENİZLİ, A., ARICA, M.Y., 2001. Immobilization of Catalase via Adsorption onto L-Histidine Grafted Functional pHEMA Based Membrane. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 15: 197-206

AKGÖL, S., DİNÇKAYA, E., 1999. A Novel Biosensor for Specific Determination of Hydrogen Peroxide: Catalase Enzyme Electrode Based on Dissolved Oxygen Probe. Talanta, 48: 363-367

ANDERSON, L.A., DAWSON, L.A., 1991. EXAFS Spectroscopy of Hemecontaining Oxygenases and Peroxidases. Structure and Bonding, 64: 1-40

APPLETON, B., GIBSON, T.D., WOODWARD, J.R., 1997. High Temperature Stabilisation of Immobilized Glucose Oxidase: Potential Applications in Biosensors. Sensors and Actuators B, 43: 65-69

BAO, J., FURUMOTO, K., FUKUNAGA, K., NAKAO, K., 2001. A Kinetic Study on Air Oxidation of Glucose Catalyzed by Immobilized Glucose Oxidase for Production of Calcium Gluconate. Biochemical Engineering Journal, 8: 91-102

BAO, J., FURUMOTO, K., YOSHIMOTO, M., FUKUNAGA, K., NAKAO, K., 2003. Competitive Inhibition by Hydrogen Peroxide Produced in Glucose

Oxidation Catalyzed by Glucose Oxidase. Biochemical Enginnering Journal, 13: 69-72.

BAUTİSTA, F.M., CAMPELO, J.M., GARCIA, A., JURADO, A., LUNA, D., MARINAS, J.M., ROMERO, A.A., 2001. Properties of a Glucose Oxidase Covalently Immobilized on Amorphous $AlPO_4$ Support. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 11: 567-577

BLANDINO, A., MACIAS, M., CANTERO, D., 2001. Immobilization of Glucose Oxidase within Calcium Alginate Gel Capsules. Process Biochemistry, 36: 601-606

BLANDINO, A., MACIAS, M., CANTERO, D., 2002. Modelling and Simulation of a Bienzymatic Reaction System Co-immobilized Within Hydrogel-membrane Liquid-core Capsules. Enzyme and Microbial Technology, 31: 556-565

BOUIN, J., ATALLAH, M.H., HULTIN, H.O., 1971. The Glucose Oxidase-Catalase System. Methods in Enzymology, 44: 478-488

BRAHIM, S., NARINESINGH, D., GUISEPPI-ELIE, A., 2002. Kinetics of Glucose Oxidase Immobilized in p(HEMA)-hydrogel Microspheres in a Packed-bed Bioreactor. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 715: 1-12.

BRIGHT, H.J., APPLEBY, M., 1969. The pH Dependence of the Individual Steps in the Glucose Oxidase Reaction. The Journal of Biological Chemistry, 244 (13): 3625-3634

BULMUŞ, V., AYHAN, H., PİŞKİN, E., 1997. Modified PMMA Monosize Microbeads for Glucose Oxsidase İmmobilization. The Chemical Engineering Journal, 65: 71-76

CAMPANELLA, L., ROVERSİ, R., SAMMAORTİNO, M..P., TOMOSETTİ, M., 1997. Hydrogen Peroxide Determination in Pharmaceutical Formulation and Cosmetics Using a New Catalase Biosensor. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 18: 105-116

CANIZARES-MACIAS, P., HERNANDEZ-GARCIADIEGO, L., GOMEZ-RUIZ, H., 2001. An Automated Flow Injection Analysis Procedure for the Determination of Reducing Sugars by DNSA Method. Journal of Food Science, 66 (3): 407-411

CHATTERJEE, U., KUMAR, A., SANWAL, G.G., 1990. Goat Liver Catalase On Various Solid Supports. Journal of Fermentation and Bioengineering, 70(6):429-430

CHEN, L., ZHANG, X., XIE, W., ZHOU, Y., ZHANG, Z., CASS, A.E.G., 2002. Genetic Modification of Glucose Oxidase for Improving Performance of an Amperometric Glucose Biosensor. Biosensor and Bioelectronics, 00: 1-7

CHO, S.W., RHEE, J.S., 1993. Immobilization of Lipase for Effective Interestification of Fats and Oils in Organic Solvents. Biotechnol. Bioeng., 41:204-210

CHUDOBOVA, I., VRBOVA, E., KODICEK, M., JANOVCOVA, J., KAS, J., 1996. Fibre Optic for the Determination of D-glucose Based on Absorption Changes of Immobilized Glucose Oxidase. Analytica Chimica Acta, 319: 103-110

