ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZLEM ALPTEKİN

135575

FLORİSİL ÜZERİNE KOVALENT OLARAK TUTUKLANMIŞ KATALAZ ENZİMİNİN KATALİTİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2003

YÜKSEKÖĞRETİM KURULU DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLORİSİL ÜZERİNE KOVALENT OLARAK TUTUKLANMIŞ KATALAZ ENZİMİNİN KATALİTİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

ÖZLEM ALPTEKİN

YÜKSEK LİSANS

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 2.1./.01./2023 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu İle~~ Kabul Edilmiştir.

İmza..... İmza..... İmza.....

Prof.Dr S.Seyhan TÜKEL Yrd.Doç.Dr Güzide YÜCEBİLGİÇ Yrd.Doç.Dr Elif ORUÇ

DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No : 2116

Prof. Dr. Fikri AKDENİZ

Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No:FBE.2002.YL.113

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FLORİSİL ÜZERİNE KOVALENT OLARAK TUTUKLANMIŞ KATALAZ ENZİMİNİN KATALİTİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Özlem ALPTEKİN
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman: Prof.Dr. S. Seyhan TÜKEL
Yılı: 2003 , **Sayfa:** 90
Jüri: Prof.Dr. S. Seyhan TÜKEL
Yrd.Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
Yrd.Doç. Dr. Elif ORUÇ

Bu çalışmada sığır karaciğer katalazı (EC 1.11.1.6) florisil üzerine glutaraldehit veya glutaraldehit+3-aminopropiyonik asit üzerinden olmak üzere iki farklı şekilde kovalent olarak bağlanmıştır. Glutaraldehit derişiminin (% 0,625, 1,25, 2,50), katalaz derişiminin (0,42, 0,83, 3,33, 5,00, 8,32, 16,65, 33,30, 50,00 mg/mL) ve immobilizasyon süresinin (2, 24, 48, 72 saat) desteğe bağlanan enzim miktarına ve immobilize enzimin aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. Serbest, glutaraldehit ve glutaraldehit+3-aminopropiyonik asit üzerinden immobilize edilmiş enzimlerin maksimum aktiviteleri sırasıyla 136889, 1250, 1803 μmol H_2O_2/mg prot. dk., Michaelis-Menten hız sabitleri sırasıyla 13,30, 250,00, 297,90 mM, aktivasyon enerjileri 14,38, 14,83, 9,41 kJ/mol olarak bulunmuş, termal kararlılıkları ve depolama kararlılıkları saptanmıştır. Ayrıca immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlikleri araştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: Katalaz, Florisil, Kovalent İmmobilizasyon, Glutaraldehit, 3-Aminopropiyonik asit

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION OF CATALYTIC ACTIVITY OF CATALASE COVALENTLY IMMOBILIZED ONTO FLORISIL

Ozlem ALPTEKIN

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

INSTITUE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof.Dr. Seyhan TUKEL

Year: 2003 , **Pages:**90

Jury : Prof.Dr. Seyhan TUKEL

Asst. Prof. Dr. Guzide YUCEBILGIC

Asst. Prof. Dr. Elif ORUC

The bovine liver catalase (EC 1.11.1.6) was immobilized covalently with glutaraldehyde or glutaraldehyde+3-aminopropionic acid as a spacer onto florisil. Effect of the immobilization conditions, such as, glutaraldehyde concentrations (0.625, 1.25, 2.50 %), catalase concentrations (0.42, 0.83, 3.33, 5.00, 8.32, 16.65, 33.30, 50.00 mg/mL) and immobilization periods (2, 24, 48, 72 h) were investigated. Maximum activities of free enzyme, enzyme immobilized with glutaraldehyde and enzyme immobilized with glutaraldehyde+3-aminopropionic acid were found as 136889, 1250, 1803 μmol H_2O_2/mg prot. min., respectively. Michaelis-Menten constants of free enzyme, enzyme immobilized with glutaraldehyde and enzyme immobilized with glutaraldehyde+3-aminopropionic acid were found as 13.30 250.00 297.90 mM, respectively. Activation energy of free enzyme, enzyme immobilized with glutaraldehyde and enzyme immobilized with glutaraldehyde+3-aminopropionic acid were found as 14.38, 14.83, 9.41 kJ/mol, respectively. Thermal stabilities and storage stabilities of enzyme preparation were determined. Additionally, reuse times of immobilized enzyme preparations were investigated.

Key Words: Catalase, Florisil, Covalent Immobilization, Glutaraldehyde, 3-Aminopropionic acid .

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, danışman hocam sayın Prof.Dr. S. Seyhan TÜKEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda bana her zaman destek olan hocalarım, Yrd.Doç.Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e ve Yrd.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN'e, arkadaşlarım Arş.Gör. Gül ÖZYILMAZ'a , Arş. Gör. Hasan KARADAĞ'a , Deniz YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Ayrıca beni her zaman destekleyen annem Zekiye ALPTEKİN'e, babam Ogün ALPTEKİN'e kardeşim aynı zamanda meslektaşım Cem ALPTEKİN' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ.....I
ABSTRACT.....II
TEŞEKKÜR.....III
İÇİNDEKİLER.....IV
SİMGE VE KISALTMALAR.....VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....X
1. GİRİŞ.....1
1.1. Enzimler.....1
1.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....2
1.2.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri.....3
1.2.1.1. Bağlama.....3
1.2.1.2. Tutuklama Yöntemleri.....7
1.3. İmmobilize Edilen Enzimden Beklenen Özellikler.....8
1.4. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması.....8
1.5. Katalazın Biyolojik İşlevi.....9
1.6. Katalazın Endüstriyel Önemi.....12
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....14
3. MATERYAL VE METOD.....20
3.1. Materyal.....20
3.2. Metod.....20
3.2.1. Serbest Katalaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....20
3.2.2. Katalaz Enziminin Florisil Üzerine Kovalent Olarak İmmobilizasyonu.....22
3.2.2.1. Alkilamin Türevinin Hazırlanması.....22
3.2.2.2. Katalazın İmmobilizasyonu.....22
3.2.2.3. Protein Tayini.....26
3.2.3. Serbest Enzim İçin Belirlenen Parametreler.....26

3.2.4. Glutaraldehit ve Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilen Enzim İçin Belirlenen Parametreler.....27
3.2.5. Michaelis-Menten Katsayısı (Km) ve Maksimum Hızın (Vmax) Grafiksel Yöntemle Belirlenmesi.....28
3.2.6. Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması.....29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....30
4.1. Bulgular.....30
4.1.1.Serbest Katalaz Enzimi İle Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular.....30
4.1.2. İmmobilize Katalaz Enzimi İle Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular.....40
4.1.2.1. Katalazın Glutaraldehit Üzerinden İmmobilizasyonu İle Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular.....40
4.1.2.2. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Enzimin Optimum pH, iyonik Güç ve Sıcaklığın Belirlenmesi.....53
4.1.2.3. Katalazın Ara Kol Üzerinden İmmobilizasyonu İle Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular.....63
4.2. Tartışma.....75
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....84
5.1. Sonuçlar.....84
5.2. Öneriler.....85
KAYNAKLAR.....86
ÖZGEÇMİŞ.....90

SİMGELER VE KISALTMALAR

Vmax : Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği maksimum hız.

Km : Michaelis-Menten sabiti.

Prot. : Protein

DEAE : Dietilaminoetil

HEMA : 2-hidroksietil metakrilat

CB : Cibacron Blue F3GA

CAT : Katalaz

Des. : Destek

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1 İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması..... 9

Çizelge 1.2 Sığır Karaciğer Katalazı Ve Aspergillus Katalazının Yapısında Bulunan Aminoasit Türleri Sayıları..... 11

Çizelge4.1 H_2O_2'in Farklı Derişimlerdeki Çözeltilerinin 240 nm'deki Ölçülen Absorbans Değerleri..... 30

Çizelge 4.2 Standart Protein Grafiği İçin Elde Edilen Bulgular..... 31

Çizelge 4.3 Serbest Enzim İçin Farklı pH'larda Ölçülen Aktivite (V) Değerleri..... 32

Çizelge 4.4. Serbest Enzim İçin Farklı Derişimlerdeki pH 7,5 Fosfat Tamponunda Ölçülen Aktivite Değerleri..... 33

Çizelge 4.5. Serbest Enzim İçin Farklı Sıcaklıklarda Ölçülen Aktivite Değerleri..... 34

Çizelge 4.6 Serbest Enzim İçin Farklı Substrat Derişimlerinde Ölçülen Aktivite Değerleri..... 36

Çizelge 4.7 Serbest Enzim İçin Termal Kararlılık..... 38

Çizelge 4.8 Serbest Enzimin Depolama Kararlılığı İle İlgili Bulgular..... 39

Çizelge 4.9 %0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Farklı Enzim Derişimlerinde ve İmmobilizasyon Sürelerinde Elde Edilen Bulgular..... 40

Çizelge 4.10 % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Farklı Enzim Derişimlerinde ve İmmobilizasyon Sürelerinde Tutuklanan Enzimin Yüzde Değerleri..... 41

Çizelge 4.11 % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 24 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri .. 42

Çizelge 4.12 % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 48 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri.. 43

Çizelge4.13 % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 72 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite

Değerleri..... 44

Çizelge 4.14 % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Farklı Enzim Derişimlerinde ve İmmobilizasyon Sürelerinde Elde Edilen Bulgular..... 45

Çizelge 4.15 %2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Farklı Enzim Derişimlerinde Ve İmmobilizasyon Sürelerinde Tutuklanan Enzimin Yüzde Değerleri..... 46

Çizelge 4.16 %2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 24 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri..... 47

Çizelge 4.17 % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 48 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri..... 48

Çizelge 4.18 % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 72 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri..... 49

Çizelge 4.19 % 1,25 (v/v) Glutaraldehit İle 24 Sa. İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Elde Edilen Bulgular 50

Çizelge 4.20 % 1,25 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekle 24 Sa. İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Ölçülen Aktivite Değerleri.... 51

Çizelge 4.21 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Farklı pH'larda Ölçülen Aktivite Değerleri..... 53

Çizelge 4.22 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Farklı Derişimlerdeki pH 6,5 Fosfat Tamponunda Ölçülen Aktivite Değerleri 54

Çizelge 4.23 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Farklı Sıcaklıklarda Ölçülen Aktivite Değerleri..... 55

Çizelge 4.24 Glutaraldehit üzerinden immobilize edilen katalaz enziminin farklı substrat derişimlerinde ölçülen aktivite değerleri..... 56

Çizelge 4.25 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Termal Kararlılık..... 59

Çizelge 4.26 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığı İle İlgili Bulgular..... 60

Çizelge 4.27 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Tekrar Kullanım Sayısına Bağlı Olarak Ölçülen Aktivite Değerleri..... 61

Çizelge 4.28 Farklı pH'larda Ara kol Üzerinden Yapılan İmmobilizasyonda Elde Edilen Bulgular..... 64

Çizelge 4.29 Ara kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Farklı pH'larda Ölçülen Aktivite Değerleri..... 66

Çizelge 4.30 Ara kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Enzimin Farklı Derişimlerdeki Fosfat Tamponunda Ölçülen Aktivite Değerleri..... 67

Çizelge 4.31 Ara kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Farklı Sıcaklıklarda Ölçülen Aktivite Değerleri..... 68

Çizelge 4.32 Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Farklı Substrat Derişimlerinde Ölçülen Aktivite Değerleri..... 70

Çizelge 4.33 Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Termal Kararlılık..... 72

Çizelge 4.34 Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Depolama Kararalılığı İle İlgili Bulgular..... 73

Çizelge 4.35 Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Tekrar Kulanım Sayısına Bağlı Olarak Aktivite Değişimi..... 74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Sınıflandırılması..... 3

Şekil 1.2 Amino Asit Yan Zincirlerinin Reaktif Grupları..... 6

Şekil 1.3 Protoporfirin IX Yapısı..... 10

Şekil 1.4. Katalazın Etki Mekanizması..... 12

Şekil 3.1 Katalaz İmmobilizasyonunda Kullanılan Yöntemlerin Şematik Özeti..... 23

Şekil 4.1 H_2O_2'in 240 nm'deki Standart Grafiği..... 31

Şekil 4.2 Standart Protein Eğrisi..... 32

Şekil 4.3 Serbest Enzim İçin pH-Aktivite Grafiği..... 33

Şekil 4.4. Serbest Enzim İçin İyonik Güç-Aktivite Grafiği..... 34

Şekil 4.5 Serbest Enzim İçin Aktivite-Sıcaklık Grafiği..... 35

Şekil 4.6. Serbest Enzim İçin Arrhenius Grafiği..... 35

Şekil 4.7 Serbest Enzim İçin Michealis-Menten Grafiği..... 37

Şekil 4.8 Serbest Enzim İçin Lineweaver-Burk Grafiği..... 37

Şekil 4.9 Serbest Enzim İçin Termal Kararlılık Grafiği..... 38

Şekil 4.10 Serbest Enzimin Depolama Kararlılığı Grafiği..... 39

Şekil 4.11 % 0,625(v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak g Destek Başına Tutuklanan Enzim Miktarının Başlangıç Enzim Derişimine ve İmmobilizasyon Süresine Bağlı Değişimi..... 41

Şekil 4.12 % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Tutuklanan Enzim Yüzdesinin Başlangıç Enzim Derişimine ve İmmobilizasyon Süresine Bağlı Değişimi..... 42

Şekil 4.13 % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 24 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği..... 43

Şekil 4.14 % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 48 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği..... 44

Şekil 4.15 % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 72 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği..... 45

Şekil 4.16 % 2,5(v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak g Destek Başına Tutuklanan Enzim Miktarının Başlangıç Enzim Derişimine ve İmmobilizasyon Süresine Bağlı Değişimi..... 46

Şekil 4.17 % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Tutuklanan Enzim Yüzdesinin Başlangıç Enzim Derişimine ve İmmobilizasyon Süresine Bağlı Değişimi..... 47

Şekil 4.18 % 2,5(v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 24 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği 48

Şekil 4.19 % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 48 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği..... 49

Şekil 4.20 % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 72 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği..... 50

Şekil 4.21 % 1,25 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekle 24 Sa. İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Tutuklanan Enzim Miktarı ve % Tutuklanan Enzim Oranı Grafiği..... 51

Şekil 4.22 % 1,25 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekle 24 Sa. İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Aktivite Garfiği..... 52

Şekil 4.23 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin pH-%Aktivite Grafiği..... 53

Şekil 4.24 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimin İyonik Güç-Aktivite Grafiği..... 54

Şekil 4.25 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Sıcaklık-Aktivite Grafiği (Aktivite birimi µmol H_2O_2 /mg prot.dk.)..... 55

Şekil 4.26 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Arrhenius Grafiği(Aktivite birimi µmol H_2O_2 /mg prto.dk.)..... 56

Şekil 4.27 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enzimi İçin Michealis-Menten Grafiği(Aktivite birimi µmol H_2O_2 /mg prto.dk.)..... 57

Şekil 4.28 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Lineweaver-Burk Grafiği (Aktivite birimi µmol H_2O_2 /mg prot.dk.)..... 57

Şekil 4.29 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enzimi İçin Michealis Menten Grafiği (Aktivite birimi µmol H_2O_2 /g des.dk.). 58

Şekil 4.30 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Lineweaver-Burk Grafiği (Aktivite birimi µmol H_2O_2 /g des.dk.).. 58

Şekil 4.31 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Termal Kararlılık Grafiği..... 59

Şekil 4.32 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığı Grafiği 61

Şekil 4.33 Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Kullanım Sayısı - % Kalan Aktivite Grafiği 63

Şekil 4.34 Ara kol Üzerinden Yapılan İmmobilizasyonda pH İle g Destek Başına Bağlanan Protein Miktarının Değişimi..... 64

Şekil 4.35 Ara kol Üzerinden Yapılan İmmobilizasyonda pH İle % Tutuklanan Enzim Miktarının Değişimi..... 65

Şekil 4.36 Ara kol Üzerinden Yapılan İmmobilizasyonda Bağlanma pH'sı İle Aktivitenin Değişimi Grafiği..... 65

Şekil 4.37 Ara kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz İçin pH-Aktivite Grafiği..... 67

Şekil 4.38 Ara kol Üzerinden İmmobilize Edilen Enzim İçin İyonik Güç-Aktivite Grafiği..... 67

Şekil 4.39 Ara kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Sıcaklık-Aktivite Grafiği..... 68

Şekil 4.40 Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Arrhenius Grafiği..... 69
Şekil 4.41 Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Michealis Menten Grafiği..... 70
Şekil 4.42 Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Lineweaver- Burk Grafiği (Aktivite birimi µmol H_2O_2 /mg prot.dk.)..... 71
Şekil 4.43 Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Lineweaver-Burk Grafiği(Aktivite birimi µmol H_2O_2 /g des.dk.)... 71
Şekil 4.44 Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Termal Kararlılık Grafiği..... 72
Şekil 4.45 Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığı Grafiği..... 73
Şekil 4.46 Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Enzimin Tekrar Kullanım Sayısına Bağlı Aktivite Değişimi Grafiği 75

1.GİRİŞ

1.1. Enzimler

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

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

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.

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

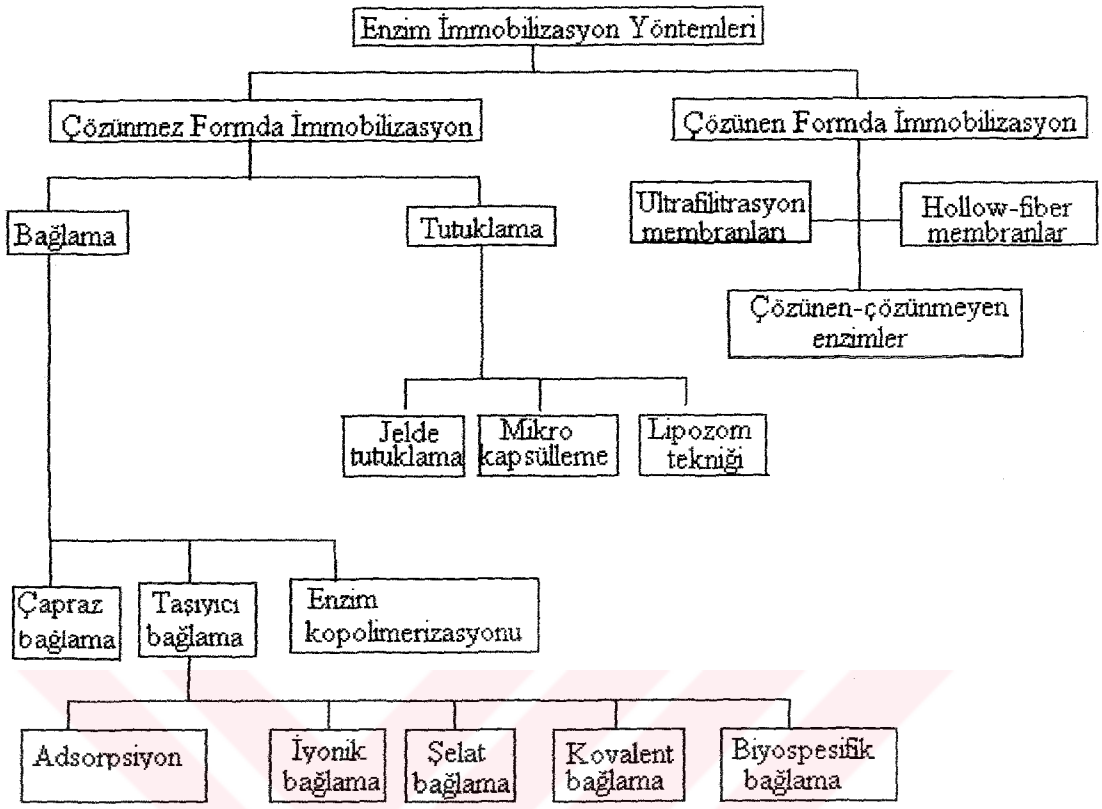
Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıtıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler.

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.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır.

1.2.Enzim immobilizasyon yöntemleri

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



Şekil 1.1 Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

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

1.2.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

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

1.2.1.1. Bağlama

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

Çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminde küçük moleküllü bi- veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşmaktadır. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH ya ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, klorformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsulfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorohidrinlerdir.

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

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

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Mekanik stabilite uygun partikül formu,
- Kimyasal ve termal stabilite,
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik,
- Rejenere olabilme

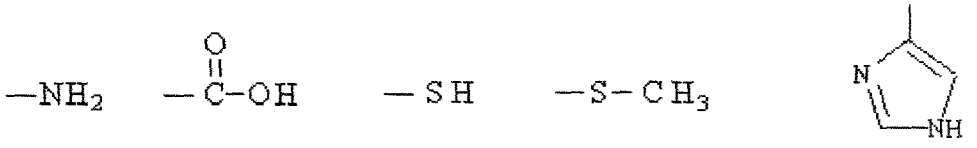
Taşıyıcıya bağlama yöntemleri; adsorpsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama olmak üzere beş gruba ayrılır.

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

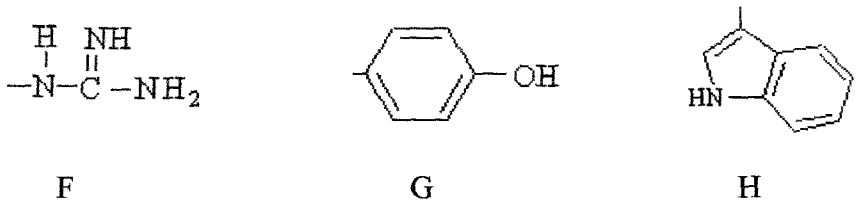
İyonik Bağlama: Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif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

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

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



A B C D E



F G H

Şekil 1.2 Amino asit yan zincirlerinin reaktif grupları

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

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

C : Sisteinin sülfhidril grubu

D : Methioninin tiyoeter grubu

E : Histidinin imidazol grubu

F : Argininin guanidinil grubu

G : Tirozinin fenolik grubu

H : Triptofanın indolil grubu

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile 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 edilir.

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

1.2.1.2. Tutuklama Yöntemleri

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

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

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

Lipozom tekniği, sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır. Çapı 1-100 μ arasında değişen enzim çözeltisi damlacıklarını içeren hidrokarbon çözücü; çeşitli katkı maddeleri ve yüzey yapıcılarla enzim çözeltisi damlacıkları çevresinde oluşturduğu suda çözünmeyen faza sıvı yüzey yapıcı membranlar adı verilmektedir. Yüzey yapıcı olarak en çok kullanılan Span 80'dir. Yöntemin en önemli üstünlüğü; süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel oluşudur. Aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlar ve oldukça büyük bir kontakt yüzeyine sahiptir. Önemli sakıncaları ise; substrat ve ürünün membranda geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin inaktive olması ve sıvı olan membrandan enzimin kaçma olasılığıdır.

1.3. 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

1.4. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

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

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

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

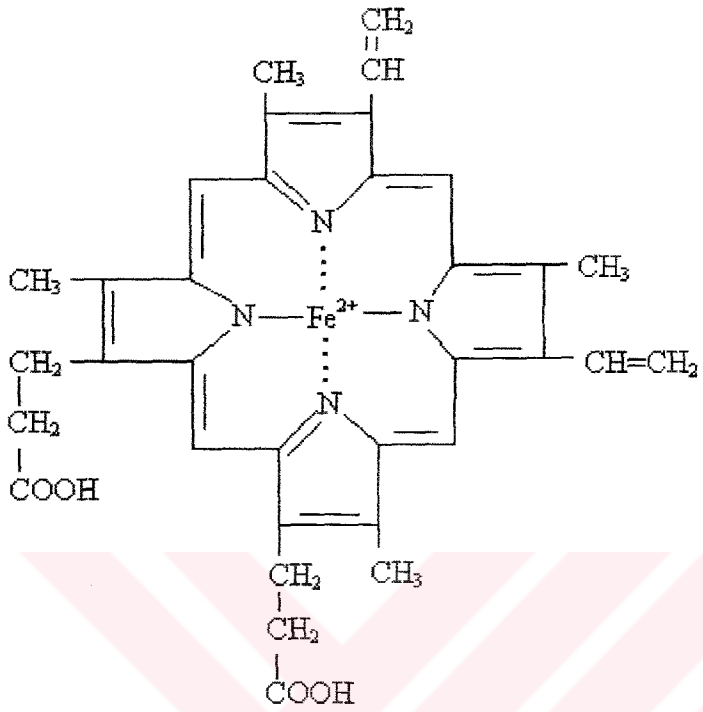
1.5. Katalazın Biyolojik İşlevi

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

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

Acetobacter peroxidans ve *Shigello dysenteriae* hariç aneoroblarda bulunmaz. Katalaz aerobik hücrelerde bulunan bir hem proteinidir. Katalaz kanda, kemik iliğinde, mukoz membranlarda, böbrek ve karaciğerde bulunur. Katalaz peroksizomun belirli bir enzimidir. Asetil Co-A oksidaz reaksiyonlarında üretilen H_2O_2'nin parçalanmasına katılır. Katalaz, aminoasit oksidaz ve alkoldehidrojenazın

içinde bulunduğu oksidatif enzimlerle görev yapar, (Sekhar, S., 1999). Katalaz şekil 1.3'de yapısı gösterilmiş olan Protoporfirin IX halkasını içerir.



Şekil 1.3 Protoporfirin IX yapısı

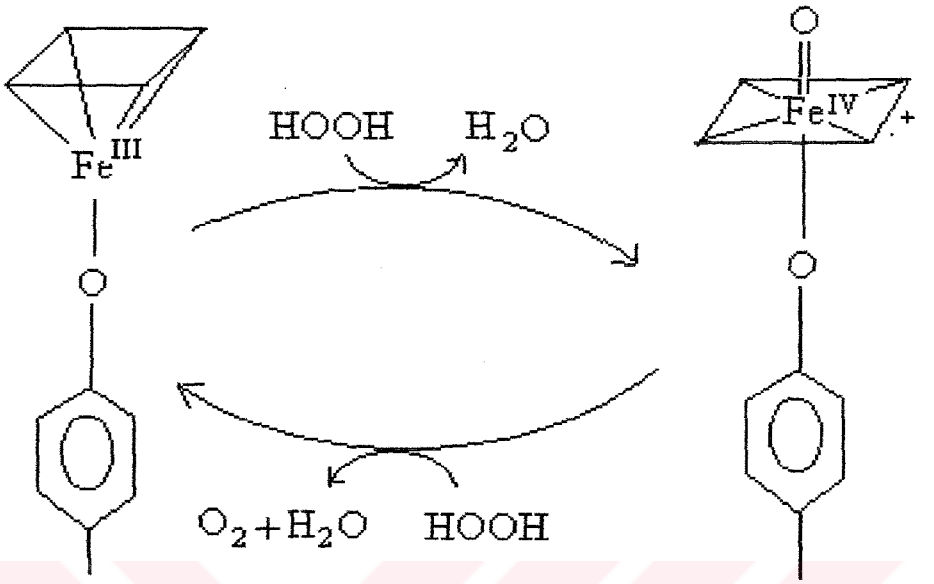
Sığır karaciğer katalazının dört tane alt ünitesi vardır. Molekül ağırlığı yaklaşık 240 kdalton olup; izoelektrik noktası pI=5,4'dır. Aspergillus katalazının molekül ağırlığı yaklaşık 323 kdaltondur (Vasudevan, P.T., 1994) Sığır karaciğer katalazı ve Aspergillus katalazının yapısında bulunan aminoasit türleri ve bunların bir mol katalazda bulunan aminoasit artıklarının sayıları Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2 Sığır karaciğer katalazı ve Aspergillus katalazının yapısında bulunan aminoasit türleri ve sayıları

	Sığır Karaciğer Katalazı	Aspergillus Katalazı
Aminoasit Türü	Aminoasit Artığı Sayısı (mol^{-1} katalaz)	Aminoasit Artığı Sayısı (mol^{-1} katalaz)
Aspartik asit	294	451
Glutamik asit	197	349
Prolin	166	266
Glisin	155	302
Alanin	154	363
Valin	141	245
Methionin	41	72
İzolösin	79	146
Lösin	154	257
Tirozin	86	149
Fenilalanin	132	245
Lizin	116	230
Histidin	89	99
Arginin	130	180
Sistein	58	68

Katalazın etki şekli Şekil 1.4'de gösterilmiştir. Katalaz H_2O_2'yi hem elektron verici hem de alıcısı olarak kullanır. Reaksiyon döngüsünde katalazın ferrik (Fe^{+3}) içeren hali, Bileşik I'i oluşturmak üzere peroksid molekülü ile tepkime verir. $Fe^{+4.}$ radikali içeren porfirinin π katyonu elektron vericisinin oksidasyonu ile Bileşik I doğal haline dönüşür.

Dinlenme durumundaki enzim



Şekil 1.4. Katalazın etki mekanizması

$$\text{Katalaz } Fe^{+3} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Bileşik I} + H_2O$$

$$\text{Bileşik I} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Katalaz } Fe^{+3} + H_2O + O_2$$

Tüm katalazlarda hem demirin beşinci ligandı tirozin artığıdır. Histidin artığı hem bölgesinin yakınında yer alarak kataliz için önemli rol oynamaktadır.

1.6. Katalazın Endüstriyel Önemi

Peroksitler beyazlatma, oksitleme özelliğinden dolayı endüstriyel madde olarak yaygın kullanılırlar. H_2O_2 deterjanlarda, kağıt hamuru ve kağıtta, selülozda, ev ile ilgili beyazlatıcılarda, tekstil ve şarap mantarı imalatında ve gıda endüstrisinde temel beyazlatıcı maddedir. H_2O_2 çok küçük miktarlarda eczacılıkta ve kozmetik ürünlerinde antiseptik ve dezenfektan olarak, diş macunu, diş beyazlatıcısı ve gargaralarda da kullanılmaktadır.

Peroksidin belirlenmesi için bir çok yöntem (kromatografik, kimyasal indirgeme, kolorimetrik, polarografik, fotometrik) kullanılmıştır (Ertaş, N., 2000).

