

**POLİ(VİNİL ALKOL)–KALSİYUM ALJİNAT,
POLİ(N-İZOPROPİLAKRİLAMİT)-KALSİYUM ALJİNAT
KÜRELERİNE β -GALAKTOSİDAZ İMMOBİLİZASYONU**

Banu Lütfiye ÖCAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EYLÜL 2007
ANKARA**

Banu Lütfiye ÖCAL tarafından hazırlanan POLİ(VİNİL ALKOL) – KALSİYUM ALJİNAT, POLİ(N-İZOPROPİLAKRİLAMİT)-KALSİYUM ALJİNAT KÜRELERİNE  -GALAKTOSİDAZ İMMOBİLİZASYONU adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

.....

Bu alışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serpil AKSOY

Kimya Anabilim Dalı, Gazi  ni.

.....

Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

Kimya Anabilim Dalı, Gazi.  ni.

.....

Doç. Dr. Meral Karakışla şAHİN

Kimya Anabilim Dalı, Ankara  ni.

.....

Tarih: 14 / 09 / 2007

Bu tez ile G. . Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nermin ERTAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Banu Lütfiye ÖCAL

**POLİ(VİNİL ALKOL) - KALSİYUM ALJİNAT,
POLİ(N-İZOPROPİLAKRİLAMİT) - KALSİYUM ALJİNAT
KÜRELERİNE β -GALAKTOSİDAZ İMMOBİLİZASYONU**

(Yüksek Lisans Tezi)

Banu Lütfiye ÖCAL

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Eylül 2007**

ÖZET

Bu çalışmada, β -galaktosidaz enzimi (EC.3.2.1.23), poli(vinil alkol)-kalsiyum aljinat (CaAlj-PVA), poli(N-izopropilakrilamit)-kalsiyum aljinat (CaAlj-P(NIPA)) kürelerine hapsetme yöntemi ve karbodimit (CDI), N-hidroksisüksinimit (NHS), karbodimit ve N-hidroksisüksinimit (CDI-NHS) ile aktifleştirilerek kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edildi. Serbest enzim için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{mak}) değerleri sırası ile 0,343mM, 0,0259mM.dak⁻¹ olarak bulundu. Kovalent bağlanma ve hapsetme yöntemleriyle immobilize edilen enzimler için ise K_m değerleri 0,746 mM - 4,97mM arasında değişirken V_{mak} değerleri 0,0049mM.dak⁻¹ - 0,7997 mM.dak⁻¹ aralığında bulundu. Serbest enzim, kovalent bağlanma ve hapsetme yöntemleriyle immobilize edilen enzimler için optimum pH değerleri sırasıyla 5,0; 4,5; 5,0 olarak bulundu. Serbest enzim, kovalent bağlanma ve hapsetme yöntemleriyle immobilize edilen enzimler için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 30 °C, 35 °C, 35 °C olarak bulundu. 45 °C'de inaktivasyon sabitleri (k_i) serbest enzim için 0,0289 dak⁻¹ iken hapsetme yöntemiyle immobilize edilen enzimler için 0,0005dak⁻¹- 0,0135dak⁻¹ aralığında; kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimler için 0,0100dak⁻¹-0,0216dak⁻¹ aralığında bulundu. Serbest enzim 30 gün

sonunda aktifliğinin % 10' unu korurken hapsetme yöntemiyle immobilize edilen enzimler 70 gün sonunda aktifliğinin yaklaşık %45'ini; kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimler ise aktifliğinin yaklaşık %49'unu koruduğu görüldü. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanım sayıları 5 ve 10 arasında değişirken kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin ise tekrar kullanım sayıları 56- 60 arasında olduğu ve enzim aktifliklerini %20 - %62,5 aralığında koruduğu bulundu. Enzimin tekrar kullanım sayısı, depolama ve termal kararlılığı immobilizasyon işlemleri ile arttırıldı.