COSNIER, S., NOVOA, A., MOUSTY, C., MARKS, R.S., 2002. Biotinylated Alginate Immobilization Matrix in the Construction of an Amperometric Biosensor: Application for the Determination of Glucose. Analytica Chimica Acta, 453: 71-79

COSTA, S.A., TZANOV, T., PAAR, A., GUDELJ, M., GÜBİTZ, G.M., CAVACO-PAULO, A., 2001. Immobilization of Catalases from *Bacillus SF* on Alumina for the Treatment of Textile Bleaching Effluents. Enzyme and Microbial Technology, 28: 815-815

ÇETİNUS Ş.A., ÖZTOP, H.N., 2000. Immobilization of Catalase on Chitosan Film. Enzyme and Microbial Technology, 26: 497-501

ÇETİNUS, Ş.A., ÖZTOP, H.N., 1999. Katalazın Sefadeks Destek G-100 Üzerinden Tutuklanması. C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 21:85-98

D'AGNILLO, F., CHANG, T.M.S., 1993. Cross-linked Hemoglobin-Superoxide Dismutase-Catalase Scavenges Oxygen-Derived Free Radicals and Prevents

Methemoglobin Formation and Iron Release. Biomat. Art. Cells & Immob. Biotech., 21 (5): 609-621

DAI, G., LI, J., JIANG, L., 2002. Difference in Enzyme Activity and Conformation of Glucose Oxidase before and after Purification. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 24: 171-176

DENİZLİ, A., YAVUZ, H., ARICA, Y.,2000. Monosize and non-porous p(HEMA-co-MMA) Microparticles Designed as Dye and Metal-Chelate Affinity Sorbent. Colloids and Surfaces, 174: 307-317.

DIJKEN, J.P., TUIJL, A., LUTTIK, M.A.H., MIDDELHOVEN, W.J., PRONK, J.T., 2002. Novel Pathway for Alcoholic Fermentation of δ-Gluconolactone in the Yeast *Saccharomyces bulderi*. Journal of Bacteriology, 184(3): 672-678

EBERHARDT, A.M, PEDRONI, V., VOLPE, M., FERREIRA, M.L., 2004. Immobilization of Catalase from *Aspergiius niger* on Inorganic and Biopolymeric Supports for H_2O_2 Decomposition. Applied Cataysis B: Environmental, 47: 153-163

EFTEKHARİ, A., 2002. Aluminum as a Suitable Substrate for the Deposition of Conducting Polymers: Application to Polyaniline and Enzyme-modified Electrode. Synthetic Metals, 125: 295-300

FERNANDEZ-LAFUANTE, R., RODRIGUEZ, V., GUISAN, J.M., 1998. The Co-immobilization of D-amino Acid Oxidase and Catalase Enables the Quantitive Transformation of D-Amino Acids (D-Phenylalanine) into α-keto Acids (Phenylpyruvic Acid). Enzyme and Microbial Technology, 23: 28-33

GARJONYTE, R., MALINAUSKAS, A., 2000. Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Immobilized in Electropolymerized Polypyrrole and Poly(*o*-phenylenediamine) Films on a Prussian Blue-modified Electrode. Sensors and Actuators B, 63: 122-128

GODJEVARGOVA, T., KONSULOV, V., DIMOV, A., VASILEVA, N., 2000. Behaviour of Glucose Oxidase Immobilized on Ultrafiltration Membranes Obtained by Copolymerizing Acrylonitrile and *N*-vinylimidazol. Journal of Membrane Science, 172: 279-285

GODJEVARGOVA, T., DAYAL, R., MARINOV, I., 2004. Simultaneous Covalent Immobilization of Glucose Oxidase and Catalase onto Chemically Modified Acrylonitrile Copolymer Membranes. Journal of Applied Polymer Science, 91: 4057-4063

GOTTLIEB, D., INOUE, Y., 1967. Flavensomycin , an Inhibitor of Enzyme Reactions Involving Hydrogen Transfer. Journal of Bacteriology, 94 (4): 844-849

GRAY, C.J., LIVINGSTONE, C.M., 1977. Properties of Enzymes Immobilized by the Diazotized m-Diaminobenzene Methods. Biotechnology and Bioengineering, 19: 349-364

GULLA, K.C., GOUDA, M.D., THAKUR, M.S., KARANTH, N.G., 2004. Enhancement of Stability of Immobilized Glucose Oxidase by Modification of Free Thiols Generated by Reducing Disulfide Bonds and Using Additives. Biosensors and Bioelectronics, 19: 621-625

