ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fitnet HÜRREM

KATALAZIN ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARINI (CLEA) OLUŞTURMA YÖNTEMİYLE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATALAZIN ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARINI (CLEA) OLUŞTURMA YÖNTEMİYLE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Fitnet HÜRREM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez ...../ ...../..... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/Oy Çokluğu İle Kabul Edilmiştir.

…… …….. ……

Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL Prof.Dr.Nuray GÜZELER Doç.Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ

Danışman Üye Üye

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:.....

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF2009YL50

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

ÖZ

YÜKSEK LISANS TEZİ

KATALAZIN ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARINI (CLEA) OLUŞTURMA YÖNTEMİYLE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Fitnet HÜRREM
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman **:** Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Yıl: 2010, Sayfa: 65
Jüri **:** Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Nuray GÜZELER
: Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

Bu çalışmada sığır karaciğer katalazı, amonyum sülfatla çöktürme ve glutaraldehitle çapraz bağlama yoluyla çapraz bağlı katalaz agregatları (CLEA-CAT) oluşturularak immobilize edilmiştir. En yüksek CLEA-CAT aktivitesinin görüldüğü; amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v) glutaraldehit derişimi 140 mM, immobilizasyon pH'sı 7,0, immobilizasyon süresi 6 saat olarak belirlenmiştir. CLEA-CAT örneklerinin hazırlanmasında ortamdaki enzim+protein miktarının CLEA-CAT aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi sonucunda, en yüksek aktivite 10 mg/ml CAT + 10 mg/ ml sığır serum albumini (BSA) kullanılarak hazırlanan CLEA-CAT' dan elde edilmiştir. CLEA-CAT örneklerinin termal kararlılıkları, depolama kararlılıkları ve kesikli reaktörde kullanımları araştırılmıştır. Ayrıca, CLEA-CAT örneklerinin taramalı elektron mikroskobunda görüntüleri incelenmiştir.

Serbest katalazın ve CLEA-CAT örneklerinin maksimum aktivite gösterdiği pH, tampon derişimi, sıcaklık gibi koşullar serbest katalaz ve CLEA-CAT için sırasıyla, 7,5, 50 mM, 25°C ve 7,5, 75 mM, 35°C olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda serbest katalaz için K_m, V_{max}, k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla, 50 mM, $1{,}98 \times 10^4$ U/mg prot., $7{,}92 \times 10^4$ s^{-1} ve $1{,}58 \times 10^6$ $s^{-1}M^{-1}$, CLEA-CAT için ise sırasıyla, K_m = 43 mM H_2O_2, $V_{max}=2{,}0 \times 10^3$ U/g CLEA-CAT olarak hesaplanmıştır. 50°C' de 15 saat inkübe edilen CLEA-CAT' ın başlangıç aktivitesinin % 30' unu, serbest katalazın ise aynı koşullarda başlangıç aktivitesinin % 4' ünü koruduğu belirlenmiştir. Serbest katalaz 5°C' de 19 gün saklandığında başlangıç aktivitesinin % 11' ini korurken, CLEA-CAT örnekleri 5°C' de yaklaşık iki ay sonunda başlangıç aktivitesinin % 10' unu koruyabildiği belirlenmiştir. CLEA-CAT örneklerinin kesikli reaktörde 32 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 29'unu koruyabildiği saptanmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda CLEA-CAT' ın termal ve depolama kararlılıklarının serbest enzimden daha yüksek olduğu ve ekstrem koşullarda daha uzun süre kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: İmmobilizasyon, Çapraz Bağlı Enzim Agregatları, Katalaz, Glutaraldehit.

ABSTRACT

MSc THESIS

PREPARATION OF CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES (CLEA) OF CATALASE AND ITS CHARACTERIZATION

Fitnet HÜRREM
ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor **:** Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Year **:** 2010**,** Pages**:** 65
Jury **:** Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Nuray GÜZELER
: Assoc. Prof. Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ

In this study, bovine liver catalase was immobilized as cross-linked catalase aggregates (CLEA-CAT) via precipitation with ammonium sulfate and cross-linking with glutaraldehyde. CLEA-CAT with the highest activity was obtained for the immobilization conditions as ammonium sulfate concentration % 70 (w/v), glutaraldehyde concentration 140 mM, pH 7.0 and immobilization duration 6 hours. The highest activity was obtained from CLEA-CAT prepared with 10 mg/ml CAT + 10 mg/ml Bovine serum albumin (BSA). The thermal stabilities, storage stabilities and usage in a batch type reactor of CLEA-CAT preparations were determined. Also, the images of CLEA-CAT preparations were investigated at scanning electron microscope.

The conditions as pH, buffer concentration, temperature in which free catalase and CLEA-CAT preparations showed their maximum activities were determined as 7.5, 50 mM, 25°C for the free CAT and 7.5, 75 mM, 35°C for the CLEA-CAT, respectively. For free catalase at optimum defined conditions, K_m, V_{max}, k_{cat} and k_{cat}/K_m values were calculated as 50 mM, 1.98×10^4 U/mg prot., 7.92×10^4 s^{-1} and 1.58×10^6 $s^{-1}M^{-1}$ and K_m and V_{max} values of CLEA-CAT were calculated as 43 mM and 2.0×10^3 U/g CLEA-CAT, respectively. It was determined that CLEA-CAT saved 30 % of its initial activity for 15 hours preincubation at 50°C. However, free catalase saved 4 % of its initial activity at the same conditions. Free catalase was stored for 19 days at 5°C and saved 11 % of its initial activity, CLEA-CAT was stored for 2 months at 5°C and saved 10 % of its initial activity. CLEA-CAT preparations saved 29 % of their initial activities in a batch type reactor at the end of 32 usages.

As a result of study, it was concluded that CLEA-CAT's thermal and storage stabilities were higher than that of free catalase and CLEA-CAT can be used for longer at extreme conditions.

Keywords: Immobilization, Cross-linked enzyme aggregates, Catalase, Glutaraldehyde.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimi ile yardım ve önerilerini hiçbir zaman esirgemeyen, sabırla ve özveriyle her konuda beni aydınlatan, deneysel çalışmalarımda izlemem gereken yol hakkında ve deneysel verilerimin değerlendirilmesinde önsezili ve geliştirici açıklamaları ile çalışmalarım boyunca önümde bir ışık olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e sevgi ve emeklerinden ötürü sonsuz şükranlarımı sunarım.

Ayrıca saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ ve Doç. Dr. Ramazan BİLGİN' e ilgilerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bilgi ve deneyimleri ile izlemem gereken yöntem ve metotlar hakkında sürekli beni bilgilediren, hiçbir zaman yardım ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Dr. Özlem ALPTEKİN'e, Deniz YILDIRIM' a, Dilek ALAGÖZ'e ve laboratuvardaki diğer arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca maddi manevi hiçbir desteği ve sevgilerini benden esirgemeyen babam Mustafa HÜRREM'e, annem Zehra HÜRREM'e ablam Şefika HÜRREM'e, abilerim Veliyettin HÜRREM'e, Ali Rıza Bektaş HÜRREM'e, Nazım HÜRREM'e ve çalışmalarım sırasında desteğini benden esirgemeyen arkadaşlarım Özlem KOÇ' a, Özlem Deniz DUMAN' a, Ümit AYGÜL' e, Sedat DÖNMEZ' e, İzlem ERSÖZ' e ve diğer arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Hazırladığım bu çalışmanın konu ile ilgilenecek herkes için faydalı olmasını dilerim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ ……I
ABSTRACT……II
TEŞEKKÜR……III
İÇİNDEKİLER……...IV
ÇİZELGELER DİZİNİ……...VI
ŞEKİLLER DİZİNİ……...VII
SİMGELER VE KISALTMALAR……IX
1. GİRİŞ……1
1.1. İmmobilizasyon Yöntemleri……..2
1.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri……...4
1.1.1.1. Bağlama……4
1.1.1.2. Tutuklama Yöntemleri……8
1.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon……...10
1.2. İmmobilize Edilen Enzimden Beklenilen Özellikler……..10
1.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması……11
1.4. Katalaz (CAT)……11
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR……..15
3. MATERYAL VE METOD……21
3.1. Materyal……..21
3.1.1. Kimyasallar……21
3.1.2. Araç ve Gereçler……..……..21
3.2. Metod……..21
3.2.1. CLEA-CAT Hazırlanması……21
3.2.1.1. CLEA-CAT Örneklerinin Hazırlanmasında İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu……..22
3.2.2. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT Aktivitesinin Ölçülmesi….....23
3.2.3. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT‘ ın Karakterizasyonu…….25

3.2.3.1. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT'ın Optimum pH'larının Belirlenmesi……..……..25
3.2.3.2. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT'ın Optimum Tampon Derişimlerinin Belirlenmesi……25
3.2.3.3. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT'ın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi……..25
3.2.3.4. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT'ın Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi……..25
3.2.3.5. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT'ın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi……26
3.2.3.6. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT'ın Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi……26
3.2.3.7. CLEA-CAT' ın Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi……...26
3.2.4. CLEA-CAT Örneklerinde CAT Miktarının Belirlenmesi……26
4. BULGULAR ve TARTIŞMA……29
4.1. Bulgular ……..29
4.1.1. Serbest Katalazın Karakterizasyonu……29
4.1.2. CLEA Örneklerinin Hazırlanmasında İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu İçin Elde Edilen Bulgular……33
4.1.3. CLEA-CAT' ın Karakterizasyonu……36
4.1.4. CLEA-CAT Miktarının Belirlenmesi……40
4.1.5. CLEA-CAT Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobunda(SEM) İncelenmesi……...42
4.2. Tartışma……...49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER……57
5.1. Sonuçlar……..57
5.2. Öneriler……...58
KAYNAKLAR……...59
ÖZGEÇMİŞ……65

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması……11

Çizelge 4.1. Katalazın immobilizasyonu için CAT+BSA oranının belirlenmesi……...35

Çizelge 4.2. CLEA-CAT örneklerinin aktivitesinin depolama süresine bağlı değişimi…… 39

Çizelge 4.3. CLEA-CAT örneklerinin bağlanma yüzdesindeki ve miktarındaki değişimler…….42

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması 3
Şekil 1.2. Taşıyıcı olmadan yapılan enzim immobilizasyon yöntemleri.....5
Şekil 1.3. Polimer matrikste enzim immobilizasyonu 9
Şekil 1.4. Katalazın prostetik grubu olan *hem b* ve *hem d*'nin yapısı 13
Şekil 4.1. Serbest katalaz aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi..... 29
Şekil 4.2. Serbest katalaz aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi..... 30
Şekil 4.3. Serbest katalaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi..... 30
Şekil 4.4. Serbest katalazın inkübasyon süresine bağlı aktivite değişimi..... 31
Şekil 4.5. Serbest katalazın aktivitesinin depolama süresine bağlı değişimi..... 32
Şekil 4.6. Serbest Katalaz İçin Lineweaver-Burk Grafiği 32
Şekil 4.7. İmmobilizasyon ortamındaki amonyum sülfat derişimine bağlı olarak CLEA-CAT örneklerinin aktivitelerindeki değişim..... 33
Şekil 4.8. İmmobilizasyon ortamındaki glutaraldehit derişimine bağlı olarak CLEA-CAT örneklerinin aktivitelerindeki değişim. 34
Şekil 4.9. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak CLEA-CAT örneklerinin aktivitelerindeki değişim…….. 34
Şekil 4.10. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak CLEA-CAT örneklerinin aktivitelerindeki değişim…….35
Şekil 4.11. CLEA-CAT aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi……...36
Şekil 4.12. CLEA-CAT aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi……...37
Şekil 4.13. CLEA-CAT aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi……...37
Şekil 4.14. CLEA-CAT' ın inkübasyon süresine bağlı aktivite değişimi……...38
Şekil 4.15. CLEA-CAT' ın kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı aktivite değişimi……39
Şekil 4.16. CLEA-CAT için Lineweaver-Burk Grafiği……..40
Şekil 4.17. Optimum Amonyum Sülfat derişimi belirlenen CLEA-CAT' ın SEM fotoğrafı (büyütme oranı 500x)…….....43

Şekil 4.18. Optimum Amonyum Sülfat derişimi belirlenen CLEA-CAT' ın SEM Fotoğrafı (büyütme oranı 20000x)……..... 44
Şekil 4.19. Optimum Glutaraldehit derişimi belirlenen CLEA-CAT'ın SEM fotoğrafı (büyütme oranı 500x)……45
Şekil 4.20. Optimum Glutaraldehit derişimi belirlenen CLEA-CAT' ın SEM fotoğrafı (büyütme oranı 20000x)……45
Şekil 4.21. Optimum sürenin belirlenmesinde elde edilen CLEA-CAT örneğinin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 500x)……46
Şekil 4.22. Optimum sürenin belirlenmesinde elde edilen CLEA-CAT örneğinin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 20000x)……..46
Şekil 4.23. Optimum pH' nın belirlenmesinde elde edilen CLEA-CAT örneğinin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 500x)……..47
Şekil 4.24. Optimum pH' nın belirlenmesinde elde edilen CLEA-CAT örneğinin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x)……..47
Şekil 4.25. Optimum immobilizasyon derişiminin belirlenmesinde hazırlanan CLEA-CAT' ın SEM fotoğrafı (büyütme oranı 500x)……48
Şekil 4.26. Optimum immobilizasyon derişiminin belirlenmesinde hazırlanan CLEA-CAT' ın SEM fotoğrafı (büyütme oranı 20000x)……...48

SİMGELER VE KISALTMALAR

7-ACA	: 7- amino cephalosporanic asit
AAS	: Atomik absorpsiyon spektrofotometresi
ABTS	: 2-2'-azido-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sülfonik asit)
AXE	: Asetil ksilan esteraz
BLC	: Sığır karaciğer katalazı (Bovine liver catalase)
BSA	: Sığır serum albumini (Bovine serum albumin)
CPC	: Cephalosporin C
CAT	: Katalaz
CLE	: Çapraz bağlı çözünmüş enzim (Cross-linked dissolved enzyme)
CLEA	: Çapraz bağlı enzim agregatlatı (Cross-linked enzyme aggregate)
CLEC	: Çapraz bağlı enzim kristali (Cross-linked enzyme crystal)
CSDE	: Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim (Cross-linked spray-dried enzyme)
CLEA-CAT	: Katalazın çapraz bağlı enzim agregatları
DME	: 1,2-dimetoksietan
DMF	: Dimetilformamit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
GA	: Glutaraldehit
K_m	: Michealis hız sabiti
k_{cat}	:Turnover sayısı
k_{cat}/K_m	: Katalitik etkinlik
MLC	: *Micrococcus lysodeikticus* katalazı
PEG	: Polietilenglikol
Prot.	: Protein
RNA	: Ribonükleik Asit
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
V_{max}	: Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği maksimum hız

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 (Tükel ve Alptekin, 2007).

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler proteindir. Katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim denature olursa veya alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur. Eğer enzim bileşeni olan amino asitlerine dönüştürülürse, katalitik aktivitesi yok olur. Bu yüzden protein enzimlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı katalitik aktivite için esastır (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlar. Bununla beraber yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkânı ortaya çıkmaktadır. Enzimlerin teknik kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmalarının artmasına neden olmuştur (Wiseman, 1986).

Enzim üretiminde hammadde sorunu mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte, enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Bu nedenle, saflaştırılan enzimlerden olabildiğince faydalanmak için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (Tükel ve Alptekin, 2007).

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 artırmaktadır. 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 (Tükel ve Alptekin, 2007).

Enzim saflaştırma işemlerinin zahmetli ve pahalı olmasının yanı sıra endüstriyel uygulamalarda karşılaşılan bir takım zorlukların üstesinden gelmek için çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasıyla, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler (Klibanov, 1983).

İmmobilize enzimin serbest enzime üstünlükleri;

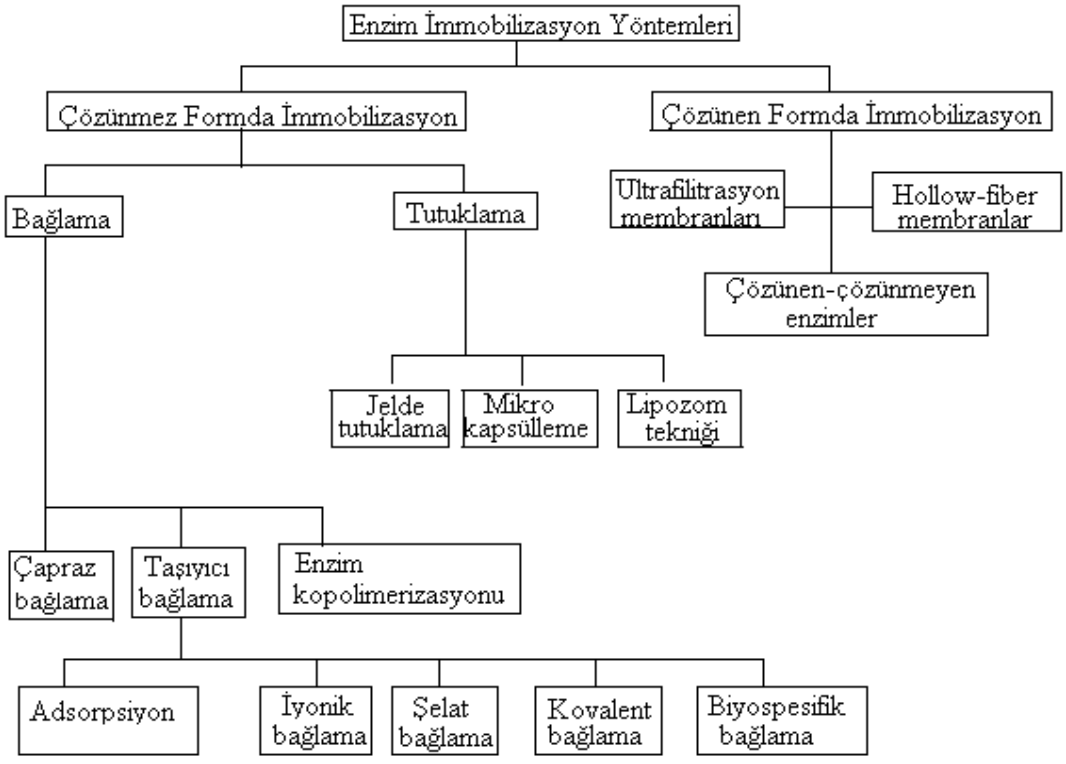
-Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.

- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Serbest 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.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.
- Otomatik işlemlere imkân verir.
- Endüstriyel boyutta önemli bir ekonomi sağlar; üretim kaybı azalır.

1.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Bir enzimin immobilizasyonunda önemli olan bağlanma metodunun seçimidir. Bu bağlanmada, enzimin kimyasal doğasının değişimi veya enzimin bağlanma bölgesindeki reaktif grupların değişimi ile enzimin aktivite kaybetmesi önlenmelidir. Diğer bir deyişle, enzim mümkün olan en düşük hasarla bağlanmalıdır.

Enzimin aktif bölgesindeki önemli bilgi, bu görevin başarılmasında yarar sağlayacaktır. Enzimin esansiyel bağlanma bölgesindeki gruplarla reaksiyondan kaçınılması istenmektedir. Alternatif olarak, bağlanma sırasında aktif bölge enzim aktivitesini kaybetmeksizin uzaklaştırılabilecek uzun koruyucu gruplar ile korunabilir. Bazı durumlarda koruyuculuk fonksiyonu bir substrat veya enzimin bir yarışmalı inhibitörü tarafından yerine getirilebilir. İmmobilize enzimin yüzeyi, enzim içerisindeki hidrojen bağlarında veya elektron geçiş komplekslerinin oluşumunda, yapının muhafaza edilmesinden sorumludur. Yüzeyin ve enzimin mikro çevresi yüklere sahiptir. Bu da enzimin optimum pH'dan 2 pH birimi değişebilmesini sağlar. Enzimin etkili çalışabilmesinde pH bölgesinin geniş olması büyük yarar sağlar. Etkileşimin ve kullanılan desteğin özellikleri esas alınarak enzim immobilizasyon metotlarının sınıflandırılması yapılmıştır (Rosevear ve ark., 1987).