Ayrıca H_2O_2'in belirlenmesi için oksidaz enzimleri içeren bir çok biosensör geliştirilmiştir. Çalışma koşullarına bağlı olarak gıda depolama alanında bazı katkıların kullanımı önemlidir. Günümüz endüstrisinde mikrobiyal canlıların sütte çoğalmalarını engellemede soğuk pastörizasyon için H_2O_2 kullanılmaktadır. Dünya Gıda ve Tarım Organizasyonu ve Birleşmiş Milletler Tarım Organizasyonu süte eklenen H_2O_2'in % 0.025-0.05 miktarlarda olmasına izin vermektedir. İşlemden sonra sütteki H_2O_2 katalaz ile O_2 ve H_2O'ya dönüştürülür (Tahran, L.,1991). Glukozun meyve sularından, sıvı yumurtadan uzaklaştırılmasında, kanda ve serumda glukozun belirlenmesinde glukozoksidaz ve katalaz kombinasyonları kullanılmaktadır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hossain, M. ve Do, D., (1987), bu çalışmada sığır karaciğer katalazı ve *Aspergillus niger* amiloglukozidazı iki farklı gözenek büyüklüğü olan kontrollü gözenekli cam parçalarında kovalent olarak immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon işleminin uzun zaman aldığı, desteğin gözeneklerine enzimlerin difüzyonunun kısıtlanmasıyla immobilizasyonun kontrol edilebildiğini rapor etmişlerdir.

Bellobono, I. R. ve Ark. (1990), bu çalışmada kullanılan destek ortamı poli (vinilklorür) membranın akrilik monomerleri ile photographing işlemi ile elde etmişlerdir. Katalaz enziminin UV ışınlarına maruz kalması sonucu minimum aktivite kaybının olduğu koşulları belirlemişlerdir. Kesikli reaktörde membranda tutuklu enzim ve serbest enziminin başlangıç hızlarını belirlemişlerdir.

Tarhan, L. ve Telefoncu, A. (1990), fungal kökenli katalaz ve *Aspergillus niger* kökenli glukozoksidazı iki destek kullanarak birlikte tutuklamışlardır. Birinci destek olarak seçilen dimetilaminoetil selüloz önce 2-amino-4,6-dikloro–s-triazin ile sonra diaminohekzan ve glutaraldehid ile modifiye etmişlerdir. İkinci destek, akrolein/sitiren monomerlerinin 1:1 oranında azot atmosferinde dibenzilperoksidin bulunmasıyla radikalik kopolimerizasyon sonucu elde edilmiştir. Tutuklu enzim çifti sisteminde pH ve sıcaklığa bağlı aktivite değişimini incelemişlerdir.

Chaterjee, U. ve Ark. (1990), bu çalışmada, keçi karaciğer katalazı, aluminyumoksit, jelatin, poliamid ve tavuk yumurtası kabuğuna tutuklanmıştır. Yumurta kabuğuna bağlı enzimin depolamada çok kararlı olduğu, H_2O_2'e karşı fazla ilgi gösterdiği, formaldehit ve sodyum azid tarafından inhibisyona serbest enzime göre çok daha az duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Metelitsa, D.I. ve Ark. (1991), bu çalışmada katalazın MIFIL poliamid film membranı ile polisitiren test tüplerinde adsorpsiyonunu incelemişlerdir. Polisitiren ve poliamid membranda adsorplanan katalazın aktivitesinin % 4,5 ve % 11,2'nin kaldığını gözlemlemişlerdir.

Kohjiya, S. ve Ark. (1991), bu çalışmada sığır karaciğer katalazı poli (sodyum 2-akrilamid-2-metil1-propansulfonat) ve poli (2-trimetilaminoetil) metakrilat klorürden oluşan poliiyon kompleksinde tutuklanmıştır. Tutuklanmış

katalazın serbest enzimden daha fazla termal karalılık gösterdiğini bulunmuştur. Poliiyon kompleksi oluştuğu zaman lesitin, histon, albumin gibi inert bileşiklerin ilave edilmesiyle tutuklanmış katalazın karalılığının ve aktivitesinin arttığı rapor etmişlerdir.

Sılva, M.A.D. ve Ark. (1991), Bu çalışmada, polietilen-g-co-akrilik asit ve poli (tetrafluroetilen)-g-co-akrilik asidin birleştirildiği membranda sığır karaciğer katalazını kovalent olarak immobilize ederek, H_2O_2'tin belirlenmesi için bir elektrokimyasal sensör tasarlamışlardır. Hidrofobik destek üzerindeki karboksilik asit gruplarının enzim immobilizasyonu için uygun bir ortam sağladığını rapor etmişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda sensörün minimum 4,7 µmol/L derişimdeki H_2O_2'yi ölçebildiğini, 10 µmol/L-6 mmol/L derişimlerinde ise doğrusal ölçüm yaptığını bildirmişlerdir. Sensörün H_2O_2 miktarını belirleme süresinin oldukça kısa olduğunu, bir örneğin H_2O_2 derişimini 1 dakika içinde belirleyebildiğini ve sensörün oda sıcaklığında 4 aydan daha uzun bir sürede kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Dajun, C. ve Ark. (1993), Katalazı alkilleme reaktifi olarak dimetilsülfat yerine trietiloksonyumflorborat kullanarak naylon membran üzerine kovalent bağlanma ile tutuklamışlardır. Dimetilsülfat metoduna göre elde edilen enzim aktivitesinden 2 kat fazla enzim aktivitesi gözlemlemişlerdir.

Jıang, B. ve Zhang, Y. (1993), Bu çalışmada, sığır karaciğer katalazı, poliakrilamid (G1), poli(sodyummetakrilat) (G2), poli (akrilamid-co-sodyumakrilat) (G3)'te N,N'metilenbisakrilamidin çapraz bağlandığı jelde % 85 tutuklanmıştır. G1'de tutuklu enzimin düşük aktivite, G3'te tutuklanmış enzimin en fazla aktivite gösterdiği, G1 ve G2 'de tutuklanmış katalazın daha düşük pH'larda serbest ve G1'de tutuklanmış katalazdan daha kararlı olduğu, tutuklanmış katalazın termal kararlılığında önemli bir değişme olmadığını rapor etmişlerdir.

Vrbova, E. ve Ark. (1993), Bu çalışmada, nişastanın belirlenmesi için Clark tipi oksijen elektrodunda enzim sisteminin tutuklanmasıyla bir biosensör geliştirmişlerdir. Amiloglukozoksidaz, mutarotaz, glukozoksidaz ve katalaz enzimleri kısmen hidroliz edilmiş naylon ağ veya aktive edilmiş kollagen membrana

birlikte tutuklamışlardır. Her iki durumda da glutaraldehid ve siklohekzilizosiyanat kullanılarak enzimin kovalent olarak immobilize olmasını sağlamışlardır.

Solas, M.T. ve Ark. (1994), Sığır karaciğer katalazı iyonik adsorpsiyon ile bioskin adı verilen *Acetobacterxylium* ve bir kaç bakteri tarafından kültürde üretilen doğal bir polimer üzerine tutuklamışlardır. Düşük enzim yoğunluğunda tutuklu enzimin H_2O_2 'te karşı ilgisinin serbest enzimden % 30 daha az olduğu bulunmuştur. Tutuklanmış katalazın depolamadan 16 gün sonra aktivitesinin % 70'nin kaldığı, serbest enzimin oda sıcaklığında 3 gün sonra inaktif hale geldiğini rapor etmişlerdir.

Vasudevan, P.T. ve Weiland, R. H. (1994), gözeneksiz cam destek üzerine tutturulmış Aspergillus ve sığır karaciğer katalazının elektron mikroskobu ile morfolojik çalışmalarını yapmişlardır. Aspergillus katalazının, sığır karaciğer katalazından daha yoğun , sık bir şekilde yüzeyde tutunduğu rapor etmişlerdir.

Naka, K. ve Ark. (1996), bu çalışmada gözenek büyüklüğü 7nm olan silika jele (Wakogel C-300) pH=7,0 de adsorplanan katalaz miktarının; poli[(N-asetilimino) ve poli(N-pentanilimino)etilen içeren blok kopolimerlerden oluşan polimer varlığında önemli oranda artığının bildirmişlerdir. Gözenek büyüklüğü 80 nm olan silika jele (MB-800) poli[(N-asetilimino)etilen] ve poli[(nanonilimino)etilen] içeren blok kopolimerler varlığında çeşitli pH'larda katalaz ve yabanturpu peroksidazının adsorplanan miktarlarını incelemişlerdir. Alkali koşullarda (pH=8.0) ikinci çalışmada silika yüzeyinde adsorplanan katalaz miktarının, kopolimerin yokluğunda silika yüzeyinde adsorplanan katalaz miktarından 10 kat fazla olduğunu, ilk yapılan çalışmada pH=7.0'de silika yüzeyinde adsorplanan katalaz miktarının, kopolimer yokluğunda adsorplanan katalaz miktrarından 7 kat fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Campanella, L. ve Ark. (1997), bu çalışmada , sığır karaciğer katalazı kappakarragenan jelde tutuklanarak hem sulu hem de susuz çözücülerde çalışan bir biosensör geliştirmişlerdir. Kozmetikte kullanılan kremlerde, emulsiyonlarda ve dezenfektanlardaki H_2O_2 'tin miktarını incelemişlerdir.

Yakup, M. A. ve Ark. (1997), poli(2-hidroksimetilmetakrilat) poli(HEMA) membranı a,a'azobisizobutironitril(AIBN)'nin başlatıcı olarak kullanılmasıyla HEMA'nın UV fotopolimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Cibacron Blue F3GA ile

kovalent olarak birleştirilmiş ve sonra Fe(III) iyonu ile kompleks oluşturmuşlardır. Katalazın adsorpsiyonunda poli(HEMA)-CB ve poli(HEMA)-CB- Fe(III) membran türevleri kullanılmıştır. Fe(III) içeren membranın enzim tutma miktarını daha fazla bulmuşlardır. Tutuklu enzimin Km, Vmax, optimum sıcaklık, pH, depolama kararlılığı ve inaktivasyonunu incelemişlerdir.

Legaz E.M. ve ark.(1998), sığır karaciğer katalazı bioskin adlı *Acetobacter Xylinum* ve birkaç maya tarafından üretilen, aminosekerler(glukozamin ve N-asetilglukozamin) içeren doğal polimere adsorpsiyon ile immobilize etmişlerdir.Oda sıcaklığında serbest enzim 3 gün sonunda inaktif olurken immobilize enzimin yarı ömrünü 26.5 gün olarak rapor etmişlerdir.

Akgöl, S. ve Dinçkaya, E. (1999), çözünmeyen oksijen prob ile katalazın birleştirilmesi ile H_2O_2 'tin belirlenmesi için bir biosensör geliştirmişlerdir. Enzim elektrod olarak hazırlanmış teflon membranda sabitleştirilmiş gluteraldehid ile katalaz jelatine tutturulmuştur. Biosensörün 1×10^{-5} - 3×10^{-3} M H_2O_2 içeren çözeltilerde doğrusal ölçüm yaptığını, ölçüm süresinin 30 s olduğunu, biosensörün 400 deneme ve 3 aydan uzun bir periyotta kararlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Çetinus Ş., Öztop, H.N. (1999), katalaz enzimini bir polisakkarit olan Sefadeks G-100 destek üzerine adsorbe ederek tutuklamışlardır. Serbest katalaz ve tutuklu katalaz için optimum sıcaklık 25 °C olarak, optimum pH'yı 7.0 olarak bulmuşlardır. Serbest katalaz için ise Km'i 25,16 mM Vmax'ı 24042 μmol dk^{-1} mg $protein^{-1}$, Sefadeks G-100 destek üzerinde tutuklu katalaz için ise Km'i 28,03 mM, Vmax'ı 6653 μmoldk^{-1} mg $protein^{-1}$ olarak rapor etmişlerdir.

Lida T. ve Ark. (2000), *Micrococcus lyzodeikticus* kaynaklı katalaz enzimini fotonla çapraz bağlanmış reçine kullanarak immobilize etmişler ve düşük derişimlerde hidrojen peroksid içeren atık sularda çalışmalar yapmışlardır. Fotonla çapraz bağlanmış reçine jelin uzun süreli hidrojen peroksid varlığında bile kararlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bazı prepolimerler (ENT-2000 polietilen glikol, ENTG-3800 polietilenglikol ve polipropilenglikol kombinasyonu,) ve fonksiyonel monomerler (vinilpirolidonakrilolmorfolin, methakriloloksietilisosiyanik glukozid) ile taşıyıcı jelin modifiye edilmesi veya modifikasyon yapmadan stabilizör (Tween 80, polioksietilen, sorbitan monooleat, Triton X-100, polioksietilen,oktilfenileter)

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU DOKÜMANTASYON MERKEZİ

maddelerin eklenmesiyle immobilize edilmiş katalazın kararlılığını incelemişlerdir. Enzim hidrofilik fotonla çapraz bağlanmış reçineye immobilize edilirken, Tween 80, polioksietilen ve sorbitan monooleatın katalaza eklenmesiyle önceki aktivitesinin % 80'nini göstermiştir.

Çetinus Ş., Öztop, H.N. (2000), bu çalışmada, sığır karaciğer katalazı doğal bir polimer olan chitosanda kovalent bağlama ile tutuklanmıştır. Serbest ve tutuklu katalaz için optimum sıcaklık, pH, termal kararlılık, depolama kararlılığı ve kinetik parametrelerini araştırmışlardır.

Denizli, A. ve Ark. (2000), kongo kırmızısı gözeneksiz poli[2-hidroksimetakrilat-co- metakrilat] p[HEMA-co-MMA] kopolimer mikro partiküllere tutuklanmıştır. Ortamın pH'sı ve Fe(III) iyolarının derişimleri değiştirilerek farklı miktarlarda Fe(III) iyonları boya türevi mikro partiküllere yüklenmiştir. Kongo kırmızısı türevi ve Fe(III) ile kompleks oluşturmuş mikropartikülleri, glukozoksidaz, sığır karaciğer katalazı, lizozim ve sığır serum albumin adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Adsorpsiyon ortamında proteinlerin miktarları ve pH'nın değişimiyle bu mikro partiküllerin maksimum adsorpsiyon kapasitelerini belirlemişlerdir.

Costa, S.A. ve Ark. (2001), bu çalışmada Bacillus sp.'den saflaştılılan katalaz enzimi glutaraldehid kullanılarak alumina üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Enzimin desteğe bağlanma süresinin enzimin bağlanma yüzdesine etkisini ve bu belirlenen zamanda enzimin aktivitesini incelemişlerdir. İmmobilize edilen enzimin serbest enzime göre yüksek pH'larda daha kararlı olduğunu belirlemişlerdir. Substrat çözeltisi olan hidrojen peroksid çözeltisine surfaktanlar veya anyonik stabilizörler eklediklerinde immobilize enzimin inhibe olduğunu rapor etmişlerdir.

Costa, S.A. ve Ark. (2002), bu çalışmada katalaz enzimini, aluminyumoksid üzerine çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile immobilize etmişlerdir. Kesikli karıştırılan tank rektörde ve tekrar sirkülasyonun olduğu kolon reaktörde enzim aktivitesinin pH, sıcaklık ve depolama kararlılığına bağlı değişimini incelemişlerdir. Her iki reaktör de substrat derişimi 1 M üstünde olduğunda inhibisyon gözlemlemişlerdir. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH'yı 7,0 olarak belirlemişlerdir. İmmobilize

enzimin pH 7,0 de 80 °C de aktivitesinin % 90'nının, pH 11,0 de 30 °C de % 44'nün kaldığını rapor etmişlerdir. İmmobilize katalazın yarı ömrünün pH 12,0 de ve 60 °C de 2 saat arttığını bildirmişlerdir.

3.MATERYAL VE METOD

3.1.Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup hidrojen peroksid Merck, Darmstadt'tan diğer kimyasallar Sigma, St. Louis, MO. firmasından sağlanmıştır. Araştırmada kullanılan kimyasallar, araç ve gereçler şunlardır:

Kimyasallar, sığır karaciğer katalazı (C-100 51100 U/mg prot.), florisil (60-100 mesh) destek materyali (magnezyum silikat içeren inorganik matriks), aseton, glutaraldehit, 3-aminopropil trietoksisilan, 3-aminopropiyonik asit, 1-siklohekzil-3-(2-morfolinoetil) karbodiimid metho-p-toluen sülfonat, hidrojen peroksit, nitrik asit, aseton, sodyum karbonat, sodyum hidroksit, bakır sülfat, sodyum-potasyum tartarat, folin-ciocalteu çözeltisi, sığır albumini, sodyum klorür.

Araç ve gereçler, UV-Vis spektrofotometre (ATI UNICAM), pH metre (HANNA8417), magnetik karıştırıcı, inkübatör (ES 500), santrifüj, elektrikli terazi, otomatik pipet, girdap karıştırıcı.

3.2.Metod

3.2.1.Serbest Katalaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Katalaz aktivitesi Aebi, H. (1974) tarafından önerilen Lartillot, S. ve arkadaşları (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 0.0396cm^2/µmol'dır. Yöntemde, 50 mmol/L fosfat tamponu (pH=6.8) içinde 10 mmol/L H_2O_2 olacak şekilde substrat çözeltisi hazırlanır. 20 µL test edilecek enzim çözeltisi üzerine 2,5 mL substrat çözeltisi eklenir ve 37 °C'de 2 dakika bekletilir. Reaksiyonu durdurmak için ortama 0,5 mL 1 M HCl çözeltisi ilave edilir. 240 nm'de absorbansı (Ar) ölçülür.

Kör olarak 2,5 mL tampon (50 mM, pH=6,8) ve 0,5 mL 1 M HCl içeren çözelti kullanılarak aynı işlemler tekrarlanır.

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

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

Enzimatik aktiviteden dolayı absorbans (A) değişimi;

A=(As+At)-Ar

Enzim aktivitesinin IU/mL cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılır.

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

V_t= Toplam reaksiyon hacmi (mL)

V_e= Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (mL)

ε=H_2O_2'nin molar ekstinksiyon katsayısı(0.0396 $cm^2/\mu mol$)

t= Reaksiyon zamanı (dakika)

Bu çalışmada her bir örnekteki protein miktarı belirlenerek aktivite $\mu molH_2O_2$ mg $prot^{-1}$ dak^{-1} olarak hesaplanmıştır.

İmmobilize edilen katalaz enzimin aktivitesinin ölçümünde, immobilize katalaz içeren 10 mg destek alınarak üzerine 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 10 mM H_2O_2 çözeltisinden 5 mL eklenir. 2 dakika sonunda reaksiyon 1 mL 1 M HCl çözeltisi ile durdurulur. 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilir ve üst faz alınarak 240 nm'de absorbansı ölçülür (Ar). Başlagıçta H_2O_2 absorbansını (As) belirlemek için; 5,0 mL substrat ve 1,0 mL 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülür. Proteinin neden olacağı absorbansı belirlemek için (At); immobilize katalaz içeren 10 mg destek, 5,0 mL tampon ve 1,0 mL 1 M HCl içeren karışım 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilir ve üst faz alınarak 240 nm'de absorbansı ölçülür. İmmobilize edilmiş katalaz için aktivite iki şekilde hesaplanmıştır; birincisi $\mu molH_2O_2$ mg $prot^{-1}$ dk^{-1}, ikincisi $\mu molH_2O_2$ g des^{-1} dk^{-1}'dir.

3.2.2. Katalaz Enziminin Florisil Üzerine Kovalent Olarak İmmobilizasyonu

3.2.2.1 Alkilamin Türevinin Hazırlanması

Alkilamin türevinin hazırlanmasında (silanlama) Weetall,H.H. (1976) tarafından literatürde bildirilen yöntem kullanılmıştır. Yöntemde, destek materyali olarak seçilen florisil % 5 (v/v)'lik nitrik asit ile 80-90 °C'de 60 dakika yıkanır ve takiben su ile yıkanıp 120 °C'de kurutulur. Kurutulmuş desteğin 1 gramı hacimce % 4'lük 3- aminopropiltrietoksisilanın aseton içerisindeki çözeltisine eklenerek 45 °C'de 24 sa. bekletilir. Saf su ile yıkanarak 115 °C'de etüvde 1 gece kurutulur.

3.2.2.2. Katalazın İmmobilizasyonu

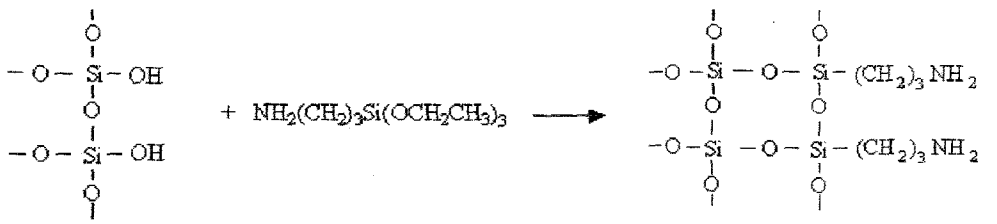
Katalazın immobilizasyonunda kullanılan yöntem literatürde Costa S.A. (2001) ve Sang Wco (1992) tarafından bildirilmiş ve şekil 3.1.'de şematik olarak özetlenmiştir. 1 g silanlanmış desteğe 25 mL % 2,5 (v/v)'luk glutaraldehitin 50 mM pH=7,0 fosfat tamponundaki çözeltisi eklenip 120 dakika beklendikten sonra, reaksiyona girmemiş glutaraldehit saf su ile yıkanarak uzaklaştırılır ve 60 °C'de 1 sa kurutulur. Bu basamaktan sonra enzim destek üzerine ya doğrudan (a) veya destek ile enzim arasında ara kol oluşturacak 3-aminopropiyonik asit üzerinden (b) olmak üzere iki farklı şekilde immobilize edilir.

(a) Katalazın gluteraldehit üzerinden immobilizasyonunda kullanılan yöntemin esası literatürde Costa S.A.(2001) tarafından bildirilmiştir. 5 g destek için enzimin son derişimi 0,42, 0,83, 3,33, 5,00, 8,32, 16,65, 33,30, 50,00 mg/mL olacak şekilde 20 mL enzim çözeltisi kullanılmıştır. Enzim ve destek materyali oda sıcaklığında pH 7,0 fosfat tamponunda 24, 48, 72 sa. bekletilerek enzimin desteğe kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. İmmobilizasyon işleminden sonra ortamda kalan serbest enzimi uzaklaştırmak için 50 mM fosfat tamponu ile 280 nm'de süzüntüde absorbans görülmeyinceye kadar yıkanmıştır. İmmobilize edilen enzim miktarının belirlenmesi için Lowry ve ark. (1951) yöntemiyle süzüntüde protein

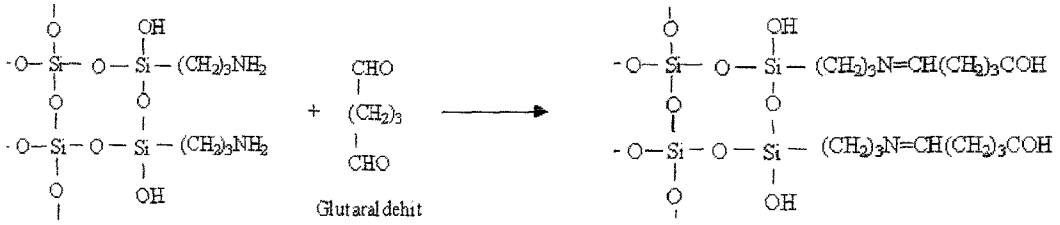
tayini yapılmıştır. İmmobilizasyon işleminin başında ortamda bulunan protein miktarından süzüntüde ki protein miktarı çıkartılarak g destek başına tutuklanan mg enzim hesaplanmıştır.

(b) Katalazın gluteraldehite bağlı ara kol olan 3-aminopropiyonik asit üzererinden immobilizasyonunda literatürde Sang Wco (1992) tarafından belirtilen yöntem kullanılmıştır. Glutaraldehit bağlanmış destekten 4 g alınarak üzerine 50 mM, pH 7,0 fosfat tamponuyla % 1'lik olacak şekilde hazırlanmış 3-aminopropiyonik asit çözeltisinden (ara alkil kolu) 40 mL eklenerek 2 sa. yavaş yavaş karıştırılır. Bu süre sonunda 3-aminopropiyonik asitin reaksiyona girmeyen fazlası saf su ile yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra üzerine 40 mL pH 4,0 50 mM asetat tamponu içinde 200 mg 1-siklohekil-3-(2-morfolinoetil) karbodiimid metho-p-toluen sülfonat eklenerek 2 sa. karıştırılır. Bu süre sonunda yine reaksiyona girmemiş 1-siklohekil-3-(2-morfolinoetil) karbodiimid metho-p-toluen sülfonat saf su ile yıkanarak uzaklaştırılır. Bu aşamadan sonra farklı pH'larda katalaz enzimi immobilize edilerek katalaz enziminin bağlanması için en uygun pH belirlenir. Glutaraldehit üzerinden bağlanma çalışmaları sonunda belirlenmiş olan en uygun enzim derişimi kullanılarak 5 g destek ve 20 mL enzim çözeltisi ile immobilizasyon gerçekleştirilir. İmmobilizasyon işleminden sonra immobilize enzim tampon çözeltisi ile süzüntüde protein kalmayıncaya kadar yıkanır, toplam süzüntüde protein tayini yapılarak g destek başına tutuklanan mg enzim miktar hesaplanır. Aşağıda, desteğin hazırlanmasından enzimin immobilizasyonuna kadar olan her aşamada gerçekleşen tepkimeler verilmiştir. İmmobilizasyon işlemi şekil 3.1'de özetlenmiştir.

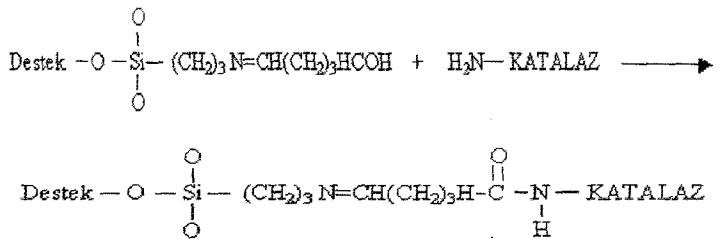
Florisilin silanlanması:



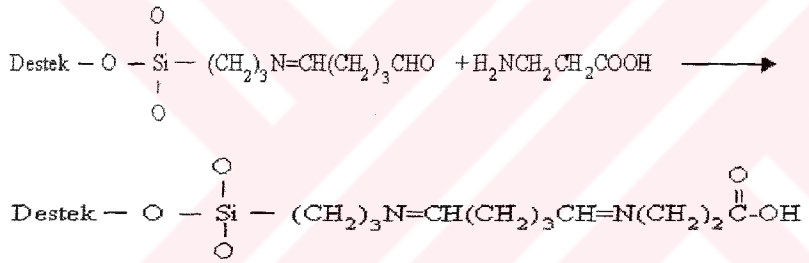
Glutaraldehitin desteğe bağlanması:



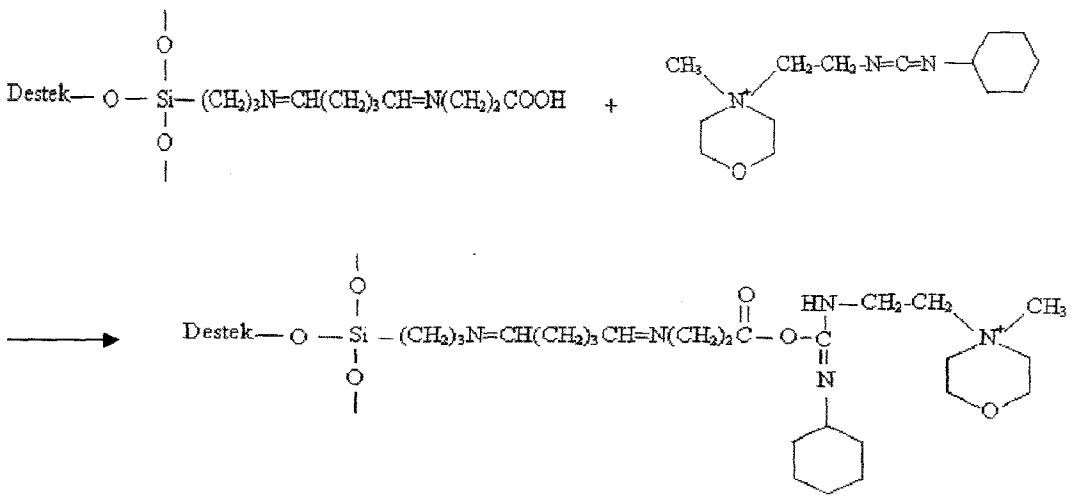
Glutaraldehit üzerinden enzimin bağlanması:



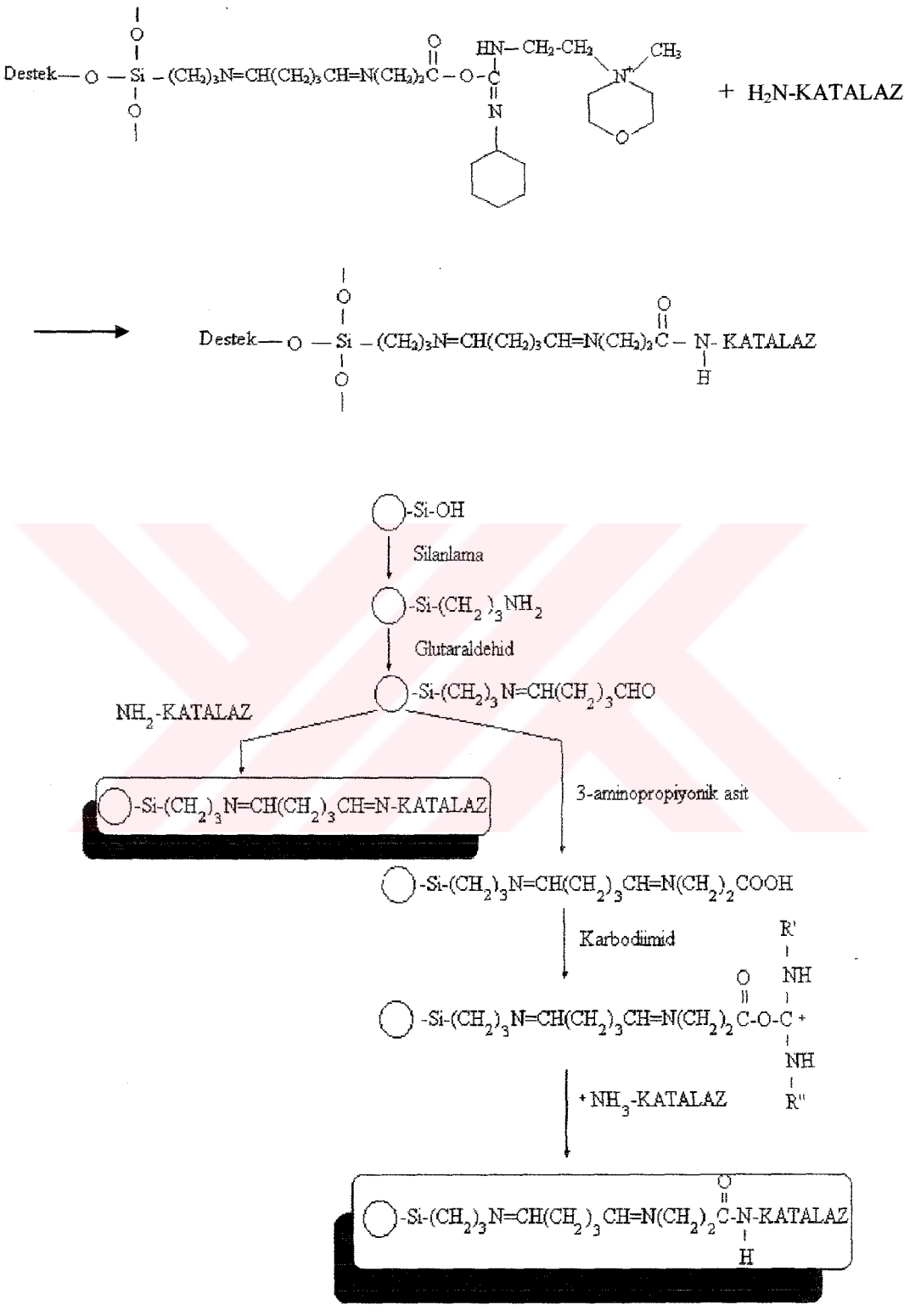
Desteğe glutaraldehit üzerinden ara kolun bağlanması:



Ara kol bağlı desteğin karbodiimid ile aktifleştirilmesi:



Aktifleştirilmiş desteğe enzimin bağlanması:



Şekil 3.1. Katalaz immobilizasyonunda kullanılan yöntemlerin şematik özeti

3.2.2.3 Protein Tayini

Protein tayini için Lowry, O.H. ve arkadaşları tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1) Çözelti A:Bu çözelti 20 g Na_2CO_3, 4 g NaOH saf suda birlikte çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
2) Çözelti B: 0,5 g $CuSO_4.5H_2O$, % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
3) Çözelti C: 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. (Kullanılacağı zaman hazırlanmasına dikkat edilmiştir.)
4) Folin-Ciocalteu çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
5) Standart protein çözeltisi:100 mL'de 3,95 mg sığır albümini olacak şekilde % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile hazırlanmıştır.
6) Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0,0 50,0, 100,0, 125,0, 250,0, 500,0, 750,0 ve 1000,0 µL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi serum fizyolojik ile 1 mL'ye tamamlanmış, her tüpe 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuştur, bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. Serbest Enzim İçin Belirlenen Parametreler

Serbest Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi:

Farklı pH değerlerine sahip tamponlardan (pH 5,5 asetat, pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat, pH 9,0 borat) 50 mM hazırlanarak 25 °C'de katalaz enziminin aktivitesi ölçülerek maksimum aktivite gösterdiği pH belirlenmiştir.