HAOUZ, A., GLANDIERES, M., ALPERT, B., 2001. Involvement of Protein Dynamics in Enzyme Stability, The Case of Glucose Oxidase. FEBS Letters, 506: 216-220

HARBORN, U., XIE, B., VENKATESH, R., DANIELSSON, B., 1997. Evaluation of a Miniaturized Thermal Biosensor for the Determination of Glucose in Whole Blood. Clinica Chimica Acta, 267:225-237

HERMANSON G.T., MALLIA A.K. SMITH P.K., 1992. Immobilized Affinity Ligand Techniques, Acadamic Press, (sy 69)

HERUYAMA, T., AIZAWA, M., 1998. Electron Transfer Between an Electrochemically Deposited Glucose Oxidase / Cu(II) Complex and an Electrode. Biosensors & Bioelectronics, 13: 1015-1022

HORNBY, W.E., FILIPPUSSON, H., McDONALD, A., 1970. The Preparation of Glucose Oxidase Chemically Attached to Polystyrene and Its Use in the Automated Analysis of Glucose. FEBS Letters, 9: 8-10

HOROZOVA, E., DIMCHEVA, N., JORDANOVA, Z., 2000. Electroxoidation of Phenol by Catalase Immobilized on Graphite Electrodes. Bioelectrochemistry, 53: 11-16

ISAKSEN, A., ADLER-NISSEN, J., 1997. Antioxidative Effect of Glucose Oxidase and Catalase in Mayonnaises of Different Oxidative Susceptibility.I. Product Trials. Lebensm. Wiss.u.Technology, 30: 841-846

KATZ, E., RIKLIN, A., HELEG-SHABTAI, V., WILLNER, I., BÜCKMANN, A.F., 1999. Glucose Oxidase Electrodes via Reconstitution of the Apo-enzyme: Tailoring of Novel Glucose Biosensors. Analytica Chimica Acta, 385: 45-58

KLEIN, J., ROSENBERG, M., MARKOS, J., DOLGOS, O., KROSLAK, M., KRISTOFIKOVA, L., 2002. Biotransformation of Glucose to Gluconic Acid by *Aspergillus niger*- Study of Mass Transfer in an Airlift Bioreactor. Biochemical Engineering Journal, 10: 197-205

KLEPPE, K., 1966. The Effect of Hydrogen Peroxide on Glucose Oxidase From *Aspergillus niger.* Biochemistry, 5 (1): 139-143

KRAMER, L., STECKHAN, E., 1997. Co-immobilization of L-α-Glycerophosphate Oxidase with Catalase and its Application for the Synthesis of Dihydroxyacetone Phosphate. Tetrahedron, 53 (43): 14645-14650

KUBAL, B.S., D'SOUZA, S.F., 2004. Immobilization of Catalase by Entrapment of Permeabilized Yeast Cells in Hen Egg White Using Glutaraldehyde. Journal of Biophysics Methods (baskıda)

LARTILLOT, S., KADZIORA, P., ATHIOS, A., 1988. Purification and Characterization of New Fungal Catalase. Preparative Biochemistry, 18 (3): 241-246

LI, Z.F., KANG, E.T., NEOH, K.G., TAN, K.L., 1998. Covalent Immobilization of Glucose Oxidase on the Surface of Polyaniline Films Graft Copolymerized with Acrylic Acid. Biomaterials, 19: 45-53

LIDA, T., MARUYAMA, D., FUKUNAGA, K., 2000. Stabilization of Entrapped Catalase Using Photo-crosslinked Resin Gel for Use in Wastewater Containing Hydrogen Peroxide. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 75: 1026-1030

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RONDALL, R.J, 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193:261-275

LU, T., PENG, X., YANG, H., JI, L., 1996. The Production of Glucose Oxidase Using the Waste Myceliums of *Aspergillus niger Aspergillus niger* and the Effects of Metal Ions on the Activity of Glucose Oxidase. Enzyme and Microbial Technology, 19: 339-342

MALIKKIDES, C.O., WEILAND, R.H., 1982. On the Mechanism of Immobilized Glucose Oxidase Deactivation by Hydrogen Peroxide. Biotechnology and Bioengineering, 24: 2419-2439

MILLER, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31 (3): 426-428

OKUDA, J., MIWA, I., 1971. Mutarotase Effect on Micro Determinations of G-glucose and its Anomers with β-D-glucose Oxidase. Analytical Biochemistry, 43: 312-315

PARK S.W., KIM Y.I., CHUNG K.H., HONG S.I., KIM S.W., 2002. Covalent Immobilization of GL-7-ACA acylase on Silica Gel Through Silanazitaion, Reactive &Functional Polymers, 51: 78-92