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

Şekil 1.1.' deki sınıflandırmaya gore 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 olarak ikiye ayrılmaktadır.

1.1.1.1. Bağlama

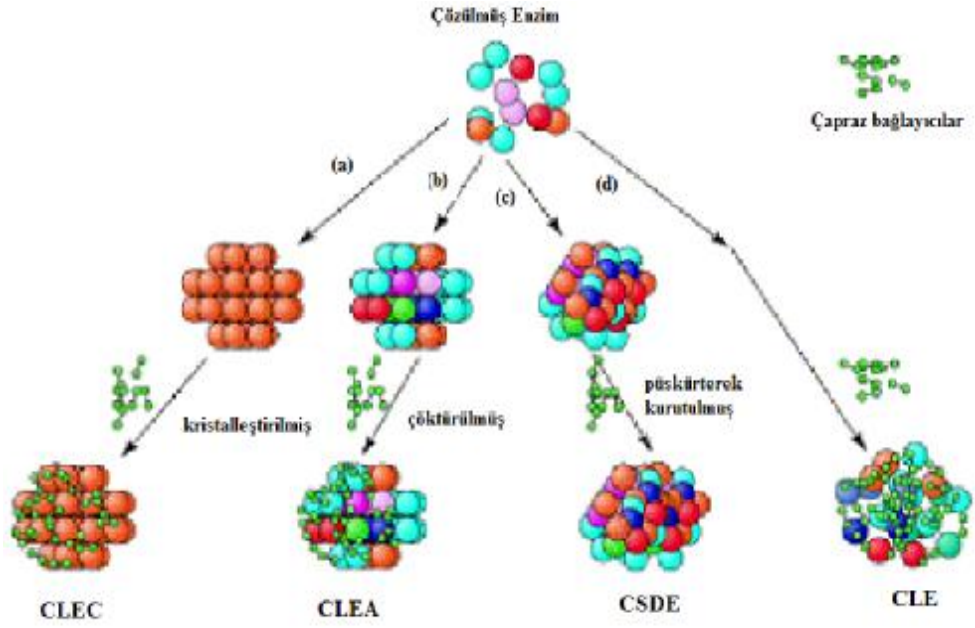
Bağlama yöntemi; çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu ve taşıyıcıya bağlama olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Çapraz bağlama: Çapraz bağlama ile yapılan enzim immobilizasyon yöntemlerinde küçük molekül yapılı, bi- veya multi fonksiyonel reaktifler, enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşturmaktadır (Govardhan, 1999; Schoevaart ve ark.,2004; Sheldon ve ark., 2005; Shah ve ark., 2006). Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH'ya ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, kloroformat ve karbonilimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorohidrinlerdir. Genellikle pahalı olmadığı ve ticari olarak kolay bulunduğu için glutaraldehit çapraz bağlama reaktifi olarak kullanılmaktadır.

Çapraz bağlı immobilize enzimler;

- CLE: Çapraz bağlı çözünmüş enzim (Cross-linked dissolved enzyme)
- CLEC: Çapraz bağlı enzim kristali (Cross-linked enzyme crystal)
- CSDE: Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim (Cross-linked spray-dried enzyme)
- CLEA: Çapraz bağlı enzim agregatları (Cross-linked agregate enzyme)

olmak üzere dört farklı şekilde hazırlanabilmektedir (Şekil 1.2).



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

CLE: Bu tür immobilize enzim için termal kararlılık güçlendirilebilir ancak çapraz bağlayıcının miktarı, sıcaklık, pH ve iyonik güç gibi birkaç faktör arasında hassas bir denge gerektirir. Ayrıca çözünmüş enzim moleküllerinin arasındaki yüksek oranda intermoleküler çapraz bağların oluşması düşük aktivite, zayıf tekrarlanabilirlik, düşük mekanik kararlılık gibi bazı olumsuzluklara neden olabilmektedir. Ayrıca jölemsi yapıda olması da dezavantajlarından biridir (Cao ve ark., 2003).

CLEC: Büyüklükleri 1- 100 µm arasında kontrol edilebilen, yüksek oranda aktif ve kararlı immobilize enzimler olarak geliştirilmiştir. Diğer taraftan enzim kristalizasyonu için kullanılacak enzimin son derece saf olması gerekmektedir. Bu da maliyeti çok artırmaktadır. Lipaz, proteaz ve açilaz gibi birçok hidrolazlar asimetrik sentezler için kiral biyokatalizörler olarak ticari amaçla CLEC olarak kullanılmıştır (Cao ve ark., 2003).

CSDE: Püskürtülerek kurutulmuş enzim tozları çapraz bağlı enzim preparatları hazırlamak için kullanılır. Uygun bir aktivite göstermesine rağmen bu

yöntemden şimdiye kadar yararlanılmamıştır. Çünkü bu yöntem uygulanırken enzim, kurutulması nedeniyle etkisiz hale gelmektedir. CSDE'nin CLEC, CLEA veya taşıyıcı ile yapılan immobilize enzimlerle kıyaslandığında oldukça düşük aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Cao ve ark., 2003).

CLEA: Çözünür enzim moleküllerinin çözünmez agregatlar oluşturmasına dayanmaktadır. Uygun agregat oluşturucular eklenmesiyle enzim çözeltisinin elektrostatik sabitlerinin değişmesi ile ya da enzim çözeltisinin hidrasyon durumunun değiştirilmesi ile çözünmez enzim agregatları oluşturulabilmektedir. Yüksek oranda çözünmüş serbest enzim molekülleri çöktürücülerle çözünmez çökeltiler halinde çöktürülürler. Bu çözünmez çökeltiler daha sonra bifonksiyonel çapraz bağlayıcıların eklenmesiyle çapraz bağlanırlar. Oluşmuş CLEA'lar CLEC'lerle karşılaştırılabilir aktivite ve kararlılık gösterirler. CLEA'nın kullanımı halen gelişmekte olan bir teknolojidir (Cao ve ark., 2003). CLEC'in aksine enzimin kristal formunu gerektirmez bu nedenle maliyeti daha düşüktür (Sheldon, 2007a).

Enzim molekülleri başka bir destek maddesi olmadan, kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlanarak immobilize olabilirler. Bu yöntem üç boyutlu çapraz bağlı enzim oluşumu esasına dayanmaktadır. Bu immobilizasyon metodu enzimi tamamen saf bir halde kullanmaya gerek duymadığı için basit, sağlam ve etkili bir metottur. CLEA'da çapraz bağlama için kullanılan reaktif aldehit grubu içeren, yüksek molekül ağırlıklı polifonksiyonel polimerlerin (100-200 kDa) enzimlerin veya alt ünitelerin çapraz bağlanmasında etkili olduğu bildirilmektedir (Mateo ve ark., 2004).

Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulumu zahmetlidir. Enzim aktifliği; tepkime süresi, sıcaklık, iyonik şiddet, pH, çapraz bağlayıcı madde ve enzim derişimi gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır.

CLEA'nın Avantajları:

- Tek bir işlemde enzimlerin immobilize edilebilmesi,
- Enzim immobilizasyonu için yeni, çok yönlü ve etkili olması,
- Metodun hızlı immobilizasyon için basit olması,

- Metod ilk adımda saflaştırma ve immobilizasyonun bir bileşimi olduğundan enzimin yüksek saflığını gerektirmemesi,

- Yöntemin kombine CLEA'ların hazırlanması için de uygun olması,

- Herhangi bir destek kullanılmaması nedeniyle enzim aktivitesinde seyrelme olmaması,

- Yüksek kararlılık ve düşük üretim maliyeti,

- Endüstriyel uygulamalarda zamandan ve maliyetten kazanç,

- Multimerik enzimlerin alt ünitelerinin ayrılmasını engelleyerek enzimin kararlılığının artması ve dördüncül yapısının dengeli tutulması.

CLEA' nın Dezavantajları:

- Yüksek aktiflik gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki zorluklar,

- Çöken enzimlerin partikül boyutlarının kontrolünün zorluğu.

Enzim kopolimerizasyonu: Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır. Yöntem polimer matrikse tutuklanmaya benzemekle birlikte enzim kaçışının önlenmesi gibi üstünlüğü vardır.

Taşıyıcıya bağlama: Adsorpsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama olarak beş gruba ayrılmaktadır. Bu yöntemde 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 stabilite,

- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcıların yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel grupları taşıması,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik,
- Rejenere olabilme.

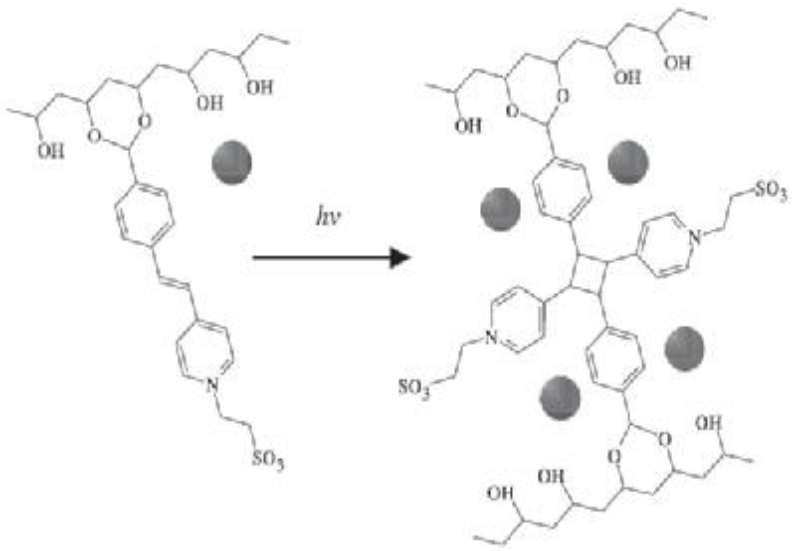
Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktifleştirilmesi gerekir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, 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 (Tükel ve Alptekin, 2007).

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 (Sperinde ve Griffith, 1997). Bu amaçla en çok

kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir (Tükel ve Alptekin, 2007).



Şekil 1.3. Polimer matrikste enzim immobilizasyonu (Cao, 2005).

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 bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır (Tükel ve Alptekin, 2007).

Lipozom tekniği; sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır (Regen ve ark., 1984). 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 (Tükel ve Alptekin, 2007)

1.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin herhangi bir destekle fiziksel veya kimyasal etkileşiminden çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir yöntemdir (Weethall, 1976). Yarı geçirgen özellik gösteren oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu immobilizasyon yöntemi hiçbir kimyasal bileşiğin veya tekniğin kullanılmasının gerekmediği son derece kolay bir yöntemdir. Oyuk elyaf membranlar ile ultrafilrasyon membranları enzimi geçirmezken substrat ve ürünün geçişine izin verir. Ayrıca mikropların enzime ulaşmasını engelleyerek koruyucu etki gösterirler. Enzim taşıyıcıya herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmez, ancak substratın membrandan geçip enzime ulaşmasında 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 artırmaktadır (Tükel ve Alptekin, 2007).

1.2. İmmobilize Edilen Enzimden Beklenilen Özellikler

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

- Yüksek kararlılık
- Tekrar kullanılabilirlik
- Sürekli üretime olanak vermesi
- Reaksiyon kontrolüne olanak vermesi
- Yüksek saflık
- Yüksek ürün yüzdesi

- Ekonomik olması

1.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Enzimlerin çoğuna uygulanabilen çok sayıda immobilizasyon teknikleri geliştirilmesine karşın, enzimlerin bileşenlerinin ve kimyasal özelliklerinin oldukça geniş, ürünlerin ve substratların farklı özelliklerde olmaları nedeniyle bütün enzimler veya uygulamalar için geçerli tek bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen her farklı enzim için ve her farklı durumda bir veya bikaç değişik yöntem önerilebilir. Şekil 1.1‘ de immobilizasyon yöntemlerinin karşı kıyaslanmaları gösterilmiştir (Tükel ve Alptekin, 2007).

Çizelge 1.1 İmmobilizasyon yöntemlerinin Kıyaslanması (Wiseman, 1986)

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

1.4. Katalaz (CAT)

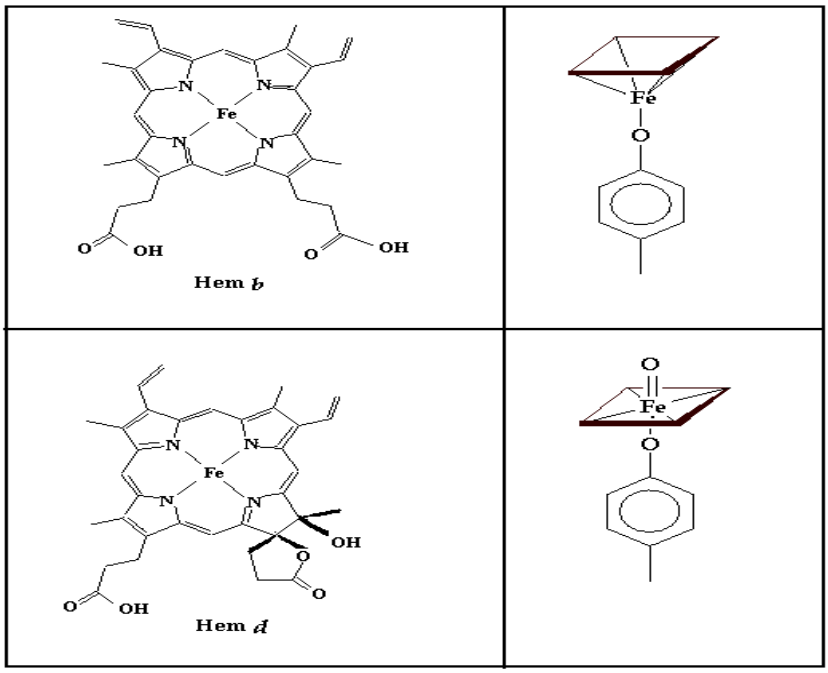
Katalaz (H_2O_2: H_2O_2 oksidoredüktaz EC 1.11.1.6), hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan bir enzimdir.

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

Üzerinde en çok araştırma yapılan enzimlerden biri olan katalaz saflaştırıldığı kaynağa göre farklı özellikler göstermektedir. Sığır karaciğeri katalazı 250 kD molekül ağırlığına sahipken, *Micrococcus lysodeikticus* kaynaklı katalazının molekül ağırlığı 232 kD, *A. Niger* kaynaklı katalazının ise 323 kD olarak belirlenmiştir.*A. Niger* katalazının 3422 amino asit, sığır karaciğeri katalazının ise 1922 aminoasitten meydana geldiği belirlenmiştir (Vasudevan ve Weiland, 1994).

Katalaz, çok yaygın bir şekilde hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda mevcuttur. Biyolojik ve biyokimyasal sistemlerde katalaz, antioksidan etkiye sahip bir enzim olup toksik ve yükseltgen etkiye sahip hidrojen peroksidi hücrelerden uzaklaştırmada önemli rol oynar. Katalaz, dokuları H_2O_2 ve kısmen indirgenmiş oksijen türlerinin toksik etkilerinden korumada görevlidir (Aydemir ve Kuru, 2003). Antioksidan savunma sistemi, hücreyi serbest radikal veya diğer reaktif moleküllerin oksidatif hasarından korur. Katalaz hem grubu içeren bir oksidoredüktazdır. Katalaz enzimi canlı organizmanın eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği ve çeşitli dokularında da bulunan bir enzim olup hücrelerin özellikle peroksizomlarında yüksek derişimlerde bulunur (Çimen ve ark., 2005).

Katalaz aktif bölgesinde *hem* grubu (Protoporfirin IX halkası) içerir. Farklı kaynaklara ait katalaz moleküllerinin çoğu *hem b* prostetik grubunu içerirken, az sayıda mantar ve bakteriyel katalaz *hem d* grubunu içermektedir (şekil 1.4). Katalaz enziminin hem molekülü ve enzime tirozin amino asit artığı üzerinden bağlanışı şekil 1.4‘ te gösterilmektedir. Sığır karaciğer katalazının molekül kütlesi 240 kDa olup, dört tane alt ünitesi vardır. İzoelektrik noktası (pI) ise 5,4‘ tür (Vesudevan ve Weiland, 1994).



Şekil 1.4. Katalazın prostetik grubu olan *hem b* ve *hem d*'nin yapısı

Doğada yaygın bir şekilde bulunan katalaz tüm aerobik organizmalarda, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunur. Katalaz aktivitesi memeli dokularında çok çeşitlilik gösterir; karaciğer ve böbrekte yüksek, bağ dokularında düşüktür. Bu hücrelerde (mitokondri ve peroksizomlarda) tanecik bağımlı iken eritrositlerde sulu fazda bulunur. İnsan eritrositleri katalaz bakımından oldukça zengindir (Aebi, 1984).

Katalazın kullanım alanları;

Katalazın, oksitleyici, ağartıcı veya sterilize edici olarak kullanılan H_2O_2'nin fazlasının uzaklaştırılması için endüstride, glukoz veya H_2O_2 biosensorlerinin bileşeni olarak analitik uygulamalarda kullanımı mümkündür. Katalazın H_2O_2'nin uzaklaştırılması, çeşitli bileşiklerin sentezinde farklı enzimlerle birlikte kullanımı ve analitik amaçlı kullanımı ile ilgili bazı örnekler aşağıda verilmiştir (Alptekin, 2009).

- Tekstilde pamuğun boyanmadan önce kimyasal beyazlatma işleminde kullanılan H_2O_2'nin aşırısının uzaklaştırılmasında (Paar ve ark., 2001; Costa ve ark., 2001),

- Sütün soğuk pastörizasyonunda mikrobiyal kirliliklerin çoğalmasının engellenmesi amacıyla konulan H_2O_2'nin aşırısının uzaklaştırılmasında (Tarhan, 1995),

- Sterilizasyon işlemleri sonrasında atık sulardaki H_2O_2'nin uzaklaştırılmasında (Lida ve ark., 2000),

- Glukoz oksidaz enzimi ile birlikte glukonik asit üretiminde ve glukoz veya oksijenin gıdalardan uzaklaştırılmasında (Godjevargova ve ark., 2004),

- Glukoz oksidaz enzimi ile birlikte kan, serum vb. çeşitli örneklerde glukozun belirlenmesinde (biyosensörlerde) (Santoni ve ark., 1997),

- Hidrojen peroksitin miktarının belirlenmesi amacıyla biyosensörlerde (Ertaş, 2000; Akgöl ve Dinçkaya, 1999; Choi ve Yiu, 2004),

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

- D- aminoasit oksidazlarla birlikte D-aminoasit oksidazlarla birlikte D-aminoasitlerin α-ketoasitlere dönüştürülmesinde kullanılan bir enzimdir (Lafuente, ve ark., 1998),

- CAT peroksidaz aktivitesi göstererek H_2O_2 varlığında alkol, nitrit ve fenolü yükseltgemek amacıyla kullanılmaktadır (Özyılmaz ve ark., 2005).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tarhan (1991), tereftaldikarbosialdehit ile çapraz bağlı olan polivinilalkoldeki tereftaldikarbosialdehit yerine 2-amino-4,6-dikloro-s-triazin kullanmışlardır. Katalazın jelatin kaplı 2-amino-4,6-dikloro-s-triazin ile çapraz bağlı polivinilalkol üzerine immobilizasyonu için optimum koşulların belirlenmesi için araştırmalar yapmışlardır. Serbest ve immobilize katalaz enziminin pH, sıcaklık, kararlılık davranışı, Km değerleri gibi değişkenlere bağlı olarak değişen aktivitesindeki çeşitliliği araştırmışlardır. İmmobilize katalaz enziminin H_2O_2'i parçalama tepkimesine ait hız sabiti ve aktivitesini yitirmesini banyo tipi sürekli olmayan reaktör kullanarak belirlemişlerdir. Katalaz enziminin aktivitesi üzerine H_2O_2 derişiminin etkisini araştırmışlardır.