Serbest Enzim Aktivitesine İyonik Gücün Etkisinin İncelenmesi:

Belirlenmiş olan optimum pH'daki tamponun 25, 50, 100 mM çözeltileri hazırlanarak farklı derişimlerde 25 °C'de katalaz enziminin aktivitesi ölçülerek maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimi belirlenmiştir.

Serbest Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi:

Katalaz enzimin daha önce belirlenmiş olan optimum pH ve uygun tampon derişiminde farklı sıcaklıklarda (278, 283, 293, 298, 303, 308, 313, 323, 330 K'de) katalaz enziminin aktivitesi ölçülerek maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık belirlenmiştir.

Serbest Enzimin Termal Kararlılığının Belirlenmesi:

Katalaz enziminin daha önce belirlenmiş olan uygun tampon içerisinde çözeltisi hazırlanarak termal kararlılığının belirlenmesi için farklı sıcaklıklarda (278, 283, 293, 298, 303, 308, 313, 323, 330 K'de) ve her bir sıcaklıkta farklı sürelerde (1, 3, 7, 15 sa.) bekletilerek 25 °C'de katalaz enziminin aktivitesi ölçülmüştür.

3.2.4. Glutaraldehit ve Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilen Enzim İçin Belirlenen Parametreler

Glutaraldehit ve Ara Kol Üzerinden Üzerinden İmmobilize Edilen Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi: Farklı pH değerlerine sahip tamponlardan (pH 5.5 asetat, pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat, pH 9,0 borat) 50 mM hazırlanarak 25 °C'de immobilize enziminin aktivitesi ölçülerek maksimum aktivite gösterdiği pH belirlenmiştir.

Glutaraldehit ve Ara Kol Üzerinden Üzerinden İmmobilize Edilen Enzimin aktivitesine İyonik Gücün Etkisinin İncelenmesi: Belirlenmiş olan optimum pH'daki tamponun 25, 50, 100 mM çözeltileri hazırlanarak farklı derişimlerde 25 °C'de immobilize enziminin aktivitesi ölçülerek maksimum aktivite gösterdiği tampon derişimi belirlenmiştir.

Glutaraldehit ve Ara Kol Üzerinden Üzerinden İmmobilize Edilen Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi: İmmobilize enzimin daha önce belirlenmiş olan optimum pH ve uygun tampon derişiminde farklı sıcaklıklarda (278, 283, 293, 298, 303, 308, 313, 323, 330 K'de) katalaz enziminin aktivitesi ölçülerek maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık belirlenmiştir.

Glutaraldehit ve Ara Kol Üzerinden Üzerinden İmmobilize Edilen Enzimin Termal Kararlılığının Belirlenmesi: İmmobilize enzimin termal kararlılığının belirlenmesi için farklı sıcaklıklarda (278, 283, 293, 298, 303, 308, 313, 323, 330 K'de) ve her bir sıcaklıkta farklı sürelerde (1, 3, 7, 15 sa.) bekletilerek daha önce belirlenmiş olan optimum sıcaklıkta immobilize enziminin aktivitesi ölçülmüştür.

Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi: Katalaz enziminin 50 mM pH 7,5 fosfat tamponunudaki çözeltisi, glutaraldehit üzerinden ve ara kol üzerinden immobilize edilen katalaz enzimleri 5 °C de ve oda sıcaklığında bekletilerek belirli zaman aralıklarında aktiviteleri ölçülmüştür.

İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kulanılabilirliği İle İlgili Çalışmalar: Glutaraldehit üzerinden ve ara kol üzerinden immobilize edilen katalaz enzimlerinden 10 mg alınarak cam kolona koyulmuştur. 10 mM H_2O_2 çözeltisinden 5 mL üzerine eklenmiş 2 dakika sonunda H_2O_2 çözeltisi hızla kolondan uzaklaştırılarak aynı zamanda H_2O_2'tin 240 nm'deki absorbansı ölçülmüştür. Aynı işlemler tekrarlanarak immobilize enzimlerin tekrar kullanıma bağlı aktivite değişimleri incelenmiştir.

3.2.5. Michealis-Menten Katsayısı(Km) ve Maksimum Hızın(Vmax) Grafiksel Yöntemle Belirlenmesi

Lineweaver-Burk grafiğinden faydanılarak enzimin Km ve Vmax değerleri hesaplanır.

$$\frac{1}{V} = \frac{Km\ 1}{Vmax\,[S]} + \frac{1}{Vmax}$$

Bu eşitlikte;

V= Herhangi bir andaki ilk hız

[S]=Substrat derişimi

Vmax=Maksimum reaksiyon hızı

Km= Michealis-Menten katsayısını göstermektedir.

3.2.6. Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması

Arrhenius'a göre biyolojik bir reaksiyonun hızı (V) ile ortam sıcaklığı (T) arasında ;

$V=Ce^{-A/RT}$

Denklemi ile gösterilen bir ilişki vardır. C bir katsayı, R gaz sabiti, A ise reaksiyonun aktivasyon enerjisidir. Bu denklem;

In V= In C- A/RT

Şeklinde yazılırsa, InV ile 1/T arasında çizilen grafikten aktivasyon enerjisi bulunur. İki farklı deney sıcaklığında T_1 ve T_2 belirlenen aktiviteler, V_1 ve V_2 olarak gösterildiğinde;

$$A=2,303R\,\frac{T_1T_2}{T_2-T_1}\,(\log V_2-\log V_1)$$

eşitliği elde edilir ve aktivasyon enerjisi kolaylıkla hesaplanabilir.

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

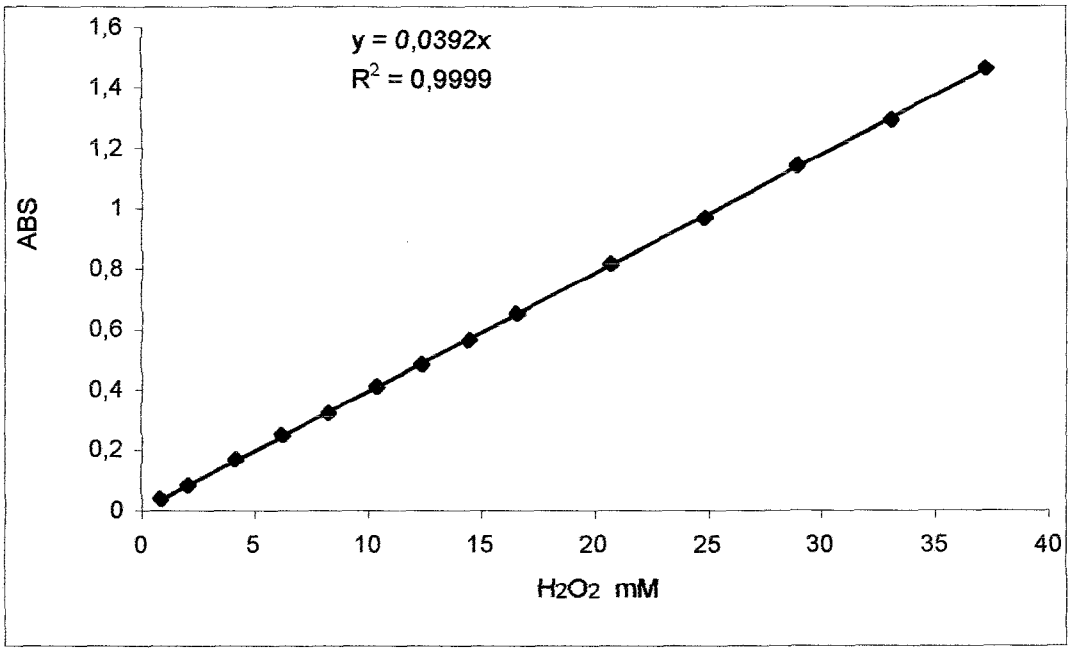
4.1.Bulgular

4.1.1.Serbest Katalaz Enzimi İle Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde H_2O_2'nin molar ekstinksiyon katsayısı kullanılmıştır. Bunun için H_2O_2' nin belirli derişimlerde çözeltileri hazırlanıp 240 nm'de absorbans değerleri okunmuş sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiş Şekil 4.1'de şematik olarak gösterilmiştir. Buna göre H_2O_2 için 240 nm'de molar ekstinksiyon katsayısı 0,0392 $cm^2 \mu mol^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. H_2O_2'in Farklı Derişimlerdeki Çözeltilerinin 240 nm'deki Ölçülen Absorbans Değerleri

H_2O_2 mM	ABS
0,8	0,038
2,1	0,084
4,1	0,169
6,2	0,249
8,3	0,322
10,3	0,409
12,4	0,483
14,5	0,563
16,6	0,652
20,7	0,816
24,8	0,967
29,0	1,140
33,1	1,292
37,2	1,461

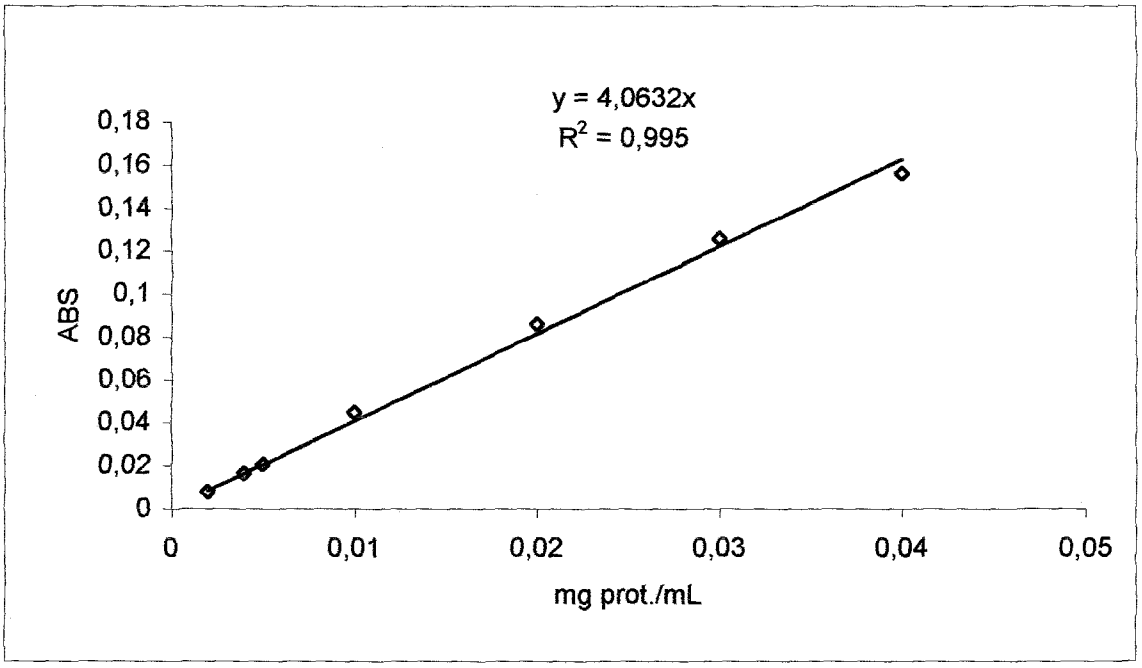


Şekil 4.1. H_2O_2'in 240 nm'deki standart grafiği

Enzim immobilizasyonun da tutuklanan enzim miktarını belirlemek amacıyla protein tayini yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi amacıyla sığır serum albumini kullanılarak standart protein eğrisi çizilmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.2.'de verilmiş Şekil 4.2.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Standart Protein Grafiği İçin Elde Edilen Bulgular

Derişim (mg/mL)	Absorbans
0,002	0,008
0,004	0,017
0,005	0,021
0,010	0,045
0,020	0,087
0,030	0,126
0,040	0,156

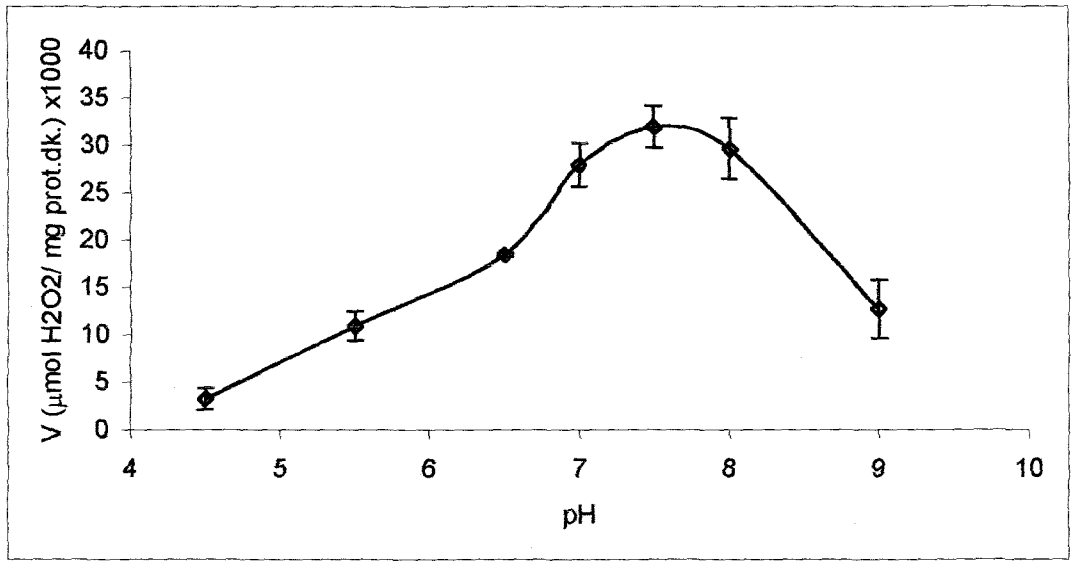


Şekil 4.2. Standart Protein Eğrisi

Serbest enzimin optimum aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek için farklı pH değerlerine sahip tamponların (pH 5,5 asetat, pH 6,0 6,5 7,0 7,5 8,0 fosfat, pH 9,0 borat) 50 mM çözeltileri kullanılarak 25 °C'de katalaz enziminin aktivitesi ölçülmüş (her bir pH değeri için 5 çalışma yapılmıştır), sonuçlar Çizelge 4.3.'de verilmiş Şekil 4.3.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Serbest Enzim İçin Farklı pH'larda Ölçülen Aktivite (V) Değerleri

pH	Spesifik Aktivite ($\mu molH_2O_2$ mg $prot^{-1}.dk^{-1}$)	% Aktivite
4,5	$3,2(\pm1,1)x\ 10^2$	10,0
5,5	$10,9(\pm1,6)x\ 10^3$	34,2
6,5	$18,4(\pm0,2)x\ 10^3$	57,7
7,0	$27,9(\pm2,3)x\ 10^3$	87,5
7,5	$31,9(\pm2,2)x\ 10^3$	100
8,0	$29,6(\pm3,2)x\ 10^3$	92,8
9,0	$12,7(\pm3,1)x\ 10^3$	39,8



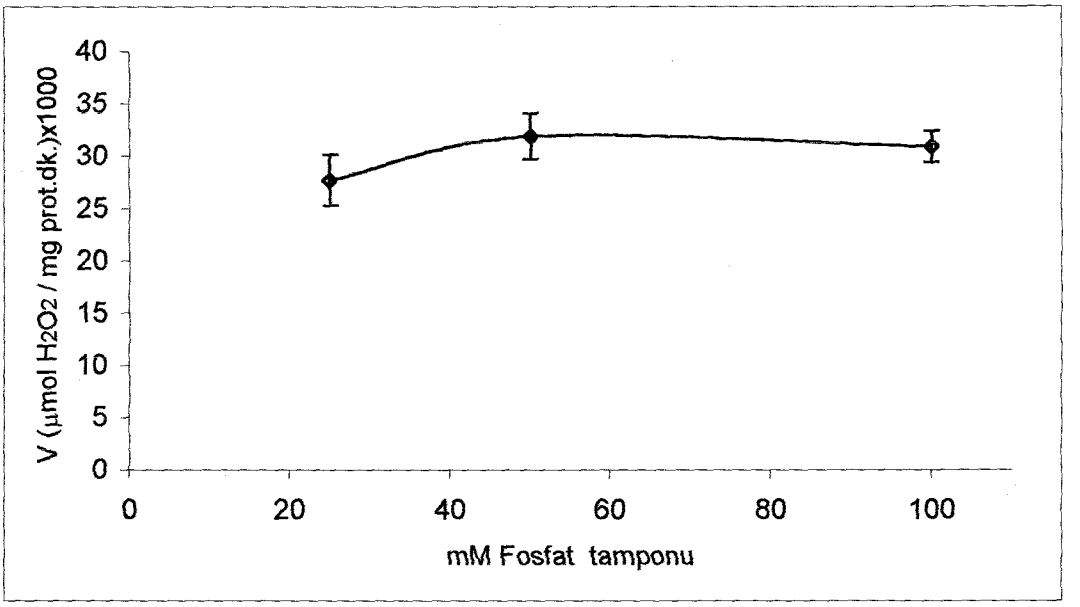
Şekil 4.3. Serbest Enzim İçin pH-Aktivite Grafiği

Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi serbest enzim pH 7,0-8,0 aralığında oldukça yüksek aktivite göstermiştir. Biz serbest enzim için bu aşamadan sonra yaptığımız çalışmalarda pH 7,5 fosfat tamponunu kullandık.

Serbest enzimin aktivitesinin iyonik güce bağlı değişimini incelemek için farklı derişimlerde (25, 50 ve 100 mM) pH 7,5 fosfat tamponlarında 25 °C'de aktivitesi ölçülmüş, elde edilen bulgular Çizelge 4.4.'de verilmiş Şekil 4.4.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Serbest Enzim İçin Farklı Derişimlerdeki pH 7,5 Fosfat Tamponunda Ölçülen Aktivite Değerleri

Fosfat Tamponu pH=7,5 (mM)	V ($\mu molH_2O_2$ mg $prot^{-1}.dk^{-1}$)	% Aktivite
25	$27,7(\pm2,4)x\ 10^3$	86,8
50	$31,9(\pm2,2)x\ 10^3$	100
100	$30,9(\pm1,5)x10^3$	96,9



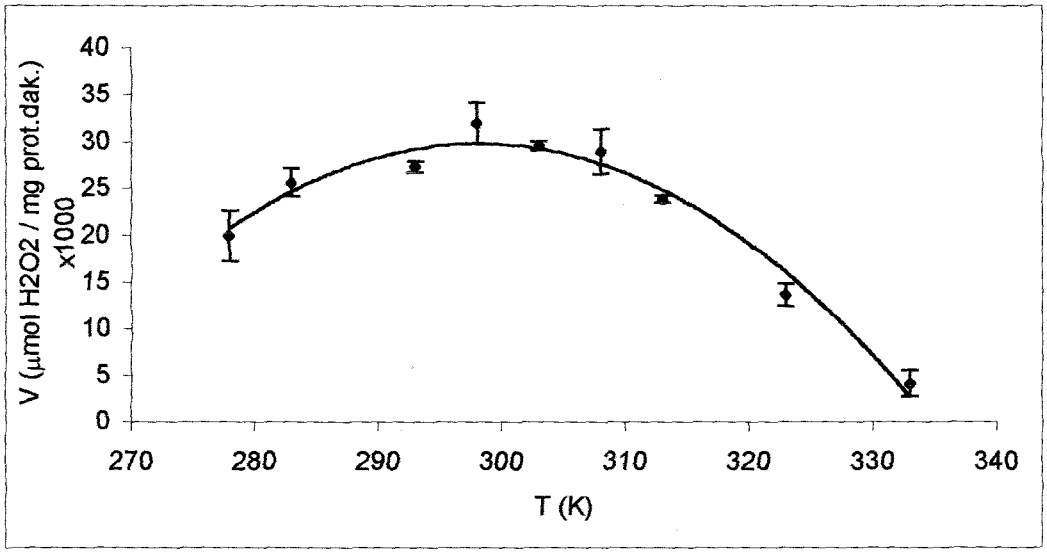
Şekil 4.4. Serbest Enzim İçin İyonik Güç-Aktivite Grafiği

Şekil 4.4.'de görüldüğü gibi elde edilen bulgular doğrultusunda en uygun tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.

Serbest enzimin aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi farklı sıcaklıklarda (278, 283, 293, 298, 303, 308, 313, 323, 330 K'de) incelenmiş, aktivite değerleri Çizelge 4.5.'de verilmiş sıcaklık-aktivite grafiği Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.

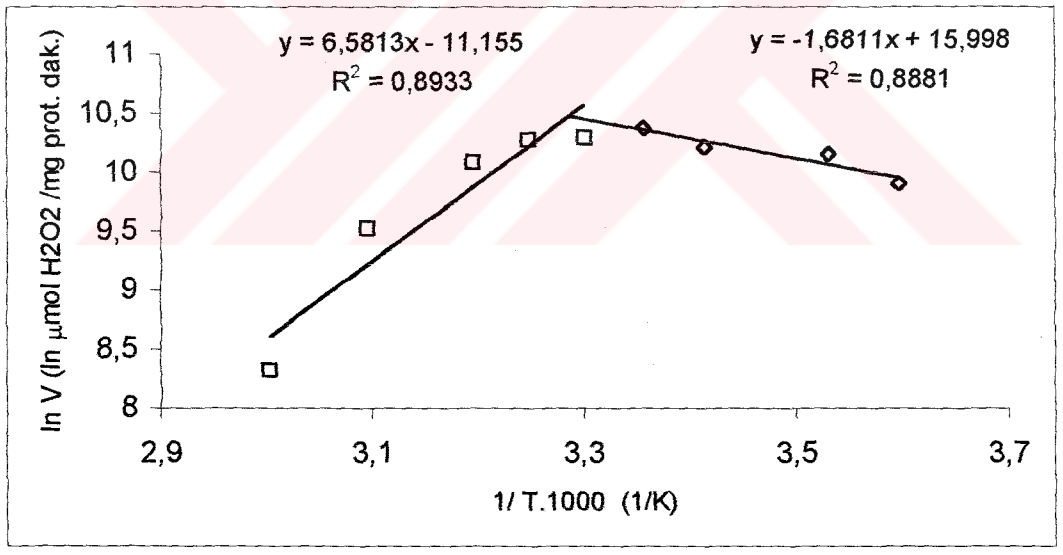
Çizelge 4.5. Serbest Enzim İçin Farklı Sıcaklıklarda Ölçülen Aktivite Değerleri

T (K)	V ($\mu molH_2O_2$ mg. $prot^{-1}.dk^{-1}$)	1/T.1000 (1/K)	lnV (ln $\mu molH_2O_2$mg.$prot^{-1}dk^{-1}$)
278	19,9(±2,7)x10^3	3,597	9,90
283	25,6±(1,5) x10^3	3,53	10,15
293	27,3(±0,6) x10^3	3,413	10,21
298	31,9(±2,2) x10^3	3,356	10,37
303	29,5(±0,5) x10^3	3,300	10,29
308	28,9(±2,4) x10^3	3,247	10,27
313	23,8(±0,4) x10^3	3,194	10,08
323	13,6(±1,19)x10^3	3,096	9,52
333	4,1(±1,4) x10^3	3,00	8,32



Şekil 4.5. Serbest Enzim İçin Aktivite-Sıcaklık Grafiği

Şekil 4.5.'deki sıcaklık eğrisinden görüleceği gibi serbest enzimin en fazla aktivite gösterdiği sıcaklık 298 K olarak belirlenmiştir.



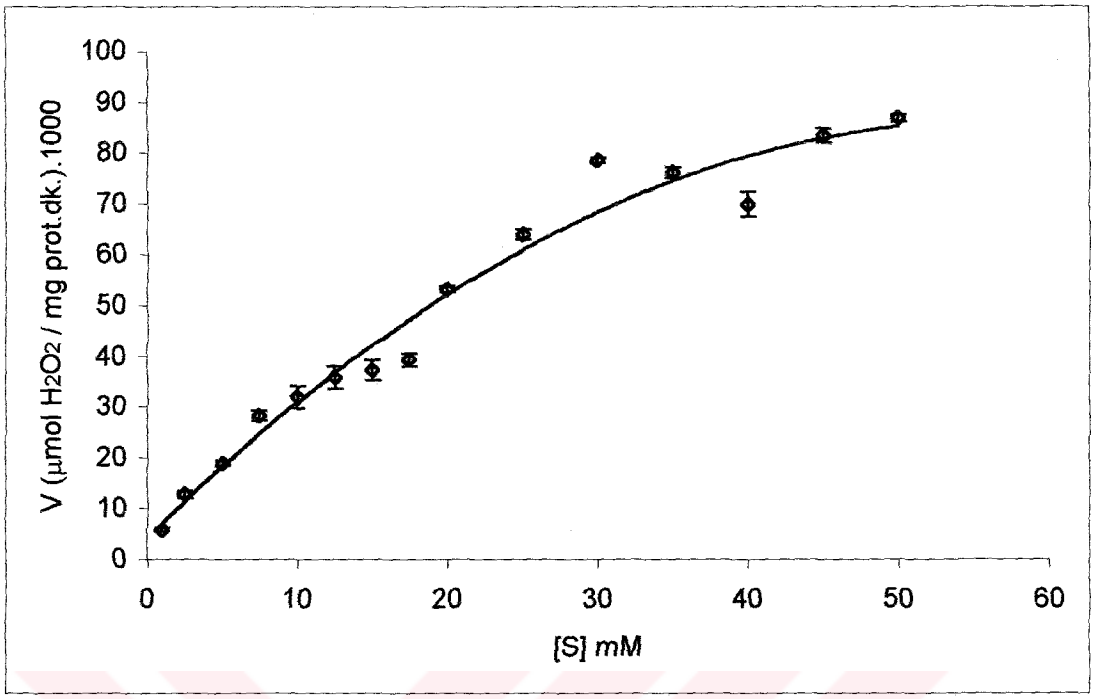
Şekil 4.6. Serbest Enzim İçin Arrhenius Grafiği

Şekil 4.6.'daki Arrhenius grafiğinden serbest enzim için 5 °C ve 25 °C arasında aktivasyon enerjisi 14,377 kj/mol olarak hesaplanmış, iki doğrunun kesişim noktasında enzimin denature olmaya başladığı sıcaklık 31,3 °C olarak hesaplanmıştır.