Bilim kodu	: 405.1.117
Anahtar Kelimeler	: β-Galaktosidaz, poli(vinil alkol), sodyum-aljinat, enzim immobilizasyon, hapsetme, N-izopropilakrilamit, kovalent bağlanma,
Sayfa Adedi	: 83
Tez Yöneticisi	: Yrd.Doç.Dr.Hayrettin TÜMTÜRK

**IMMOBILIZATION OF β -GALACTOSIDASE IN POLY(VINYL ALCOHOL)-
CALCIUM ALGINATE, POLY(N-ISOPROPYLACRYLAMIDE) - CALCIUM
ALGINATE
(M.Sc. Thesis)**

Banu Lütfiye ÖCAL

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
September 2007**

ABSTRACT

In this study, β -galactosidase (E.C 3.2.1.23) was immobilized using entrapment method in poly(vinyl alcohol)-calcium alginate (CaAlj-PVA), poly(N-isopropylacrylamide)-calcium alginate (CaAlj-P(NIPA)), beads and also covalently immobilized by activating the beads with carbodiimide (CDI), N-hydroxysuccinimide (NHS), carbodiimide and N-hydroxysuccinimide (CDI-NHS). Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum reaction rate (V_{max}) values were found as 0.343 mM and 0.0259 mM.min⁻¹, for free enzyme respectively. K_m and V_{max} values were changed between 0.746 mM – 4.97mM and 0.0049mM.min⁻¹–0.7997 mM.min⁻¹, for covalently bonded and entrapped enzymes respectively. Optimum pH was determined as 5.0, 4.5 and 5.0 and optimum temprature was determined as 30°C, 35°C, 35°C for free β -galactosidase, entrapment and covalently bonded enzymes respectively. At 45°C, inaktivation contstants were calculated as 0,0289 min⁻¹ for free enzyme, 0,0100 min⁻¹ - 0,0216 min⁻¹ for covalently bounded enzymes and 0,0005 min⁻¹ - 0,0135 min⁻¹ for entrapped enzymes. After 30 days of storage at 4 °C free β -galactosidase retained 10 % of its original activity. Also after 70 days of storage at 4 °C, entrapped and covalently bonded enzymes were retained 45 % and 49 % of their original activities, respectively. It was observed that 20 – 62.5 % of

original activity were preserved when entrapped β -galactosidase were used repeatedly 5 to 10 times while covalently bonded enzymes were 56 to 60 times. Reuseability, storage stability and thermal stability of free enzyme were increased by immobilization.

Science code	: 405.1.117
Key Words	: β -Galactosidase, poly (vinyl alcohol), calcium alginate, enzyme immobilization, entrapment, N-isopropylacrylamide, covalent bonding
of pages	: 83
Supervisor	: Assist.Prof.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, zorlukları aşabilmemiz için yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen sadece çalışmalarına değil, hayatıma ışık tutan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK 'e

Hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen ve çoğu zaman hayatımı kurtaran Uzman Ferat Şahin'e, bilgisiyle hep yanımda olan Gökhan Demirel'e; laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Nur TAN ve Hasibe Pınar GÜRSES'e

Çalışmalarım süresince yardımları ve neşeli sohbetleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Arş. Gör. Demet UZUN'a, Arş. Gör. Özlem GÜNGÖR'e, Ülkü ÜNAL 'a ve Eylem TURAN'a sonsuz teşekkür
İyi ki varsınız...

En büyük teşekkürüm, şükranım, minnetim; tüm dert ve sıkıntılarımın yanında mutlu anlarımda da yalnız bırakmayan, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak, bana olan güven ve inançlarını sonsuz hissettiren, varlıklarıyla her zaman güç veren, hayatımın anlamı, yaşam kaynağım çok kıymetli babam Dursun ÖCAL, annem Fatma ÖCAL, abim Fatih Bilge ÖCAL ve tabii ki canım kardeşim biricik sırdaşım Zeliha Özlem EREN'e.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xix
1. GİRİŞ	1
2. ENZİMLER VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU.....	2
2.1. Enzimler	2
2.1.1. Enzimlerin genel özellikleri	2
2.1.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması	3
2.1.3. Enzimlerin uygulama alanları.....	3
2.2. β -Galaktosidaz Enzimi ve Özellikleri	4
2.3. Enzimlerin İmmobilizasyonu.....	10
2.3.1. Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri	11
2.3.2. İmmobilize edilen enzimden beklenen özellikler	13
2.3.3. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması	14
2.3.4. Enzim immobilizasyon yönteminin seçimi	16
2.3.5. Enzim destek materyali.....	17
2.3.6. Sodyum aljinat	18