Cao ve ark. (2000), Penisilin G açilazın immobilizasyonu için CLEA yöntemini uygulamışlardır. CLEA'ları oluşturmak için amonyum sülfat, ter-bütil alkol ve PEG olmak üzere üç farklı çöktürücü kullanmışlardır. Ter-bütil alkol ile çöktürülerek oluşturulan CLEA en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Bunu CLEC yöntemiyle yapılan penisilin G açilaz immobilizasyon sonuçlarıyla karşılaştırmışlar ve enzimin aynı aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak, CLEA'nın basit bir yöntem olduğunu belirterek CLEA'ların yüksek aktiviteye sahip kararlı biyokatalizörler olduğunu göstermişlerdir.

Mateo ve ark. (2004), penisilin G açilaz, hidroksinitril liyaz, alkol dehidrojenaz ve iki nitrilazdan çöktürme yoluyla CLEA'lar hazırlamışlar ve çapraz bağlayıcı olarak dekstran polialdehit ve glutaraldehit kullanmışlardır Çoğunlukla kullanılan glutaraldehitle karşılaştırdıklarında, dekstran polialdehitten elde edilen immobilizasyon veriminin daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Penisilin açilaz CLEA'larının aktif bölge titrasyonunun, çapraz bağlayıcı olarak dekstran polialdehit kullanılan aktif bölgelerde düşük miktardaki kayıptan kaynaklanan yüksek aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Proteinin aktif bölgesine nüfuz etmesi için oldukça büyük makromoleküler çapraz bağlayıcılar önermişlerdir. Enzimin protein miktarının belirlenmesinde Bradford (1976) metodunu izlemişlerdir. Oksinitrilaz, alkol dehidrojenaz penisilin açilaz ve iki nitrilazın (*Ps. Fluorescens* ve BioCatalitics 1004)

aktivitesini belirlemişlerdir. Aktif CLEA'ların alkol dehidrojenaz ve iki nitrilazdan değil penisilin G açilaz ve (R)- oksinitrilazdan elde edildiğini belirtmişlerdir.

Wilson ve ark. (2004), tetramerik yapılı katalazın dördüncül yapısını stabilize etmek için CLEA yöntemini uygulamışlardır. Katalaz kaynağı olarak sığır karaciğeri ve *Micrococcus Iysodeikticus* katalazlarını dietilen-glikol-dimetileterle çöktürerek glutaraldehitle çapraz bağlamışlar ve CLEA-CAT'ın yapısal kararlılığını belirlemek için SDS-PAGE yöntemini kullanmışlardır. Enzimleri çöktürüp kimyasal bir şekilde glutaraldehitle bağladıktan sonra SDS varlığında kaynatmışlardır. Enzimin alt ünitelerini bu kaynatma işleminden sonra süpernatantta belirleyememişlerdir. Böylece her iki kaynaktan elde edilen katalazın dördüncül yapısının tamamen korunduğunu belirtmişlerdir. Hazırlanmış CLEA'ların aktivitesinin serbest enzimin aktivitesine göre % 40'ın üzerinde olduğunu göstermişlerdir.

Schoevaart ve ark. (2004), *Candida antarctica* lipazını (E.C.3.1.1.3), *Coriolus versicolor lakkazını* (E.C.1.10.3.2), *Aspergillus niger* fitazını (E.C.3.1.3.8), *Dactylium dendroides* galaktoz oksidazını (E.C.1.1.3.9), domuz tripsinini, *Aspergillus niger* glukoz oksidazını (E.C.1.1.3.4), *Aspergillus oryzae* β-galaktozidazını (E.C.3.2.1.23), *Rhodococcus erythropolis* alkol dehidrogenazını (E.C.1.1.1.2), *Candida boidinii* format dehidrogenazını (E.C.1.2.1.2) tampon, etanol, metanol, 1-propanol, 2-propanol, ter-bütil alkol, aseton, asetonitril, etil laktat, doygun amonyum sülfat, DME, DMF, PEG, DMSO gibi çöktürücü (90 % (v/v)) ajanları kullanarak CLEA yönteminin optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Langen ve ark., (2005), Bademdeki (R)-oksinitrilaz enzimini sırasıyla 1,2-dimetoksietan ile çöktürmüşler ve çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanarak CLEA yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Bu yöntemle immobilize edilen (R)-oksinitrilaz enziminin çok az miktarda suyun bulunduğu koşullarda hidrosiyanasyon işlemini katalizlediğini bulmuşlardır. Bu koşulların yararlı etkisini yavaş reaksiyona giren aldehitlerin hidrosiyanasyonu üzerinde ispatlamışlardır. (R)-oksinitrilaz CLEA'sını aktivite kaybı olmadan 10 kez geri kazanmışlardır.

Yu ve ark. (2006), *Candida rugosa* lipaz enzimini CLEA yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Öncelikle, oluşan CLEA'ların partikül büyüklüğüne, çöktürücü olarak kullanılan tuz türünün etkisini incelemişlerdir. En büyük partikül

boyutunu (16.86 µm) $(NH_4)_2SO_4$ tuzu ile yapılan CLEA'larda elde ettikleri için bu tuzu tercih etmişlerdir. *C. Rugosa* Lipaz protein agregatlarının partikül boyutları üzerine $(NH_4)_2SO_4$ konsantrasyonunun etkisini incelemişlerdir. Glutaraldehit miktarı sabit tutularak, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanan $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisinin farklı derişimlerini denemişler ve optimum $(NH_4)_2SO_4$ derişimini saptamışlardır. Daha sonra $(NH_4)_2SO_4$ miktarını sabit tutarak, farklı derişimlerde glutaraldehit çözeltisinden optimum glutaraldehit derişimini belirlemişlerdir. Partikül büyüklüğü üzerine pH'nın etkisini incelediklerinde ise, optimum pH'nın 10 olduğunu tespit etmişlerdir. *C. Rugosa* lipaz protein agregatlarının partikül boyutu üzerinde enzim konsantrasyonunun etkisini incelemişlerdir.Bunun için, $(NH_4)_2SO_4$ ve glutaraldehit miktarını sabit tutarak enzim çözeltisinden farklı derişimlerde almışlar ve optimum enzim derişimini belirlemişlerdir. Çapraz bağlı lipazın enantiyoseçiciliğinde; çapraz bağlı lipazın E değerinin (23.3) doğal lipazın E değerinden 1.8 kat daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Sheldon (2007b), bu tarama makalesinde enzim immobilizasyonu için çok yönlü ve etkili yeni bir metod olan CLEA yöntemini tanımlamıştır. Bu yöntemin hızlı optimizasyon için oldukça basit olduğunu ve hidrolaz, liyaz, nitril hidrataz, oksinitrilaz, oksidoreduktaz gibi birçok enzime uygulanabilirliğini göstermiştir. CLEA'ların kararlı, geri dönüşümlü katalizörler olduğunu ve yüksek katalizör verimliliği gösterdiğini belirtmiştir. Ayrıca metod ilk adımda saflaştırma ve immobilizasyonun bir bileşimi olduğundan enzimin yüksek saflığını gerektirmeyeceğini belirtmiştir.

Aytar ve Bakir (2008), Mantardaki tirosinazı amonyum sülfat ile çöktürüp, glutaradehitle çapraz bağlayarak CLEA yöntemiyle immobilize etmişlerdir. CLEA aktivitesi üzerine, çöktürme ve çapraz bağlamanın etkisiyle birlikte immobilize edilen tirosinazın karakterizasyonunu araştırmışlardır. CLEA'ların aktivite kazanımı üzerine amonyum sülfat derişiminin etkisi incelemişler ve farklı derişimlerde amonyum sülfat kullanmışlardır. Her bir amonyum sülfat derişimi için, enzim, sığır serum albumini ve glutaraldehit miktarını sabit tutarak optimum amonyum sülfat derişimini belirlemişlerdir. Reaksiyonu pH 7' de oda sıcaklığında gerçekleştirmişler ve agregatların partikül boyutlarını küçültmüşlerdir. Termal ve depolama

kararlılıklarını yükselterek CLEA'larda %100 aktivite kazanımı elde etmişlerdir. Tirosinaz aktivitesine, pH ve sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Serbest ve immobilize tirosinazın optimum sıcaklıklarının, enzim aktivitelerinin ölçüldüğü 25-35°C aralığında olduğunu belirlemişlerdir. Serbest ve immobilize tirosinazın optimum pH'larını ise 6,5 ve 7 olarak belirlemişlerdir. Tirosinazın depolama kararlılığı üzerine immobilizasyonun etkisini araştırmışlar ve CLEA'ların üç aydan daha fazla süre oda sıcaklığında saklandığında % 83 aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bundan dolayı, CLEA'ların tirosinazın raf ömrünü oldukça artırdığını belirtmişlerdir.

Cabana ve ark. (2007), Küf mantarı *Coriolopsis polyzon'*daki lakkazı CLEA yöntemiyle ilk kez immobilize etmişlerdir. Lakkaz CLEA'ları hazırlanırken çöktürücü olarak polietilen glikol (PEG) (enzim çözeltisinin litresi başına 1000 g), çapraz bağlayıcı etken olarak ise, glutaraldehit (200µM) kullanmışlardır. Bu CLEA'larda 148 U g^{-1} lakkaz aktivitesi ve % 60,2 aktivite kazanımı elde etmişlerdir. Substrat olarak, 2-2'-azido-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) kullanmışlardır. Çöktürücü olarak PEG, amonyum sülfat, metanol ve aseton kullanmışlar en iyi sonucu PEG'den elde etmişlerdir. Optimum glutaraldehit derişimini 200µM olarak saptamışlardır. Sonuçta, Lakkaz CLEA'larını endokrin parçalayıcı kimyasallar olan, nonilfenol, bisfenol ve triklosanın eliminasyonunda başarılı bir şekilde kullanmışlardır.

Sangeetha ve Abraham (2008), Triton X-100, tween 20 gibi yüzey aktif maddeleriyle, amonyum sülfat ve PEG kullanılarak ***Bacillus subtilis***'in ürettiği subtilisin enzimini (proteaz aktivitesi) çöktürmüşler ve glutaraldehit ile çapraz bağlamışlardır. Amonyum sülfatla yapılan çöktürmede maksimum aktivite elde etmişlerdir. Hekzan ve siklohekzan gibi apolar çözücülerle, isopropanol ve etil asetat gibi organik çözücülerde CLEA'nın kararlılığını incelemişlerdir. Subtilisin CLEA'nın aktivitesi üzerine pH'ın, sıcaklığın etkisini, CLEA'nın termal kararlılığını, tekrar kullanımını, kinetik parametrelerini ve organik çözücüdeki subtilisin CLEA'nın kararlılığını incelemişlerdir. Subtilisin CLEA'nın optimum pH'sını 9, optimum sıcaklığını 70ºC bulmuşlardır. Subtilisin CLEA' nın hekzan ve siklohekzan gibi polar olmayan organik çözücülerde iyi bir kararlılığa ve 60ºC'den daha yüksek

termal kararlılığa sahip olduğunu göstermişlerdir. Böylece sulu ortamlarda çözünmeyen bileşiklerin biotransformasyonları için biyokatalizör olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Subtilisin CLEA 60ºC'de 11 kez kullanıldıktan sonra aktivitenin yaklaşık olarak %68' nin kaldığını göstermişlerdir. Enzimin katalitik etkinliği (k_{cat}) immobilizasyondan sonra 0,147 mol s^{-1}enzim molü$^{-1}$'den 8,71 mol s^{-1}enzim molü$^{-1}$' ne yükseldiğini göstermişlerdir. Bu değerdeki artışın enzim ve substrat arasındaki etkileşimin immobilizasyondan sonra güçlenmiş olmasına bağlamışlardır. Farklı CLEA örneklerinin 2500x ve 5000x büyütülmüş SEM fotoğraflarında 1 ya da 2 mikron boyutundaki enzim mikroagregatlarının yüzey morfolojisinin tek düze bir yapıya sahip olduğunu göstermişlerdir. Çöktürücülerin ve surfaktanların mikro agregatların boyutunda ve morfolojisinde çok etkili olmadığını belirtmişlerdir.

Hara ve ark. (2008), *Burkholderia cepacia* (eski adının *Pseudomonas cepacia)*' dan Lipaz PS' nin CLEA' sını 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda çöktürücü olarak doygun amonyum sülfat çözeltisi(9 mL), çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit(377µL, 100 mM, %25 suda) kullanmak suretiyle 4°C' de 5 saat karıştırarak hazırlamışlardır. Jeli kurutmak için liyofilizasyon kullanarak düşük metanol şartlarında sol jellerden Lipase PS' yi immobilize etmişlerdir. Çöktürücü olarak amonyum sülfat dışında 1,2- dimetoksietan, aseton ve etanol kullanmışlardır. Çöktürme sırasında (%446) ve çapraz bağlanma sonrasında (%174) en yüksek aktivitenin doygun amonyum sülfatla (9 mL) hazırlanan CLEA' da görüldüğünü açıklamışlardır. BSA ile hazırlanan CLEA' ların aktivitelerinde BSA' sız hazırlanan CLEA' lara göre % 100' ün üzerinde (12 kata kadar) aktivite artışı gözlendiğini, bu farklılığın eski ticari *Burkholderia cepacia* lipaz örneklerindeki kizelgura nazaran lipaz PS tozundaki dekstrinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

García ve ark. (2010), *Bacilus pumilus*' tan ilk kez bir rekombinant asetil ksilan esteraz (AXE)' ın CLEA' sının hazırlandığını bildirmişlerdir. 5,3 mg/mL derişimindeki saf enzimi 3,2 M (% 80 doygunlukta) amonyum sülfatla çöktürdükten sonra çapraz bağlayıcı olarak %1(v/v) glutaraldehit kullanarak 3 saatte CLEA hazırlamışlardır. Karıştırma hızı ve süresi artırıldığında CLEA aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir. Serbest enzime göre CLEA' nın pH'sının ekstrem değerlere (pH 3-

11) karşı daha dirençli olduğunu açıklamışlardır. Çözünür enzim 3 ay boyunca 4°C ve oda sıcaklığında saklandığında enzim aktivitesi sırasıyla %80 ve >%90 oranlarında azalırken, CLEA' da bu oranın %20 ve %45 olduğunu belirtmişlerdir. Çözünür enzim 55 °C' de 5 dk ısıtıldığında tamamen inaktive olurken aynı muameleye tabi tutulan CLEA için geriye kalan enzim aktivitesinin yaklaşık %80 olduğunu bildirmişlerdir. CLEA' ların SEM görüntülerindeki amorf yapıları çöktürücülerin farklılığına bağlı olarak açıklamışlardır. Amonyum sülfatla elde edilen CLEA' ların asetonitril ve t-butanol ile elde edilen CLEA' lara göre daha düzenli yapıda olduğunu belirmişlerdir. Sulu ortamdaki β-lactam antibiyotiklerinin üretiminde asetil ksilan esteraz (AXE) CLEA' larının potansiyelini araştırmak amacıyla amonyum sülfat- CLEA' larını kullanarak 7-amino cephalosporanic asit (7-ACA) ve cephalosporin C (CPC)' nin deasetilasyonunu çalışmışlar ve 100 dk sonra 25 °C' de 500 µg CLEA' daki 200 mM 7-ACA' nın tamamının deasetile olduğunu açıklamışlardır. Serbest enzim ve CLEA' da β- lactam substratı olan 7-ACA' nin K_m, V_{max} ve K_{cat}/K_m değerlerini sırasıyla serbest enzim için, 20,6 mM, 23,3 µmol/dk mg, 266,7 $dk^{-1}mM^{-1}$; CLEA için 70,8 mM, 14,0 µmol/dk mg, 46,6 dk^{-1} mM^{-1}; CPC' nin K_m, V_{max} ve K_{cat}/K_m değerlerini sırasıyla serbest enzim için, 215 mM, 81 µmol/dk mg, 88,6 dk^{-1} mM^{-1}; CLEA için 144,5 mM, 59,3 µmol/dk mg, 96,5 dk^{-1} mM^{-1} olarak belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Fluka, Merck ve Sigma firmalarından sağlanmıştır. Araştırmada kullanılan kimyasallar, araç ve gereçler şunlardır:

3.1.1. Kimyasallar

Bu çalışmada Sığır karaciğer katalazı (C9322-10G 3940 U/mg prot.), glutaraldehit (GA), amonyum sülfat, potasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, hidrojen peroksit, sodyum hidroksit, sığır serum albumini (BSA), fosforik asit, aseton, sülfirik asit, borik asit, sitrik asit, asetik asit kullanılmıştır.

3.1.2. Araç ve gereçler

Bu çalışmada UV-Vis spektrofotometre (SHIMADZU), soğutmalı santrifüj (HETTICH), inkübatör (BINDER), pH metre (HANNA8424), magnetik karıştırıcı, elektrikli terazi, otomatik pipet (Eppendorf, Mikrolit), girdap karıştırıcı, termostatlı çalkalayıcılı su banyosu, sonikatör (COLE-PARMER), Atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS) (PERKIN ELMER AANALYST 400) kullanılmıştır. Ayrıca, CLEA-CAT örneklerinin görüntülerinin incelenmesi amacıyla İnönü Üniversitesinde bulunan taramalı elektron mikroskobu (SEM) (EVO 40 LE BROKER 125 eV) kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. CLEA-CAT Hazırlanması

CLEA-CAT' ın hazırlanmasında Yu ve ark. (2006) önerdiği yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. 20 mg/mL derişimindeki 0, 252 g saf katalaz, 6,8 ml (50

mM, pH 7,0) fosfat tamponunda çözüldükten sonra derişimi % 70 (w/v) olacak şekilde 4,72 g amonyum sülfat eklenerek çöktürülmüştür. Daha sonra katalazın tamamının çökmesi için 4ºC'de 15 dakika bekletilmiş ve çöktürme sağlandıktan sonra üzerine 140 mM derişimindeki 3,2 ml glutaraldehit eklenerek sürekli karıştırılmıştır. Karışım, 4ºC'de çalkalayıcılı su banyosunda 6 saat bekletildikten sonra saf su ile süzüntüde glutaraldehit kalmayıncaya kadar yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra çökeltinin kurumasını hızlandırmak amacıyla, 1 ml aseton eklenmiştir. Süzüntüde glutaraldehit ve protein olup olmadığını kontrol etmek için 280 nm' de süzüntüde absorbans görülmeyinceye kadar yıkama işlemi yapılmıştır. Oluşan CLEA-CAT çökeltisi soğutmalı inkübatörde kurutulduktan sonra 4ºC'de kullanılıncaya kadar bekletilmiştir.

3.2.1.1. CLEA-CAT Örneklerinin Hazırlanmasında İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

- Optimum amonyum sülfat derişiminin belirlenmesi amacıyla çöktürücü olarak kullanılan amonyum sülfatın son derişimi % 50, 60, 70 (w/v) olacak şekilde immobilizasyon ortamı hazırlanmış ve immobilizasyon yapılmıştır. En yüksek CLEA-CAT aktivitesinin elde edildiği amonyum sülfat derişimi belirlenmiştir.

- Optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi amacıyla, immobilizasyon ortamında glutaraldehitin son derişimi, 35, 70, 140 ve 210 mM olacak şekilde CLEA-CAT örnekleri hazırlanmıştır ve en yüksek aktivitenin görüldüğü glutaraldehit derişimi belirlenmiştir.

- Optimum immobilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla, 1, 2, 4, 6 ve 16 saatlik CLEA-CAT örnekleri hazırlanmıştır. En yüksek CLEA-CAT aktivitesinin elde edildiği immobilizasyon süresi belirlenmiştir.

- Optimum immobilizasyon pH'sının belirlenmesi amacıyla, CLEA-CAT örnekleri pH 5,0-8,0 aralığında hazırlanmıştır. En yüksek CLEA-CAT aktivitenin elde edildiği immobilizasyon pH'sı belirlenmiştir.