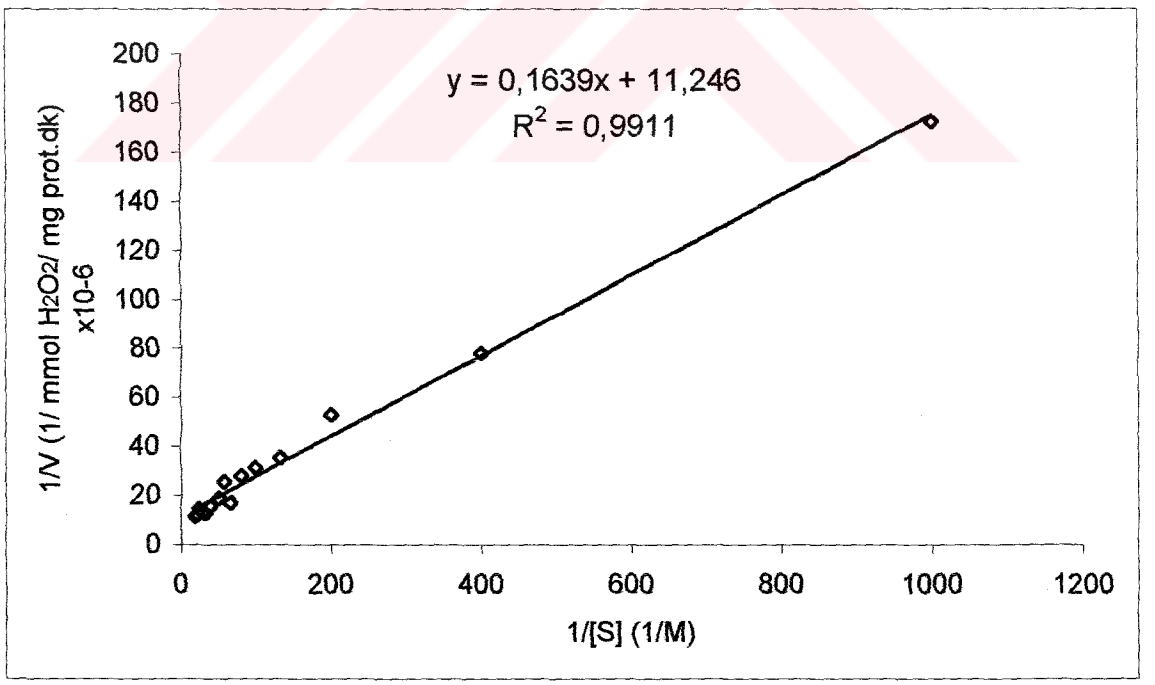
Serbest enzim için farklı substrat derişimlerinde (1-50 mM) ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.6'da verilmiş Şekil 4.7.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Serbest Enzim İçin Farklı Substrat Derişimlerinde Ölçülen Aktivite Değerleri

[S] mM	V ($\mu molH_2O_2$ mg $prot^{-1}.dk^{-1}$)	1/[S] (1/M)	1/V (prot.dk / $\mu molH_2O_2$ mg)
1,0	5,8(±0,3) x 10^3	1000,0	172,4 x10^{-6}
2,5	12,8(±0,7) x 10^3	400,0	78,1 x10^{-6}
5,0	18,9(±0,5) x 10^3	200,0	52,9 x10^{-6}
7,5	28,2(±1,0) x 10^3	133,3	35,5 x10^{-6}
10,0	31,9(±2,2) x 10^3	100,0	31,3 x10^{-6}
12,5	35,8(±2,2) x 10^3	80,0	27,9 x10^{-6}
15,0	37,2(±2,0) x 10^3	66,7	16,9 x10^{-6}
17,5	39,3(±1,3) x 10^3	57,1	25,4 x10^{-6}
20,0	53,2(±0,6) x 10^3	50,0	18,8 x10^{-6}
25,0	64,0(±1,0) x 10^3	40,0	15,6 x10^{-6}
30,0	78,5(±0,5) x 10^3	33,3	12,7 x10^{-6}
35,0	76,1((±1,0) x 10^3	28,6	13,1 x10^{-6}
40,0	69,9(±2,5) x 10^3	25,0	14,3 x10^{-6}
45,0	83,4(±1,4) x 10^3	22,2	12,0 x10^{-6}
50,0	86,8(±0,7) x 10^3	20,0	11,5 x10^{-6}



Şekil 4.7. Serbest Enzim İçin Michaelis-Menten Grafiği



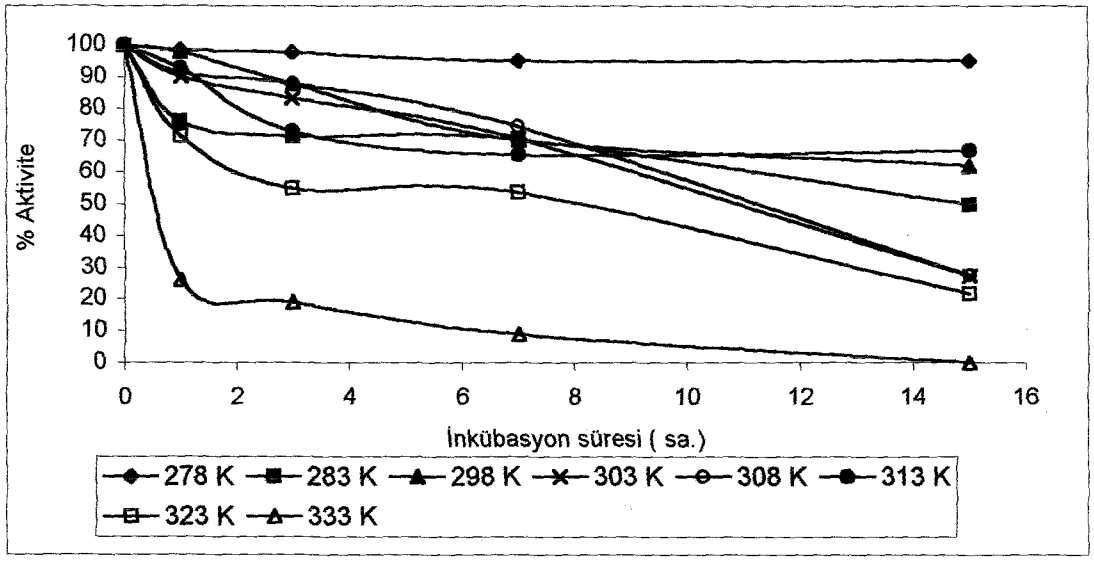
Şekil 4.8. Serbest Enzim İçin Lineweaver-Burk Grafiği

Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi elde edilen doğru 1/V eksenini 7,305 değerinde, 1/[S] eksenini –75,16 değerinde kesmektedir.bu değerlerden serbest enzim için Vmax 136889 µmol H_2O_2 mg. $prot^{-1}.dak^{-1}$ ve Km 13,3 mM geri dönüşüm sayısı $1,37x10^5$ s^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Serbest enzimin termal kararlılığını belirlemek için farklı sıcaklıklarda (278, 283, 298, 303, 308, 313, 323, 333 K'de) ve farklı sürelerde (1, 3, 7, 15 sa.) bekletilerek 25 ° C'de aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Çizelge 4.7.'de verilmiş Şekil 4.9.'da şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Serbest Enzim İçin Termal Kararlılık

İNKÜBASYON SÜRESİ (sa.)	V(µmolH_2O_2 mg $prot^{-1}.dk.^{-1}$							
	278 K	283 K	298 K	303 K	308 K	313 K	323 K	333 K
1	31,4±6,6	24,2±4,3	31,2±1,4	28,7±4,9	29,1±3,2	29,5±1,9	22,7±3,1	8,3±1,9
3	31,1±3,0	22,7±4,3	28,0±3,3	26,5±4,9	28,0±3,4	23,2±2,1	17,5±3,5	6,0±1,9
7	30,3±4,1	22,4±2,3	22,34±1,3	22,5±2,8	23,7±1,5	20,9±1,5	17,1±2,2	2,8±1,0
15	30,3±4,0	15,9±3,3	19,8±1,6	8,7±1,2	8,8±1,3	21,3±1,5	6,9±1,0	0,0
İNKÜBASYON SÜRESİ (sa.)	% KALAN AKTİVİTE							
	278 K	283 K	298 K	303 K	308 K	313 K	323 K	333 K
1	98,4	75,9	97,8	90,0	91,2	92,5	71,2	26,0
3	97,5	71,2	87,8	83,1	87,8	72,7	54,9	18,8
7	95,0	70,3	70,0	70,5	74,3	65,5	53,6	8,8
15	95,0	49,8	62,1	27,3	27,6	66,8	21,6	0



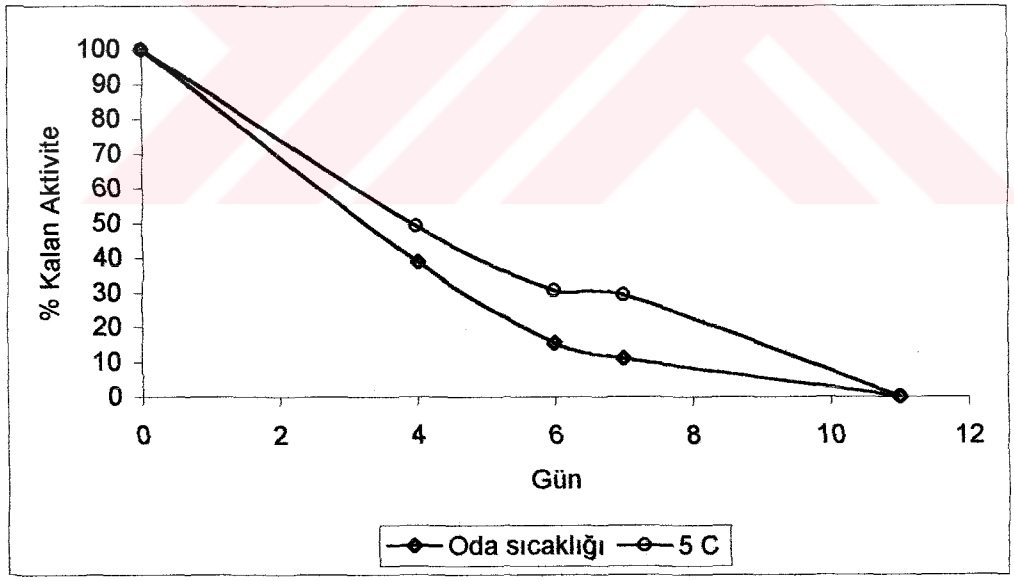
Şekil 4.9. Serbest Enzim İçin Termal Kararlılık Grafiği

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Serbest katalazın depolama kararlılığını incelemek için enzimin 50 mM pH 7,5 fosfat tamponundaki $1,6x10^{-3}$ mg/mL derişimdeki çözeltisi 5 °C'de ve oda sıcaklığında bekletilerek belirli zaman aralıklarında aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen veriler Çizelge 4.8.'de verilmiş olup Şekil 4.10.'da şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Serbest Enzimin Depolama Kararlılığı İle İlgili Bulgular

Gün	Oda Sıcaklığında Saklanan Enzim Aktivitesi V ($\mu molH_2O_2$ mg $prot^{-1}.dk.^{-1}$	Oda Sıcaklığında Saklanan Enzimin % Kalan Aktivitesi	+5 °C'de Saklanan Enzim aktivitesi V ($\mu molH_2O_2$ mg $prot^{-1}.dk.^{-1}$)	+5 °C'de Saklanan Enzimin % Kalan Aktivitesi
0.	33398,72±1638,48	100	33398,72±1638,48	100
4.	12985,03±523,04	38,9	16427,56±2240,4	49,2
6.	5133,62±1569,12	15,4	10267,2±1811,8	30,7
7.	3684,12±1183,50	11,0	9763,97±1766,56	29,3
11.	0,0	0	0,0	0



Şekil 4.10. Serbest Enzimin Depolama Kararlılığı Grafiği

Serbest enzim 5 °C'de ve oda sıcaklığında bekletildiğinde 11 gün sonra aktivitesini tamamen kaybetmiştir.

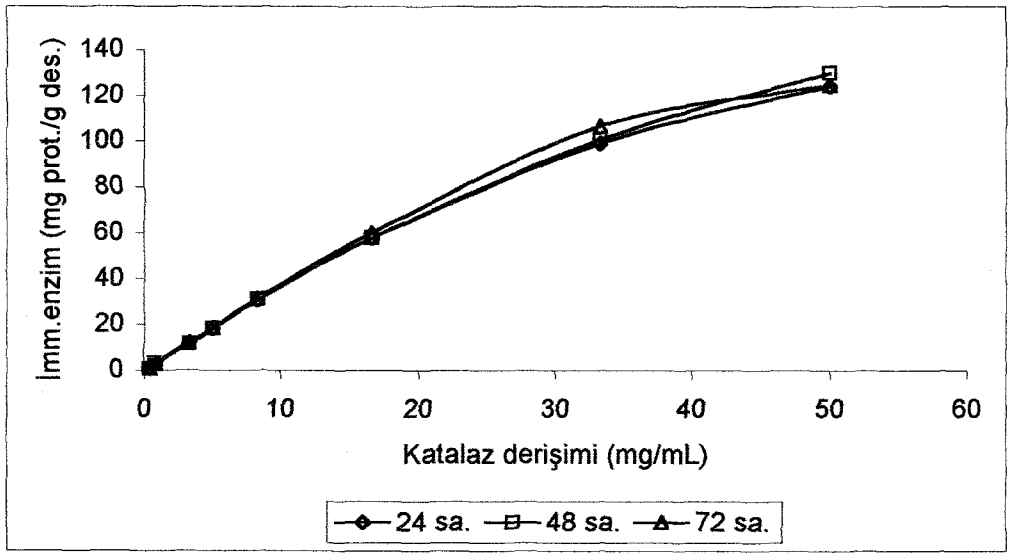
4.1.2.İmmobilize Katalaz Enzimi İle Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

4.1.2.1.Katalazın Glutaraldehit Üzerinden İmmobilizasyonu İle Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Enzim immobilizasyonunda, destek materyali üç farklı glutaraldehit derişiminde (% 0,625 1,25 2,5 (v/v)) hazırlanmıştır. Uygun enzim miktarını ve immobilizasyon süresini belirlenmek için enzimin 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda farklı derişimlerde (0,42 0,83 3,33 5,00 8,32 16,65 33,30 50,00 mg/mL) hazırlanan çözeltileri kullanılmıştır. 5 g destek 20 mL enzim çözeltisi ile 25 °C'de 24, 48 ve 72 sa. bekletilerek enzimin desteğe kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. Buna göre, % 0,625 (v/v) glutaraldehit kullanılarak hazırlanan destek ile yapılan 24 sa. immobilizasyon sonucunda elde edilen değerler Çizelge 4.9. ve 4.10.'da verilmiş ve Şekil 4.11. ve 4.12.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Farklı Enzim Derişimlerinde ve İmmobilizasyon Sürelerinde Elde Edilen Bulgular

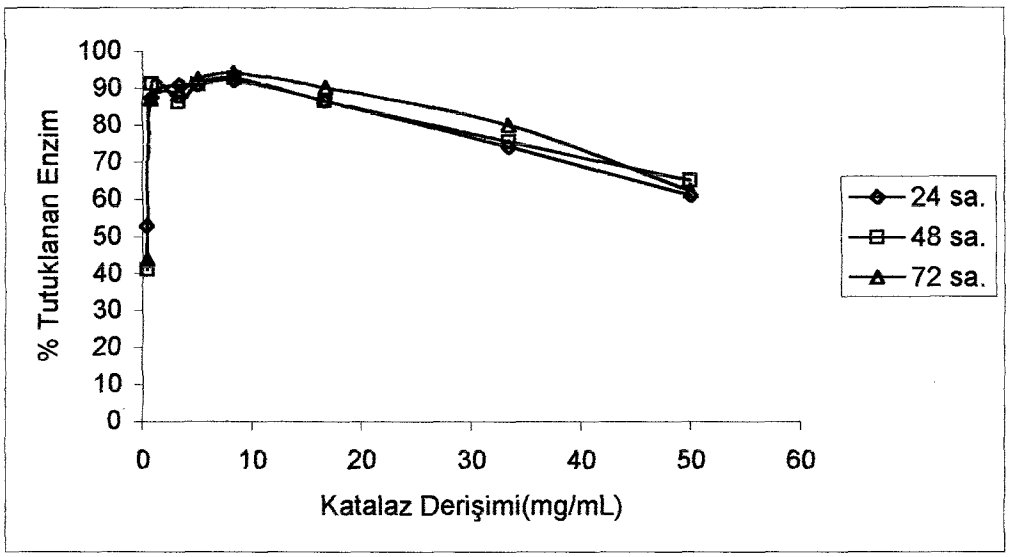
Enzim Derişimi (mg/mL)	24 Sa. İmm.sonra Tutuklanan enzim mg prot./ g destek	48 Sa. İmm.sonra Tutuklanan enzim mg prot./ g destek	72 Sa. İmm.sonra Tutuklanan enzim mg prot./ g destek
0,42	0,875	0,681	0,727
0,83	2,86	3,04	2,9
3,33	12,11	11,50	11,84
5,00	18,16	18,20	18,49
8,33	30,65	30,87	31,33
16,65	57,64	57,67	60,08
33,3	98,87	100,80	106,66
50,0	124,24	130,04	124,6



Şekil 4.11. % 0, 625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak g Destek Başına Tutuklanan Enzim Miktarının Başlangıç Enzim Derişimine ve İmmobilizasyon Süresine Bağlı Değişimi

Çizelge 4.10. % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Farklı Enzim Derişimlerinde ve İmmobilizasyon Sürelerinde Tutuklanan Enzimin Yüzde Değerleri

Enzim Derişimi (mg/mL)	24 Sa. İmm.sonra %Tutuklanan enzim	48 Sa. İmm.sonra %Tutuklanan enzim	72 Sa. İmm.sonra %Tutuklanan enzim
0,42	52,8	40,9	43,7
0,83	87,4	91,2	87,1
3,33	90,9	86,3	88,9
5,00	90,9	91,0	92,4
8,33	92,1	92,7	94,1
16,65	86,5	86,56	90,2
33,3	74,2	75,6	80,1
50,0	61,12	65,0	62,3
78,92	43,2	46,7	57,7

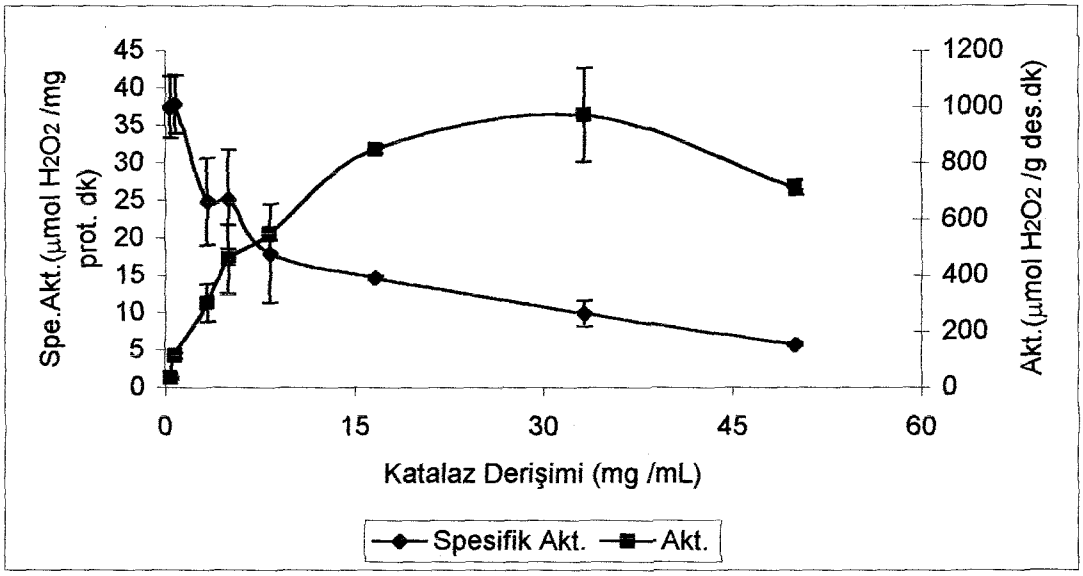


Şekil 4.12. % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Tutuklanan Enzim Yüzdesinin Başlangıç Enzim Derişimine ve İmmobilizasyon Süresine Bağlı Değişimi

% 0,625 (v/v) glutaraldehit ile hazırlanan destekte 24 sa. immobilizasyon yapıldıktan sonra ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.11.'de verilmiş Şekil 4.13.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 24 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri

Başlangıç Katalaz Derişimi (mg /mL)	Spesifik Aktivite (μmol H_2O_2 / mg prot. $^{-1}$ dk. $^{-1}$)	Aktivite (μmol H_2O_2 / g destek $^{-1}$ dk. $^{-1}$)
0,42	37,4±4,1	32,8±3,6
0,83	37,8±3,9	112,4±10,0
3,33	24,8±5,8	300,0±66,3
5,00	25,1±6,6	455,4±122,9
8,33	17,9±6,6	547,98±23,4
16,65	14,7±0,3	848,5±15,2
33,3	9,8±1,7	969,7±167,9
50,0	5,7±0,2	712,1±27,0

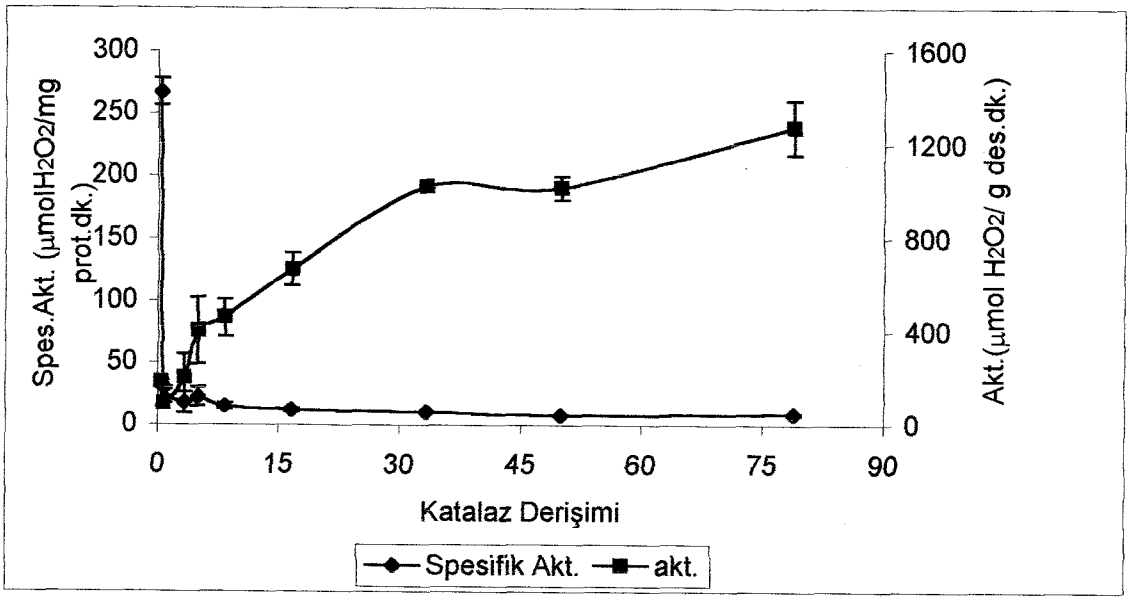


Şekil 4.13. % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 24 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği

% 0,625 (v/v) glutaraldehit ile hazırlanan destekte 48 sa. immobilizasyon yapıldıktan sonra ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.12.'de verilmiş Şekil 4.14.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 48 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri

Başlangıç Katalaz Derişimi (mg /mL)	Spesifik Aktivite (µmol H_2O_2 / mg prot. $^{-1}$ dk. $^{-1}$)	Aktivite (µmol H_2O_2 / g destek $^{-1}$ dk. $^{-1}$)
0,42	267,1±11,1	181,8±7,6
0,83	29,38±7,0	90,91±21,9
3,33	17,6±8,5	202,3±98,5
5,00	22,1±7,9	401,5±143,9
8,33	14,8±2,6	458,3±79,5
16,65	11,6±1,2	666,7±68,2
33,3	10,3±0,1	1021,2±9,1
50,0	7,8±0,4	1015,1±49,5

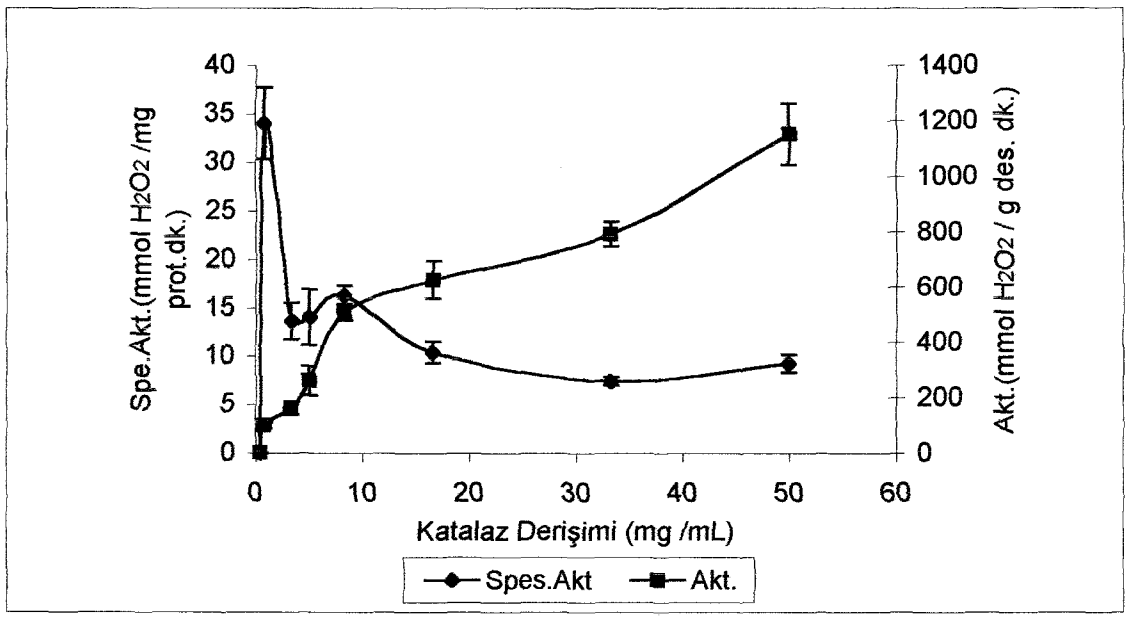


Şekil 4.14. % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 48 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği

% 0,625 (v/v) glutaraldehit ile hazırlanan destekte 72 sa. immobilizasyon yapıldıktan sonra ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.13.'de verilmiş Şekil 4.15.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 72 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri

Başlangıç Katalaz Derişimi (mg /mL)	Spesifik Aktivite (µmol H_2O_2 / mg prot. $^{-1}$ dk. $^{-1}$)	Aktivite (µmol H_2O_2 / g des. $^{-1}$ dk. $^{-1}$)
0,42	0	0
0,83	34,0±3,7	98,4±10,7
3,33	13,6±1,9	160,6±22,7
5,00	14,0±2,9	259,1±53,0
8,33	16,3±1,0	509,1±30,3
16,65	10,4±1,1	626,5±68,1
33,3	7,4±0,4	790,4±44,7
50,0	9,2±0,9	1151,5±111,4

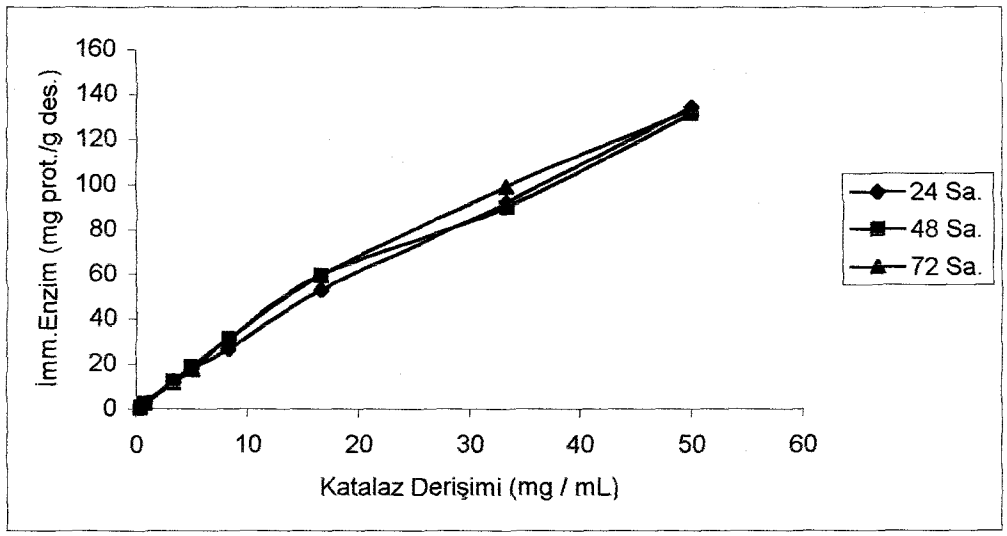


Şekil 4.15. % 0,625 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 72 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği

% 2,5 (v/v) glutaraldehit kullanılarak hazırlanan destek ile yapılan immobilizasyon sonucunda elde edilen değerler Çizelge 4.14. ve 4.15.'de Şekil 4.16 ve 4.17.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Farklı Enzim Derişimlerinde ve İmmobilizasyon Sürelerinde Elde Edilen Bulgular

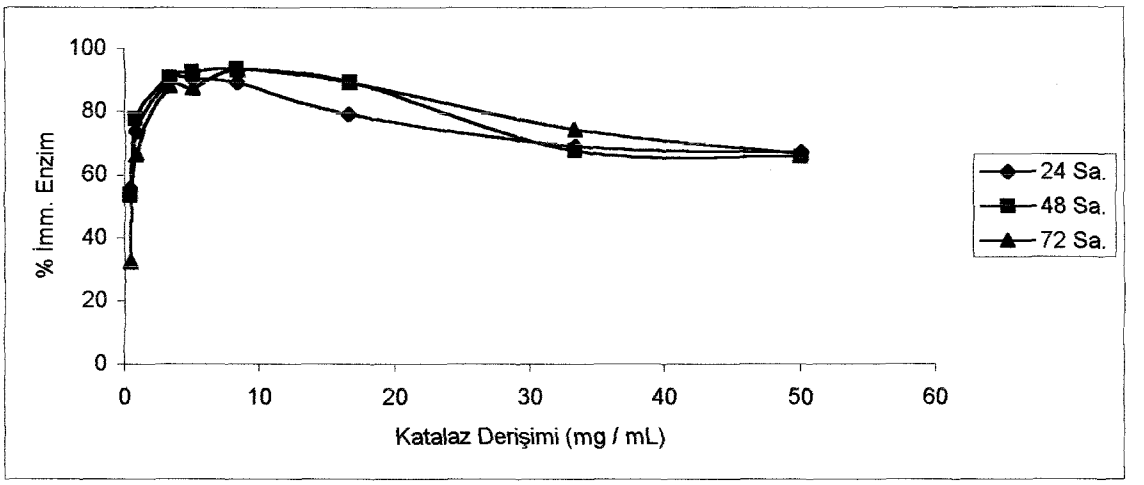
Enzim Derişimi (mg/mL)	24 Sa. İmm.sonra Tutuklanan enzim mg prot./ g destek	48 Sa. İmm.sonra Tutuklanan enzim mg prot./ g destek	72 Sa. İmm.sonra Tutuklanan enzim mg prot./ g destek
0,42	0,93	0,89	0,54
0,83	2,45	2,58	2,20
3,33	11,97	12,08	11,70
5,00	18,08	18,51	17,45
8,33	26,56	31,10	31,0
16,65	52,64	59,43	59,36
33,3	91,76	89,79	98,64
50,0	134,04	131,1	132,84



Şekil 4.16. % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak g Destek Başına Tutuklanan Enzim Miktarının Başlangıç Enzim Derişimine ve İmmobilizasyon Süresine Bağlı Değişimi

Çizelge 4.15. % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Farklı Enzim Derişimlerinde ve İmmobilizasyon Sürelerinde Tutuklanan Enzimin Yüzde Değerleri

Enzim Derişimi (mg/mL)	24 Sa. İmm.sonra %Tutuklanan enzim	48 Sa. İmm.sonra %Tutuklanan enzim	72 Sa. İmm.sonra %Tutuklanan enzim
0,42	55,6	53,3	32,2
0,83	73,6	77,6	66,2
3,33	89,9	90,7	87,9
5,00	90,4	92,5	87,3
8,33	89,0	93,5	93,1
16,65	79,0	89,2	89,1
33,3	68,9	67,4	74,1
50,0	67,02	65,6	66,4