Sayfa

3. β -GALAKTOSİDAZIN İMMOBİLİZASYONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR	21
4. DENEYSEL KISIM	24
4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
4.2. Kullanılan Aletler.....	27
4.3. Kullanılan Çözeltiler.....	27
4.4. P-Nitrofenil- β -D-Galaktosid Kalibrasyon Grafiği	29
4.5. Enzim İmmobilizasyonu.....	30
4.5.1. Hapsetme yöntemiyle enzim immobilizasyonu	30
4.5.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle enzim immobilizasyonu	32
4.6. β -Galaktosidazın Aktivlik Tayini.....	37
4.6.1. Serbest β -galaktosidaz enziminin aktivlik tayini	37
4.6.2. Immobilize β -galaktosidaz enziminin aktivlik tayini	37
4.7. Enzim Aktivliğine pH Etkisi	38
4.7.1. Serbest β -galaktosidazın aktivliğine pH etkisi	38
4.7.2. Hapsetme ile immobilize edilen β -galaktosidazın aktivliğine pH etkisi	38
4.7.3. Kovalent bağlanarak immobilize edilen β -galaktosidazın aktivliğine pH etkisi	38
4.8. Enzim Aktivliğine Sıcaklığın Etkisi.....	38
4.8.1. Serbest β -galaktosidazın aktivliğine sıcaklığın etkisi	38
4.8.2. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktivliğine sıcaklığın etkisi	39
4.8.3. Kovalent bağlanarak immobilize edilen β -galaktosidazın aktivliğine sıcaklığın etkisi	39

Sayfa

4.9. Enzim Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi.....	39
4.9.1. Serbest β -galaktosidazın aktifliğine substrat değişiminin etkisi	39
4.9.2. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat değişiminin etkisi	39
4.9.3. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat değişiminin etkisi	40
4.10. Depolanma Kararlılığı.....	40
4.10.1. Serbest β -galaktosidaz enziminin depolanma kararlılığı.....	40
4.10.2. Hapsedilerek immobilize edilen β -galaktosidazın depolanma kararlılığı.....	40
4.10.3. Kovalent bağlanarak immobilize edilen β -galaktosidazın depolanma kararlılığı.....	40
4.11. Tekrar Kullanılabilirlik	41
4.11.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın tekrar kullanılabilirliği	41
4.11.2. Kovalent bağlanarak immobilize edilen β -galaktosidazın tekrar kullanılabilirliği	41
4.12. Termal İnaktivasyon	41
4.12.1. Serbest β -galaktosidaz enziminin termal inaktivasyonu	41
4.12.2. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın termal inaktivasyonu	41
4.12.3. Kovalent bağlanarak immobilize edilen β -galaktosidazın termal inaktivasyonu	42
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	43
5.1. Aktifliğe pH Etkisi	43
5.1.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisi	43

Sayfa

5.1.2. Kovalent bağlanarak immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisi	45
5.2. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi	47
5.2.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisi	48
5.2.2. Kovalent bağlanarak immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisi	51
5.3. Aktifliğe Substrat Değişiminin Etkisi	53
5.3.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat değişiminin etkisi.	54
5.3.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat değişiminin etkisi	57
5.4. Serbest ve İmmobilize β -Galaktosidazın Depolama Kararlılığı	59
5.4.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı	59
5.4.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı	62
5.5. Enzim Aktifliğinin Tekrar Kullanım ile Değişimi	64
5.5.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğinin tekrar kullanım ile değişimi	64
5.5.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğinin tekrar kullanım ile değişimi	67
5.6. Termal İnaktivasyon	70
5.6.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın termal inaktivasyonu	70
5.6.2. Kovalent bağlanarak immobilize edilen β -galaktosidazın termal inaktivasyonu	73