- CLEA-CAT örneklerinin hazırlanmasında ortamdaki enzim + protein miktarının CLEA-CAT aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bunun için farklı derişimlerde katalaz (CAT) ve inert bir protein olan sığır serum albumini (BSA)

kullanılmıştır. 20 mg/ml CAT; 10 mg/ml CAT + 10 mg/ml BSA; 20 mg/ml CAT + 10 mg/ml BSA; 20 mg/ml CAT + 20 mg/ml BSA alınarak CLEA-CAT örnekleri hazırlanmış ve en yüksek aktivitenin olduğu CAT veya CAT + BSA derişimi belirlenmiştir.

3.2.2. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT Aktivitesinin Ölçülmesi

CLEA-CAT' ın aktivite ölçümü Aebi (1974) tarafından önerilen Lartillot ve ark. (1988) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. Enzimatik aktivite tayini, Hidrojen peroksidin 240 nm'deki absorbansının enzim ile etkileşmesinden sonra zamanla azalmasına bağlı olarak yapılmıştır. Hidrojen peroksit için molar ekstinksiyon katsayısı 0.0396 $cm^2/\mu mol$'dür (Tükel ve Alptekin, 2007). 10 mg CLEA-CAT alınarak üzerine 50 mM fosfat tamponu (pH:7,0) içinde 10 mM H_2O_2 olacak şekilde hazırlanan substrat çözeltisinden 5 ml eklenmiş ve 2 dk sonra reaksiyon 1,0 ml 1,0 M HCl çözeltisi ile durdurulmuştur. 3500 rpm' de 20 dk santrifüj edilmiş ve üst faz alınarak 240 nm' de absorbansı ölçülmüştür (Ar). Başlangıçtaki H_2O_2 absorbansını belirlemek için (As); 5,0 ml substrat ve 1,0 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Proteinden kaynaklanan absorbansı belirlemek için (At); 10 mg CLEA-CAT, 5,0 ml tampon çözelti ve 1,0 ml HCl içeren karışım 3500 rpm' de 20 dk santrifüj edildikten sonra üst faz alınarak absorbansı ölçülmüştür. Kör olarak 5,0 ml tampon (50 mM, pH=7.0) ve 1,0 ml 1M HCl içeren çözelti kullanılarak aynı işlemler tekrarlanmıştır.

Serbest katalazın karakterizasyonunda optimum sıcaklık, termal kararlılık ve depolama kararlılığı için yapılan aktivite ölçümü Aebi (1974) tarafından önerilen Lartillot ve ark.(1988) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. 50 mM fosfat tamponu (pH:7,0) içinde 10 mM H_2O_2 olacak şekilde hazırlanan 2,5 ml substrat çözeltisi üzerine 1,0 mg' ı 50 ml (50 mM pH 7,0) tampon içerisinde çözülmüş katalaz (1mg/50 ml) çözeltisinden 20 µl eklenerek 2 dk sonra reaksiyonu durdurmak için ortama 0,5 ml 1 M HCl çözeltisi ilave edilmiş ve 240 nm'de absorbansı (Ar) ölçülmüştür. H_2O_2'nin başlangıçtaki absorbansını (As) belirlemek için; 2,5 ml substrat ve 0,5 ml 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Proteinin neden olacağı absorbansı (At) belirlemek için; 20 µl enzim çözeltisi, 2,5 ml tampon ve 1 M

HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Bu çalışmada aktivite, µmol H_2O_2 /mg protein dk. (U/ mg protein) olarak hesaplanmıştır.

Enzimatik aktiviteden kaynaklanan absorbans (A) değişimi;

$$A = (As + At) - Ar$$

Enzim aktivitesinin IU/ml cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır(Tükel ve Alptekin, 2007).

$$Akt = \frac{A.Vt}{\varepsilon.t.Ve}$$

V_t : Toplam reaksiyon hacmi

V_e : Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi

ε : H_2O_2'nin molar ekstinksiyon katsayısı (0,0396 cm^2/µmol)

t : Reaksiyon zamanı (dakika)

Ayrıca serbest katalazın karakterizasyonunda optimum pH ve optimum tampon derişiminin belirlenmesi için yapılan aktivite ölçümünde Stern (1937) ve Beers ve ark. (1952) tarafından önerilen yöntemden yararlanılmıştır. Bu yöntemde, katalazın saf suda çözülmesiyle 1mg/50ml derişiminde çözelti hazırlanmıştır. Substrat çözeltisi olarak, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 20 mM H_2O_2 çözeltisi hazırlanmıştır. Substrat çözeltisinin 240 nm' deki absorbansı 0, 550 ve 0, 520 aralığında olmalıdır. Yöntemin uygulanmasında, kuartz küvete alınan 2,9 ml substrat çözeltisinin üzerine 0,1 ml enzim çözeltisi eklenmiş ve absorbansının 0,450' den 0,400' e azalma süresi kaydedilmiştir. Enzim aktivitesinin IU/ml cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Ünite/ ml enzim = 3,45x(sf) / süre(dk)x0,1

sf = seyreltme faktörü

3.2.3. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT' ın Karakterizasyonu

3.2.3.1. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT' ın Optimum pH'larının Belirlenmesi

Farklı pH' larda (pH 4,5 sitrat, 5,0, 5,5 asetat, pH 6,0 sitrat, pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat, pH 9,0 borat) 50 mM derişiminde çözeltiler hazırlanarak 25°C'de serbest katalaz ve CLEA-CAT örneklerinin aktiviteleri ölçülmüş ve maksimum aktivite gösterdiği pH'lar belirlenmiştir.

3.2.3.2. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT' ın Optimum Tampon Derişimlerinin Belirlenmesi

Optimum pH' sı belirlenmiş olan tamponun 25, 50, 75 ve 200 mM derişimlerinde çözeltileri hazırlanarak 25°C'de serbest katalaz ve CLEA-CAT örneklerinin aktiviteleri ölçülmüş ve maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimleri belirlenmiştir.

3.2.3.3. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT' ın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Optimum pH ve tampon derişimi belirlenmiş olan Serbest Katalaz ve CLEA-CAT örneklerinin farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50°C'de) aktiviteleri ölçülerek maksimum aktivite gösterdiği sıcaklıklar belirlenmiştir.

3.2.3.4. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT' ın Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest katalazın daha önce optimum pH ve derişimi belirlenmiş olan uygun tampon içerisinde çözeltisi hazırlanarak termal kararlılığının belirlenmesi için 50°C'de farklı sürelerde (1, 3, 7, 15 saat) bekletilerek 25°C'de katalazın kalan aktivitesi ölçülmüştür. CLEA-CAT örnekleri, 35 ve 50°C'lerde farklı sürelerde (1, 3, 7, 15 saat) bekletilerek 25°C'de immobilize katalazların kalan aktivitesi ölçülmüştür.

3.2.3.5. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT' ın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Serbest katalaz ve CLEA-CAT örneklerinin aktiviteleri daha önce belirlenmiş olan optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde (2,5-25,0 mM) ölçülmüş ve Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Ayrıca serbest katalaz için geri dönüşüm sayısı (k_{cat}) ile katalitik etkinliği (k_{cat}/K_m) hesaplanmıştır.

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

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

3.2.3.6. Serbest Katalaz ve CLEA-CAT' ın Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

50 mM pH 7,5 fosfat tamponunda çözeltisi hazırlanmış olan serbest katalazın ve kurutulmuş CLEA-CAT örneklerinin başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra belirli zaman aralıklarında 5 $^{\circ}$C ve oda sıcaklığında bekletilerek kalan aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.3.7. CLEA-CAT' ın Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

CLEA-CAT örneğinin kesikli reaktörde tekrar kullanım kararlılığının araştırılmasında, çapı 1,5 cm uzunluğu 6,0 cm olan kolon kullanılmıştır. CLEA-CAT örneğinden 50 mg tartılarak üzerine 10 mM H_2O_2 çözeltisinden 5 ml eklenmiş ve 2 dk sonunda çözelti kolondan hızla uzaklaştırılarak H_2O_2' in 240 nm' deki absorbansı ölçülmüştür. CLEA-CAT'ın tekrar kullanımına bağlı aktivite değişimini incelemek amacıyla aynı işlemler tekrarlanmıştır.

3.2.4. CLEA-CAT Örneklerinde CAT Miktarının Belirlenmesi

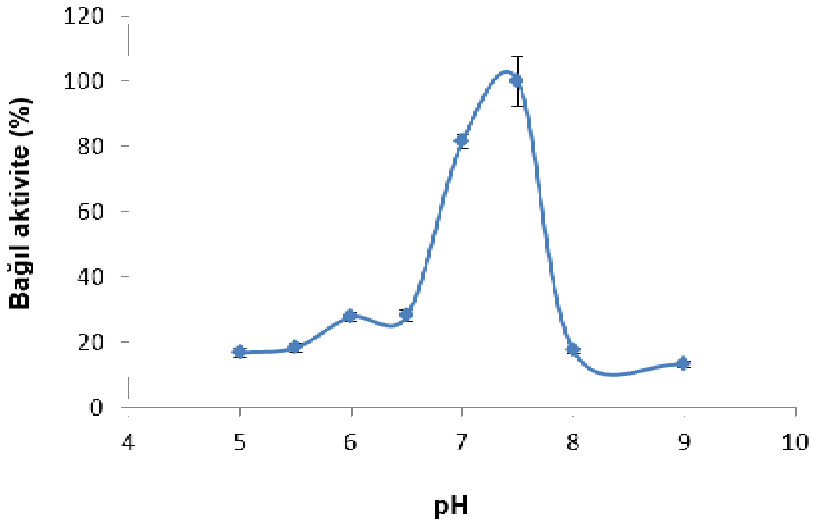
CLEA-CAT Örneklerinde katalaz miktarının belirlenmesi için Alptekin ve ark. (2008) tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemde, CLEA-CAT örneklerindeki bağlanan katalaz miktarını ve bağlanma yüzdesini hesaplayabilmek için katalazın yapısında bulunan demirin AAS ile belirlenmesinden yararlanılmıştır. Protein standardı olarak sığır karaciğer katalazı kullanılmıştır. Her bir CLEA-CAT örneğinden 15 mg alınarak 4,0 ml H_2SO_4' te çözdükten sonra 3,0 ml H_2O_2 eklenerek saf suyla 10 ml' ye tamamlanmıştır. 6,25 ppm derişiminde stok çözeltinin hazırlanması; 0,670 g sığır karaciğer katalazı alınarak 4,0 mL H_2SO_4' te çözüldükten sonra 3,0 ml H_2O_2 eklenerek saf su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır. Stok çözeltiden son derişimleri 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 ve 2,5 ppm olacak şekilde sırasıyla 2,5, 5,0, 7,5, 10 ve 12,5 ml alınarak saf suyla 25 ml'ye tamamlanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

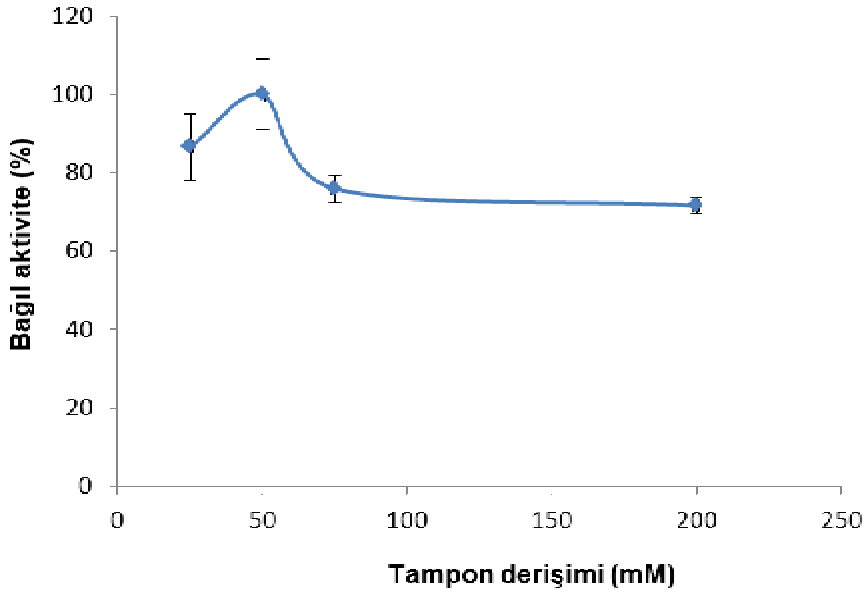
4.1.1. Serbest Katalazın Karakterizasyonu

Serbest katalazın optimum aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek için farklı pH' larda (pH 5,0, 5,5 asetat, pH 6,0 sitrat, pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat, pH 9,0 borat) hazırlanan tamponların 50 mM derişimindeki çözeltileri kullanılarak 25°C'de katalazın aktivitesi ölçülmüş ve maksimum aktivite gösterdiği pH 7,5 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).



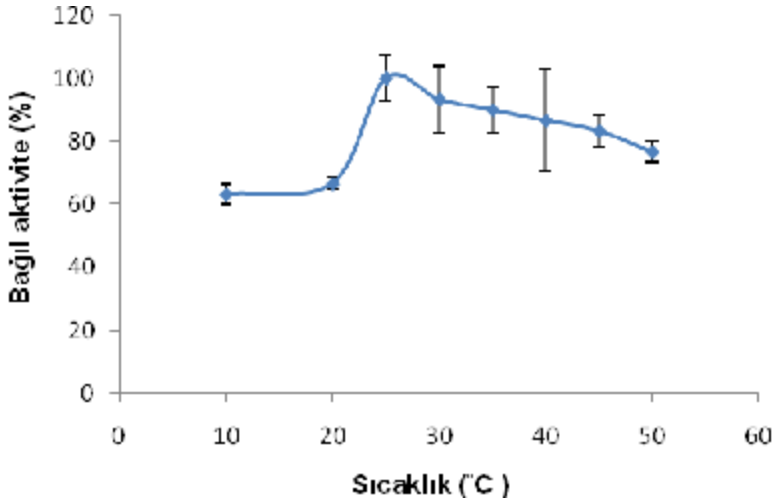
Şekil 4.1. Serbest katalaz aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

Serbest katalaz aktivitesi pH 7,5' te ve farklı tampon derişimlerinde (25, 50, 75 ve 200 mM) hazırlanmış olan substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüş ve maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Serbest katalaz aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi.

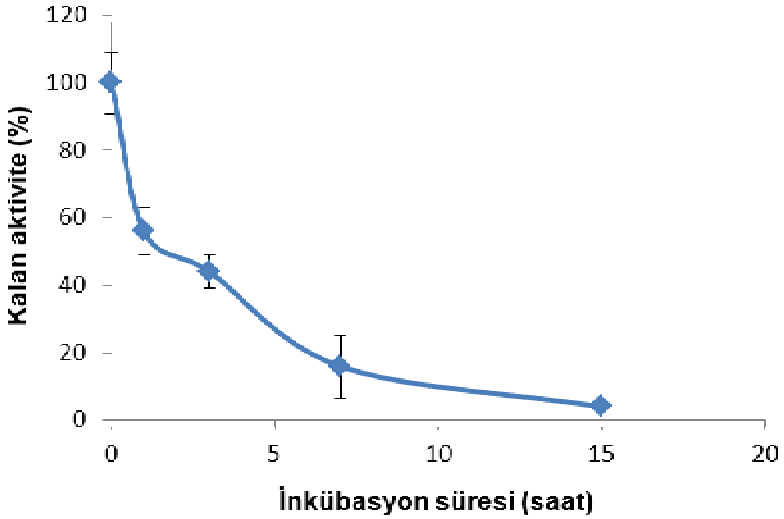
Serbest katalaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi pH 7,5 50 mM fosfat tamponu kullanılarak farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50°C'de) ölçülmüş ve enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 25°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Serbest katalaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

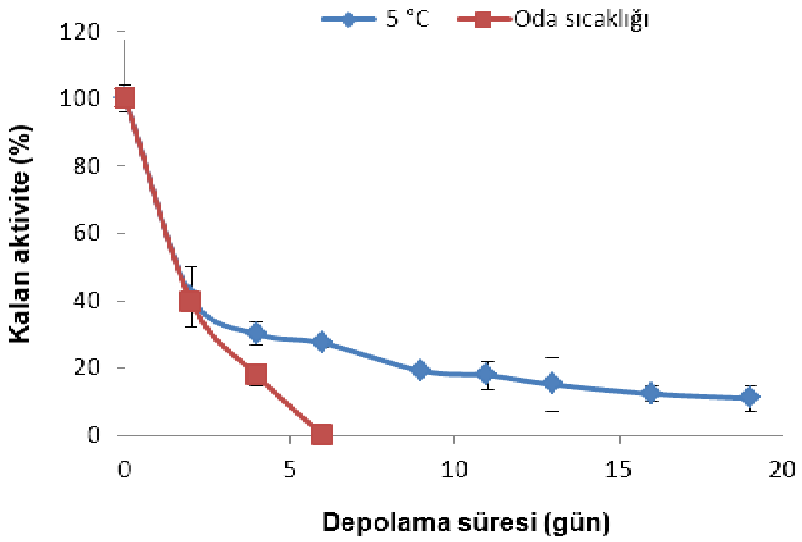
Serbest katalazın termal kararlılığını belirlemek için enzim 50°C sıcaklıkta farklı sürelerde (1, 3, 7, 15 saat) bekletilerek 25°C'de aktivitesi ölçülmüştür. Serbest

katalaz 50 °C' de 15 saat inkübe edildiğinde aktivitesinin yaklaşık % 4' ünü korumuştur (Şekil 4.4).



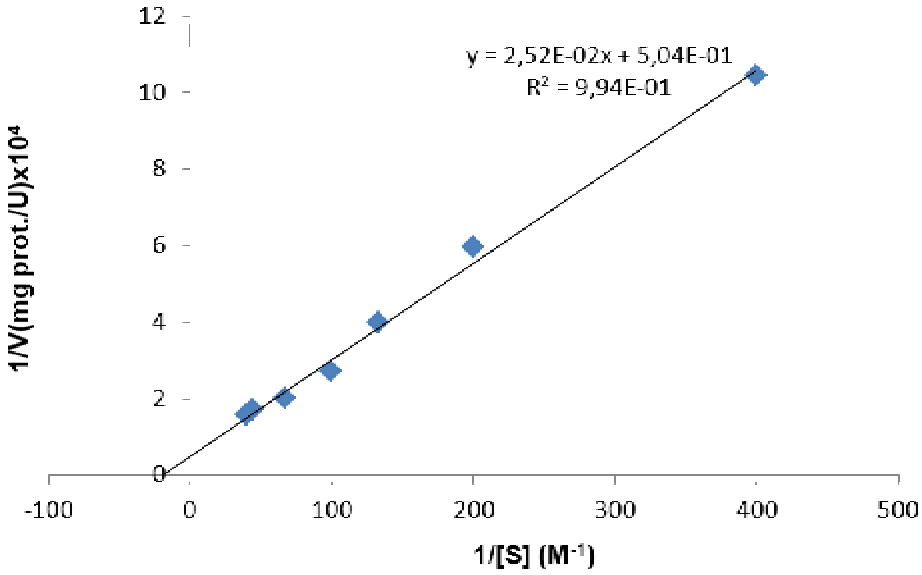
Şekil 4.4. Serbest katalazın inkübasyon süresine bağlı aktivite değişimi.

Serbest katalazın 50 mM pH 7,5 fosfat tamponundaki çözeltisi 5°C ve oda sıcaklığında bekletilerek belirli zaman aralıklarında aktivitesi ölçülmüş ve depolama kararlılığı belirlenmiştir. Serbest katalaz, 5°C'de bekletildiğinde 19 gün sonra başlangıç aktivitesinin % 11' ini korurken, oda sıcaklığında ise, 6 gün sonra aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Serbest katalazın aktivitesinin depolama süresine bağlı değişimi.

Serbest katalaz aktivitesi farklı substrat derişimlerinde (2,5-25,0 mM) ölçülmüş aktivite değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde gösterilmiştir (Şekil 4.6).