PARPINELLO, G.P., CHINNICI, F., VERSARI, A., RIPONI, C., 2002. Preliminary Study on Glucose Oxidase-Catalase Enzyme System to Control the Browning of Apple and Pear Purees. Lebensm.-Wiss. U.-Technol., 35: 239-243

PETRUCCIOLI, M., FENICE, M., PICCIONI, P., FEDERICI, F., 1995. Effect of Stirrer Speed and Buffering Agents on the Production of Glucose Oxidase and Catalase by *Penicillium Variable* (P16) in Benchtop Bioreactor. Enzyme and Microbial Biotechnology, 17: 336-339

PICKERİNG, G.J., HEATHERBELL, D.A., BARNES, M.F., 1999. Optimising Glucose Conversion in the Production of Reduced Alcohol Wine Using Glucose Oxidase. Food research International, 31 (10): 685-692

PODUAL, K., DOYLE III, F.J., PEPPAS, N.A., 2000. Glucose-Sensitivity of Glucose Oxidase-Containing Cationic Copolymer Hydrogels Having Poly(ethylene glycol) Grafts. Journal of Controlled Release, 67: 9-17

PORTACCIO, M., EL-MASRY, M., DIANO, N.R., DE MAIO, A., GRANO, V., LEPORE, M., TRAVASCIO, P., BENCIVENGA, U., PAGLIUCA, N., MITA, D.G., 2002. An Amperometric Sensor Employing Glucose Oxsidase Immobilized on Nylon Membranes with Different Pore Diameter and Grafted with Different Monomers. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 714: 1-19

PRENOSIL, J.E., 1979. Immobilized Glucose Oxidase-Catalase and Their Deactivation in a Differential-Bed Loop Reactor. Biotechnology and Bioengineering, 21: 89-109

RAKOTOZAFY, L., MACKOVA, B., DELCROS, J.F., BOUSSARD, A., DAVIDOU, S., POTUS, J., NICOLAS, J., 1999. Effect of Adding Exogenous Oxidative Enzyme on the Activity of Three Endogenous Oxidoreductases During Mixing of Wheat Flour Dough. Cereal Chemistry, 76(2): 213-218

RAMANATHAN, K., JÖNSSON, B.R., DANIELSSON, B., 2001. Sol-gel Based Thermal Biosensor, for Glucose. Analytica Chimica Acta, 427: 1-10

REITER, S., HABERMULLER, K., SCHUHMANN, W., 2001. A Reagentless Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Entrapped into Osmium-complex Modified Polypyrrole Films. Sensors and Actuators B, 79: 150-156

ROGERS, M.J., BRANDT, K.G., 1971. Multiple inhibition analysis of *Aspergillus niger* glucose oxidase by D-Glucal and Halide ions. Biochemistry, 10 (25):4636-4641

TARHAN, L., TELEFONCU, A., 1989. Characterization of Immobilized Glucose Oxidase-Catalase and Their Deactivation in a Fluid-Bed Reactor. Applied Biochemistry and Biotechnology, 45-47

TARHAN, L., TELEFONCU, A., 1992. Effect of Enzyme Ratio on the Properties of Glucose Oxidase and Catalase Immobilized on Modified Perlite. Process Biochemistry, 27: 11-15

TARHAN L., 1995, Use Of Immobilised Catalase to Remove H_2O_2 Used ın the Sterilisation Of Milk, Process Biochemistry, 30(7):623-628

TİNKILIÇ, N., CUBUK, O., ISİLDAK, I., 2002. Glucose and Urea Biosensors on all Solid-state PVC-NH_2 Membrane Electrodes. Analytica Chimica Acta, 452: 29-34

TRAITEL, T., COHEN, Y., KOST, J., 2000. Characterization of Glucose-sensitive Release Systems in Simulated in vivo Conditions. Biomaterials, 21: 1679-1687

TUKEL, S.S., ALPTEKİN, Ö., 2004. Immobilization and Kinetics of Catalase onto Magnesium Silicate. Process Biochemistry, 39: 2149-2155

TZANOV, T., CALAFELL, M., GUEBITZ, G.M., CAVACO-PAULO, A., 2001. Bio-preparation of Cotton Fabrics. Enzyme and Microbial Technology, 29: 357-362

TZANOV, T., COSTA, S.A., GÜBİTZ, G.M., CAVACO-PAULO, A., 2002. Hydrogen Peroxide Generation with Immobilized Glucose Oxidase for Textile Bleaching. Journal of Biotechnology, 93: 87-94