	Sayfa
6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	77
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	83

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Substrat spesifikliğı	8
Çizelge 2.2. β -galaktosidaz enziminin bulunduğu kaynaklar	8
Çizelge 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması	15
Çizelge 2.4. Enzim immobilizasyonun da kullanılan bazı destek materyalleri	17
Çizelge 4.1. Farklı bileşimlerde CaAlj-PVA kürelerinin hazırlanması	31
Çizelge 4.2. Farklı bileşimlerde CaAlj-P(NIPA) kürelerinin hazırlanması	32
Çizelge 5.1. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın kinetik parametreleri	55
Çizelge 5.2. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın kinetik parametreleri	56
Çizelge 5.3. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın kinetik parametreleri	58
Çizelge 5.4. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -Galaktosidazın kinetik parametreleri	59
Çizelge 5.5. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -Galaktosidazın tekrar kullanım sayıları ...	65
Çizelge 5.6. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -Galaktosidazın tekrar kullanım sayıları ...	66
Çizelge 5.7. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın tekrar kullanım sayıları	68
Çizelge 5.8. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin tekrar kullanım sayıları	69

Çizelge	Sayfa
Çizelge 5.10. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın 45°C deki inaktivasyon hız sabitleri	73
Çizelge 5.11. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın 45° C deki inaktivasyon hız sabitleri.....	75
Çizelge 5.12. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın 45° C deki inaktivasyon hız sabitleri.....	76

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. β -Galaktosidazın üç boyutlu yapısı	4
Şekil 2.2. β -Galaktosidaz enziminin üç boyutlu yapısında Na^+ ve Mg^{+2} iyonlarının gösterimi.....	5
Şekil 2.3. Nötral pH'da β -galaktosidaz enziminin bilinen mekanizması	6
Şekil 2.4. Endüstride β -galaktosidaz (laktazın) enziminin uygulanması	9
Şekil 2.5. Enzim immobilizasyonunda kullanılan immobilizasyon yöntemleri	13
Şekil 2.6. sodyum aljinat'ın kimyasal yapısı	19
Şekil 4.1. P-Nitrofenil β -D-galaktosid kalibrasyon grafiği.....	29
Şekil 4.2. Enzimlerin Ca-aljinat ile immobilizasyonu	30
Şekil 4.3. Polimerik desteğin karbodiimit ile aktifleştirilmesi ve polimerik desteğe enzim bağlanması	33
Şekil 4.4. Polimerik desteğin N-hidroksisüksinimit ile aktifleştirilmesi ve polimerik desteğe enzim bağlanması	34
Şekil 4.5. Polimerik desteğin karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit ile aktifleştirilmesi ve polimerik desteğe enzim bağlanması	36
Şekil 5.1. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi	43
Şekil 5.2. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β - galaktosidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi.....	44
Şekil 5.3. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi	46

Şekil	Sayfa
Şekil 5.4. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi	47
Şekil 5.5. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi	49
Şekil 5.6. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi	50
Şekil 5.7. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi	51
Şekil 5.8. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi	52
Şekil 5.9. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaza ait Linewear- Burk grafiği	55
Şekil 5.10. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaza ait Linewear- Burk grafiği	56
Şekil 5.11. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaza ait Linewear- Burk grafiği	57
Şekil 5.12. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaza ait Linewear- Burk grafiği	58
Şekil 5.13. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı	60
Şekil 5.14. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı	61
Şekil 5.15. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı	62

Şekil	Sayfa
Şekil 5.16. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı	63
Şekil 5.17. CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanımı	65
Şekil 5.18. CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanımı	66
Şekil 5.19. CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanımı	68
Şekil 5.20. CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanım sayıları	69
Şekil 5.21. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi	71
Şekil 5.22. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi	72
Şekil 5.23. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi	74
Şekil 5.24. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
β	Beta
ΔA	Absorbans değişimi
ΔC	Derişim değişimi
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre
K_m	Michaelis-Menten sabiti
UV	Ultraviyole
V_{mak}	Maksimum hız
V	Hız
Kısaltmalar	Açıklama
APS	Amonyum persülfat
BRT	Britton ve Robinson Tamponu
CaAlj	Kalsiyum aljinat
Ca-Alj-P(NIPA)	Kalsiyum aljinat - Poli(N-izopropilakrilamit)
Ca-Alj-PVA	Kalsiyum aljinat - Poli (vinil alkol)
CDI	Karbodiimit
Na-Alj	Sodyum aljinat
NHS	N-Hidroksi süksinimit
NIPA	N-izopropilakrilamit
P(NIPA)	Poli(N-izopropilakrilamit)
PVA	Poli (vinil alkol)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