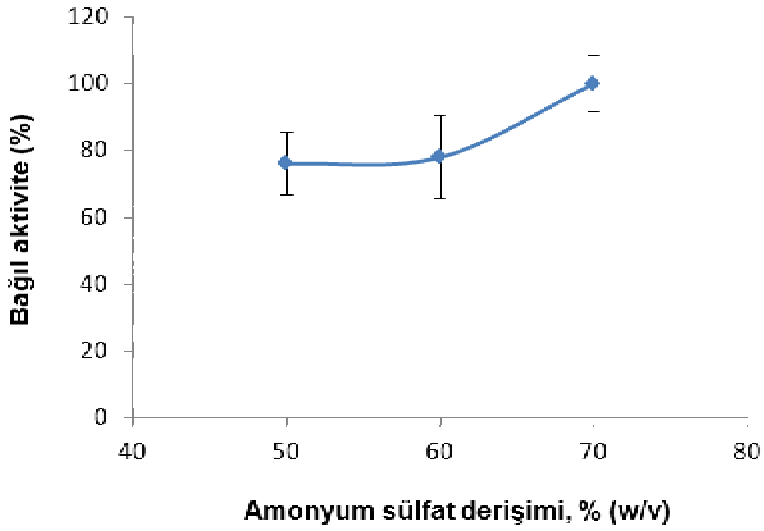


Şekil 4.6. Serbest katalaz için Lineweaver-Burk Grafiği.

Serbest Katalaz için, K_m = 50 mM H_2O_2, V_{max}=1,98x10^4 U/mg protein, turnover sayısı k_{cat}= 7,92x10^4 s^{-1} ve katalitik etkinliği k_{cat}/K_m=1,58x10^6 $s^{-1}M^{-1}$ olarak elde edilmiştir.

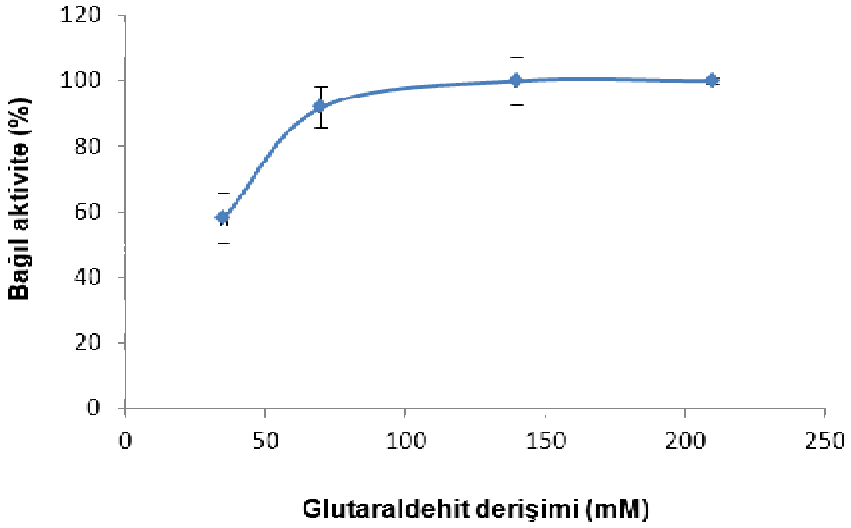
4.1.2. CLEA-CAT Örneklerinin Hazırlanmasında İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu İçin Elde Edilen Bulgular

Optimum amonyum sülfat derişimini belirlemek için çöktürücü olarak kullanılan amonyum sülfatın son derişimi % 50, 60, 70 (w/v) olacak şekilde immobilizasyon ortamı hazırlandı ve immobilizasyon yapıldı. En yüksek CLEA-CAT aktivitesinin elde edildiği amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7).



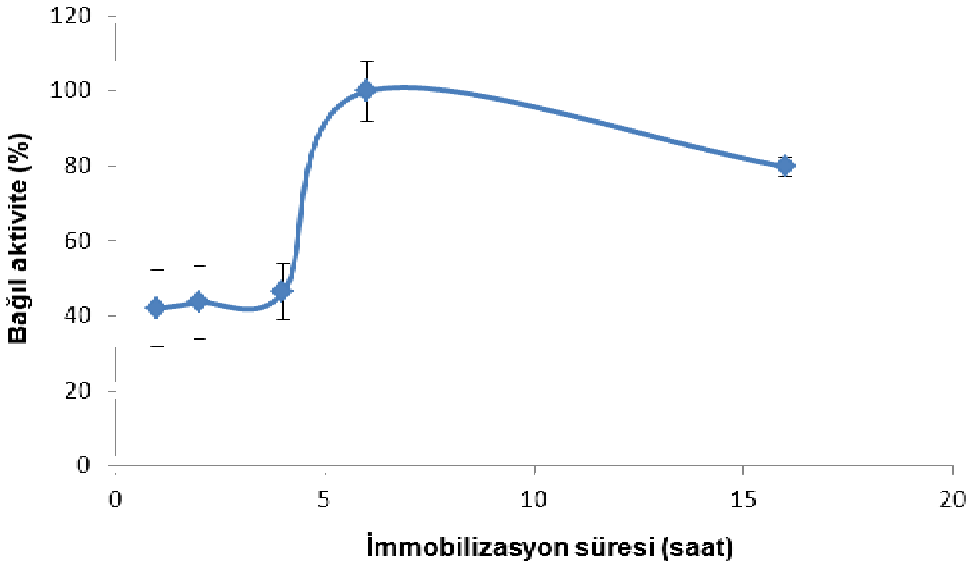
Şekil 4.7. İmmobilizasyon ortamındaki amonyum sülfat derişimine bağlı olarak CLEA-CAT örneklerinin aktivitelerindeki değişim.

Optimum glutaraldehit derişiminin belirlenmesi amacıyla, immobilizasyon ortamında glutaraldehitin son derişimi, 35, 70, 140 ve 210 mM olacak şekilde CLEA-CAT örnekleri hazırlanmıştır ve en yüksek aktivitenin görüldüğü glutaraldehit derişimi 140 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8).



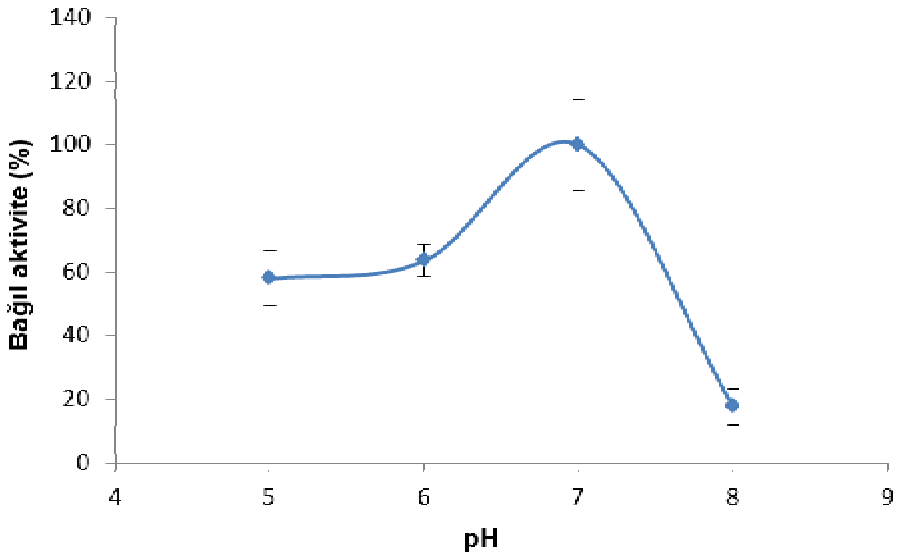
Şekil 4.8. İmmobilizasyon ortamındaki glutaraldehit derişimine bağlı olarak CLEA-CAT örneklerinin aktivitelerindeki değişim.

Optimum immobilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla, 1, 2, 4, 6 ve 16 saatlik CLEA'lar hazırlanmıştır. En yüksek CLEA-CAT aktivitesinin elde edildiği immobilizasyon süresi 6 saat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. İmmobilizasyon süresine bağlı olarak CLEA-CAT örneklerinin aktivitelerindeki değişim.

Optimum immobilizasyon pH'sının belirlenmesi amacıyla, CLEA-CAT örnekleri pH 5-9 aralığında hazırlanmıştır. En yüksek CLEA-CAT aktivitesinin elde edildiği immobilizasyon pH'sı 7,0 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10) .



Şekil 4.10. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak CLEA-CAT örneklerinin aktivitelerindeki değişim.

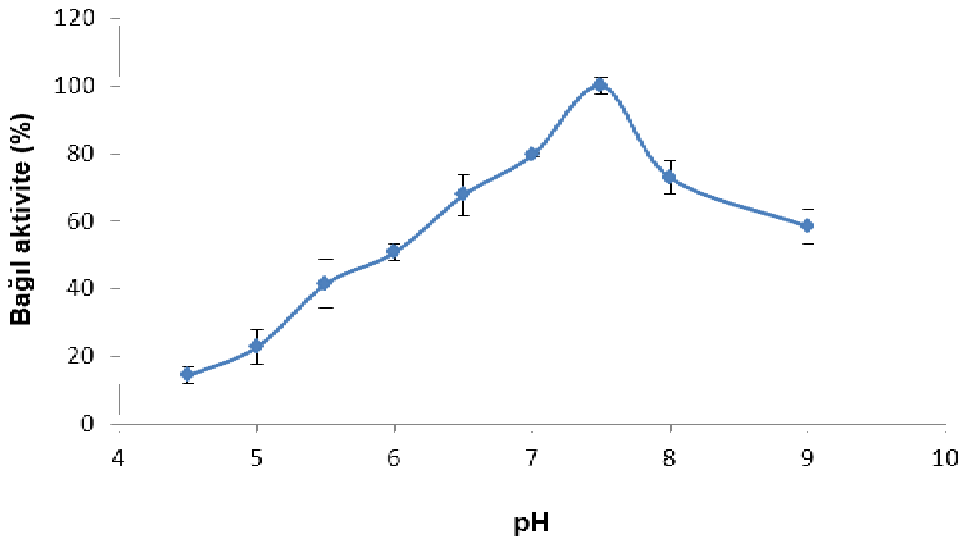
CLEA-CAT örneklerinin hazırlanmasında ortamdaki enzim + protein miktarının CLEA-CAT aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için farklı derişimlerde katalaz ve inert bir protein olan sığır serum albumini kullanılmıştır. 20 mg/ml CAT; 10 mg/ml CAT + 10 mg/ml BSA; 20 mg/ml CAT + 10 mg/ml BSA; 20 mg/ml CAT + 20 mg/ml BSA alınarak CLEA-CAT örnekleri hazırlanmış ve en yüksek aktivite 10 mg/ml CAT + 10 mg/ml BSA kullanılarak hazırlanan CLEA-CAT'dan elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Katalazın immobilizasyonu için CAT+BSA oranının belirlenmesi.

CLEA-CAT Örnekleri	**Bağıl Aktivite (%)**
20 mg/ml CAT	55
20 mg/ml CAT + 20 mg/ml BSA	28
20 mg/ml CAT + 10 mg/ml BSA	40
10 mg/ml CAT + 10 mg/ml BSA	100

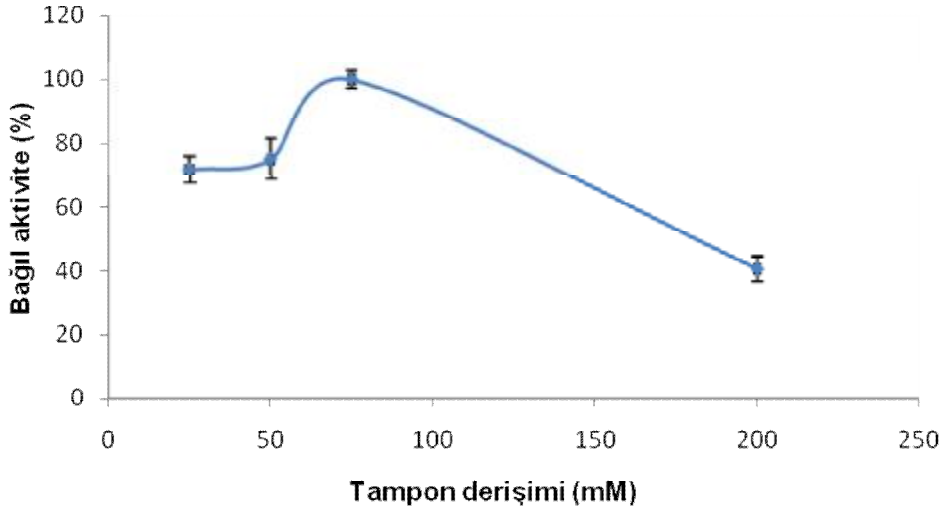
4.1.3. CLEA-CAT' ın Karakterizasyonu

CLEA-CAT' ın hazırlanmasında optimum immobilizasyon koşulları belirlendikten sonra karakterizasyon için öncelikle CLEA-CAT' ın maksimum aktivite gösterdiği pH belirlenmiştir. Bunun için, farklı pH'larda (pH 4,5 sitrat, 5,0, 5,5 asetat, pH 6,0 sitrat, pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat, pH 9,0 borat) 50 mM derişiminde tamponlar hazırlanarak CLEA-CAT örneklerinin aktiviteleri ölçülmüş ve maksimum aktivite gösterdiği pH 7,5 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11).



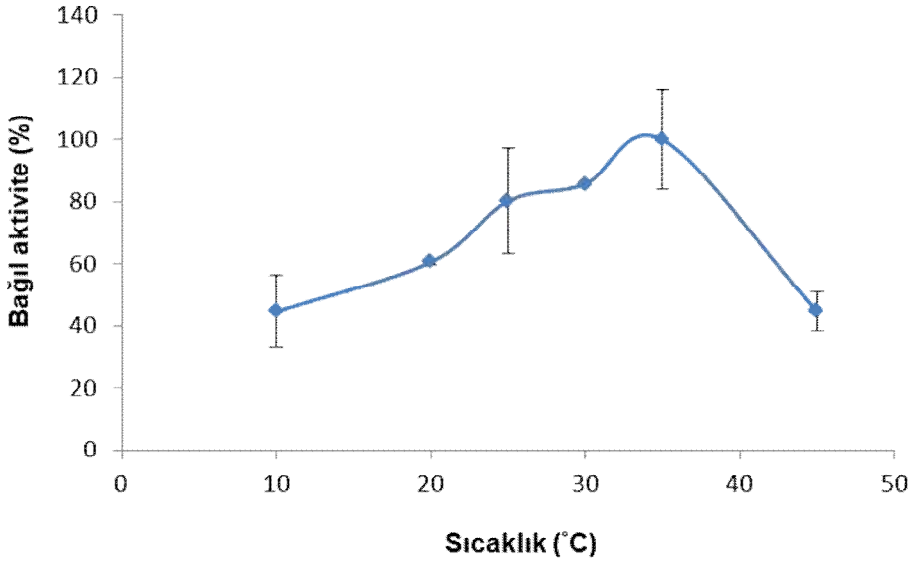
Şekil 4.11. CLEA-CAT aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

CLEA-CAT örneklerinin aktivitesi farklı derişimlerdeki (25, 50, 75 ve 200 mM) pH 7,5 fosfat tamponuyla hazırlanmış olan substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüş ve maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimi 75 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).



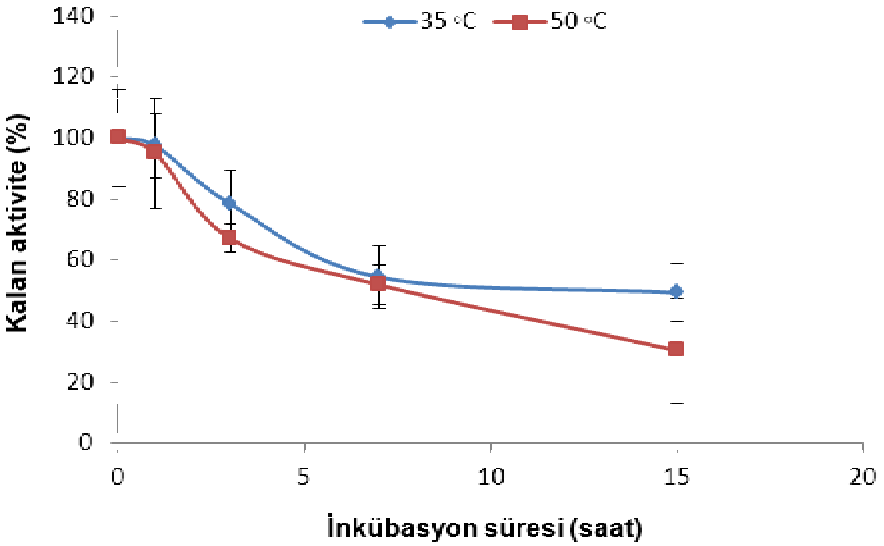
Şekil 4.12. CLEA-CAT aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi.

CLEA-CAT örneklerinin aktivitesi farklı sıcaklıklarda (10, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45°C) ölçülmüş ve maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 35°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. CLEA-CAT aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

CLEA-CAT örnekleri 35 ve 50°C' de 1, 3, 7 ve 15 saat boyunca bekletildikten sonra daha önce belirlenmiş olan pH 7,5 fosfat tamponuyla hazırlanmış olan substrat çözeltileri kullanılarak 35°C sıcaklıkta kalan aktiviteleri ölçülmüş ve inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite değişimleri belirlenmiştir (Şekil 4.14).



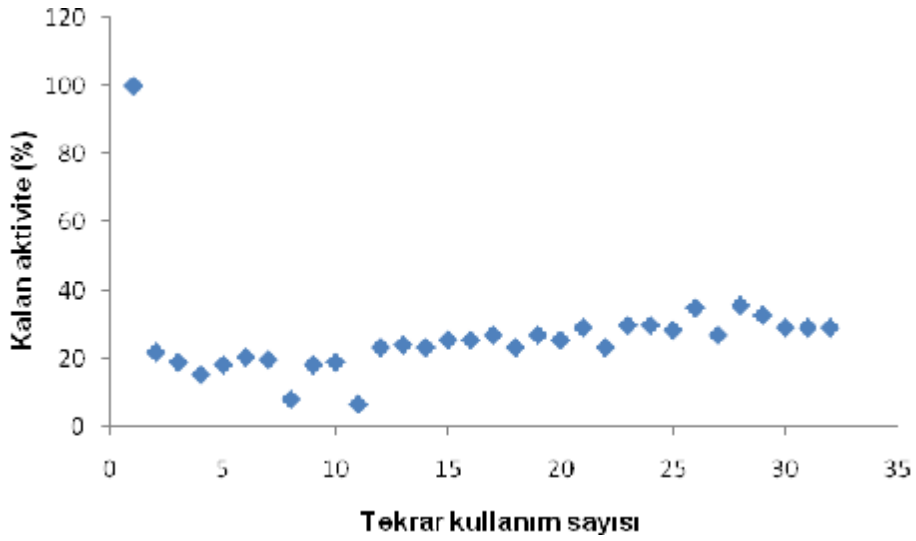
Şekil 4.14. CLEA-CAT' ın inkübasyon süresine bağlı aktivite değişimi.

CLEA-CAT örnekleri ağzı kapalı cam tüplerde 5°C ve oda sıcaklığında bekletilerek belirli zaman aralıklarında aktivitesi ölçülmüş ve depolama kararlılığı belirlenmiştir. CLEA-CAT örnekleri, 5°C'de 1 ay ve 2 ay bekletildiğinde başlangıç aktivitesinin sırasıyla %54'ünü ve %10'unu korurken, oda sıcaklığında ise, aynı sürelerde başlangıç aktivitesinin sırasıyla %54'ünü ve % 21'ini korumuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. CLEA-CAT örneklerinin aktivitesinin depolama süresine bağlı değişimi.