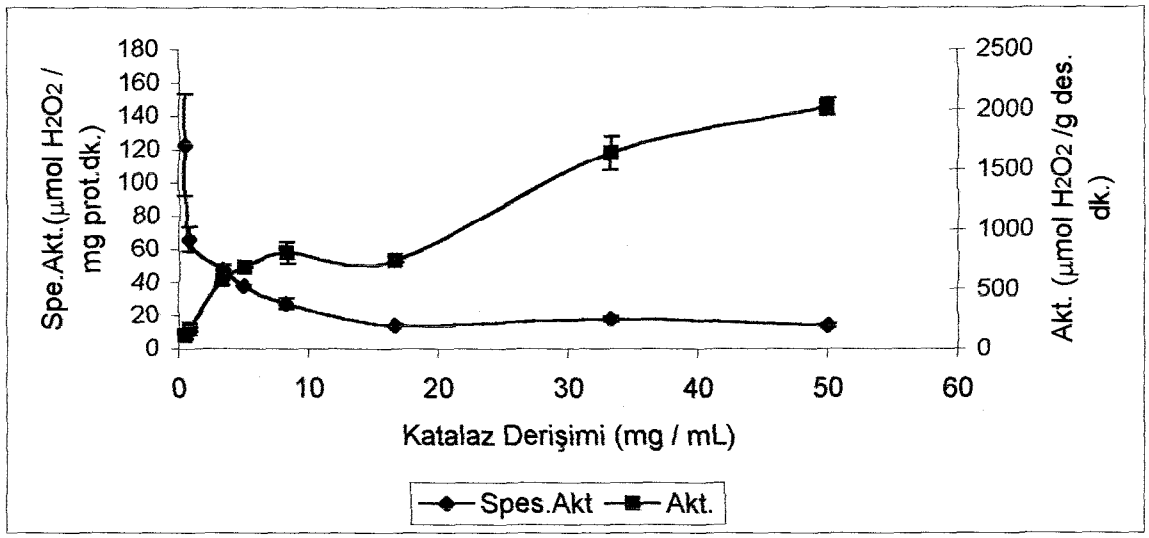


Şekil 4.17. % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destek Kullanılarak Tutuklanan Enzim Yüzdesinin Başlangıç Enzim Derişimine Ve İmmobilizasyon Süresine Bağlı Değişimi

% 2,5 (v/v) glutaraldehit ile 24 sa. immobilize edilmiş enzimin ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.16.'da verilmiş Şekil 4.18.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 24 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri

Başlangıç Katalaz Derişimi (mg /mL)	Spesifik Aktivite (μmol H_2O_2 / mg prot. $^{-1}$ dk. $^{-1}$)	Aktivite (μmol H_2O_2 / g destek $^{-1}$ dk. $^{-1}$)
0,42	122,7±30,6	113,6±28,3
0,83	66,0±7,3	161,6±17,9
3,33	47,4±3,1	568,2±37,6
5,00	37,8±0,2	684,3±3,6
8,33	27,2±3,1	803,0±91,5
16,65	14,1±0,4	742,4±18,6
33,3	17,8±1,5	1636,3±141,7
50,0	14,1±1,3	2020,2±71,7

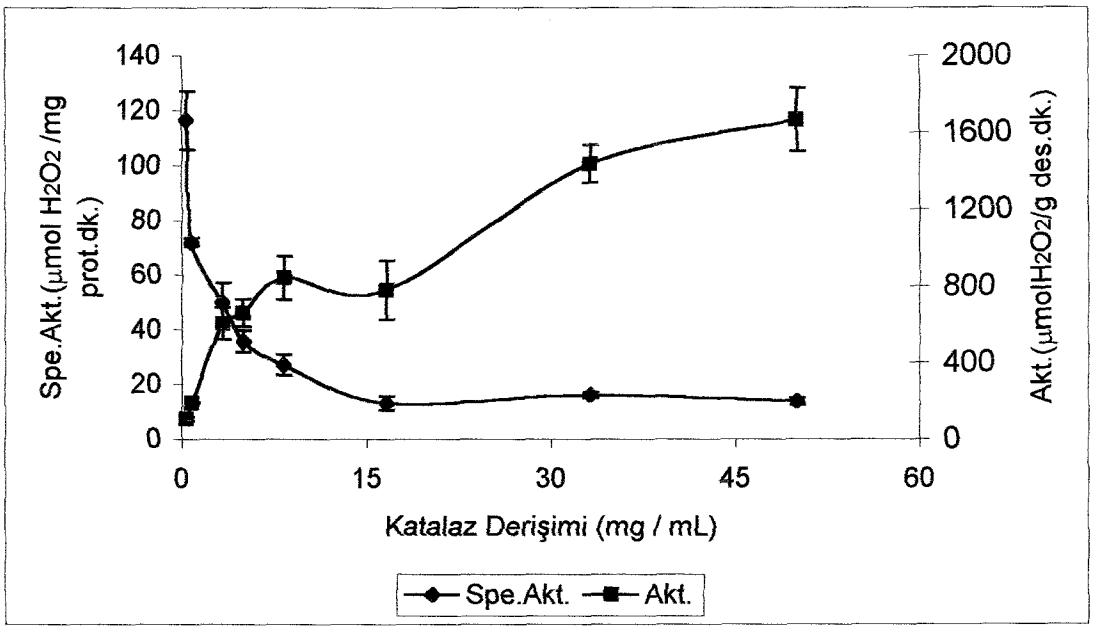


Şekil 4.18. % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 24 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği

% 2,5 (v/v) glutaraldehit ile 48 sa. immobilize edilmiş enzimin ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.17.'de verilmiş Şekil 4.19.'da şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 48 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri

Başlangıç Katalaz Derişimi (mg /mL)	Spesifik Aktivite (µmol H_2O_2 / mg prot. $^{-1}$ dk. $^{-1}$)	Aktivite (µmol H_2O_2 / g des. $^{-1}$ dk. $^{-1}$)
0,42	116,4±10,6	103,5±9,4
0,83	71,8±1,5	185,6±3,8
3,33	50,0±7,1	603,4±85,9
5,00	35,6±4,0	659,3±73,8
8,33	27,0±3,7	840,9±113,4
16,65	*13,1±2,6*	777,8±153,7
33,3	16,0±1,1	1435,0±98,7
50,0	13,7±1,3	1664,8±164,0

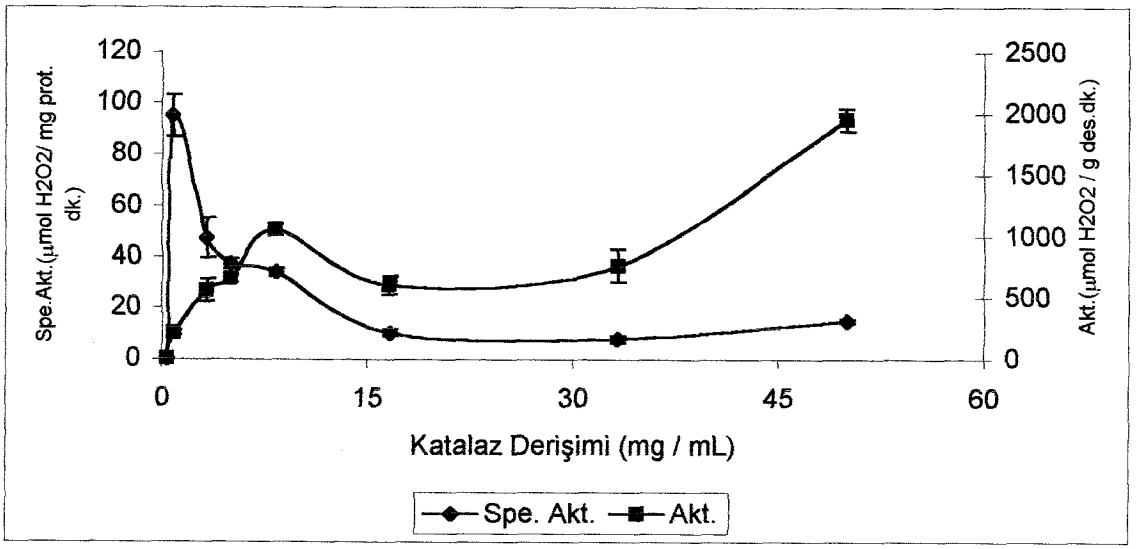


Şekil 4.19. % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 48 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği

% 2,5 (v/v) glutaraldehit ile 72 sa. immobilize edilmiş enzimin ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.18.'de verilmiş Şekil 4.20.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte 72 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Değerleri

Başlangıç Katalaz Derişimi (mg /mL)	Spesifik Aktivite (µmol H_2O_2 / mg prot. $^{-1}$ dk. $^{-1}$)	Aktivite (µmol H_2O_2 / g destek $^{-1}$ dk. $^{-1}$)
0,42	0	0
0,83	95,0±8,1	209,4±17,9
3,33	47,2±7,9	552,4±91,8
5,00	37,2±2,0	648,4±35,2
8,33	33,9±1,5	1050,2±45,6
16,65	10,1±1,3	598,1±77,7
33,3	7,7±1,4	757,8±134,4
50,0	14,7±0,7	1947,2±92,6

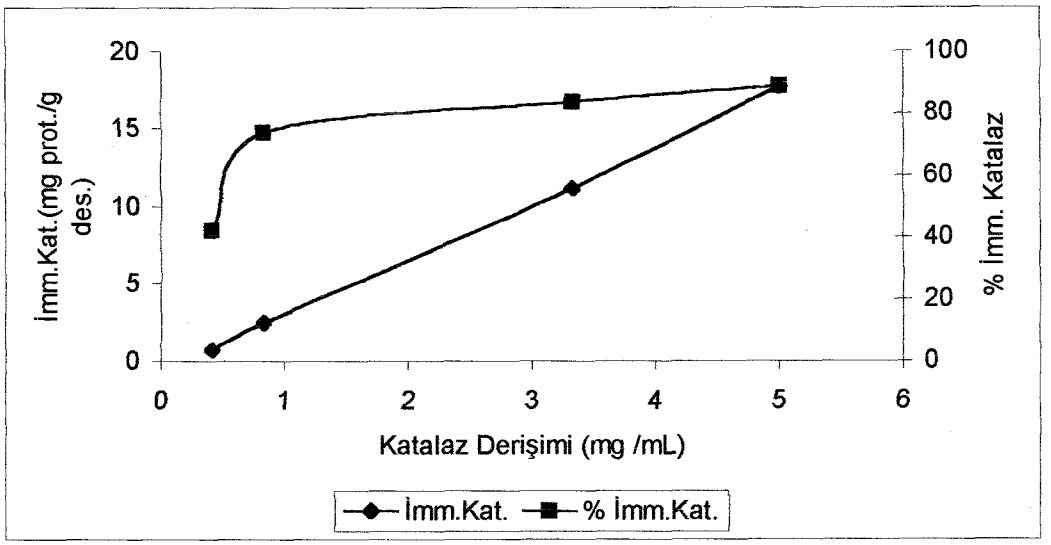


Şekil 4.20. % 2,5 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekte Farklı Derişimlerde Enzim İle 72 Sa. İmmobilizasyon Yapıldıktan Sonra Ölçülen Aktivite Grafiği

% 1,25 (v/v) glutaraldehit ile 24 sa. immobilize edilmiş enzim için elde edilen bulgular Çizelge 4.19.'de verilmiş Şekil 4.21.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.19. % 1,25 (v/v) Glutaraldehit İle 24 Sa. İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Elde Edilen Bulgular

Başlangıç Katalaz Derişimi (mg /mL)	24 Sa. İmm.sonra Tutuklanan enzim mg prot./ g destek	24 Sa. İmm.sonra %Tutuklanan enzim
0,42	0,701	42,1
0,83	2,45	73,7
3,33	11,13	83,6
5,00	17,76	88,9

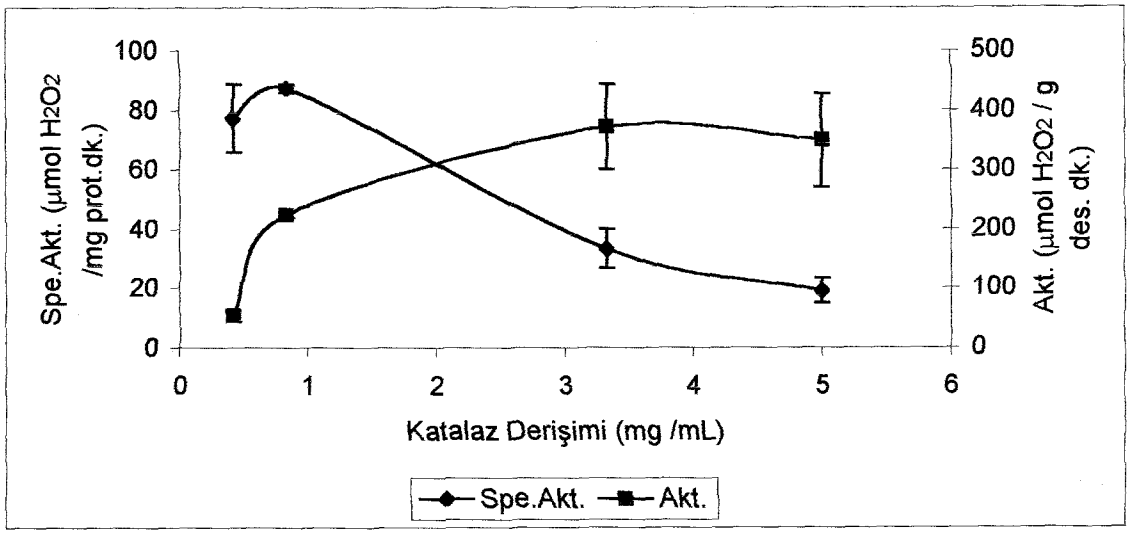


Şekil 4.21. % 1,25 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekle 24 Sa. İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Tutuklanan Enzim Miktarı ve % Tutuklanan Enzim Oranı Grafiği

% 1,25 (v/v) glutaraldehit ile 24 sa. immobilize edilmiş enzimin ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.20.'de verilmiş Şekil 4.22.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. % 1,25 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekle 24 Sa. İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Ölçülen Aktivite Değerleri

Başlangıç Katalaz Derişimi (mg /mL)	Spesifik Aktivite (μmol H_2O_2 / mg prot.$^{-1}$ dk.$^{-1}$)	Aktivite (μmol H_2O_2 / g des.$^{-1}$ dk.$^{-1}$)
0,42	77,2±11,4	53,0±8,8
0,83	87,3±1,4	224,7±3,6
3,33	33,4±6,5	372,1±71,8
5,00	19,1±4,2	348,9±78,8



Şekil 4.22. % 1,25 (v/v) Glutaraldehit İle Hazırlanan Destekle 24 Sa. İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Aktivite Garfiği

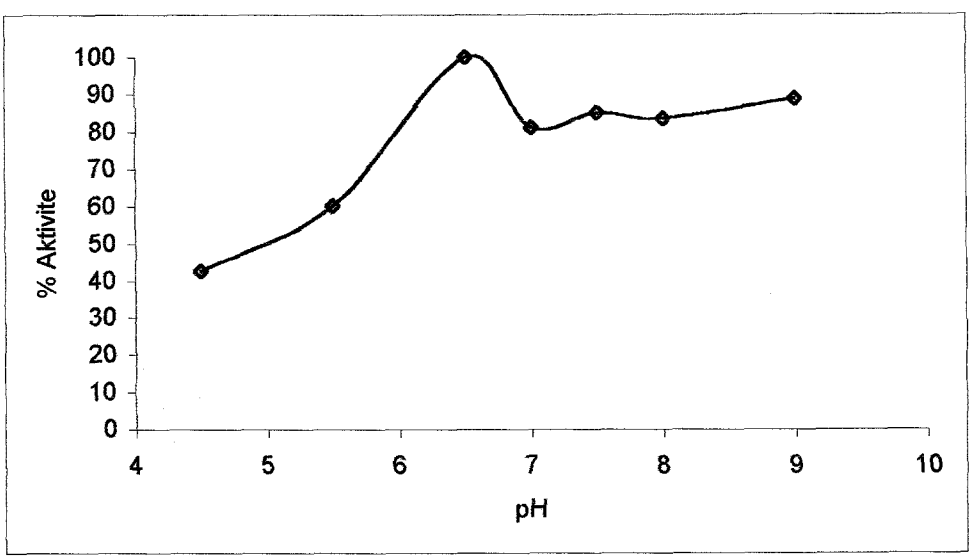
Enzim immobilizasyonunda % 2,5 (v/v) glutaraldehit ile hazırlanan destek ile 3,33 mg/mL katalaz derişiminde en uygun immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon işleminde katalaz derişimi artıkça % immobilize olan enzim değeri giderek artmakta belirli bir derişimden sonra azalmaya başlamaktadır. İmmobilize enzimin spesifik aktivitesi immobilizasyonda kullanılan enzimin derişimi ile ters orantılıdır.Yani immobilizasyon işleminde kullanılan katalaz derişimi arttıkça immobilize enzimin spesifik aktivitesi azalmıştır. Aktivite gram destek başına incelendiğinde katalaz derişimine bağlı olarak sürekli artmaktadır. Aralarında doğru orantı vardır. Spesifik aktivite ve normal aktivitedeki eğilimler incelendiğinde en uygun enzim derişimi 3,33 mg /mL olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon işleminde sürenin etkisi incelendiğinde 24, 48, 72 sa. yapılan immobilizasyon sonucunda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu enzimin desteğe bağlanabileceği en fazla miktarın 24 sa.ten önce bağlanmış olduğunu göstermektedir. Bu nedenle immobilizasyon süresi 2 sa. enzim derişimi 3,33 mg/mL olarak immobilizasyon yapıldığında enzimin % 92,1'nin tutuklandığı, 12,27 mgprot./gdes. miktarında immobilizasyonun gerçekleştiği bulunmuştur.

4.1.2.2.Glutaraldehit üzerinden immobilize edilen enzimin optimum pH, iyonik güç ve sıcaklığın belirlenmesi

Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş enzimin optimum aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek için farklı pH değerlerine sahip tamponların (pH 5.5 asetat, pH 6,0 6,5 7,0 7,5 8,0 fosfat, pH 9,0 borat) 50 mM çözeltileri kullanılarak 25 °C'de immobilize enziminin aktivitesi ölçülmüş, sonuçlar Çizelge 4.21.'de verilmiş Şekil 4.23.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Farklı pH'larda Ölçülen Aktivite Değerleri

pH	Spesifik Aktivite (μmol H_2O_2 /mg prot.dk.)	Aktivite (μmol H_2O_2 /g des.dk.)	% Aktivite
4,5	32,3±2,3	444,56±42,6	42,7
5,5	45,55±3,7	639,6±50,9	60,2
6,5	75,7±9,6	1066,97±135,9	100
7,0	61,5±8,1	866,67±113,6	81,2
7,5	64,39±8,9	986,3±67,2	85,1
8,0	63,31±6,8	891,88±96,0	83,6
9,0	67,3±7,8	947,73±109,7	88,9



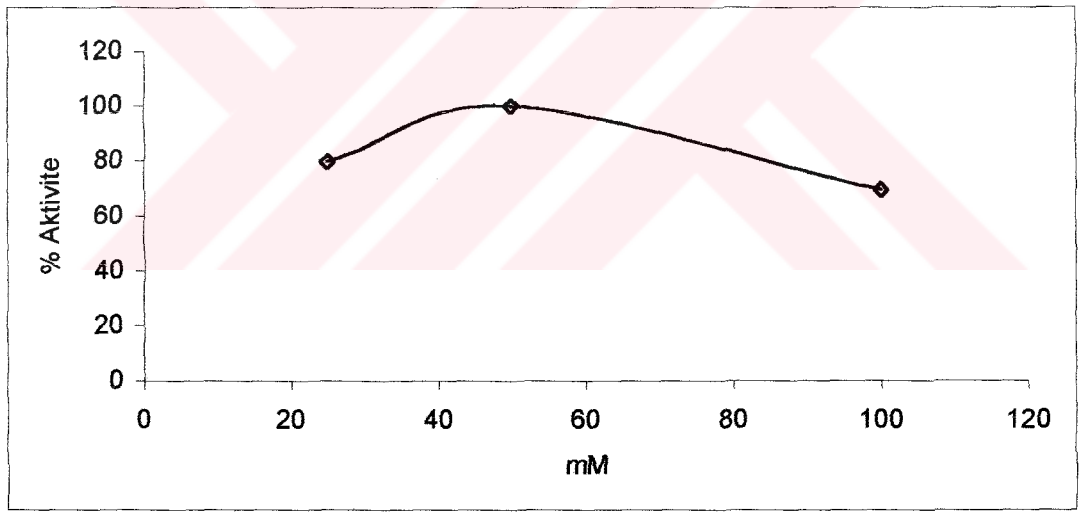
Şekil 4.23. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin pH-%Aktivite Grafiği

Glutaraldehit üzerinden immobilize edilen katalaz enzimi için optimum pH 6,5 olarak belirlenmiştir.

İyonik gücün enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için 25 mM, 50 mM, 100 mM pH 6,5 olan fosfat tamponunu kullanılarak immobilize enzimin aktiviteleri ölçülmüş elde edilen bulgular Çizelge 4.22.'de verilmiş Şekil 4.24.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Farklı Derişimlerdeki pH 6,5 Fosfat Tamponunda Ölçülen Aktivite Değerleri

Fosfat Tamponu pH 6,5 (mM)	Spesifik Aktivite (μmol H_2O_2 /mg prot.dk.)	Aktivite (μmol H_2O_2 /g des.dk.)	% Aktivite
25,0	60,3±10,6	849,1±150,4	79,7
50,0	75,7±9,6	1066,97±135,9	100,0
100,0	52,6±6,0	740,9±85,4	69,5



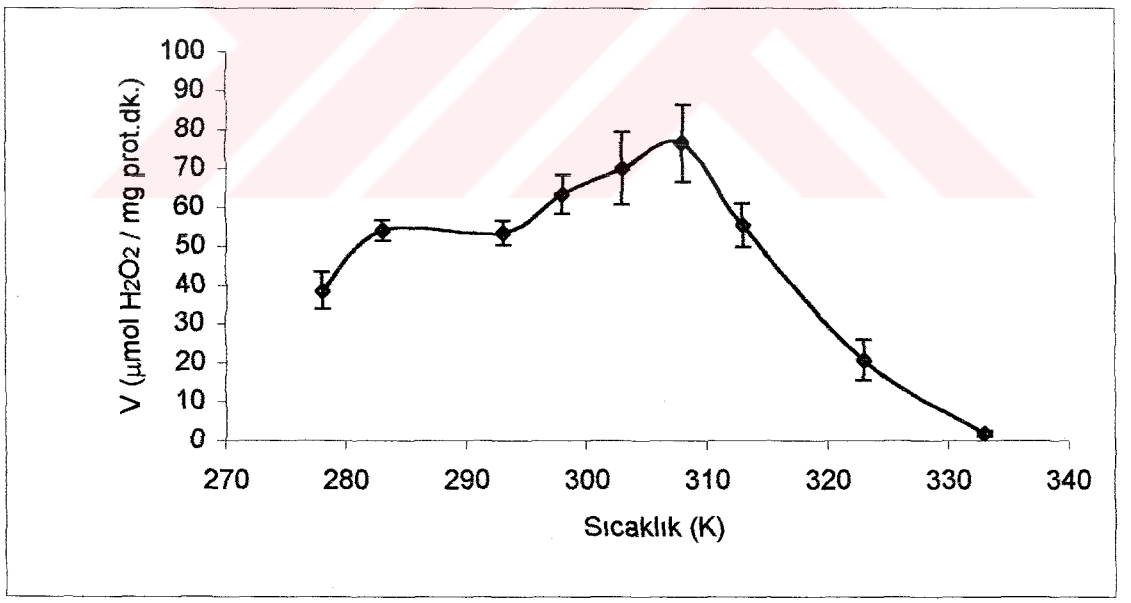
Şekil 4.24. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimin İyonik Güç-Aktivite Grafiği

Şekil 4.24.'de görüldüğü gibi glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş katalaz enzimi için en uygun tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.

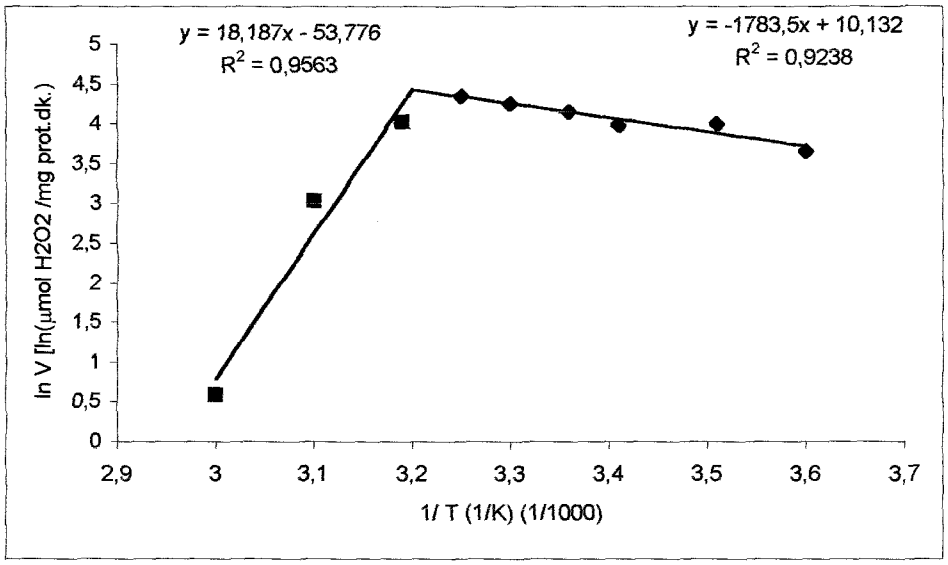
Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş enzimin aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi farklı sıcaklıklarda (278, 283, 293, 298, 303, 308, 313, 323, 330 K) incelenmiş, aktivite değerleri Çizelge 4.23.'de verilmiş sıcaklık-aktivite grafiği Şekil 4.25.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.23. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Farklı Sıcaklıklarda Ölçülen Aktivite Değerleri

Sıcaklık (K)	1/T (1/K)	Spesifik Aktivite (μmol H_2O_2 /mg prot.dk.)	ln V [ln(μmol H_2O_2 /mg prot.dk.)]	Aktivite (μmol H_2O_2 /g des.dk.)	lnV [ln(μmol H_2O_2 /g des.dk.)]
278	$3,60x10^{-3}$	38,59±4,9	3,653	543,56±68,9	6,298
283	$3,51x10^{-3}$	54,1±2,6	3,991	761,1±36,2	6,635
293	$3,41x10^{-3}$	53,5±3,1	3,980	753,5±44,3	6,625
298	$3,36x10^{-3}$	63,3±5,0	4,148	891,8±70,3	6,793
303	$3,30x10^{-3}$	70,0±9,3	4,248	986,28±131,0	6,894
308	$3,25x10^{-3}$	76,5±9,9	4,337	1102,8±125,0	7,006
313	$3,19x10^{-3}$	55,4±5,6	4,015	780,2±79,3	6,660
323	$3,10x10^{-3}$	20,68±5,2	3,029	291,6±73,3	5,675
333	$3,00x10^{-3}$	1,79±0,7	0,582	25,3±9,4	3,231



Şekil 4.25. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Sıcaklık-Aktivite Grafiği (Aktivite birimi μmol H_2O_2 /mg prot.dk.)



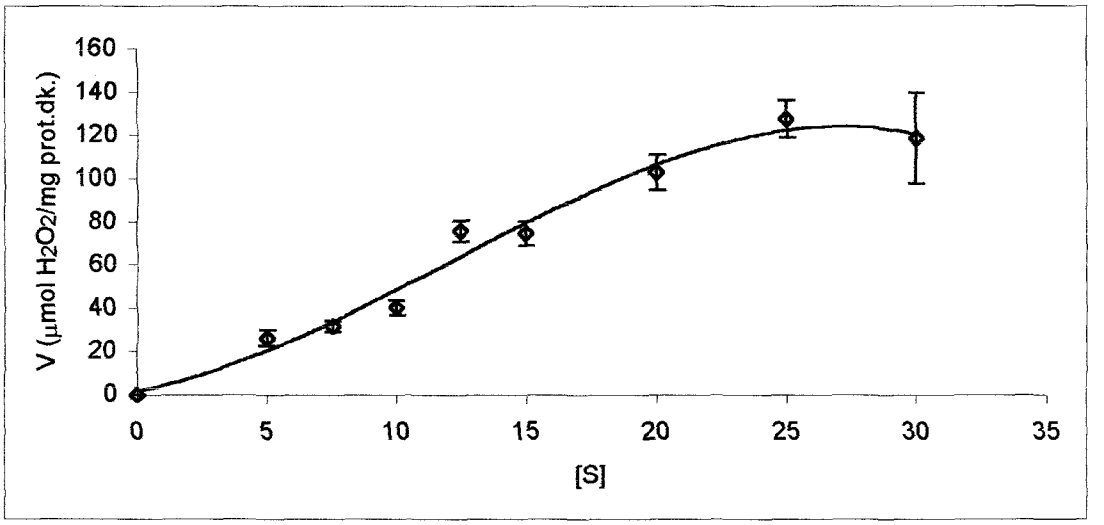
Şekil 4.26. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Arrhenius Grafiği(Aktivite birimi µmol H_2O_2 /mg prot.dk.)

Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş katalaz enzimi için tepkimenin aktivasyon enerjisi 14,83 kj/mol olarak hesaplanmış enzimin denature olmaya başladığı sıcaklık 39,5 °C olarak bulunmuştur.