UKEDA, H., OHIRA, M., SARKER, A.K., SAWAMURA, M., 1998. Deposition of Glucose Oxidase on the Surface of Microtiter Plate: its Application to Determination of Glucose in Foods. Food Research International, 31: 297-302

VASILEVA, N., GODJEVARGOVA, T., 2004. Study on the Behaviour of GOD Immobilized on Microfiltration Polyamid Membrane. Journal of Membrane Science, 239 (2): 157-161

VASUDEVAN, P.T., WEILAND, R.H., 1994. Studies on the Morphology of Immobilized Catalase. The Chemical Engineering Journal, 55: B41-B45

VIANELLO, F., BORTOLUZZI, S., ZENNARO, L., RIGO, A., 2002. Determination of Glucose Oxidase Immobilized as Monolayer onto a Flat Surface. J. Biochem. Biophys. Methods, 51: 263-271

VRBOVA, E., MAREK, M., 1990. Application of the Ugi Reaction for the Preparation of Enzyme Electrodes. Analytica Chimica Acta, 239: 263-268

VRBOVA, E., PECKOVA, J., MAREK, M., 1993. Biosensor for Determination of Starch. Starch, 45 (10): 341-344

WEETALL, H.H., 1976. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. Methods in Enzymology, 44: 134-148

WEIBEL, M.K., BRIGHTS, H.J., 1971 (a). The Glucose Oxidase Mechanism, Interpratation of the pH Dependence. The Journal of Biological Chemistry, 246 (9): 2734-2744

WEIBEL, M.K., BRIGHT, H.J., 1971 (b). Kinetic Behaviour of Glucose Oxidase Bound to Porous Glass Particles. Biochemical Journal, 124: 801-807

WISEMAN, A., 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edit. John Wiley & Sons, Chichester, England

WU, B., ZHANG, G., SHAOMIN, S., CHOI, M.M.F., 2004. Biosensors for Determination of Glucose Oxidase Immobilized on an Eggshell Membrane. Talanta, 64: 546-553

XUE, H., SHEN, Z., Lİ, Y., 2001. Polyaniline-polyisoprene Composite film Based Glucose Biosensor with High Permselectivity. Synthetic Metals, 124: 345-349

YANG, S., LU, Y., ATANOSSOV, P., WILKINS, E., LONG, X., 1998. Microfabricated Glucose Biosensor with Glucose Oxidase Entrapped in Sol-gel Matrix. Talanta, 47: 735-743.

YASUZAWA, M., MATSUKI, H., KUNUGI, A., NAKAYA, T., 2000. Properties of Glucose Sensors Prepared by the Electropolymerization of Pyrroles Containing Phosphatidylcholine (II). Sensors and Actuators B, 66: 25-27

YAVUZ, H., BAYRAMOGLU, G., KAÇAR, Y., DENİZLİ, A., ARICA, M.Y., 2002. Congo Red Attached Monosize Poly(HEMA-co-MMA) Microspheres for Use in Reversible Enzyme Immobilization. Biochemical Engineering Journal, 10: 1-8

YING, L., KANG, E.T., NEOH, K.G., 2002. Covalent Immobilization of Glucose Oxidase on Microporous Membranes Prepared from Poly(vinilidene fluoride) with Grafted Poly(acrylic acid) Side Chains. Journal of Membrane Science, 208: 361-374

ZHANG, C., GAO, Q., AIZAWA, M., 2001. Flow Injection Analytical System for Glucose with Screen-printed Enzyme Biosensor Incorporating Os-complex Mediator. Analytica Chimica Acta, 426: 33-41

ZHAO, H., ZHANG, X., ZHOU, X., LI, Z., 2002. Use of the Glucose Oxidase System for Estimation of Oxygen Transfer Rate in a Solid-state Bioreactor. Enzyme and Microbial Technology, 30: 843-846

[1]: http://www.worthington-biochem.com/GOP/default.html

[2]:http://www.biol.paisley.ac.uk/marco/enzyme_electrode/

[3]: http://www.chinegreentech.com/god.html

[4]: http://www.worthington-biochem.com/CTL/default.html

[5]: http://www.warnerinstruments.com

[6]: http://www.thermorussell.com/techox.htm

[7]: http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P00432

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Adana'da doğdum. İlk ve orta eğitimimi Adana'da tamamladıktan sonra 1995 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümünden mezun oldum. 2000 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Kimya Bölümünde yüksek lisans eğitimimi tamamladım. Doktora eğitimimi 2000 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde başladım. Evli ve 1 çocuk annesiyim.