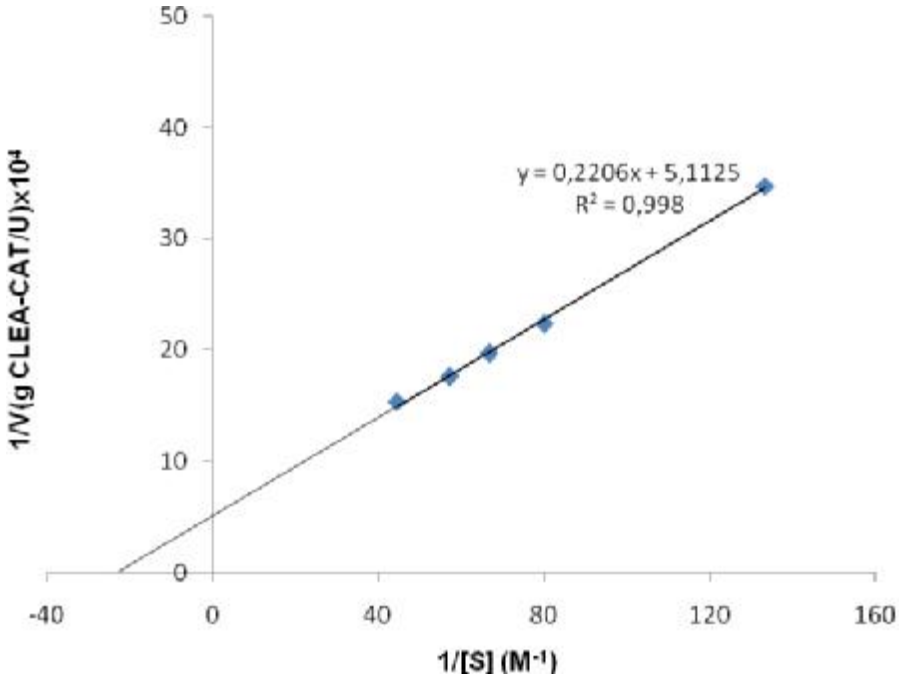
Depolama Süresi (gün)	**Kalan Aktivite (%)**	
	5 °C	**Oda sıcaklığı**
0	100	100
30	54	54
36	49	43
42	32	28
51	22	20
59	10	21

Kesikli reaktörde kolona yüklenen 50 mg CLEA örneği 32 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 29' unu korumuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. CLEA-CAT' ın kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı aktivite değişimi.

CLEA-CAT aktivitesi farklı substrat derişimlerinde (2,5-25,0 mM) ölçülmüş aktivite değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde gösterilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. CLEA-CAT için Lineweaver-Burk Grafiği.

CLEA-CAT için, K_m = 43 mM H_2O_2, V_{max}=2,0x10^3 U/g CLEA-CAT olarak bulunmuştur.

4.1.4. CLEA-CAT Miktarının Belirlenmesi

CLEA-CAT örneklerindeki bağlanan katalaz miktarı ve bağlanma yüzdesi katalazın yapısında bulunan demirin AAS ile belirlenmesinden yararlanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

Farklı amonyum sülfat derişimlerinde hazırlanan CLEA-CAT örneklerinde en fazla bağlanma % 70 (w/v) derişiminde hazırlanan CLEA-CAT örneğinde gerçekleşmiştir.

Farklı glutaraldehit derişimlerinde hazırlanan CLEA-CAT örneklerinde bağlanan katalaz miktarı 140 mM' a kadar derişimin artmasıyla birlikte artış göstermiş, 210 mM' da ise daha az miktarda katalaz bağlanmıştır.

İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu için farklı sürelerde (1, 2, 4, 6 ve 16 saat) hazırlanan CLEA-CAT örneklerinde ise, 1, 2, 4 ve 6 saatte hazırlanan

CLEA-CAT örneklerine bağlanan katalaz miktarları birbirine çok yakın iken, 16 saatte hazırlanan CLEA-CAT örneğinde artmıştır.

Farklı pH' larda (5,0, 6,0, 7,0 ve 8,0) hazırlanan CLEA-CAT örneklerine bağlanan miktarı pH' nın artmasıyla birlikte düzenli düzenli bir artış göstermemiştir. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonunda optimum pH 7,0 olarak bulunurken, bağlanan katalaz miktarının en fazla olduğu pH 6,0 olarak belirlenmiştir.

CLEA-CAT örneklerinin hazırlanmasında ortamdaki enzim+protein miktarının CLEA-CAT aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla farklı derişimlerde hazırlaan CAT+ BSA örneklerinde bağlanan katalaz miktarının diğer CLEA-CAT örneklerine göre daha düşük miktarlarda olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. CLEA-CAT örneklerinin bağlanma yüzdesindeki ve miktarındaki değişimler.

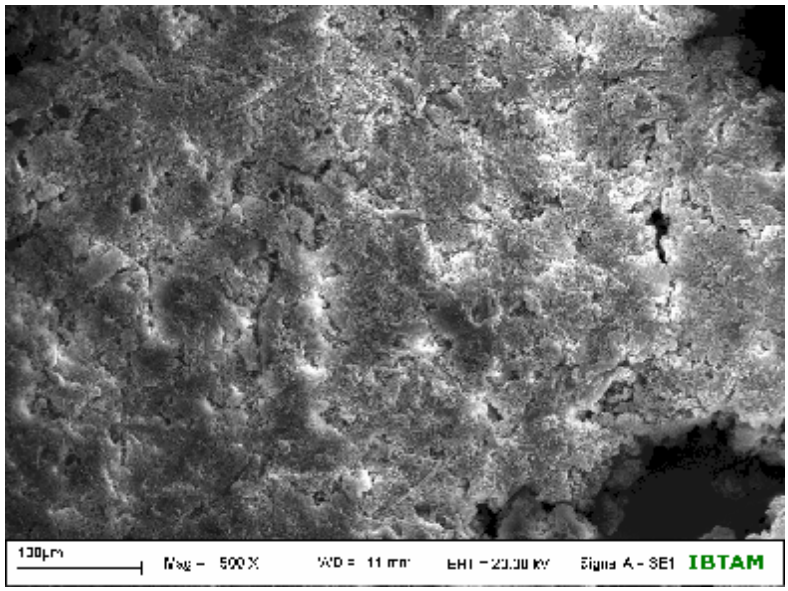
CLEA-CAT örnekleri		**Bağlanan Miktar (g CAT/ g CLEA-CAT)**	**% Bağlanma**
Amonyum sülfat derişimi (w/v)	50	0,85	79,1
	60	0,71	69,7
	70	0,90	87
Glutaraldehit derişimi (mM)	35	0,54	45
	70	0,66	65,1
	140	0,67	74,3
	210	0,58	69,3
İmmobilizasyon süresi (saat)	1	0,59	54,3
	2	0,54	53,7
	4	0,54	48,1
	6	0,56	53,1
	16	0,74	92,8
İmmobilizasyon pH' sı	5	0,59	69,8
	6	0,68	89,0
	7	0,60	77,2
	8	0,65	83,4
İmmobilizasyon için CAT+BSA derişimi (g/ml)	20	0,53	66,1
	20+20	0,13	70,1
	20+10	0,12	62,5
	10+10	0,06	66,5

4.1.5. CLEA-CAT Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) İncelenmesi

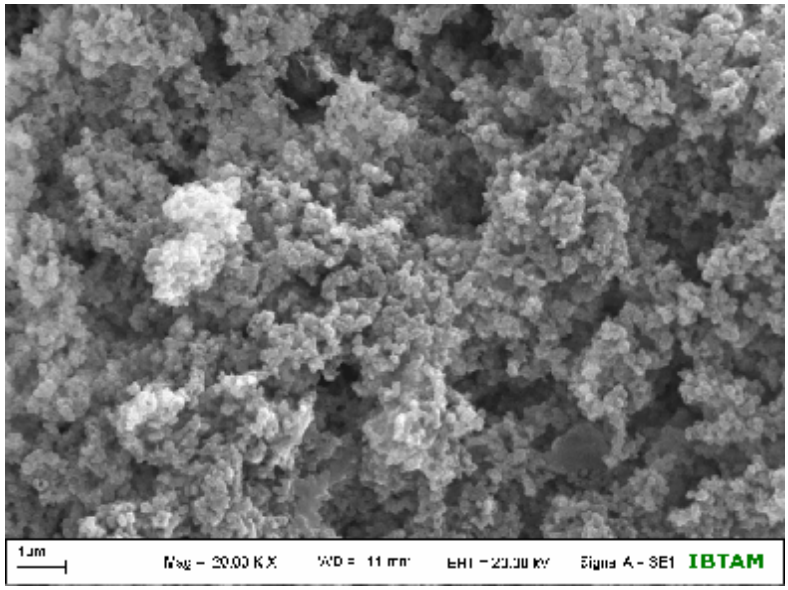
İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonunda optimum koşulları belirlenmiş olan CLEA-CAT örneklerinin SEM görüntülemesi yapılmıştır (Şekil

4.17-26). CLEA-CAT örneklerinin yüzey morfolojisi incelendiğinde enzimin mikroagregatlarının belirli bir şekli olmadığı görülmektedir. Bunun nedeni olarak moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonun ve çöken enzimin partikül ve gözenek büyüklüğünün kontrol edilmesinin zor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18' de optimum amonyum sülfat derişiminin belirlenmesinde elde edilen % 70 (w/v) derişiminde amonyum sülfat içeren CLEA-CAT örneğinin 500x ve 20000x büyütülmüş hallerinin fotoğrafları gösterilmiştir. İmmobilizasyon koşulları dikkate alınarak Şekil 4.17 ve Şekil 4.18 (% 70 (w/v) amonyum sülfat ve 35 mM glutaraldehit) ile Şekil 4.19 ve şekil 4.20 (% 70 (w/v) amonyum sülfat ve 140 mM glutaraldehit) kıyaslandığında glutaraldehit derişiminin artmasından dolayı CLEA-CAT örneklerindeki çapraz bağlanmanın daha yoğun olduğu görülmektedir.



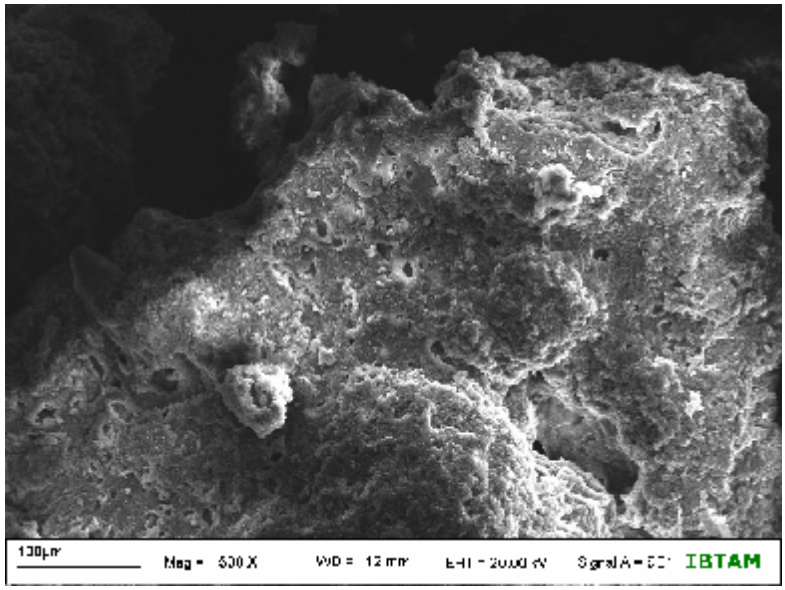
Şekil 4.17. Optimum Amonyum Sülfat derişimi belirlenen CLEA-CAT' ın SEM fotoğrafı (büyütme oranı 500x). (İmmobilizasyon koşulları: Amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v), glutaraldehit derişimi 35 mM, immobilizasyon pH'sı 7,0, immobilizasyon süresi 4 saat, CAT derişimi 20 mg/ml).



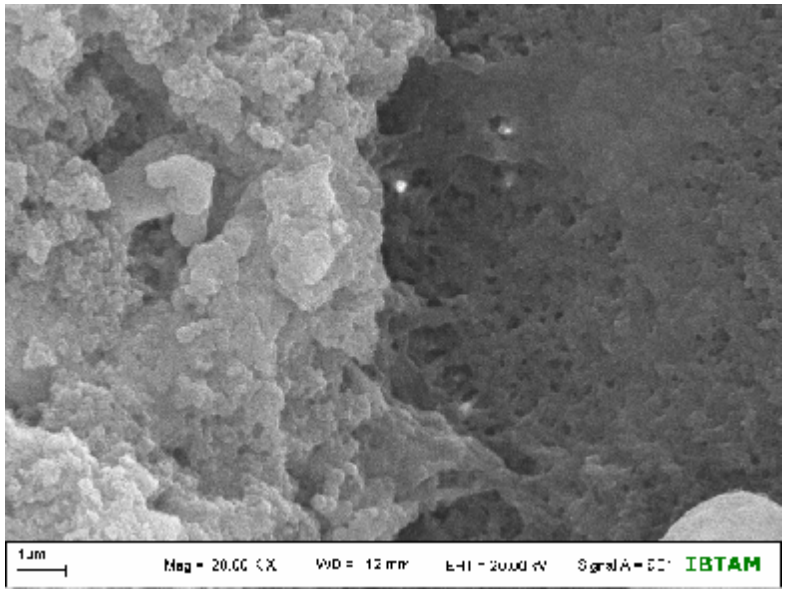
Şekil 4.18. Optimum Amonyum Sülfat derişimi belirlenen CLEA-CAT' ın SEM fotoğrafı (büyütme oranı 20000x). (İmmobilizasyon koşulları: Amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v), glutaraldehit derişimi 35 mM, immobilizasyon pH'sı 7,0, immobilizasyon süresi 4 saat, CAT derişimi 20 mg/ml).

Şekil 4.19 ve Şekil.20'de optimum gultaraldehit derişiminin belirlenmesinde 140 mM glutaraldehit kullanılarak hazırlanan CLEA-CAT örneğinin 500x ve 20000x büyütülmüş hallerinin fotoğrafları gösterilmiştir. Şekil 4.17 ve Şekil 4.19 kıyaslanırsa, glutaraldehit konsantrasyonu değiştiğinde gözenek büyüklüğünün değiştiği görülmektedir.

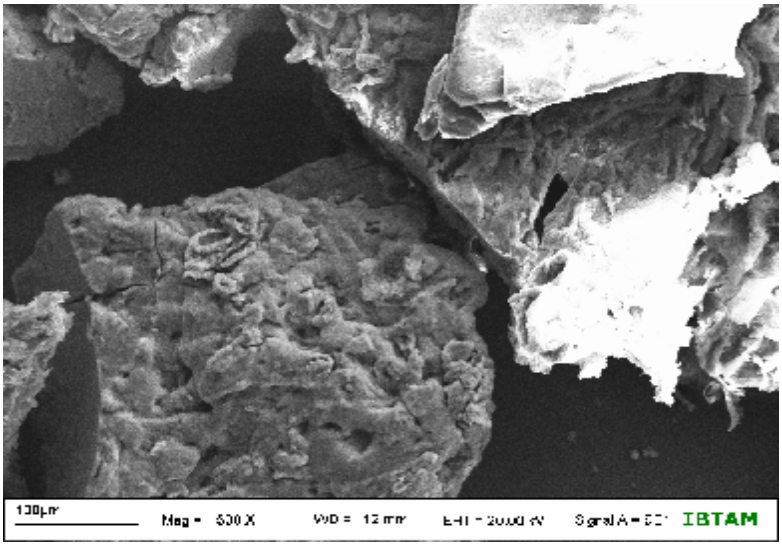
Optimum sürenin belirlenmesinde 6 saatte hazırlanan CLEA-CAT örneğinin 20000x ve 500x büyütülmüş hallerinin fotoğrafları Şekil 4.21 ve Şekil 4.22' de gösterilmiştir. İmmobilizasyon süresi değiştirildiğinde partiküllerin bir ağ yapısını anımsatan şekilde birbirlerine bağlandığı görülmektedir.



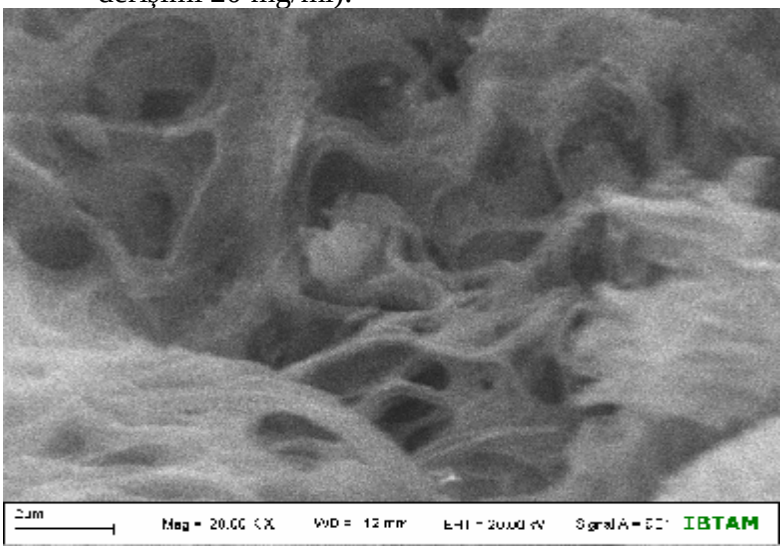
Şekil 4.19. Optimum Glutaraldehit derişimi belirlenen CLEA-CAT'ın SEM fotoğrafı (büyütme oranı 500x). (İmmobilizasyon koşulları: Amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v), glutaraldehit derişimi 140 mM, immobilizasyon pH'sı 7,0, immobilizasyon süresi 4 saat, CAT derişimi 20 mg/ml).



Şekil 4.20. Optimum Glutaraldehit derişimi belirlenen CLEA-CAT' ın SEM fotoğrafı (büyütme oranı 20000x). (İmmobilizasyon koşulları: Amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v), glutaraldehit derişimi 140 mM, immobilizasyon pH'sı 7,0, immobilizasyon süresi 4 saat, CAT derişimi 20 mg/ml).

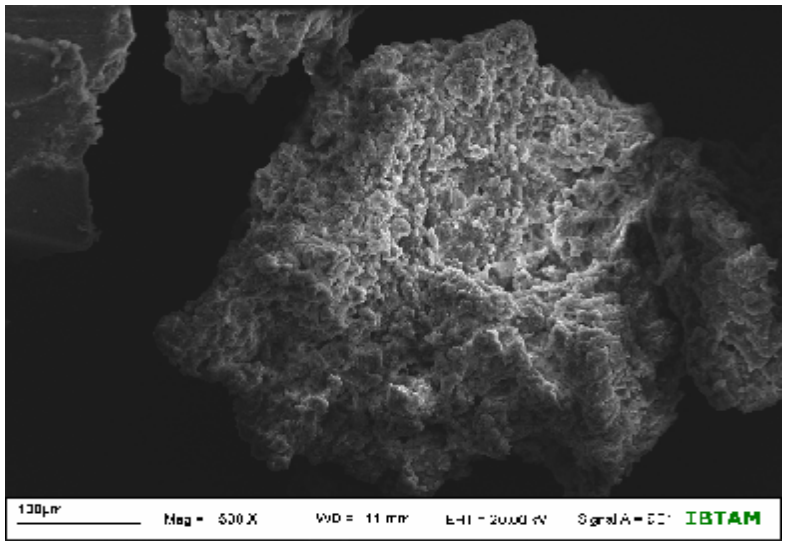


Şekil 4.21. Optimum sürenin belirlenmesinde elde edilen CLEA-CAT örneğinin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 500x). (İmmobilizasyon koşulları: Amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v), glutaraldehit derişimi 140 mM, immobilizasyon pH'sı 7,0, immobilizasyon süresi 6 saat, CAT derişimi 20 mg/ml).