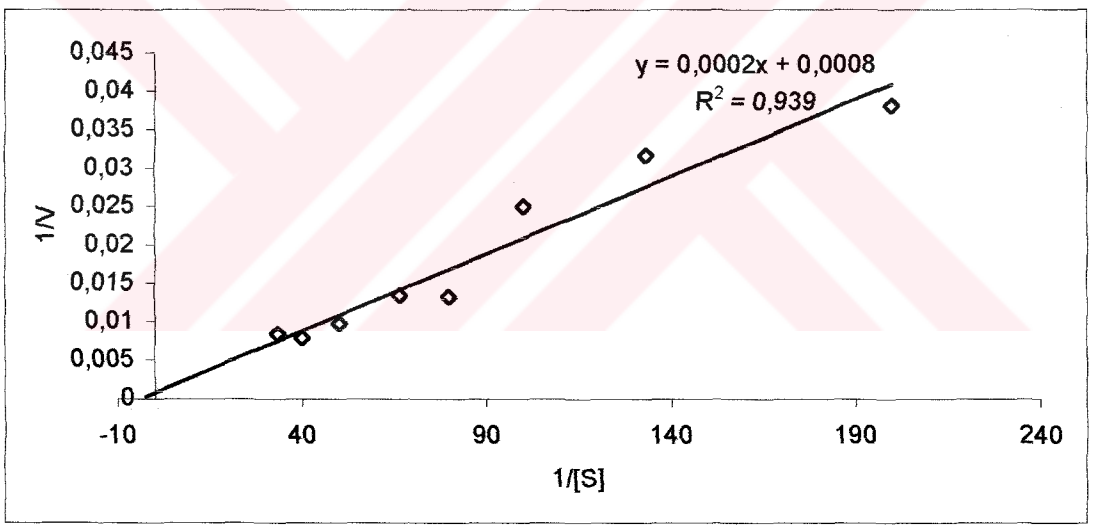
Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş katalaz enzim için farklı substrat derişimlerinde ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.24.'te verilmiş Şekil 4.27.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.24. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Farklı Substrat Derişimlerinde Ölçülen Aktivite Değerleri

[S] (mM)	1/[S] (1/M)	V (µmol H_2O_2/mg prot.dk.)	1/V (mg prot.dk. /(µmol H_2O_2).1000	V (µmol H_2O_2/g des.dk.)	1/V (g des.dk. /(µmol H_2O_2) .10000
5,0	200	26,22±3,6	38,14	346,63±47,59	28,85
7,5	133,3	31,64±2,45	31,61	418,28±32,39	23,91
10,0	100	40,1±3,4	24,94	530,12±44,95	18,86
12,5	80	75,6±4,7	13,23	999,43±62,13	10,01
15,0	66,7	74,5±5,6	13,42	984,89±74,03	10,15
20,0	50	102,8±8,3	9,73	1359,02±109,73	7,358
25	40	127,4±8,5	7,85	1684,23±112,37	5,937
30,0	33,3	118,6±20,9	8,43	1567,89±276,30	6,378

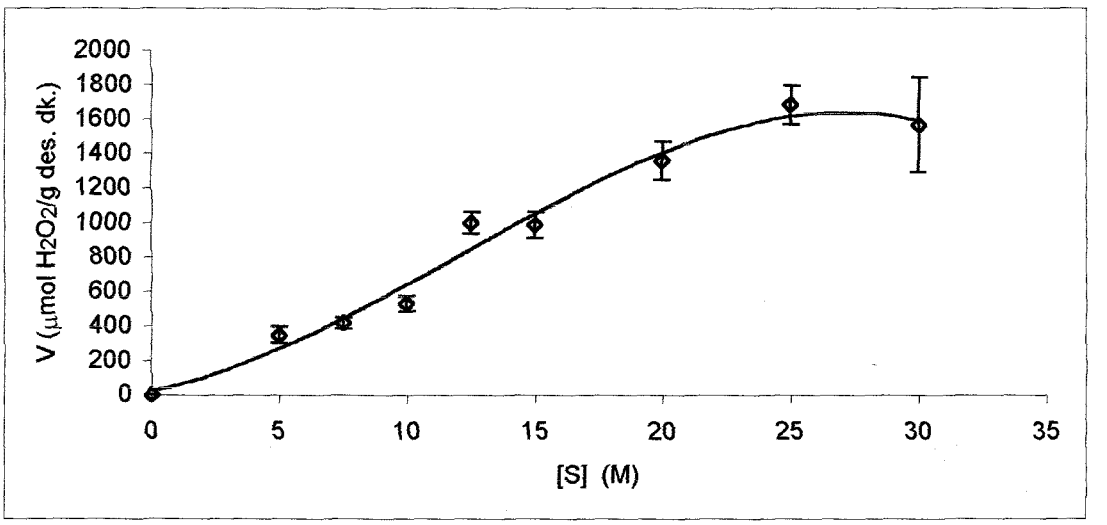


Şekil 4.27. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enzimi İçin Michaelis-Menten Grafiği(Aktivite birimi µmol H_2O_2 /mg prto.dk.)

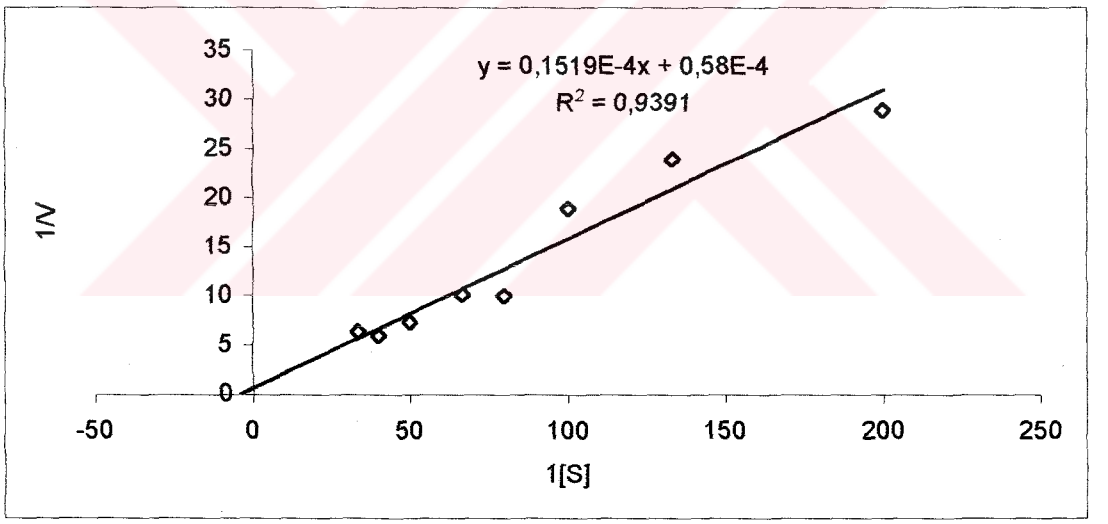


Şekil 4.28. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Lineweaver-Burk Grafiği (Aktivite birimi µmol H_2O_2 /mg prot.dk.)

Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş katalaz enzimi için Km 250,0 mM H_2O_2, Vmax 1250,0 µmol H_2O_2/mg prot.dk. geri dönüşüm sayısı $1,25x10^3$ s^{-1} olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.29. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enzimi İçin Michaelis Menten Grafiği (Aktivite birimi µmol H_2O_2 /g des.dk.)



Şekil 4.30. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Lineweaver-Burk Grafiği (Aktivite birimi µmol H_2O_2 /g des.dk.)

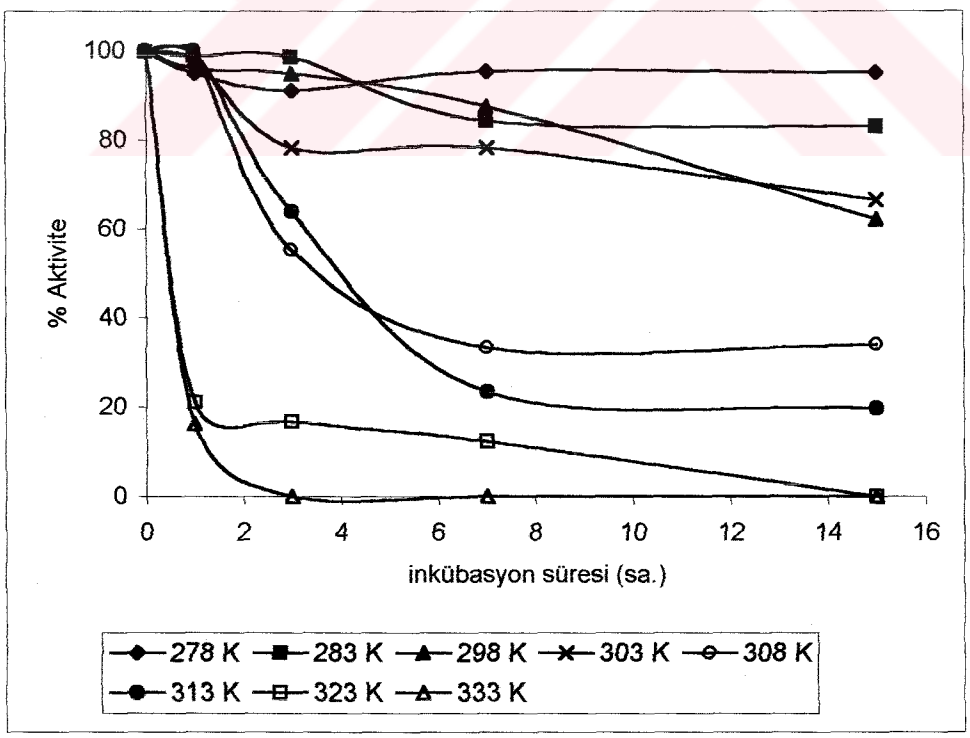
Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş katalaz enzimi için Vmax 17241,4 µmol H_2O_2/g des.dk. olarak hesaplanmıştır.

Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş katalaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için farklı sıcaklıklarda (278, 283, 298, 303, 308, 313, 323, 333 K) de ve farklı sürelerde (1, 3, 7, 15 sa.) bekletilerek 35 °C'de aktivitesi

ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Çizelge 4.25.'de verilmiş Şekil 4.31.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.25. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Termal Kararlılık

İnk.Süresi (Sa.)	V (μmol H_2O_2/mg prot.dk.)							
	278 K	283 K	298 K	303 K	308 K	313 K	323 K	333 K
1	44,9±3,4	46,73±6,2	45,4±5,3	46,3±1,7	46,7±3,9	47,74±2,1	9,94±0,8	7,62±1,2
3	43,10±2,1	46,61±5,6	44,8±6,6	36,96±4,6	26,1±1,4	30,18±3,0	7,91±0,9	0
7	45,1±2,1	39,8±2,2	41,4±6,5	36,96±3,8	15,8±2,1	11,08±1,2	5,8±2,6	0
15	44,98±9,4	39,26±7,4	29,34±1,5	31,4±3,5	16,14±4,5	9,36±0,3	0	0
	% Kalan Aktivite							
İnk.Süresi (Sa.)	278 K	283 K	298 K	303 K	308 K	313 K	323 K	333 K
1	95,0	98,8	96,0	97,9	98,8	100	21,0	16,1
3	91,2	98,6	94,8	78,2	55,2	63,8	16,7	0
7	95,4	84,2	87,6	78,2	33,4	23,4	12,3	0
15	95,1	83,0	62,1	66,4	34,0	19,8	0	0

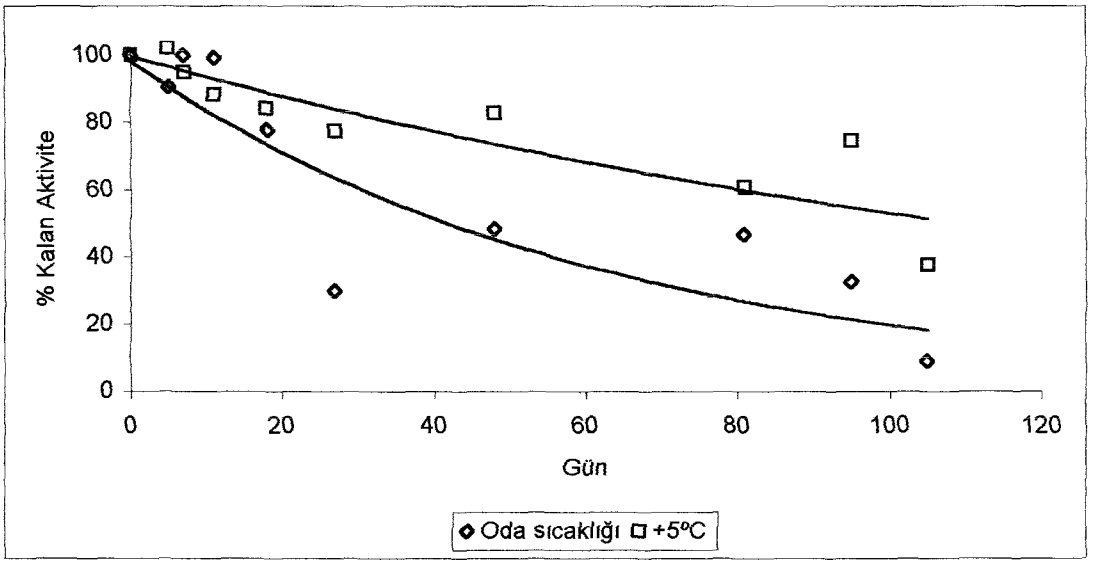


Şekil 4.31. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Termal Kararlılık Grafiği

Glutaraldehit üzerinden immobilize edilen katalaz enziminin depolama kararlılığını belirlemek amacıyla immobilize enzim oda sıcaklığında ve +5 °C'de saklanarak belirli zamanlarda aktivitesi ölçülmüş, elde edilen veriler Çizelge 4.26.' de verilmiş Şekil 4.32.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.26. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığı İle İlgili Bulgular

Gün	Oda sıcaklığında saklanan enzim			+5 °C'de saklanan enzim		
	V (μmol H_2O_2/mg prot.dk.)	V (μmol H_2O_2/g des.dk.)	% Kalan Aktivite	V (μmol H_2O_2/mg prot.dk.)	V (μmol H_2O_2/g des.dk.)	% Kalan Aktivite
0.	37,91±3,77	404,54±40,26	100	37,91±3,77	404,54±40,26	100
5.	34,26±2,12	365,53±22,62	90,4	38,87±4,77	414,76±50,93	102
7.	37.91±3,25	404,55±34,72	100	35,92±1,64	383,33±17,54	94,8
11.	37,56±5,21	400,88±55,62	99,1	33,42±5,08	356,69±54,17	88,2
18.	29,46±4,14	314,40±44,18	77,8	31,83±4,17	339,65±44,53	84,0
27.	11,26±1,18	120,20±12,69	29,7	29,36±3,54	315,39±37,79	77,4
48.	18,34±2,65	195,71±28,23	48,4	31,35±3,00	334,60±32,0	82,7
81.	17,71±3,34	189,01±35,66	46,7	23,01±3,49	242,69±35,23	60,7
95.	12,28±1,7	131,06±18,2	32,4	28,28±2,9	301,77±30,82	74,6
105.	3,4±1,5	36,00±16,0	9,0	14,2±1,3	151,53±14,37	37,5



Şekil 4.32. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığı Grafiği

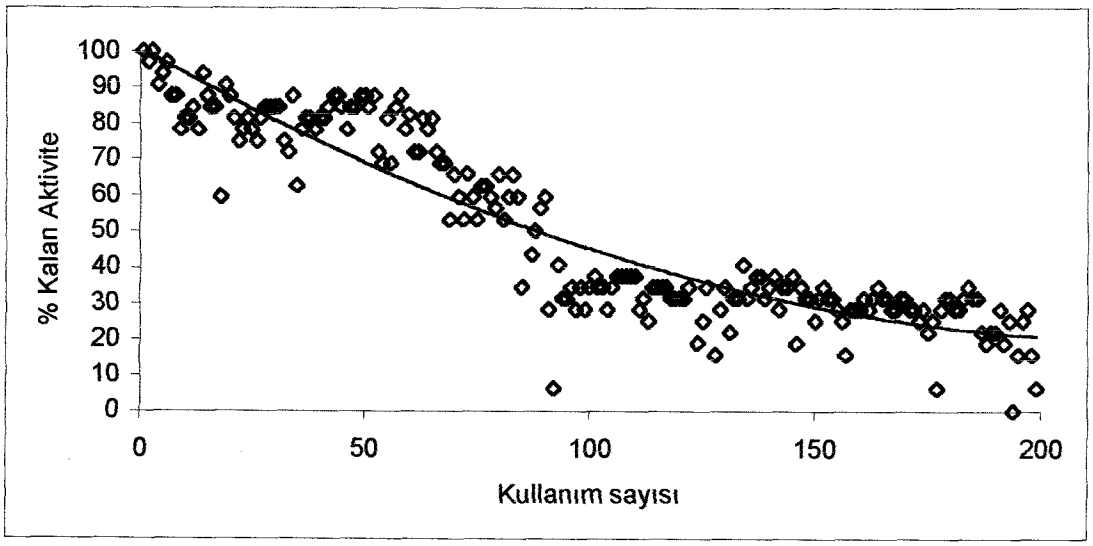
Glutaraldehit üzerinden immobilize edilen katalaz enziminin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak aktivitesindeki değişim Çizelge 4.27.'de verilmiş, Şekil 4.33.'de şematik olarak gösterilmiştir

Çizelge 4.27. Glutaraldehit üzerinden immobilize edilen katalaz enziminin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak ölçülen aktivite değerleri

Kullanım Sayısı	%Aktivite	Kullanım Sayısı	%Aktivite	Kullanım Sayısı	%Aktivite	Kullanım Sayısı	%Aktivite
1	100,0	51	84,4	102	34,4	154	31,3
2	96,9	52	87,5	103	34,4	155	28,1
3	100,0	53	71,9	104	28,1	156	25,0
4	90,6	54	68,8	105	34,4	157	15,6
5	93,8	55	81,3	106	37,5	158	28,1
6	96,9	56	68,8	107	37,5	159	28,1
7	87,5	57	84,4	108	37,5	160	28,1
8	87,5	58	87,5	109	37,5	161	31,3
9	78,1	59	78,3	110	37,5	162	28,1
10	81,3	60	82,3	111	28,1	163	31,3
11	81,2	61	71,9	112	31,3	164	34,4
12	84,4	62	71,9	113	25,0	165	31,3
13	78,1	63	81,3	114	34,4	166	31,3
14	93,8	64	78,3	115	34,4	167	28,1
15	87,5	65	81,3	116	34,4	168	28,1
16	84,4	66	71,9	117	34,4	169	31,3

17	84,4	67	68,8	118	31,3	170	31,3
18	59,4	68	68,8	119	31,3	171	28,1
19	90,6	69	53,1	120	31,3	172	28,1
20	87,5	70	65,6	121	31,3	173	25,0
21	81,3	71	59,4	122	34,4	174	28,2
22	75,0	72	53,1	124	18,9	175	21,9
23	78,1	73	65,9	125	25,0	176	25,0
24	81,3	74	59,4	126	34,4	177	6,3
25	78,1	75	53,1	128	15,6	178	28,1
26	75,0	76	62,5	129	28,1	179	31,3
27	81,3	77	62,5	130	34,4	180	31,3
28	84,4	78	59,4	131	21,9	181	28,1
29	84,4	79	56,3	132	31,3	182	28,1
30	84,4	80	65,6	133	31,3	183	31,3
31	84,4	81	53,1	134	40,6	184	34,4
32	75,0	82	59,4	135	31,3	185	31,3
33	71,9	83	65,6	136	34,4	186	31,3
34	87,5	84	59,4	137	37,5	187	21,9
35	62,5	85	34,4	138	37,5	188	18,8
36	78,1	87	43,4	139	31,3	189	21,9
37	81,3	88	50	140	34,4	190	21,9
38	81,3	89	56,3	141	37,5	191	28,1
39	78,1	90	59,4	142	28,1	192	18,8
40	81,3	91	28,1	143	34,4	193	25,0
41	81,3	92	6,25	144	34,4	194	0
42	84,4	93	40,6	145	37,5	195	15,6
43	87,5	94	31,3	146	18,8	196	25,0
44	87,5	95	31,3	147	34,4	197	28,1
45	84,4	96	34,4	148	31,3	198	15,6
46	78,1	97	28,1	149	31,3	199	6,3
47	84,4	98	34,4	150	25,0		
48	84,4	99	28,1	151	31,3		
49	87,5	100	34,4	152	34,4		
50	87,5	101	37,5	153	31,3		

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ



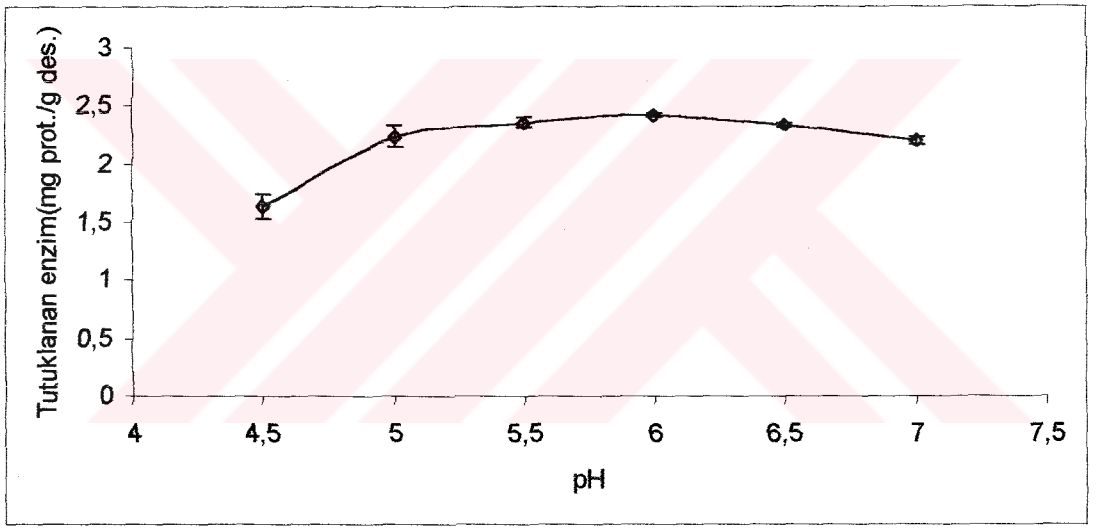
Şekil 4.33. Glutaraldehit Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Kullanım Sayısı- % Kalan Aktivite Grafiği

4.1.2.4.Katalazın Ara Kol (3-Aminopropiyonik Asit) Üzerinden İmmobilizasyonu İle Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

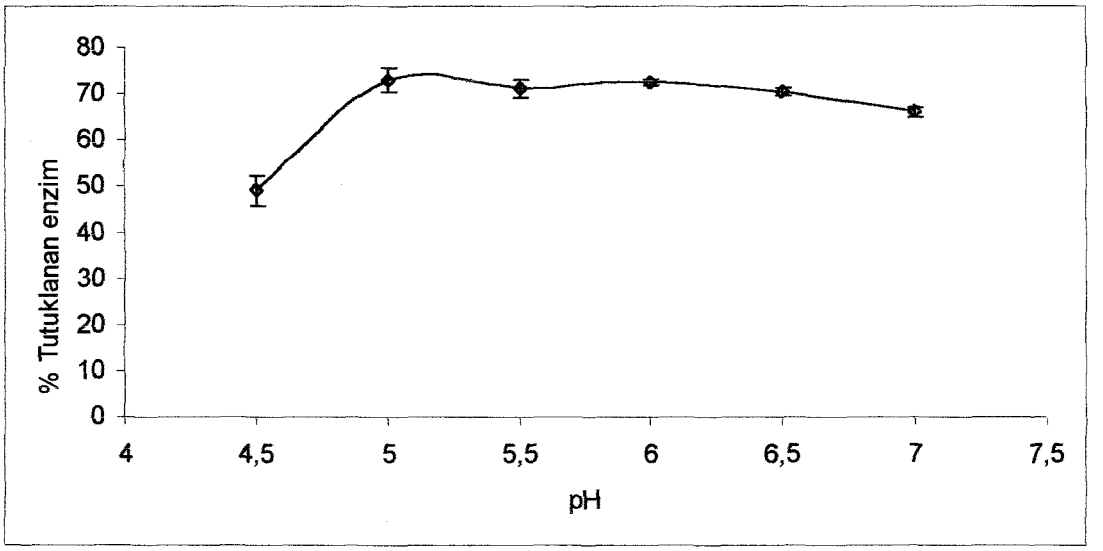
Enzimin ara kol kullanılarak yapılan immobilizasyonunda Sang-Wco (1992) tarafından bildirilen yöntem kullanlılmıştır. Yöntemde lipaz enzimi ara kol olan 3-aminopropiyonik asit üzerinden pH 4,0'de bağlanmıştır. Ancak yaptığımız çalışma sonucunda katalaz enziminin pH 4,0'de desteğe bağlanamadığı gözlenmiştir. Bu nedenle öncelikle enzimin farklı pH'larda (4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0) 50 mM tampon derişiminde desteğe bağlanma miktarı belirlenmiş ve 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda oda sıcaklığında aktiviteleri ölçülmüştür. Bu yapılan çalışmada immobilizasyonda katalazın başlangıç derişimi 0,832 mg/mL olarak seçilmiştir elde edilen bulgular Çizelge 4.28.'de verilmiş Şekil 4.28. ve Şekil 4.29.'da şematik olarak gösterilmiştir. Ara kol üzerinden farklı pH'larda yapılan immobilizasyondan sonra Şekil 4.34.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.28 Farklı pH'larda Ara kol Üzerinden Yapılan İmmobilizasyonda Elde Edilen Bulgular

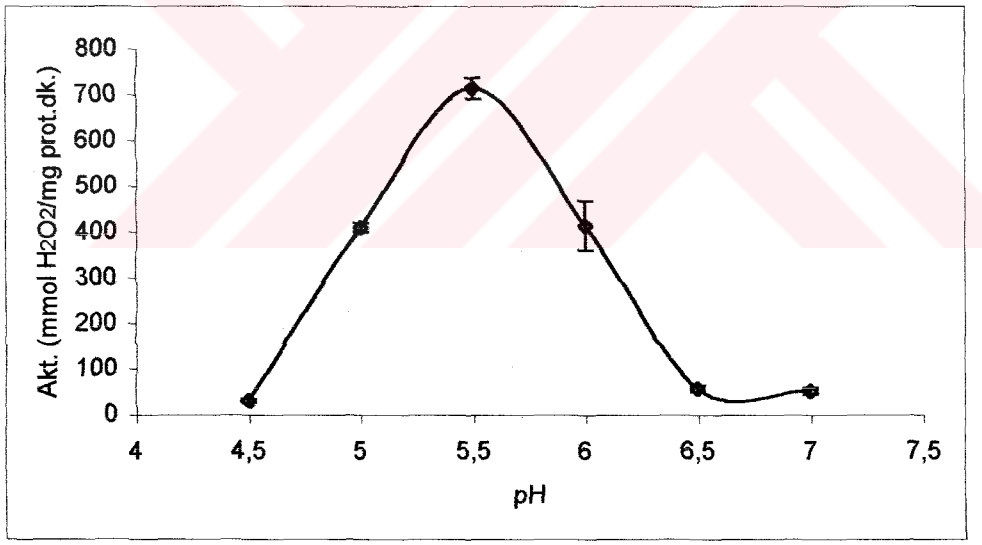
pH	Tutuklanan enzim (mg prot./g des.)	% Tutuklanma	Spesifik Akt. (µmol H_2O_2/mg prot.dk.)	Akt. (µmol H_2O_2/g des.dk.)
4,5	1,64±0,10	49,3±3,2	30,0±3,8	50,5±8,7
5,0	2,24±0,09	73,0±2,7	410,0±10,1	982,9±32,4
5,5	2,36±0,05	71,2±1,85	714,3±22,4	1685,7±52,9
6,0	2,42±0,02	72,6±0,6	414,2±53,7	990,3±117,8
6,5	2,34±0,02	70,5±0,7	57,4±6,9	135,1±17,2
7,0	2,20±0,04	66,0±1,2	51,8±7,1	113,6±15,2



Şekil 4.34 Ara kol Üzerinden Yapılan İmmobilizasyonda pH İle g Destek Başına Bağlanan Protein Miktarının Değişimi



Şekil 4.35 Ara kol Üzerinden Yapılan İmmobilizasyonda pH İle % Tutuklanan Enzim Miktarının Değişimi



Şekil 4.36 Ara kol Üzerinden Yapılan İmmobilizasyonda Bağlanma pH'sı İle Aktivitenin Değişimi Grafiği

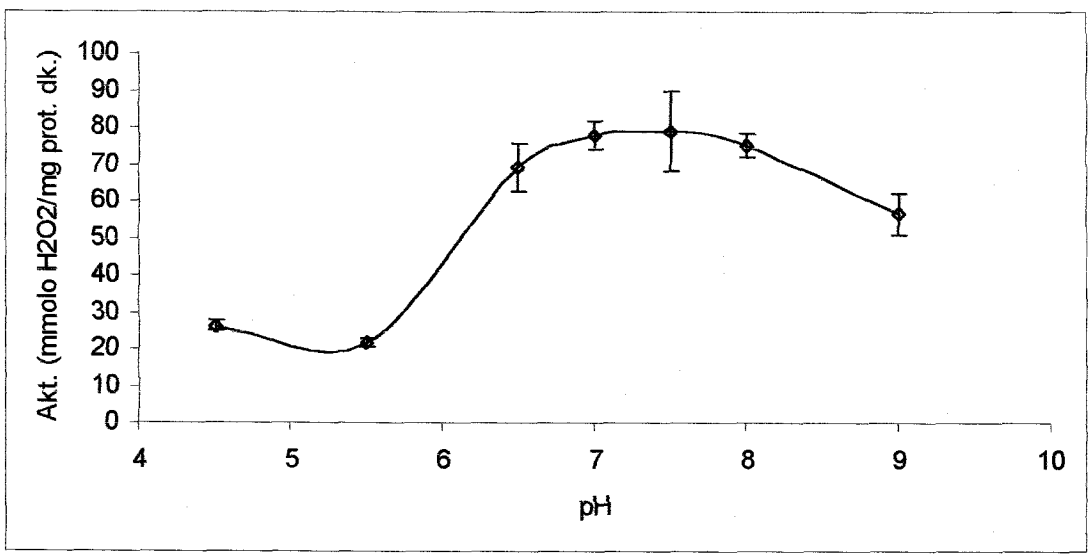
Farklı pH'larda ara kol üzerinden yapılan immobilizasyonda en uygun bağlanma pH'sı 5,5 olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra aktiviteleri pH 7,0 de ölçüldüğünde pH 5,5 de yapılan immobilizasyonda enzim en fazla aktivite gösterdiği bulunmuştur. Katalaz enziminin ara kol üzerinden bağlanmasında en uygun pH belirlendikten sonra yapılan immobilizasyonlarda 3,33

mg/mL enzim çözeltisi kullanılmıştır.Bu derişim aynı zamanda glutaraldehit üzerinden immobilizasyonda belirlenmiş olan en uygun enzim derişimidir.

Ara kol üzerinden immobilize edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek için farklı pH değerlerine sahip tamponların (pH 5,5 asetat, pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat, pH 9,0 borat) 50 mM çözeltileri kullanılarak 25 °C'de immobilize enziminin aktivitesi ölçülmüş, sonuçlar Çizelge 4.29.'da verilmiş Şekil 4.37.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.29. Ara kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Enzim İçin Farklı pH'larda Ölçülen Aktivite Değerleri

pH	Spesifik Aktivite (μmol H_2O_2 / mg prot.dk.)	Aktivite (μmol H_2O_2 / g des.dk.)	% Aktivite
4,5	26,12±1,30	290,08±14,45	33,09
5,5	21,59±1,16	239,95±12,89	27,35
6,5	69,19±6,4	768,98±71,13	87,66
7,0	77,73±3,68	863,89±40,90	98,48
7,5	78,93±10,83	877,23±120,36	100
8,0	75,19±3,07	835,66±34,12	95,26
9,0	56,53±5,71	628,27±63,46	71,62

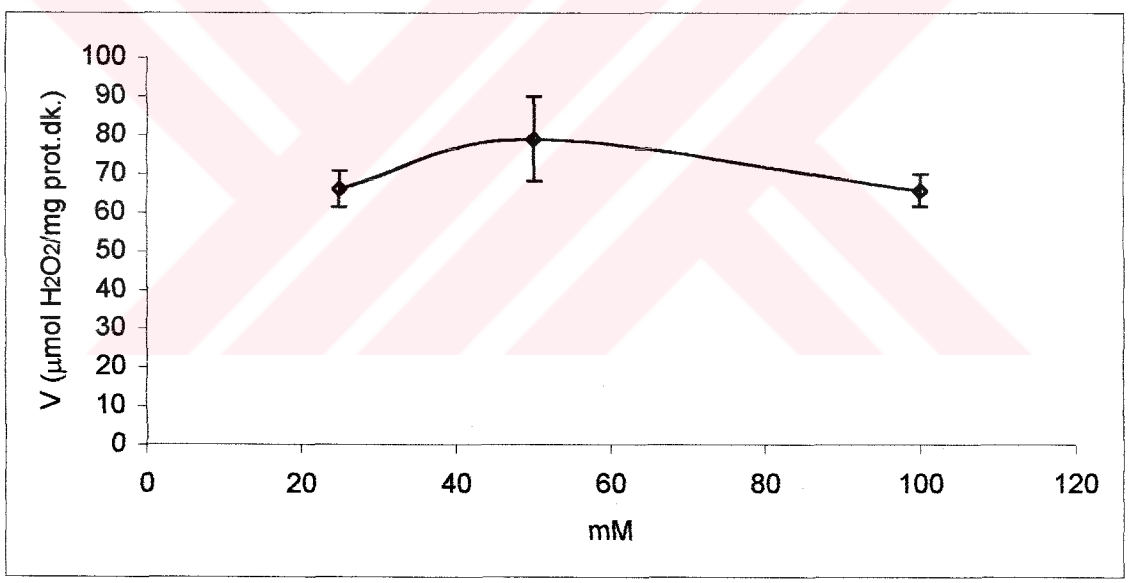


Şekil 4.37. Ara kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz İçin pH-Aktivite Grafiği

Ara kol üzerinden immobilize edilmiş enzimin aktivitesi üzerine iyonik gücün etkisini belirlemek için belirlenen optimum pH olan 7,5 fosfat tamponunun 25 mM, 50 mM ve 100 mM derişimlerdeki aktiviteleri ölçülmüş elde edilen bulgular Çizelge 4.30.'da verilmiş Şekil 4.38.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.30. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Enzimin Farklı Derişimlerdeki Fosfat Tamponunda Ölçülen Aktivite Değerleri

Tampon Derişimi (mM)	Aktivite (µmol H_2O_2/ mg prot.dk.)	Aktivite (µmol H_2O_2 g des..dk.)	% Aktivite
25	66,02±4,71	733,75±52,35	83,64
50	78,93±10,83	877,23±120,36	100
100	65,64±4,17	729,52±46,33	83,16

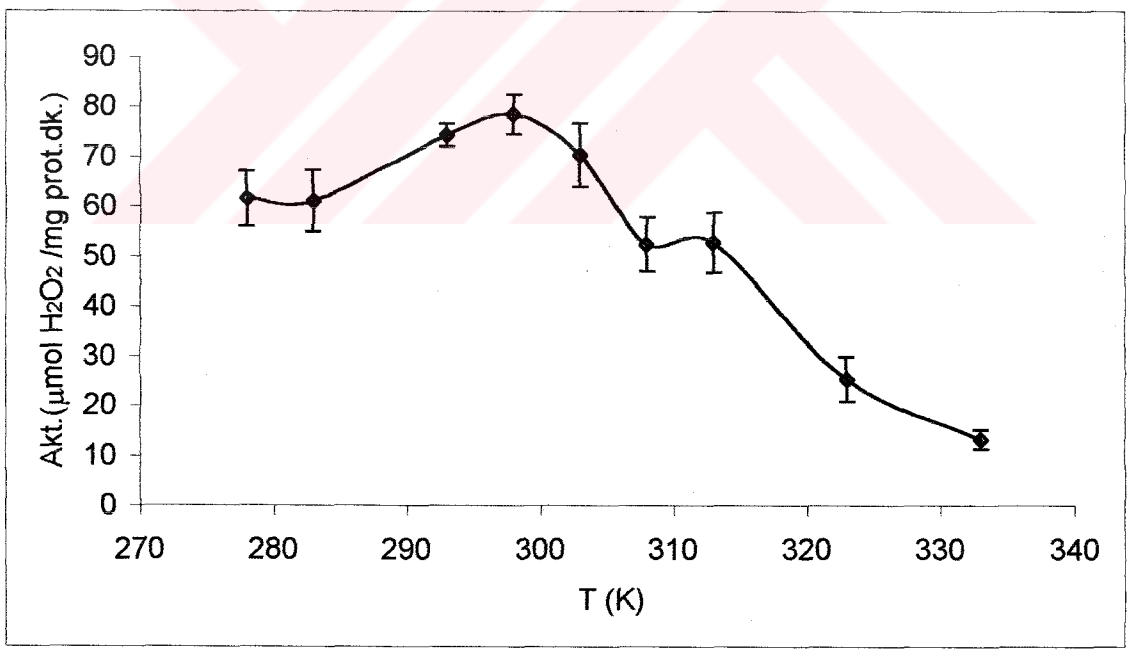


Şekil 4.38 Ara kol Üzerinden İmmobilize Edilen Enzim İçin İyonik Güç-Aktivite Grafiği

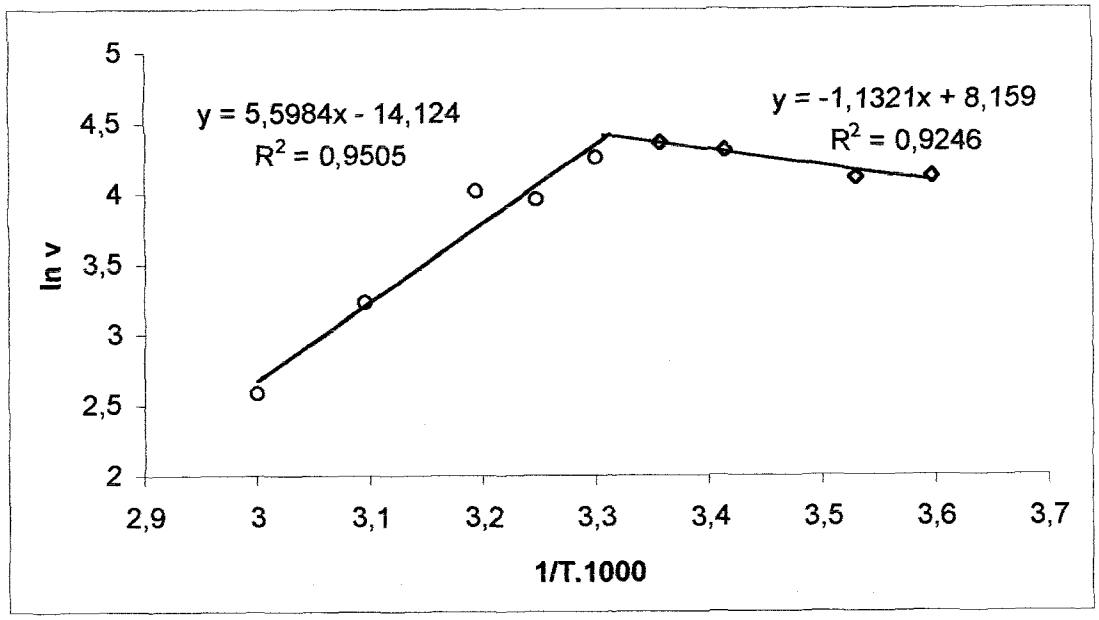
Ara kol üzerinden immobilize edilmiş enzimin aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi farklı sıcaklıklarda (278, 283, 293, 298, 303, 308, 313, 323, 330 K'de) incelenmiş, aktivite değerleri Çizelge 4.31'de verilmiş sıcaklık-aktivite grafiği Şekil 4.39.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.31. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Farklı Sıcaklıklarda Ölçülen Aktivite Değerleri

T (K)	Spesifik Aktivite (μmol H_2O_2 /mg prot.dk.)	Aktivite (μmol H_2O_2 /g des.dk.)	1/T.1000 (K^{-1})	ln V [ln (μmol H_2O_2/ mg prot.dk.)
278	61,53±5,57	683,84±61,90	3,597	4,120
283	61,12±6,15	679,29±68,35	3,530	4,113
293	74,32±2,32	825,99±25,78	3,413	4,308
298	78,55±3,95	873,05±43,90	3,356	4,364
303	70,38±6,36	782,20±70,69	3,300	4,254
308	52,42±5,44	582,60±60,46	3,247	3,959
313	52,77±5,95	586,49±66,13	3,194	4,017
323	25,26±4,53	280,74±50,35	3,096	3,229
333	13,22±1,91	146,93±21,23	3,003	2,582



Şekil 4.39. Ara kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Sıcaklık-Aktivite Grafiği



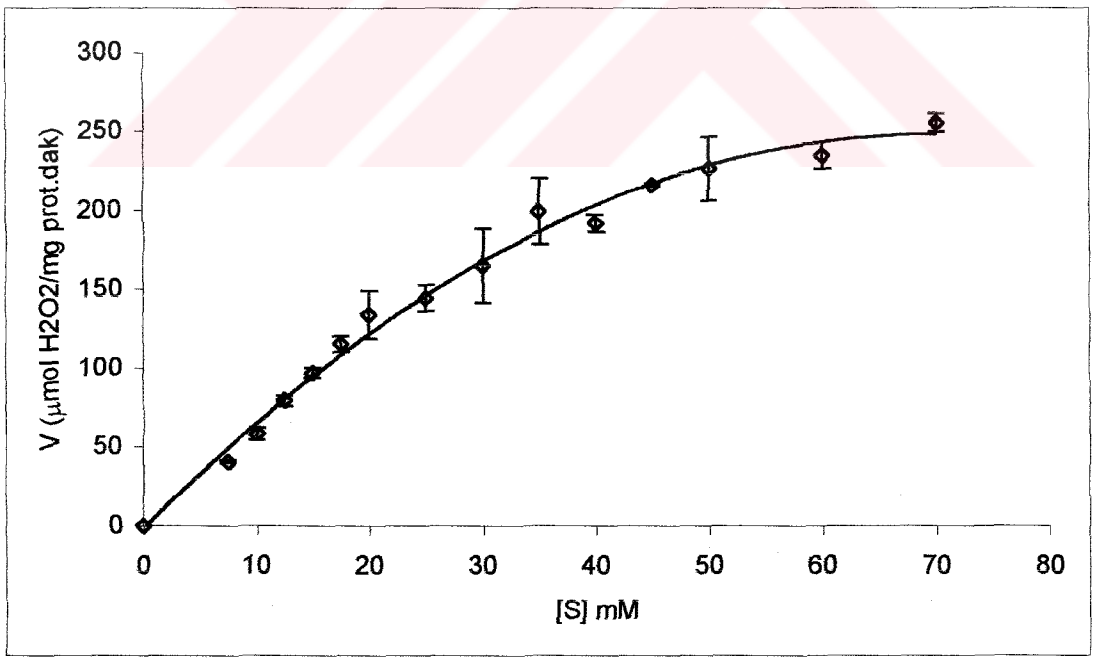
Şekil 4.40. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Arrhenius Grafiği

Ara kol üzerinden immobilize edilmiş katalaz enzimini için optimum sıcaklık 25 °C olarak bulunmuş, enzimin katalizlediği reaksiyonun aktivasyon enerjisi 9,41 kJ/mol, enzimin denature olmaya başladığı sıcaklık 29,05 °C olarak hesaplanmıştır.

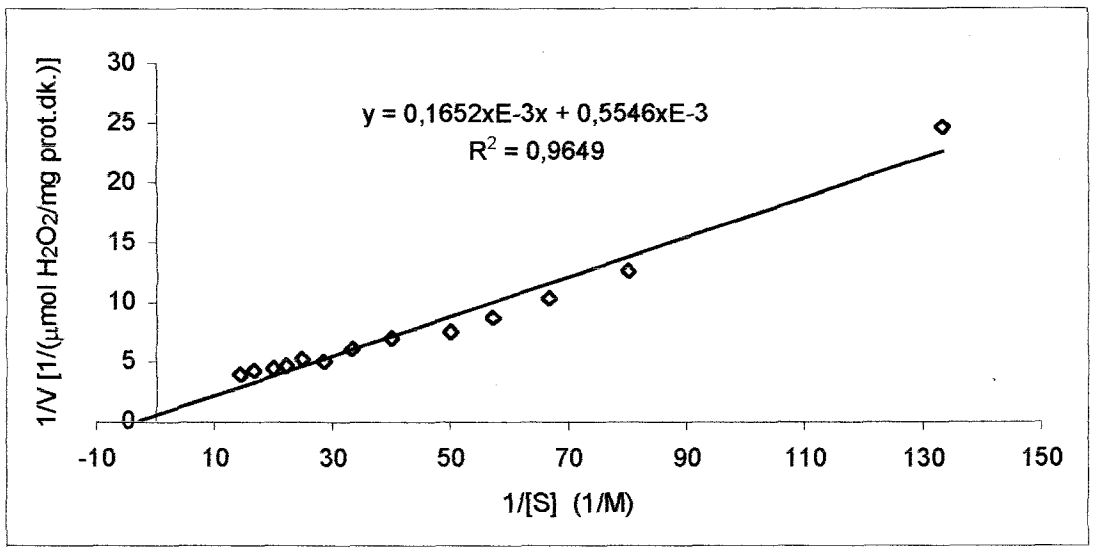
Ara kol üzerinden immobilize edilmiş katalaz enziminin farklı substrat derişimlerinde pH 7,5 50 mM fosfat tamponunda 25 °C de ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.32.'de verilmiş Şekil 4.35.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.32. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Farklı Substrat Derişimlerinde Ölçülen Aktivite Değerleri

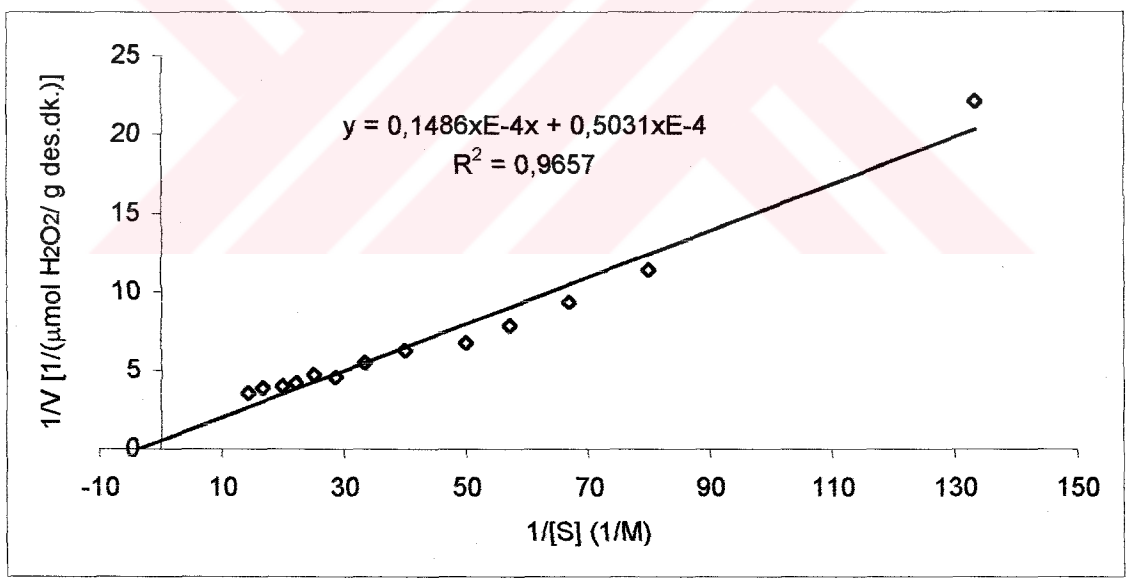
[S] mM	V (µmol H_2O_2 / mg prot.dk.)	V (µmol H_2O_2 /g des.dk.)	1/[S] (M^{-1})	1/ V (µmolH_2O_2/ mg prot.dk.)$^{-1}$	1/ V (µmol H_2O_2 / g des.dk.)$^{-1}$
7,5	40,67±0,85	452,01±9,45	133,33	$24,59x10^{-3}$	$2,21x10^{-3}$
10	78,55±3,95	873,05±43,90	100,00	$12,73 x10^{-3}$	$1,14x10^{-3}$
12,5	79,24±3,07	880,67±34,12	80,00	$12,6x10^{-3}$	$1,14x10^{-3}$
15	96,79±3.32	1075,72±36,90	66,67	$10,3x10^{-3}$	$9,30x10^{-4}$
17,5	115,03±4,82	1278,44±53,57	57,14	$8,69x10^{-3}$	$7,82x10^{-4}$
20	133,6±14,97	1484,83±166,38	50,00	$7,49x10^{-3}$	$6,73x10^{-4}$
25	143,92±8,37	1599,53±93,02	40,00	$6,95x10^{-3}$	$6,25x10^{-4}$
30	164,58±23,74	1829,14±263,85	33,33	$6,08x10^{-3}$	$5,47x10^{-4}$
35	199,04±21,01	2212,13±233,51	28,57	$5,02x10^{-3}$	$4,52x10^{-4}$
40	191,54±5,48	2128,78±60,90	25,00	$5,22x10^{-3}$	$4,70x10^{-4}$
45	215,74±1,02	2397,73±11,34	22,22	$4,64x10^{-3}$	$4,17x10^{-4}$
50	225,91±20,10	2510,76±223,39	20,00	$4,43x10^{-3}$	$3,98x10^{-4}$
60	234,53±8,38	2606,57±93,14	16,67	$4,26x10^{-3}$	$3,84x10^{-4}$
70	255,16±6,31	2835,85±70,14	14,29	$3,92x10^{-3}$	$3,53x10^{-4}$



Şekil 4.41. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Michaelis – Menten Grafiği



Şekil 4.42. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Lineweaver-Burk Grafiği(Aktivite birimi µmol H_2O_2 /mg prot.dk.)



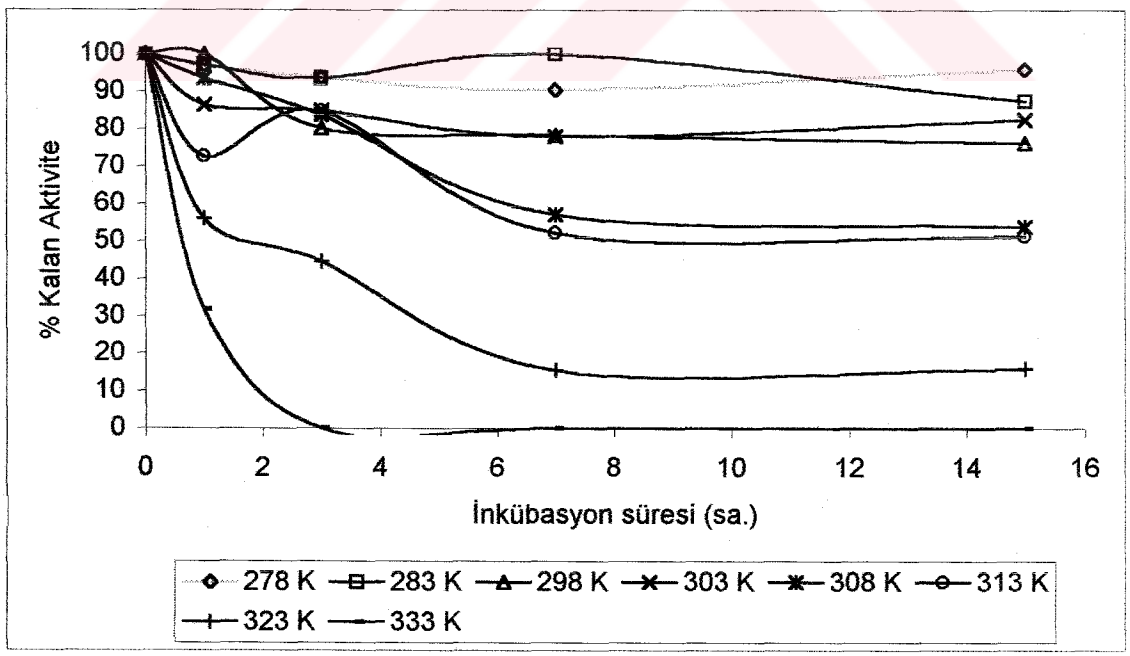
Şekil 4.43. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Lineweaver-Burk Grafiği(Aktivite birimi µmol H_2O_2 /g des.dk.)

Ara kol üzerinden immobilize edilen katalaz enzimi için Vmax 1803,1µmol H_2O_2/mg prot.dk., 19876,8 µmol H_2O_2 /g des.dk., Km 297,9 mM, geri dönüşüm sayısı $1,8x10^3$ s^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Ara kol üzerinden immobilize edilmiş katalaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için farklı sıcaklıklarda (278, 283, 298, 303, 308, 313, 323, 333 K'de) ve farklı sürelerde (1, 3, 7, 15 sa.) bekletilerek 25 °C'de aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Çizelge 4.33.'de verilmiş Şekil 4.44.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.33. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enzimi İçin Termal Kararlılık

İnk. Süresi (Sa.)	V (µmol H_2O_2/mg prot.dk.)							
	278 K	283 K	298 K	303 K	308 K	313 K	323 K	333 K
1	69,77±6,8	69,81±10,0	71,9±5,3	62,10±6,46	67,31±5,29	52,28±8,11	40,33±4,32	22,94±1,3
3	67,37±11,59	67,31±6,72	57,69±5,03	61,01±3,26	60,16±4,76	60,94±4,28	32,10±8,37	0,0
7	65,04±6,90	72,97±6,11	56,35±4,86	56,01±6,1	41,01±4,84	37,49±4,75	11,13±1,29	0,0
15	68,96±2,65	62,88±4,90	54,80±2,27	59,35±4,77	38,74±4,08	36,91±5,42	11,42±1,01	0,0
	% Kalan Aktivite							
İnk.Süresi (Sa.)	278 K	283 K	298 K	303 K	308 K	313 K	323 K	333 K
1	97,0	97,1	100	86,4	93,6	72,7	56,1	31,9
3	93,7	93,6	80,2	84,9	83,7	84,8	44,7	0,0
7	90,45	100	78,4	77,9	57,0	52,1	15,5	0,0
15	95,91	87,5	76,2	82,3	53,9	51,3	15,9	0,0

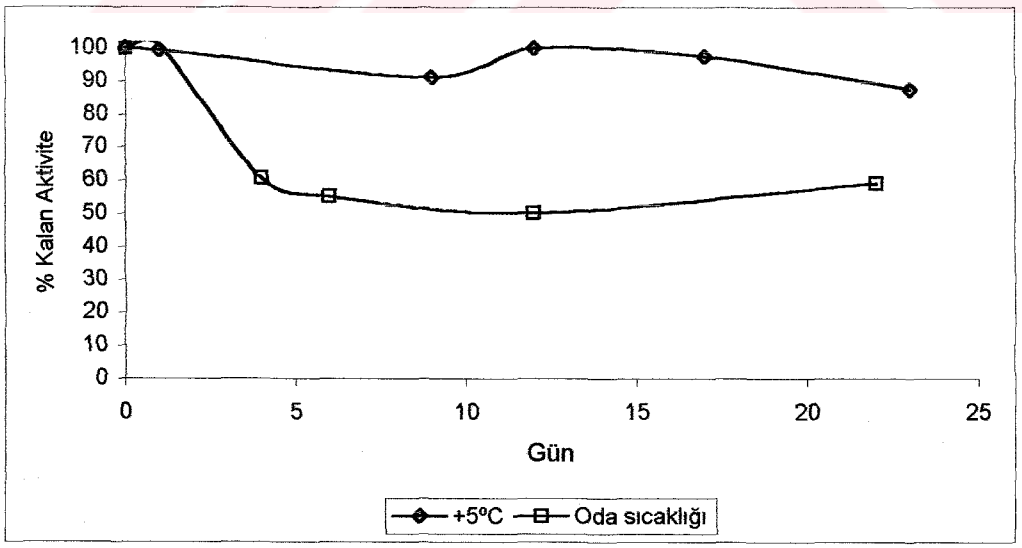


Şekil 4.44. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Termal Kararlılık Grafiği

Ara kol üzerinden immobilize edilen katalaz enziminin depolama kararlılığını belirlemek amacıyla immobilize enzim oda sıcaklığında ve 5 °C'de saklanarak belirli zaman aralıklarında aktivitesi ölçülmüş, elde edilen bulgular Çizelge 4.34.'de verilmiş, Şekil 4.45.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.34. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Katalaz Enziminin Depolama Kararalılığı İle İlgili Bulgular

Gün	Oda sıcaklığında saklanan enzim			Gün	+5 °C'de saklanan enzim		
	V (μmol H_2O_2/mg prot.dk.)	V (μmol H_2O_2/g des.dk.)	% Kalan Aktivite		V (μmol H_2O_2/mg prot.dk.)	V (μmol H_2O_2/g des.dk.)	% Kalan Aktivite
0.	124,18±8,26	1165,91±77,60	100	0.	78,93±10,83	877,27±120,36	100
1.	125,71±10,84	1180,31±101,80	101	1.	78,55±3,95	873,00±43,90	99,5
4.	75,31±4,24	701,52±41,38	60,6	9.	71,9±5,3	799,09±58,56	91,1
6.	68,45±7,66	642,69±71,92	55,12	12.	79,87±10,74	887,67±119,38	100
12.	62,29±10,72	586,85±100,67	50,16	17.	76,89±3,77	854,55±41,88	97,4
22.	73,27±10,40	695,08±87,08	59,0	23.	68,96±2,65	765,12±32,14	87,4

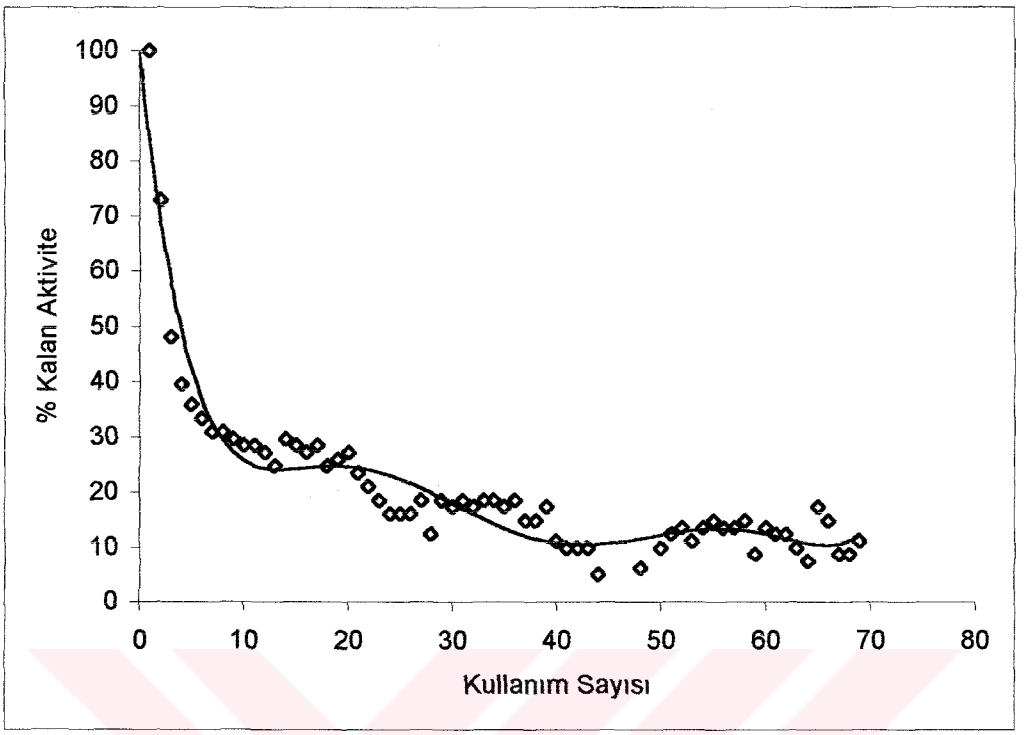


Şekil 4.45. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Depolama Kararlılığı Grafiği

Ara kol üzerinden immobilize edilen katalaz enziminin tekrar kulanım sayısına bağlı olarak aktivite değişimi Çizelge 4.35.'de verilmiş Şekil 4.46.'da şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.35. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilen Katalaz Enziminin Tekrar Kulanım Sayısına Bağlı Olarak Aktivite Değişimi

Kullanım sayısı	% Aktivite	Kullanım sayısı	% Aktivite	Kullanım sayısı	% Aktivite	Kullanım sayısı	% Aktivite
1	100,0	17	28,4	33	18,5	54	13,6
2	72,8	18	24,7	34	18,5	55	14,8
3	48,2	19	25,9	35	17,3	56	13,6
4	39,5	20	27,2	36	18,5	57	13,6
5	35,8	21	23,5	37	14,8	58	14,8
6	33,3	22	21,0	38	14,8	59	8,6
7	30,9	23	18,5	39	17,3	60	13,6
8	30,9	24	16,1	40	11,1	61	12,3
9	29,6	25	16,1	41	9,9	62	12,3
10	28,4	26	16,1	42	9,9	63	9,9
11	28,4	27	18,5	43	9,9	64	7,4
12	27,2	28	12,4	48	6,2	65	17,3
13	24,7	29	18,5	50	9,9	66	14,8
14	29,6	30	17,3	51	12,3	67	8,6
15	28,4	31	18,5	52	13,6	68	8,6
16	27,2	32	17,3	53	11,1	69	11,1



Şekil 4.46. Ara Kol Üzerinden İmmobilize Edilmiş Enzimin Tekrar Kullanım Sayısına Bağlı Aktivite Değişimi Grafiği

4.2.Tartışma

Serbest enzim ile ilgili yapılan çalışmalarda serbest enzim için optimum pH 7,0-8.0, tampon derişimi 50 mM, optimum sıcaklık 25 °C, Km 13,3 mM, Vmax 136889 µmol H_2O_2/mg prot. dk., aktivasyon enerjisi 14,38 kJ/mol, denatüre olmaya başladığı sıcaklık 31,3 °C, geri dönüşüm sayısı $1,36x10^5$ s^{-1} olarak belirlendi. Bo, J. Ve Zhang, Y. (1993), Kohjiya, S. Ve ark. (1991) serbest enzim için optimum pH'ı 7,0 olarak bildirmiş olup bu veriler bizim sonuçlarımızla uyum içindedir. Katalaz enzim için optimum sıcaklığı Akgöl, S. ve ark.(2001) 40 °C, Tarhan, L. (1995) 30-37 °C olarak belirlerken, Silva, M.A.D., ve ark(1991) optimum sıcaklığı bizim çalışmamızda olduğu gibi 25 °C olarak belirlemişlerdir. Çetinus, A.Ş., ve Öztop, N.H.(1999) katalaz enziminin Km değerini 25,16 mM Vmax değerini 24042 µmol H_2O_2/mg prot. dk olarak belirlemişlerdir. Km ve Vmax değerleri bu çalışma sonuçları ile kıyasladığında bizim serbest enzim için bulmuş olduğumuz Km değeri % 53 daha düşük, Vmax değeri ise %570 daha yüksektir.