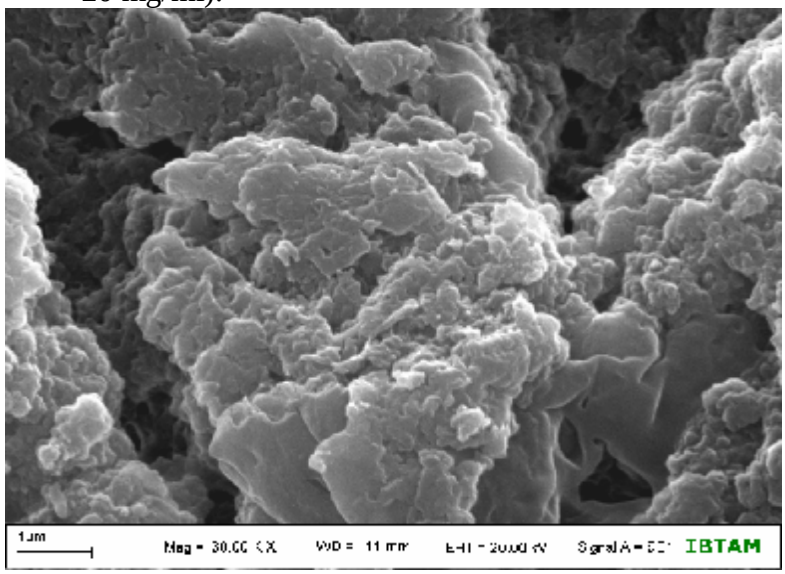


Şekil 4.22. Optimum sürenin belirlenmesinde elde edilen CLEA-CAT örneğinin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 20000x). (İmmobilizasyon koşulları: Amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v), glutaraldehit derişimi 140 mM, immobilizasyon pH'sı 7,0, immobilizasyon süresi 6 saat, CAT derişimi 20 mg/ml).

Şekil 4.23 ve şekil.24'te optimum pH' nın belirlenmesinde pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanan CLEA-CAT örneğinin 500x ve 30000x büyütülmüş hallerinin fotoğrafları gösterilmiştir.

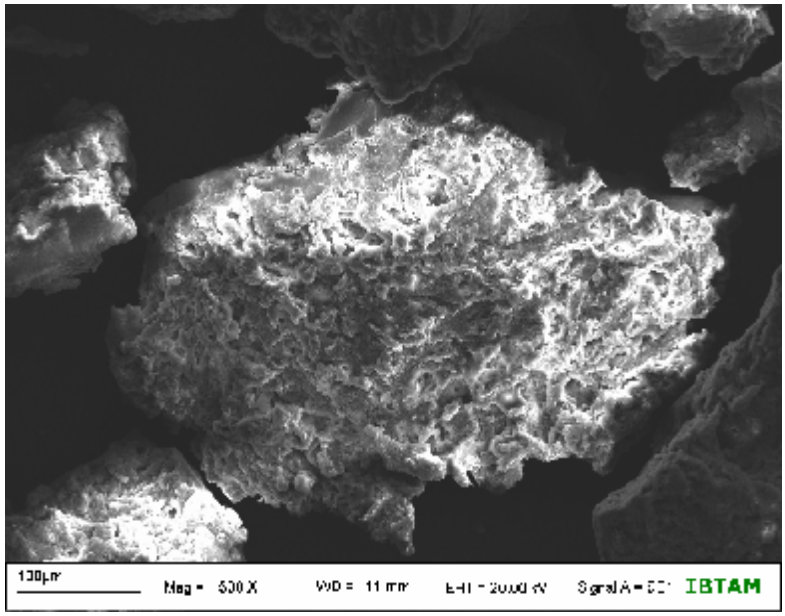


Şekil 4.23. Optimum pH' nın belirlenmesinde elde edilen CLEA-CAT örneğinin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 500x). (İmmobilizasyon koşulları: Amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v), glutaraldehit derişimi 140 mM, immobilizasyon pH'sı 7,0, immobilizasyon süresi 6 saat, CAT derişimi 20 mg/ml).

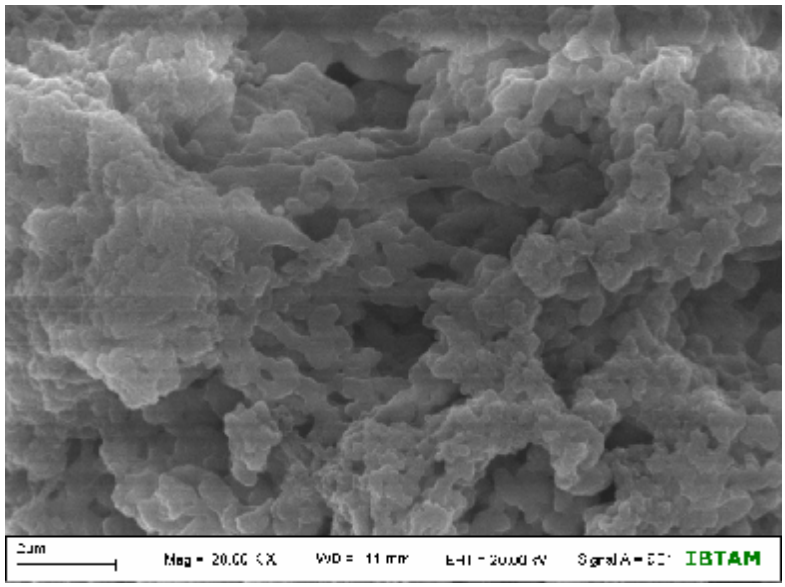


Şekil 4.24. Optimum pH' nın belirlenmesinde elde edilen CLEA-CAT örneğinin SEM fotoğrafı (büyütme oranı 30000x). (İmmobilizasyon koşulları: Amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v), glutaraldehit derişimi 140 mM, immobilizasyon pH'sı 7,0, immobilizasyon süresi 6 saat, CAT derişimi 20 mg/ml).

Optimum immobilizasyon derişiminin belirlenmesinde 10 mg/mL CAT ve 10mg/mL BSA ile hazırlanan CLEA-CAT örneğinin 500x ve 20000x büyütülmüş hallerinin fotoğrafları Şekil 4.25 ve Şekil 4.26' da gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Optimum immobilizasyon derişiminin belirlenmesinde hazırlanan CLEA-CAT' ın SEM fotoğrafı (büyütme oranı 500x) (İmmobilizasyon koşulları: Amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v), glutaraldehit derişimi 140 mM, immobilizasyon pH'sı 7,0, immobilizasyon süresi 6 saat, CAT+BSA derişimi 10+10 mg/ml).



Şekil 4.26. Optimum immobilizasyon derişiminin belirlenmesinde hazırlanan CLEA-CAT' ın SEM fotoğrafı (büyütme oranı 20000x). (İmmobilizasyon koşulları: Amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v), glutaraldehit derişimi 140 mM, immobilizasyon pH'sı 7,0, immobilizasyon süresi 6 saat, CAT+BSA derişimi 10+10 mg/ml).

4.2. Tartışma

Literatürde, CLEA hazırlanmasında kullanılan ortak uygulama enzimin tam olarak saflaştırılması yapılmaksızın fiziksel agregatlar olarak çöktürülmesini (tuzlar veya proteinlerin sulu çözeltileri için suyla karışabilir organik çözücüler, iyonik olmayan polimerler, asitler) takiben bir çapraz bağlayıcıyla (glutaraldehit, dekstranların periyodat oksidasyonuyla elde edilen büyük polialdehitler gibi) çapraz bağlama şeklinde açıklanmıştır (Sangeetha ve Abraham (2008), Sheldon (2007b)). CLEA'lar yüksek sıcaklık, ekstrem pH ve organik çözücüler gibi sert koşullarda katalitik aktivitesini koruyan, organik çözücülerde ve suda çözülmeyen katı partiküllerdir (Sangeetha ve Abraham, 2008).

Bu çalışmada, sığır karaciğer katalazı, amonyum sülfatla çöktürme ve gluteraldehitle çapraz bağlama yoluyla çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA-CAT) oluşturularak immobilize edilmiştir. Katalazın CLEA yöntemiyle ile immobilize edildiği tek yayın Wilson ve ark. (2004) tarafından rapor edilmiştir. Wilson ve ark. (2004), iki tetramerik katalaz olan sığır karaciğer katalazı (BLC) ve *Micrococcus lysodeikticus* (MLC) katalazından dietilen-glikol-dimetil eterle çöktürme ve glutaraldehitle çapraz bağlama yoluyla CLEA hazırlamışlardır. Her iki kaynaktan elde edilen katalazın dördüncül yapısının tamamen korunduğunu bildirmişlerdir. Aytar ve Bakir (2008), mantardaki tirozinazı amonyum sülfatla çöktürüp, glutaraldehitle çapraz bağlayarak CLEA yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Yu ve ark. (2006), *Candida rugosa* lipaz enzimini amonyum sülfatla çöktürme ve glutaraldehitle çapraz bağlama yöntemini kullanarak CLEA hazırlamışlardır. Çöktürücü olarak kullanılan tuz türünün partikül büyüklüğüne etkisini incelemişler ve en büyük partikül boyutunu amonyum sülfat tuzu ile yapılan CLEA' larda elde etmişlerdir.

CLEA-CAT örneklerinin taramalı elektron mikroskobunda görüntüleri incelenmiştir (Şekil 4.17-26). CLEA-CAT örneklerinin 500x, 20000x ve 30000x büyütülmüş SEM fotoğraflarında 1 µ, 2 µ ve 100 µ boyutundaki enzim mikroagregatlarının yüzey morfolojisi incelendiğinde belirli bir geometrik şekle sahip olmadıkları görülmektedir. Bunun nedeni olarak moleküller arası çapraz

bağlanma reaksiyonun ve çöken enzimin partikül ve gözenek büyüklüğünün kontrol edilmesinin zor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İmmobilizasyon koşulları dikkate alınarak şekiller arasında kıyaslama yapıldığında (Şekil 4.17, Şekil 4.18 (%70(w/v) amonyum sülfat ve 35 mM glutaraldehit) ile Şekil 4.19 ve Şekil 4.20 (%70(w/v) amonyum sülfat ve 140 mM glutaraldehit)) glutaraldehit derişiminin artmasından dolayı CLEA-CAT örneklerindeki çapraz bağlanmanın daha yoğun olduğu görülmektedir. Bu çalışmada hazırlanan CLEA-CAT örneklerinin literatürde farklı enzimler kullanılarak hazırlanan diğer CLEA' ların SEM fotoğraflarıyla karşılaştırıldığında benzer yapıya sahip oldukları görülmüştür. Sangeetha ve ark. (2008), farklı CLEA-subtilisin örneklerinin 2500x ve 5000x büyütülmüş SEM fotoğraflarında 1 ya da 2 µ boyutundaki enzim mikroagregatlarının yüzey morfolojisinin tek düze bir yapıya sahip olduğunu göstermişlerdir. Çöktürücülerin ve surfaktanların mikro agregatların boyutunda ve morfolojisinde çok etkili olmadığını belirtmişlerdir. Aytar ve Bakir (2008), CLEA' ların SEM görüntülerinden amorf yapıda olduklarını ve literatürde verilen diğer CLEA örneklerinin şekline benzediğini açıklamışlardır.

Serbest katalazın aktivitesine pH' nın etkisini araştırmak için, pH 5,0-9,0 aralığında aktivite ölçümü yapılmış ve optimum aktivite pH 7,5' te görülmüştür (Şekil 4.1). CLEA-CAT' ın immobilizasyon koşulları optimize edildiğinde en uygun pH 7,0 iken CLEA-CAT' ın en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 7,5 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11). İmmobilizasyondan sonra pH' da önemli bir kayma gözlenmemiştir. Tükel ve Alptekin (2004) sığır karaciğer katalazını Florisil'e 3-aminopropiyonik asit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize ettiklerinde, hem serbest hem de ara kol üzerinden immobilize edilen katalazın maksimum aktivitelerini pH 7,5'te gösterdiklerini bildirmişlerdir. Costa ve ark. (2001) ***Bacillus sp.***' den saflaştırdıkları katalazı glutaraldehit üzerinden aluminyum oksit üzerine doğrudan immobilize etmişlerdir. Farklı pH' larda (pH 7,0-12,0) yaptıkları aktivite ölçümü sonucunda serbest ve immobilize katalazın optimum pH' sını 8,0 olarak bulmuşlardır. İmmobilize katalazın pH 11,0 ve pH 12,0' de serbest katalaza göre daha yüksek aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Özyılmaz (2005) sığır karaciğer katalazını glutaraldehitle aktifleştirilmiş florisil desteğine immobilize etmiştir. Farklı

pH' larda (6,0-9,0) yaptığı aktivite ölçümünde en yüksek aktiviteyi; serbest katalaz için pH 7,5' te, immobilize enzim için ise, pH 6,5' te bulmuştur. Çetinus ve Öztop (2003) sığır karaciğer katalazını chitosan boncuklara glutaraldehit üzerinden kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize katalazın maksimum aktivite gösterdiği pH' yı 7,0 olarak bulmuşlar ve immobilize katalaz aktivitesinin serbest katalaza göre pH' dan daha az etkilendiğini bildirmişlerdir. Wang ve ark. (2008) Pamuklu kumaşı sodyum periodatla oksitleyerek katalazı immobilize etmişlerdir. Serbest katalaz ve immobilize katalaz için optimum pH' yı 7,0 olarak bulmuşlardır. Tükel ve Alptekin (2004), sığır karaciğer katalazını glutaraldehit veya glutaraldehit + 3-aminopropiyonik asit arakolları üzerinden magnezyum silikata kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Farklı pH aralıklarında (pH 4,5-9,0) çalışmışlar serbest katalazın optimum pH' sını 7,5, glutaraldehit üzerinden immobilize edilen katalazın optimum pH' sını 6,5 olarak bulmuşlardır.

Enzimatik reaksiyonlarda reaksiyon ortamında bulunan iyonlar enzim stabilizasyonunun sağlanmasında rol oynamaktadır. Düşük iyon derişimine sahip tampon çözeltileri enzim stabilizasyonunu sağlamada yetersiz kalırken, yüksek tampon derişimi de enzimle substrat etkileşimini azaltacağı için aktivitenin düşmesine neden olabilmektedir. Serbest katalaz için optimum tampon derişimi 50 mM, CLEA-CAT için ise, 75 mM olarak bulunmuştur (Şekil 4.2, Şekil 4.12). Tükel ve Alptekin (2007) serbest katalaz, doğrudan aspartik asit ara kolu ve glutamik asit ara kolu üzerinden immobilize edilen katalaz örneklerinin maksimum aktivitelerini 50 mM derişimde hazırlanan tampon çözeltisinde gösterdiklerini bildirmişlerdir. Serbest katalazın 100 mM tampon derişiminde maksimum aktivitesinin ~ % 95' ini gösterirken doğrudan ve ara kollar üzerinden immobilize edilen katalaz örneklerinin maksimum aktivitelerinin ~ % 70' ini gösterdiğini açıklamışlardır.

Serbest katalaz için optimum sıcaklık 25 $^{\circ}$C, CLEA-CAT örnekleri için 35°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.13). Tükel ve Alptekin (2004), katalazı florisil' e 3-aminopropiyonik asit ara kolu üzerinden immobilize ettiklerinde immobilize katalaz için optimum sıcaklığı 25 $^{\circ}$C olarak belirlemişlerdir. Wang ve ark. (2008) immobilize ve serbest katalazın sıcaklıklarını sırasıyla 40 $^{\circ}$C ve 30 $^{\circ}$C bulmuşlardır. Serbest ve immobilize katalazın sırasıyla 25-40 ve 35-55 $^{\circ}$C

aralıklarında %80' den fazla aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir. Buna göre, immobilize katalazın serbest katalaza göre optimum sıcaklığının daha yüksek olduğunu ve daha geniş sıcaklık aralığında aktivite gösterdiğini açıklamışlardır. Munshi ve ark. (1995) sığır karaciğer katalazını ve α-penisilinazı poliakrilamit matriksine başarılı bir şekilde kapsüllemişlerdir. Serbest katalaz ve kapsüllenmiş katalazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı 30 °C olarak bulmuşlardır. Çetinus ve Öztop (2003), katalazı chitosana immobilize etmişler, serbest katalaz ve immobilize katalazın optimum sıcaklığını 25°C olarak bulmuşlardır. Alkan ve ark. (2005) sığır karaciğer katalazını bentonite adsorbe ederek immobilize etmişlerdir. Serbest katalaz ve immobilize katalazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 35°C olduğunu bildirmişlerdir. Wan ve ark. (2007), elektrospun nanofiberleri üzerine katalazı kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Serbest katalazın sıcaklığını 25°C, immobilize enzimin optimum sıcaklığını ise, 35°C olarak bulmuşlardır. Yüksek sıcaklıklarda immobilize enzimin serbest enzime göre daha kararlı olduğunu göstermişlerdir. Kovalent bağlanmanın yapısal denaturasyona karşı enzim kararlılığını artırdığını bildirmişlerdir. Tükel ve Alptekin (2004), sığır karaciğer katalazını glutaraldehit veya glutaraldehit + 3-aminopropiyonik asiti ile magnezyum silikat üzerine kovalent olarak immobilize ettiklerinde serbest katalaz ve glutaraldehit arakolu üzerinden ve glutaraldehitle immobilize edilen katalazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklıkları sırasıyla 25, 25 ve 35 °C olarak belirlemişlerdir.

Serbest katalaz 50 °C' de 15 saat inkübe edildikten sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 4' ünü korurken, 35 °C ve 50 °C' de inkübe edilen CLEA-CAT ise, aynı sürede başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 49 ve % 30' unu korumuştur (Şekil 4.4, Şekil 4.14). Wilson ve ark. (2004), iki tetramerik katalaz olan sığır karaciğer katalazı (BLC) ve *Micrococcus lysodeikticus* (MLC) katalazından dietilen-glikol-dimetil eterle çöktürme ve glutaraldehitle çapraz bağlama yoluyla CLEA-CAT hazırlamışlardır. Serbest enzimi ve BLC-CLEA' larını 60 °C' de inkübe etmişlerdir. Çözünür enzimin (BLC) aktivitesini BLC-CLEA' larından daha hızlı kaybettiğini açıklamışlardır. MLC-CLEA' larını 70 °C' de inkübe ettiklerinde 30 dk sonra kalan aktivitesinin neredeyse %50' sini koruduğunu ve çözünür enzime göre daha kararlı

olduğunu belirmişlerdir. Çözünür enzimin kararlılığının enzim konsantrasyonuna bağlı olduğunu, ancak CLEA' ların seyreltilmesinin enzimin kararlılığında etkili olmadığını bildirmişlerdir. Sangeetha ve ark. (2008), subtilisini amonyum sülfat, PEG, triton X-100 ve tween-20 gibi surfaktanlarla PEG kullanarak çöktürmüşler ve glutaraldehit ile çapraz bağlayarak CLEA hazırlamışlardır. Farklı sıcaklık ve zaman aralıklarında serbest subtilisin ve subtilisin CLEA' sının termal kararlılığına bakmışlardır. CLEA' nın 60 °C ve yukarısına kadar termal kararlılığını koruduğunu, inkübasyon süresi arttıkça enzimatik aktivitenin azaldığını belirtmişlerdir.Subtilisin CLEA' sının termal kararlılığının serbest enzimden daha yüksek olduğunu açıklamışlardır. Çetinus ve Öztop (2000), sığır karaciğer katalazını chitosan filme kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize katalazı pH 7,0 fosfat tamponunda 2 ve 5 saat boyunca farklı sıcaklıklarda inkübe etmişlerdir. Serbest katalaz 40 °C' de 2 saat inkübasyon sonunda başlangıç aktivitesinin %50' sini korurken, 5 saat sonra % 35'ini koruyabilmiştir. İmmobilize katalaz ise, 40 °C' de 2 saat inkübasyon sonunda başlangıç aktivitesinin %70' ini korurken, 5 saat sonra % 60' ını koruduğunu bildirmişlerdir.