Glutaraldehit üzerinden yapılan immobilizasyon çalışmalarında glutaraldehit derişiminin(% 0,625, 1,25, 2,5), katalaz derişiminin (0,42, 0,83, 3,33, 5,00, 8,32, 16,65, 33,30, 50,00 mg/mL) ve immobilizasyon süresinin (2, 24, 48, 72 sa.) desteğe bağlanan enzim miktarına ve immobilize enzimin aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. (Çizelge 4.12, 4.13,4.16, 4.17, 4.18,). Enzim immobilizasyonunda kullanılan enzim derişimi arttıkça desteğe tutuklanan katalaz miktarı artmış, enzimin tutuklanma yüzdesi 8,33 mg/mL enzim derişimine kadar artış gösterirken, daha yüksek derişimlerde azalmaya başlamıştır.Bulgularımıza göre spesifik aktivite ve 1 g destek için hesaplanan aktivite incelendiğinde en uygun enzim derişimi 3,33 mg/mL, glutaraldehit derişimi % 2,5 ve immobilizasyon süresi 2 sa. olarak belirlenmiştir. % 2,5 glutaraldehit ile hazırlanan destek ile 3.33 mg/mL enzim derişiminde 2 sa. immobilizasyon yapıldığında enzim proteininin bağlanma yüzdesi % 92,1, tutuklanan enzim miktarı 12,27 mg prot./g des. enzimin spesifik aktivitesi 61,5±8,1 μmol H_2O_2/mg prot.dak ve aktivitesi 866,67±113,6 μmol H_2O_2 /g des.dak olarak belirlenmiştir.

Akgöl, S. ve ark. (2001) yapmış oldukları çalışmada farklı derişimlerdeki (0,5 1,0 2,0 ve 4,0 mg/mL) katalazı L-Histidin bağlı poli(2-hidroksietilmetakrilat) membrana adsorbe etmişlerdir. İmmobilizasyonda, kullanılan enzim derişimi arttıkça desteğe adsorplanan katalaz miktarının arttığını, membranın birim alanına(cm^2) düşen aktivitenin arttığını fakat spesifik aktivitenin azaldığını bildirmişlerdir. Bu veriler bizim sonuçlarımızla uyum içindedir.

Çetinus, Ş.A. ve Öztop, H.N. (2000) yapmış oldukları çalışmada katalazı chitosan'a immobilize etmişlerdir. Farklı glutaraldehit derişimlerinde (% 0-0,05) çalışarak bağlanan enzim miktarını ve aktivitesini inceleyerek immobilizasyon için en uygun glutaraldehit derişimini % 0,02 olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmalarımız sonucunda en uygun glutaraldehit derişimi % 2,5 olarak belirlenmiştir. Aktiviteyi spesifik aktivite olarak ifade ederek, glutaraldehit derişimi arttıkça spesifik aktivitenin arttığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da glutaraldehit derişimi arttığında spesifik aktivitenin arttığı gözlemlenmiştir

Costa, S.A. ve Ark. (2001), Bacillus sp.'den saflaştırılan katalaz enzimini glutaraldehit kullanılarak alumina üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir.

Farklı sürelerde (24, 48, 72 sa.) immobilizasyon yaparak enzimin desteğe en etkin Şekilde 48 sa. immobilizasyon sonucunda bağlandığını bildirmişlerdir. Oysa ki bizim çalışmalarımız sonucunda en uygun immobilizasyon süresinin 2 sa. olduğu bulunmuştur. Farklı enzim derişimlerinde (0-10,0 mg/mL) yaptıkları immobilizasyon işlemleri sonucunda desteğin 10 mg/mL enzim varlığında doygunluğa ulaştığını, immobilizasyon işlemi için en uygun derişimini 9,5 mg/mL olduğunu bildirmişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada enzim derişimi arttırıldıkça desteğe bağlanan enzim miktarı artmakta ancak bağlanan enzimin yüzdesi 8,33 mg/mL enzim derişimine kadar artmakta bu derişimin üstündeki derişimlerde azalmaktadır(Çizelge 4.9, 4.10, 4.14, 4.15, 4.18, 4.19).

Glutaraldehit üzerinden yapılan immobilizasyon işlemleri sonucunda optimum pH 6,5, optimum tampon derişimi 50 mM, optimum sıcaklık 35 °C, denatüre olmaya başladığı sıcaklık 39,5 °C, aktivasyon enerjisi 14,83 kJ/mol , Km 250,0 mM, Vmax 1250,0 μmol H_2O_2/mg prot. dk.(17241,4 μmol H_2O_2/g des. dk) ve geri dönüşüm sayısı $1,25x10^3$ s^{-1} olarak bulunmuştur. Ara kol üzerinden yapılan immobilizasyon çalışmalarında glutaraldehit üzerinden yapılan immobilizasyonda belirlenen en uygun glutaraldehit derişimi(% 2,5), enzim derişimi (3,33 mg/mL) ve immobilizasyon süresi (2 sa.) esas alınmıştır. Ara kol üzerinden bağlanan enzim için optimum pH 6,5-8,0 , optimum tampon derişimi 50 mM, optimum sıcaklık 25 °C, denatüre olmaya başladığı sıcaklık 29 °C, aktivasyon enerjisi 9,41 kJ/mol, Km 297,7 mM, Vmax 1803,1 μmol H_2O_2/mg prot. dk (19876,8 μmol H_2O_2/g des. dk) ve geri dönüşüm sayısı $1,8x10^3$ s^{-1} olarak bulunmuştur. Glutaraldehit üzerinden immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı serbest enzimin optimum sıcaklığından 10 °C daha fazla olup, ara kol üzerinden immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı serbest enzim ile aynı bulunmuştur. Glutaraldehit üzerinden immobilize edilen enzimin optimum pH'ı hafif asidik bölgeye kaymış olup ara kol üzerinden immobilize enzimin optimum pH'ı serbest enzimin maksimum aktivite gösterdiği bölgede yer almaktadır. Bu bulgularımız immobilizasyonda ara kolun kullanılması ile immobilize enzimin mikro çevresinin serbest enzimin mikro çevresine benzer bir ortamda olduğunu gösterir.

Bo, J. Ve Zhang, Y. (1993) katalazı poliakrilamid (G1), poli(sodyummetakrilat) (G2), poli (akrilamid-co-sodyumakrilat)(G3)'te N,N'metilenbisakrilamidin çapraz bağlandığı jelde tutuklamışlardır. Serbest enzim, G1 ve G2 de tutuklanan enzimlerin optimum pH'sının 7,0 olduğunu poli (akrilamid-co-sodyumakrilat)(G3)'te tutuklanan enzimin optimum pH'sının 4,6-7,4 oduğunu belirlemişlerdir. İmmobilizsyondan sonra optimum pH asidik bölgeye kaymıştır Bizim yapmış olduğumuz immobilizasyon çalışmasında glutaraldehit üzerinden immobilize edilen enzimin optimum pH'sı asidik bölgeye hafif bir kayma göstermekle birlikte pH 4,5 da ölçülen aktivite pH 6,5'da ölçülen aktivitenin ancak % 42,7'si kadardır.

Kohjiya, S. Ve ark. (1991) katalazı, poli(sodyum 2-akrilamid-2-metil-1-propansülfonat) ve poli(2-(trimetilamonyumetil)metakrilat klorür) den oluşan poliiyon komplekse immobilize etmişlerdir. İmmobilize katalazın kararlılığı ve aktivitesini poliiyon kompleksinin oluşumu sırasında ortama inert bileşikler olarak, albumin, histon, ve lesitin katarak arttırmışlardır. Serbest enzimin optimum pH'sını 7,0 olarak, albumin varlığında immobilize edilen katalazın optimum pH'sının bazik bölgeye kaydığını, histon ve lesitin varlığında asidik bölgeye kaydığını bildirmişlerdir. Albumin asidik bir protein olmasından dolayı iç bölgelerde poliiyon kompleksini nötürleştirdiği için enzimin optimum pH'sının asidik bölgeye kaydığını bildirmişlerdir.

Akgöl, S. ve Dinçkaya, E (1999) hidrojen peroksit miktarını belirlemek amacıyla katalazı jelatin ve glutaraldehit kullanarak teflon membrana immobilize ederek bir biyosensör geliştirmişlerdir. Tampon derişiminin immobilize enzimin aktivitesine etkisini incelediklerinde en uygun tampon derişimini 50 mM olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmalrımız sonucunda da serbest ve immobilize enzimler için en uygun tampon derişimi 50 mM olarak bulunmuştur.

Silva, M.A.D. ve ark.(1991) katalazı poli(etilen)-g-co-akrilik asit ve poli(tetrafloretilen)-g-co- akrilik asite bağlamışlar ve bir biyosensör geliştirmişlerdir. Serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 25 °C olarak bilidirmişlerdir. Bizim çalışmamızda serbest ve ara kol üzerinden immobilize edilmiş

enzimlerin optimum sıcaklığı 25 °C, glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş enzimin 35 °C olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize enzimlerin Km değerleri kıyaslandığında glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş enzimin Km değeri serbest enzimin Km değerinden 18,8 kat , ara kol üzerinden immobilize edilmiş enzimin ise 22,4 kat artmıştır. Legaz E.M. ve ark.(1998), sığır karaciğer katalazı bioskin adlı doğal polimere adsorpsiyon ile immobilize etmişler, serbest katalazın Km'sini 0,53 mM immobilize enzimin Km'sini 13,7 mM olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada immobilizasyon sonrası enzimin Km değeri 25,8 kat artarken, bizim çalışmamızda glutaraldehit üzerinden bağlanmış enzimin Km'si18,8 ve glutaraldehit+3-aminopropiyonik asit üzerinden bağlanmış enzimin Km'si 22,4 kat artmıştır.

Chaterjee, U. ve Ark. (1990) keçi karaciğer katalazını, aluminyumoksit, jelatin, poliamid ve tavuk yumurtası kabuğuna tutuklanmışlardır. Serbest katalazın Km'si 110 mM, Al_2O_3'e immobilize edilmiş katalazın Km'si 200 mM, jelatine immobilize edilmiş enzimin Km'si 140 mM ve yumurta kabuğuna immobilize edilmiş enzimin Km'si 200 mM olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçlardan görüldüğü gibi genel olarak immobilizasyon işleminden sonra enzimin Km'si artmaktadır.

Çetinus, A.Ş. ve Öztop, N.H. (1999) katalazı chitosan filme immobilize ettiklerinde enzimin aktivite kaybı % 95,7 dir. Arıca, Y.M. ve ark. (1997) katalaz enzimini Fe(III) varlığında ve yokluğunda Cibacron Blue F3GA'nın bağlandığı poli(2-hidroksietilmetakrilat) membrana immobilize etmişlerdir. Serbest katalaz için Km 16,5 mM, Vmax $236x10^3$ U/mg , poli(HEMA)-CB-CAT için Km 22,4mM Vmax $176x10^3$ U/mg ve poli(HEMA)-CB-Fe(III)-CAT için Km 19,3 mM Vmax $214x10^3$ U/mg olarak bulmuşlardır. Katalazın immobilizasyondan sonra Km değerleri 1,4 ve 1,17 kat artmış Vmax değeri ise % 25,4 ve % 9,3 oranında azalmıştır. Silva, M.A.D. ve ark.(1991) katalazı poli(etilen)-g-co-akrilik asit ve poli(tetrafloretilen)-g-co-akrilik asite bağlamışlar ve bir biyosensör geliştirmişlerdir. Serbest enzimin Km'sini 23 mM, immobilize enzimin Km'sini 14,5 mM , serbest enzimin Vmax değerini 1250 U/mg enzim, immobilize enzimin Vmax değerini ise 143 U/mg enzim olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada immobilizasyon sonunda enzimin Km değeri 1,6 kat azalırken Vmax değeri % 88,6 oranında azalmıştır. Bu çalışma sonuçları bizim

sonuçlarımızla kıyaslandığında, enzimin immobilizasyondan sonra aktivitesi çok fazla azalmış Km değeride ise artmıştır.

Serbest ve immobilize enzimlerin termal kararlılığı sıcaklık ve bekletme süresi arttıkça azalmıştır. Serbest enzim 278 K'de 15 sa. bekletildiğinde aktivitesinin % 95'ni koruruken 333 K'de 1, 3 ve 7 sa. sonunda sırasıyla aktivitelerinin % 26,0, 18,8 8,8'ni korumuş 15 sa. sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği gözlenmiştir. Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş enzim 278 K'de 15 sa. sonunda aktivitesinin % 95'ni korurken 333 K'de 1 sa. sonunda aktivitesinin %16,1'ni korurken 3, 7 ve 15 sa. sonunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Ara kol üzerinden immobilize edilen enzim 278 K'de 15 sa. bekletildiğinde aktivitesinin % 95,9'nu korurken 333 K'de 1 sa. sonunda aktivitesini % 16,1' i kalmış, 3,7 ve 15 sa. sonunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir(Çizelge 4.7, 4.25 ve 4.33.).

Çetinus, A.Ş. ve Öztop, N.H. (1999) yaptıkları çalışmada katalazı chitosan filme immobilize etmişlerdir. Serbest enzim 40 °C'de 2 sa. bekletildiğinde aktivitesinin % 50'sini koruruken 5 sa. sonunda % 35'ni koruduğunu, immobilize enzimin ise aynı sıcaklıkta 2 sa. sonunda aktivitesinin % 70'ni 5 sa. sonunda % 60'nı koruduğunu, immobilize enzimin termal kararlılığının serbest enzimden daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada 40 °C de serbest enzim 3 ve 7 sa. bekletildiğinde aktivitesinin sırasıyla % 72,2 ve % 65,5'ni koruduğu gözlenmiştir. Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş enzim 40 °C'de 3 ve 7 sa. bekletildiğinde aktivitesinin sırasıyla % 63,8 ve % 23,4'ni korumuş olduğu, ara kol üzerinden immobilize edilmiş enzimin ise sırasıyla % 84,8 ve % 52,1'ni korumuş olduğu belirlenmiştir.

Kohjiya, S. Ve ark. (1991) katalazı, poli(sodyum 2-akrilamid-2-metil-1-propansülfonat) ve poli(2-(trimetilamonyumetil)metakrilat klorür) den oluşan poliiyon komplekse immobilize etmişlerdir. İmmobilize katalazın serbest katalazdan termal kararlılığının daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize katalazın kararlılığı ve aktivitesini poliiyon kompleksinin oluşumu sırasında ortama inert bileşikler olarak, albumin, histon, ve lesitin katarak arttırmışlardır. Serbest katalaz 50 °C'ye kadar ısıtılıdığında aktivitesinin kaybolduğunu, immobilize enzimin ise

aktivitesini devam ettirdiğini, histon veya albumin varlığında 70 °C'de dahi aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada serbest enzim 50 °C'de 15 sa. bekletildiğide dahi aktivitesinin % 21,6'nı koruduğu gözlenmiştir. İmmobilize enzimler ise 60 °C'de 1 sa. bekletildiğinde aktivitelerinin büyük bir çoğunluğunu kaybetmişler 1 sa.in üstündeki bekleme süreleri sonunda ise hiç aktivite göstermemişlerdir.

İmmobilize enzimlerin ve serbest enzimin depolama kararlılığını incelendiğimizde serbest enzimin pH 7,5 50 mM fosfat tamponundaki çözeltisi oda sıcaklığında ve 5 °C'de saklanmış, 11 gün sonra her iki sıcaklıkta bekletilen enzimlerin aktivitelerini tamamen kaybettiği görülmüştür. Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş katalaz enzimi orijinal hali ile herhangi bir tampon kullanmaksızın oda sıcaklığında saklandığında 105. günde başlangıç aktivitesinin % 9'nu göstermiş, 5 °C'de saklandığında ise % 37,5'ni göstermiştir. Ara kol üzerinden immobilize edilen katalaz enzimi orijinal hali ile herhangi bir tampon kullanmaksızın oda sıcaklığında saklandığında saklanan enzim 23. günde başlangıç aktivitesinin % 59'nu göstermiş, 5 °C'de saklanan enzim ise 22. günde % 87,4'nü göstermiştir. Bu verilere göre serbest enzim oda sıcaklığında ve 5 °C'de saklandığında aktivitesini hızla kaybetmektedir. İmmobilize enzimlerin serbest enzime kıyasla aktivitelerini daha uzun süre koruduğu ve depolama kararlılıklarının 5 °C'de daha fazla olduğu bulunmuştur. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği incelendiğinde glutaraldehit üzerinden immobilize edilen enzimin kullanım sayısı 150-180 aralığında olmasına rağmen başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 30-20'sini göstermektedir. Bu da bize immobilize enzimin birçok kez tekrar kullanılabileceğini göstermektedir. Ara kol üzerinden immobilize edilen enzimin tekrar kullanıma bağlı aktivite değişimi incelendiğinde ilk kullanımlarda aktivitesi hızla azalmış olup 40-69 kez kullanım aralığında enzimin kalan akvitesinin yaklaşık % 10 olduğu gözlenmiştir. Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş enzim tekrar kullanım açısında ara kol üzerinden immobilize edilen enzime göre daha verimlidir.

Çetinus, Ş.A. ve Öztop, H.N (1999) katalaz enzimini Sefadeks G-100 üzerine adsorbe ederek immobilize etmişlerdir. 5 °C'de saklanan serbest enzim 18 gün sonunda aktivitesinin % 50'sini koruduğunu belirlemişler, oysa bizim çalışmamızda

11 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği gözlenmiştir. Oda sıcaklığında saklanan enzim 8 gün sonunda aktivtesinin % 50'sini koruduğunu belirlemişler, bizim çalışmamızda ise 7 gün sonunda aktvitesinin % 11'nin korunduğu gözlemlenmiştir.5 °C'de saklanan immobilize enzimin 26 gün sonunda aktivtesinin % 50'sini korumuş, oda sıcaklığında saklanan ise 20 gün sonunda aktivitesinin % 50'sini koruduğunu bildirmişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada glutaraldehit üzerinden bağlanan enzim 5 °C'de 27 gün saklandığında aktivitesinin % 77,4'nü koruduğu, oda sıcaklığında 27 gün saklandığında aktivitesinin % 29,7 koruduğu belirlenmiştir. Ara kol üzerinden immobilize edilen enzim 5 °C'de 23 gün saklandığında aktivitesinin % 87,4'nü, oda sıcaklığında 22 gün saklandığında aktivitesinin % 59,0'nı koruduğu belirlenmiştir. Depolama sıcaklığı arttıkça immobilize enzimlerin aynı süre için korudukları aktiviteler azalmaktadır. Bu nedenle depolama da düşük sıcaklıklar tercih edilmelidir.

Akgöl, S. ve ark.(2001) katalazı L-Histidin bağlı poli(2-hidroksietilmetakrilat) membrana adsorbe ederek immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin 10 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 58'ni kaybettiğini 16 kullanımdan sonra ise % 36'nı koruyabildiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda glutaraldehit üzerineden immobilize edilmiş katalaz enzimi 10 kullanım sonunda aktivitesinin % 81,3'nü 16 kullanım sonunda aktivitesinin % 84,4'sini korumuştur. Ara kol üzerinden immobilize edilen enzim 10 kullanım sonunda aktivitesinin % 28,39'ni korumuş 16 kullanım sonunda ise aktivitesinin % 27,16'nı korumuştur. Bu sonuçlara göre glutaraldehit üzerinden immobilize edile enzim tekrar kullanım açısından oldukça iyidir.

Akgöl, S. ve Dinçkaya, E (1999) hidrojen peroksit miktarını belirlemek amacıyla katalazı immobilize ederek bir biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensörün saklama kararlılığını incelemek için biyosensörü 4 °C'de 3 ay boyunca saklamış ve süre içinde sadece 5 kez ölçüm yapmışlardır. Bunun sonucunda enzim elektrodun aktivitesinin %90'nın kaldığını bildirmişlerdir.Enzim elektrodun kullanım kararlılığını belirlemek için 3 ay boyunca her gün 5 ölçüm yapmışlar ve bunun sonucunda enzim elektrodun 400'den fazla kullanım için uygun olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği

incelendiğinde glutaraldehit üzerinden immobilize edilen enzimin kullanım sayısı 150-180 aralığında olmasına rağmen başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 30-20'sini gösterdiği, ara kol üzerinden immobilize edilen enzimin ilk kullanımlarda aktivitesinin hızla düştüğü ve 40-69 kez kullanım aralığında kalan aktivitesinin yaklaşık % 10 olduğu saptanmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1.Sonuçlar

Yapılan çalışmalar doğrultusunda aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur:

1) Serbest katalaz enzimi için optimum pH 7,5 , optimum tampon derişimi 50 mM, optimum sıcaklık 25 °C, aktivasyon enerjisi 14,377 kJ/mol, denature olmaya başladığı sıcaklık 31,3 °C, Vmax 136889 μmolH_2O_2/mg. prot.dk. , Km 13,3 mM, geri dönüşüm sayısı $1,37x10^5$ s^{-1} olarak bulunmuştur.
2) Glutaraldehit üzerinden immobilize edilmiş katalaz enzimi için optimum pH 6,5, optimum tampon derişimi 50 mM, optimum sıcaklık 35 °C, denature olmaya başladığı sıcaklık 39,5 °C, aktivasyon enerjisi 14,83kj/mol, Vmax 1250,0 μmol H_2O_2/ mg pro.dk.(17241,4 μmol H_2O_2 /g des.dk), Km 250,0 mM H_2O_2, geri dönüşüm sayısı $1,25x10^3$ s^{-1} olarak belirlenmiştir.
3) Ara kol olan 3-aminopropiyonik asit üzerinden immobilize edilen katalaz enzimi için en uygun bağlanma pH'sı 5,5, optimum pH 7,5 , optimum tampon derişimi 50 mM, optimum sıcaklık 25 °C, aktivasyon enerjisi 9,41 kj/mol, Vmax 1803,1μmol H_2O_2/mg prot.dk (19876,8 μmol H_2O_2 /g des.dk), Km 297,9 mM, geri dönüşüm sayısı $1,8x10^3$ s^{-1} olarak belirlenmiştir.
4) Glutaraldehit üzerinden immobilizasyon çalışmalarında en uygun glutaraldehit derişimi % 2,5, enzim derişimi 3,33 mg/mL ve immobilizasyon süresi 2 sa. olarak belirlenmiştir.
5) Serbest ve immobilize enzimlerin termal kararlılığı sıcaklık ve bekletme süresi arttıkça azalmıştır.
6) İmmobilize enzimler tekrar kullanım açısından incelendiğinde, glutaraldehit üzerinden immobilize enzimin kullanım sayısına bağlı olarak aktivitesini ara kol üzerinden immobilize edilmiş enzime göre daha fazla koruduğu belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

1) İmmobilize enzimlerin depolama sıcaklığı için 5 °C'den daha düşük sıcaklıklarda çalışmalar yapılabilir.
2) Enzimlerin depolama kararlılığını artırmak amacıyla enzimler, sorbik asit, SO_2, 4-hidroksi benzenin metil, etil, propil esterleri , sukroz, ficoll gibi maddelerle birlikte saklanabilinir. Farklı derişimlerdeki gliserolde süspansiyonu hazırlanarak saklanabilinir.
3) Ara kol olarak kullanmış olduğumuz 3-aminopropiyonik asit yerine başka ara kollar kullanılarak immobilizasyon çalışmaları yapılabilinir ve kinetik parametreler incelenebilinir.
4) Ara kol kullanarak yapılan immobilizasyon çalışmalarında glutaraldehit derişiminin, enzim derişiminin ve immobilizasyon süresinin etkileri incelenebilir.
5) Destek materyali olarak farklı partikül büyüklüğüne sahip florisil örnekleri immobilizasyon çalışmaları için kullanılabilinir.

KAYNAKLAR

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

ARICA, M.Y., DENİZLİ, A., SALİH, B., PİŞKİN, E., HASIRCI, V., 1997. Catalase Adsorption Onto Cibacron Blue F3GA and Fe(III)_Derivatized Poly(Hydroxyethyl Methacrylate) Membranes and Application to a Continuous System. Journal Of Membran Science,129: 65-76

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

BARROUG, A., LERNOUX, E., LEMAITRE, J., ROUXHET, G., 1998. Adsorption of Catalase on Hydroxyapatite. Journal of Colloid and Interface Science, 208:147-152

BELLBONO, I.R., SELLİ, E., POLİSSİ, A., MUFFATO, F., 1990. Immobilization of Biocatalysts by Photochemically Grafted Membranes: Some Studies with Catalase as Model System. Biotechnology and Bioengineering, 35:646-649

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

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

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

COSTA, S.A., TZANOV, T., CARNEİRO, F., GÜBİTZ, G.M., PAULU, A.C., 2002. Recycling of Textile Bleaching Effluents for Dyeing Using İmmobilized Catalase. Biotechnology Letters, 24:173-176

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

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

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

DAJUN, C., XIAQIN, W., ZUXIN, Z., 1993. Biosensor of Hydrogen Peroxide Using Triethyloxonium Fluoroborate as Alkylating Reagent Before Enzyme Immobilization. Sensor and Actuators B, 13-14:554-555

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

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

HOSSAİN, M., DO, D.D., 1988. Determination of Intrinsic Parameters for Immobilization Reaction of Catalase and Amylglucosidase in Porous Glass Supports. Biotechnology and Bioengineering, 35(13): 646-649

JANG, B., ZHANG, Y.,1993. Immobilization of Catalase on Crosslinked Polymeric Hydrogels-Effect of Anion on the Activity of Immobilized Enzyme. Eur. Polym. J. 29(9):1251-1254

JIANG, B., MING, X., 1992. Immobilization of Enzymes on Polymers Modified by Ultrasonic Irradiation. Eur. Polym. J. 28(7):827-830

KOHJIYA, S., MAEDA, K., YAMASHITA, S., 1991. Immobilization of Catalase By Polyion Complex. Journal of Applied Polymer Science, 43:2219-222

LARTİLLOT, S., KADZİORA, P., ATHİOS, A., 1988. Purification and Characterization of New Fungal Catalase. Preparative Biochemistry, 18(3):241-246

LEGAZ, M.E., SOLAS, M.T., FILHO, L.X., VICENTE, C., 1998. Quarternary Structure of Catalase Using a Bioskin-immobilized enzyme. Biotechnology Techniques, 12:481-484

LEGAZ, M.E., SOLAS, M.T., FİLHO, L.X., VİCENTE, C., 1998. Quarternery Structure Of Catalase Using A Bioskin-İmmobilized Enzyme. Biotechnology Techniques, 12(6):481-484,

LENİNGER,A. L., NELSON, D.L., COX, M.M., 1993. Principles of Biochemistry 2nd Edit. Worth Publishers, New york

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

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

MAHLER, H.R., and CORDES, E.H., 1971. Biological Chemistry. Department of Chemistry Indiana University, Second Edition, 419s.

MENTEŞ, G., ERSÖZ, B., 1993. Harpers's Biochemistry , 22.edition Appleton&Lange Çevirisi, s.142

METELITSA, D.I., PLYUGACHEV, A., ARTAMONOV, V.A., BORON, G.M. 1991. Catalytic Activity of Catalase Adsorbed on MIFIL Polyamid Membranes. Kinetics and Catalysis, 31(6):1233-1239

NAKA, K., IWAKİ, K., KITANO, N., OHKI, A., MAEDA, S., 1996. Adsorption of Enzyme at Silica-Gel with Amphiphilic Block Copolymers. Polymer Journal., 28(10):911-915

SILVA, M.A.D., GIL, H., PIEDADE, A.P., REDINHA, J.S., BRETT, A.M.O., COSTA, J.M.C., 1991. Immobilization of Catalase on Membranes of Poly(ethylene)-g-co-Acrylic Acid and Poly(tetrafluoroethylene)-g-co-Acrylic

Acid and Their Application in Hydrogen Peroxide Electrochemical Sensor. Journal of Polymer Science:Part A: Polymer Chemistry, 29:269-274

SOLAS, M.T., VİCENTE, C., XAVİES, L., LEGAZ, M.E., 1994. Ionic Adsorption of Catalase on Bioskin:Kinetic and Ultrastructural Studies. J. Biotechnology, 33: 63-70

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

TARHAN, L., TELEFONCU, A., 1990. Characterization of immobilized Glucose Oxidase-Catalase and Their Deactivation in a Flued-Bed Reactor. Apl. Biochem. and Biotech., 45- 57

TARHAN, L., 1991. Some Kinetic Parameters and Inactivation of Catalase Immobilized on Modified Polyvinylalcohol. Applied Biochemistry and Biotechnology, 31:109-117

TELEFONCU, A., 1997. Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu , Kuşadası Aydın – TÜRKİYE, 446s.

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

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

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

WEBB, J.L., 1963. Enzyme and Metabolic Inhibitors.1.Band.Academic press,New York London, 49-191,

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

ÖZGEÇMİŞ

1978 de Adana'da doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi Adana'da tamamladım. 1995 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünde kimya eğitimime başladım.1999 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden bölüm ikincisi olarak mezun oldum.1999 yılında Kimya Bölümünde yüksek lisansa başladım ve 2000 yılında araştırma görevlisi kadrosuna atandım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmakta ve eğitimimi sürdürmekteyim

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