Serbest katalaz ve CLEA-CAT' ın 5 °C ve oda sıcaklığında depolama kararlılıkları incelenmiştir. Serbest katalaz 5 °C' de 19 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %11' ini korurken oda sıcaklığında 6. gün sonunda aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. CLEA-CAT ise, 5 °C' de yaklaşık iki ay sonunda aktivitesinin % 10' unu korurken, oda sıcaklığında aynı sürede aktivitesinin % 21' ini korumuştur (Şekil 4.5, Çizelge 4.2). CLEA-CAT örneklerinin depolama kararlılığı serbest enzimin depolama kararlılığından daha yüksektir. Tükel ve Alptekin (2004) serbest katalazı 5 °C ve oda sıcaklığında 2 ve 4 gün beklettiklerinde başlangıç aktivitesinin % 50' sinin kaldığını bildirmişlerdir. Çetinus ve Öztop (2000), sığır karaciğer katalazını chitosan filme kovalent olarak immobilize etmişlerdir. 5 °C' de serbest katalazın 18 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %50' sini kaybettiğini bildirmişlerdir. Islak saklanan immobilize katalazın 25 gün sonra, kuru saklanan katalazın ise, 5 gün sonra başlangıç aktivitelerinin % 50' sini kaybettiğini açıklamışlardır.

Farklı substrat derişimlerinde serbest katalaz ve CLEA-CAT örneklerinin aktivitleri ölçülmüştür. Lineweaver-Burk grafiklerinden K_m, V_{max}, k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır. Serbest Katalaz için, K_m = 50 mM H_2O_2, V_{max}=1,98x10^4 U/mg protein, k_{cat}= 7,92x10^4 s^{-1} ve k_{cat}/K_m=1,58x10^6 $s^{-1}M^{-1}$ olarak elde edilmiştir. CLEA-CAT için, K_m = 43 mM H_2O_2, V_{max}=2,0x10^3 U/g CLEA-CAT olarak bulunmuştur (Şekil 4.6, Şekil 4.16). Wilson ve ark. (2004), sığır karaciğer katalazı (BLC) ve *Micrococcus lysodeikticus* (MLC) katalazından dietilen-glikol-dimetil eterle çöktürme ve glutaraldehitle çapraz bağlama yoluyla CLEA hazırlamışlardır. MLC ve BLC' nin aktivitelerini sırasıyla %40 ve %45 olarak açıklamışlardır. Serbest MLC ve BLC' nin K_m değerlerini sırasıyla 100 mM' ın üzerinde ve 30 mM ± 3 mM olarak, immobilize BLC' nin K_m değerini 80 mM ± 9 olarak belirlemişlerdir. İmmobilize MLC' nin K_m değerini tam olarak belirleyemediklerini bildirmişlerdir. Tükel ve Alptekin (2004), sığır karaciğer katalazını glutaraldehit veya glutaraldehit + 3-aminopropiyonik asiti ile magnezyum silikat üzerine kovalent olarak immobilize ettiklerinde serbest katalaz, glutaraldehitle immobilize edilen katalaz ve glutaraldehit + 3-aminopropiyonik asit arakolu ile immobilize edilen katalazın K_m, V_{max} ve k_{cat}/K_m değerlerini sırasıyla, 28,6 ± 3,6 mM, 285,7±32,6 mM, 40,0 (±4,1) mM, 142,8 (±15,1)x10^3 U/mg protein, 1,4 (±0,1) x10^3 U/mg protein, 0,4 (±0,04) x10^3 U/mg protein, 2,1x10^7 $s^{-1}M^{-1}$, 2,0x10^4 $s^{-1}M^{-1}$, 4,2x10^4 $s^{-1}M^{-1}$ olarak belirlemişlerdir.

CLEA-CAT örneğinin tekrar kullanım kararlılığı incelenmiştir. 50 mg CLEA-CAT örneği 32 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin hala % 29' unu göstermektedir (Şekil 4.15). Çetinus ve Öztop (2000), sığır karaciğer katalazını chitosan filme kovalent olarak immobilize etmişlerdir. İmmobilize katalazın 40 dk. sonunda başlangıç aktivitesinin % 50'sinin kaldığını bildirmişlerdir. Tükel ve Alptekin (2004), sığır karaciğer katalazını glutaraldehit veya glutaraldehit + 3-aminopropiyonik asiti ile magnezyum silikat üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Glutaraldehitle immobilize edilen katalazın kesikli reaktörde 20 kullanım sonunda kalan aktivitesinin % 90 olduğunu, 199 kullanım sonunda başlangıçtaki aktivitesinin % 10' unu koruduğunu belirtmişlerdir. Sangeetha ve ark. (2008), subtilisini amonyum sülfat, PEG, triton X-100 ve tween-20 gibi surfaktanlarla PEG kullanarak çöktürmüşler ve glutaraldehit ile çapraz bağlayarak CLEA

hazırlamışlardır. İmmobilize enzimin kullanım sayısı arttıkça aktivitesinin azalacağını belirtmişlerdir. 10 kullanımdan sonra subtilisin CLEA' sının aktivitesinin % 45' ini koruduğunu bildirmişlerdir. Katalazın çeşitli immobilizasyon yöntemleri kullanılarak yapılan immobilizasyonu ile literatürdeki diğer sonuçlar kıyaslandığında CLEA-CAT' ın tekrar kullanım kararlılığının daha düşük olduğu anlaşılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. İmmobilizasyon koşulları optimize edilerek CLEA-CAT örnekleri hazırlanmıştır. Optimum amonyum sülfat derişimi % 70 (w/v), optimum glutaraldehit derişimi 140 mM, optimum immobilizasyon pH'sı 7,0 olarak belirlenmiştir. En yüksek CLEA-CAT aktivitesinin elde edildiği immobilizasyon süresi 6 saat olarak belirlenmiştir. Ortamdaki enzim + protein miktarının CLEA-CAT aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla farklı derişimlerde CAT ve inert bir protein olan BSA kullanılmış ve 10 mg/ml CAT ve 10 mg/ml BSA kullanılarak hazırlanan CLEA-CAT örneği maksimum aktivite göstermiştir.

2. Serbest ve immobilize katalazlar karakterize edilmiştir. Serbest katalaz için optimum pH 7,5, tampon derişimi 50 mM, sıcaklık 25 $^{\circ}$C, olarak belirlenmiştir. CLEA-CAT' ın karakterizasyonunda optimum pH 7,5, tampon derişimi 75 mM, sıcaklık 35 $^{\circ}$C olarak bulunmuştur.

3. Serbest katalaz 50 $^{\circ}$C' de 15 saat inkübe edildikten sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 4' ünü korurken, 35 $^{\circ}$C ve 50 $^{\circ}$C' de inkübe edilen CLEA-CAT ise, aynı sürede başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 49 ve % 30' unu korumuştur.

4. CLEA-CAT' nın 5 $^{\circ}$C ve oda sıcaklığındaki depolama kararlığının serbest katalaza göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Buna göre, serbest katalaz 5 $^{\circ}$C' de 19 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %11' ini korurken oda sıcaklığında 6. gün sonunda aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. CLEA-CAT ise, 5 $^{\circ}$C' de yaklaşık iki ay sonunda aktivitesinin % 10' unu korurken, oda sıcaklığında aynı sürede aktivitesinin % 21' ini korumuştur.

5. Serbest Katalaz için, K_m = 50 mM H_2O_2, V_{max}=1,98x10^4 U/mg protein, turnover sayısı k_{cat}= 7,92x10^4 s^{-1} ve katalitik etkinliği k_{cat}/K_m=1,58x10^6 s^{-1}M^{-1} olarak elde edilmiştir. CLEA-CAT için K_m = 43 mM H_2O_2, V_{max}=2,0x10^3 U/g CLEA-CAT olarak bulunmuştur.

6. Kesikli reaktörde kolona yüklenen 50 mg CLEA örneği 32 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 29' nu korumuştur.

5.2. Öneriler

1- Farklı derişimlerdeki tampon çözeltilerle CLEA-CAT örnekleri hazırlanarak CLEA-CAT aktivitesinin iyonik güce bağlı değişimi araştırılabilir.

2- Genel olarak, ucuz olması ve kolay bulunması nedeniyle CLEA hazırlanmasında çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılmaktadır. Farklı çapraz bağlayıcılar (dekstran polialdehit, polimerik dialdehitler, paraformaldehit gibi) kullanarak CLEA aktivitesi üzerinde çapraz bağlayıcıların etkisi incelenebilir.

3- Metanol, etanol, izo-propanol, t-bütanol, 1,2- dimetoksietan, PEG, Aseton, Asetonitril vb. çöktürücüler kullanılarak çöktürücülerin CLEA aktivitesi üzerindeki etkisi incelenebilir.

4- CLEA-CAT' ın partikül boyutu ve çözünürlüğü üzerinde farklı tuzların (NH_4Cl, Na_2SO_4, NH_4Cl, NaCl, LiCl vb.) etkisi araştırılabilir.

5- CLEA-CAT örneklerinin sürekli reaktörde kullanımı araştırılarak kesikli reaktördeki kullanımı ile kıyaslanabilir.

KAYNAKLAR

AEBİ. H. 1974. In Methods of Enzymatic Analysis. vol. 2, pp. 673-675 [H. U. Bergmeyer, editor]. New York & London: Academic Press.

AEBI, H., 1984. Catalase in vitro Method. Enzymol., 105, 121-126.

ALKAN, S., CEYLAN, H., and ARSLAN, O., 2005. Bentonite-support Catalase. Journal of Serbian Chemical Society, 70(5):721-726.

ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S.S., and YILDIRIM D., 2008. Immobilization and Characterization of Bovine Liver Catalase on Eggshell. Journal of Serbian Chemical Society, 73(6):609-618.

ALPTEKIN, Ö., 2009. Katalazın Eupergit, Florisil ve Cam Desteklere Kovalent olarak immobilizasyonu ve Karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi - Doktora Tezi 219 sayfa.

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

AYDEMIR, T., KURU, K., 2003. Purification and Partial Characterization of Catalase From Chicken Erythrocytes and the Effect of Various Inhibitors on Enzyme Activity. Turkish Journal of Chemistry 27,1,85-97.

AYTAR, B.S., BAKİR, U., 2008. Preparation of Cross-linked Tyrosinase Aggregates. Process Biochemistry 43; 125–131.

BEERS, R.F.JR., SİZER, I.W., 1952. Journal of Biological Chemistry. 121: 561-572.

BRADFORD M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Methodfor Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle Dye Binding. Anal Biochem 72:248-254.

CABANA, H., JONES, J.P., and AGATHOS, S.N., 2007. Preparation and Characterization of Cross-linked Laccase Aggregates and Their Application to the Elimination of Endocrine Disrupting Chemicals. Journal of Biotechnology 132 (2007) 23–31.

CAO, L., LANGEN, L.V., and SHELDON, R.A., (2000). Cross-linked Enzyme Aggregates: A simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. Org. Lett., 2 (10): 1361-1364.

CAO, L., LANGEN, L.V., and SHELDON, R.A., 2003. Immobilised Enzyme: Carrier-bound or Carrier-free?. Current Opinion in Biotech., 14: 387-394.

CAO, L., 2005. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design.Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p:174.

CHOI, M.F., YİU T.P., 2004. İmmobilization of Beef Liver Catalase on Eggsell Membrane for Fabrication of Hydrogen Peroxide Biosensor. Enzyme and Microbial Technology. 34 41-47

COSTA, S.A., TZANOV, T., PAAR, A., GUDELJ, M., GÜBİTZ, G.M., and PAULO, A.C., 2001. Immobilization of Bacillus SF on Alumina for the Treatment of Textile Bleaching Effluents. Enzyme and Microbial Technology, 28:815-819.

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., 2003. Immobilization of Catalase into Chemically Crosslinked Chitosan Beads. Enzyme and Microbial Technology, 32:889-894.

ÇİMEN, Ç., ÖTER Ç., DEMIR H. ve SAVRAN A., 2005. Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karekterizasyonu ve Kinetiğinin incelenmesi. Yüzüncü Yıl Ünv., Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, VAN YYÜ Vet.Fak. Derg. 16,1,15-20.

ERTAŞ, N., 2000. Spesific Determination of Hydrogen Peroxside with a Catalase Biosensor Based on Mercury Thin Film Electrodes. Turk J. Chemistry, 24:95-99

GARCÍA, S.M., ORTİZ, F.G., FERNÁNDEZ, J.N., RUBİO, V., CARMONA, F.G., and FERRER, Á.S., 2010. Improved Cross-linked β- lactam Antibiotics Intermediates. Bioresource Tecnology, 101:331-336

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

GOVARDHAN, C.P., 1999. Crosslinking of Enzymes for Improved Stability and Performance. Current Opinion in Biotechnology, l0:331-335.

HARA, P., HANEFELD, U., and KANERVA, L.T., 2008. Sol-gels and Cross-linked Aggregates of Lipase PS from *Burkholderia Cepacia* and Their Application in Dry Organic Solvents. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 50: 80-86.

KLIBANOV, A.M., 1983. Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. Science, 219:722-727.

LAFUENTE, R.F., RODRIGUEZ, V., and GUISAN, J.M., 1998. The Coimmobilization of D- amino Acid Oxidase and Catalase Enables the Quantitative Transformation of D- amino Acids(D-Phenylalanine) into α-Keto Acids(Phenylpyruvc Acid). Enzyme and Microbial Technology, 23:28-33

LANGEN, L.M., SELASSA, R.P., RANTWIJK F., and SHELDON R.A., 2005. Cross-linked Aggregates of (R)-Oxinitrilase: A Stable, Recyclable Biocatalyst for Enantioselective Hydrocyanation, 7 (2), 327-329

LARTILLOT, S., KADZIORA, P., and ATHIOS, A., 1988. Purification and Characterization of New Fungal Catalase. Preparative Biochemistry, 8(3):241-246.

LIDA, T., MARUYAMA, D., and 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.

MATEO, C., PALOMO, J.M, LANGEN, L.M., RANTWIJK, F., and SHELDON, R.A., 2004. A New, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. Biotechnology and Bioengineering, 86:273-276.

MUNSHİ, N., CHAKARVORTY, K., DE, T.K., and MAİTRA, A.N., 1995. Activity and Stability Studies of Ultrafine Nanoencapsuled Catalase and Penicillinase. Colloid Polym Sci 273:464-472.

NELSON, D.L., COX, M.M., 2005. Lehninger Principles of Biochemistry, (N. KILIÇ editör). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, 3. baskıdan çeviri, Palme Yayıncılık, Ankara, s.244

ÖZYILMAZ, G., 2005. Glukoz oksidaz ve Katalazın Ayrı Ayrı ve Birlikte İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi - Doktora Tezi 158 sayfa.

ÖZYILMAZ, G., TÜKEL, S.S., and ALPTEKİN, Ö., 2005. Activity and Storage Stability of Immobilized Glucose Oxidase onto Magnesium Silicate. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 35(4-6):154-160.

PAAR, A., COSTA, S., TZANOV, T., GUDELJ, M., ROBRA, K.H., CAVACO-PAULO, A., and GÜBITZ, G.M., 2001. Thermo-alkali-stable Catalases from Newly Isolated Bacillus sp. for the Treatment and Recycling of Textile Bleaching Effluents. Journal of Biotechnology, 89:147-153.

REGEN, S.L., SINGH, M., and SAMEUL, N.K., 1984. Functionalized Polymeric Liposomes, Efficient Immobilisation of α-Chymotrypsin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 119:646–651.

ROSEVEAR, A., KENNEDY, J.F., and CABRAL, J.M.S., 1987. Immobilized Enzymes and Cells. Adam Hilger, Bristol and Philadelphia, 239:384-385

SANGEETHA, K., ABRAHAM, T. E., 2008. Preparation and Characterization of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEA) of Subtilisin For Controlled Release Applications. International Journal of Biological Macromolecules, 43:314–319.

SANTONI, T., SANTIANNI, D., MANZONI, A., ZANARDI, S., and MASCINI, M., 1997. Enzyme Electrode for Glucose Determination in Whole Blood. Talanta, 44:1573-1580

SCHOEVAART, R., WOLBERS, M.W., GOLUBOVIC, M., OTTENS, M., KIEBOOM, A.P.G., RANTWICK, F., WIELEN, L.A.M., and SHELDON, R.A., 2004. Preparation, Optimization, and Structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates. Biotechnol Bioeng. 20;87(6):754-62.

SEIP, J.E., FAGER S.K., GAVAGAN, J.E., ANTON, D.L., and COSIMO, R.D., 1994. Glyoxylic Acid Production Using İmmobilized Glycolate Oxidase and Catalase. Bioorganic & Medicine Chemistry, 2(6):371-378

SHAH, S., SHARMA, A., and GUPTA, M.N.,2006. Preparation of Cross-linked Enzyme Aggregates by Using Bovine Serum Albumin as a Proteic Feeder. Analytical Biochemistry, 351:207–213.

SHELDON, R.A., SCHOEVAART, R., and VAN LANGEN, L.M., 2005. Cross-linked Enzyme Aggregates (CLEAs): A Novel and Versatile Method for Enzyme Immobilization A Review. Biocatalysis and Biotransformation, 23(3/4):141-147.

SHELDON, R.A., 2007a. Review, Enzyme Immobilization: The quest for optimum performance. Adv. Synth. Catal., 349:1289-1307.

SHELDON, R.A., 2007b. Cross-linked Enzyme Aggregates(CLEA's): Stable and Recyclable Biocatalysts. Biochemical Society Transactions, Volume 35, part 6, 1583-1587.

SPERINDE, J.J., GRIFFITH, L.G., 1997. Synthesis and Characterization of Enzymatically-crosslinked Poly(ethylene glycol) Hydrogels. Macromolecules, 30:5255–5264

STERN, K.G., 1937. Journal of Biological Chemistry 121: 561-572.

TARHAN, L., 1991. Some Kinetic Parametersand Inactivation of Catalase Immobilized on Modified Polyvinylalcohol, *Vol. 31*.

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

TELEFONCU, A., 1997. Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu, Kuşadası Aydın-Türkiye, 446s.

TÜKEL, S.S., ALPTEKIN, Ö., 2004. Immobilization and Kinetics of Catalase onto Magnesium Silicate, Process Biochemistry 39 (2004) 2149-2155.

TÜKEL, S.S., ALPTEKIN, Ö., 2007. Aktifleştirilmiş Florisil desteğine katalazın aspartik asit ve glutamik asit ara kolları üzerinden inhibitörleri veya aktivatörleri varlığında kovalent immobilizasyonunun araştırılması, Proje.

TWYMAN, R.M., 2005, Immobilized Enzymes. Encyclopedia of Analytical Science 523-529.

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

WAN, L.S., KE, B.B., WU, J., XU, Z.K., 2007. Catalase Immobilization on Electrospun Nanofibers: Effects of Porphyrin Pendants and Carbon Nanotubes. Journal of Physical Chemistry, 111:14091-14097.

WANG, Q., LI, C. X., FAN, X., WANG, and P. CUI, L., 2008. Immobilization of Catalase on Cotton Fabric Oxidized by Sodium Periodate. Biocatalysis and Biotransformation, September-October 2008; 26 (5): 437-443.

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

WILSON, L., B., LORENA, LORENTE, G.F., FUENTES, M., HİDALGO, A., GUİSÁN, J.M., PESSELA, B.C.C., and LAFUENTE, R.F., 2004. Cross-Linked Aggregates of Multimeric Enzymes: A Simple and Effective Methodology to Stabilize Their Quarternary Structure. Biomacromolecules, 5: 814-817.

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

YU, H.W., CHEN H.,WANG X., YANG Y.Y., and CHING C.B., 2006. Cross - linked Enzyme Aggregates (CLEAs) with Controlled Particles: Application to *Candida Rugosa* Lipase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic 43 (2006) 124-127.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Malatya'da doğdu. İlk, orta, lise eğitimini Malatya'da tamamladı. 2003 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. 2005 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Tezsiz Yüksek Lisansını tamamladı. 2006 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Kimya Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans programına başladı.