1. GİRİŞ

Enzimler çok eski yıllardan beri ekmek, peynir, şarap gibi maddelerin yapımı yanı sıra ilaç gibi pek çok endüstri alanlarında da kullanılmaktadır. Enzimlerin izolasyonu, saflaştırılması ve yapılarının tayini ile ilgili yapılan çalışmalarla katalitik potansiyeli ve tabiatı daha iyi anlaşılmıştır.

Enzimlerin kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarda kullanılmaya başlanması bilim çevrelerini bu katalizörlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir. Bilindiği gibi enzimler suda çözünen spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin geri kazanımı ekonomik değildir. Buda enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti arttıran önemli bir etmendir. Diğer bir dezavantaj ise serbest enzimin reaksiyon ortamından istenildiği an uzaklaştırılamaması nedeniyle reaksiyon kontrolüde güçtür. Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümleyebilmek, enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için özellikle son otuz yılda enzim immobilizasyonu araştırmaları yoğunluk kazanmıştır.

2. ENZİMLER VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU

2.1. Enzimler

2.1.1. Enzimlerin genel özellikleri

Enzimler, canlı organizmada biyokimyasal olayların ılıman koşullarda gerçekleşmesini sağlayan, belirli kimyasal reaksiyonları hızlandıran protein yapısında bileşiklerdir.

Enzimlerin etkinlikleri kimyasal katalizörlerden $10^6 - 10^{16}$ kat daha fazladır. Enzimler sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindirler. Hatta aynı maddenin izomerlerinden sadece biriyle reaksiyon verebilen çok spesifik enzimlerde vardır. Bu seçicilik özelliklerinden dolayı, en basit hücrede bile aynı anda çok sayıda biyokimyasal reaksiyon meydana gelebilir.

Hücredeki reaksiyonlar yan ürün oluşturmazlar, reaksiyonlar %100 verimle sonuçlanır. Enzimatik reaksiyonlar fizyolojik pH'da, canlının vücut sıcaklığında ve az enerji ile gerçekleşir. Normal laboratuvar koşullarında yüksek sıcaklık ve fazla enerji gerektiren pek çok reaksiyon, enzimlerin kullanılmasıyla daha düşük sıcaklıkta ve daha düşük enerji ile gerçekleştirilebilir [1].

Enzimler spesifik oluşları ve çok düşük derişimlerde bile substrat reaksiyonlarını katalizlemelerinden dolayı sanayide önemli kullanım alanına sahiptirler.

2.1.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliğinin (IUB) düzenlemesine göre enzimler katalizlediği kimyasal reaksiyon tipine ve reaksiyon metabolizmasına dayanılarak adlandırma ve sınıflandırma yapılmaktadır.

IUB sisteminin özellikleri şunlardır:

- 1- Reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler 6 sınıfa bölünürler; bunların her birinin 4-13 alt sınıfı vardır.
- 2- Enzim adının iki kısmı vardır. İlki substrat veya substratların adıdır; “-az” ile sonlanan ikincisi katalize olunan reaksiyon tipini gösterir.
- 3- Söz konusu reaksiyonun doğasını aydınlatmak için eğer ek bilgi gerekli ise, parantez içinde verilebilir.
- 4- Her enzimin bir kod numarası (EC) vardır; bu numarada reaksiyon tipini 1. sayı, vericinin etkiledi grubu 2. sayı, alıcı olarak yararlanılan grubu 3. sayı ve adlandırılan enzimi 4. sayı belirlemektedir [2].

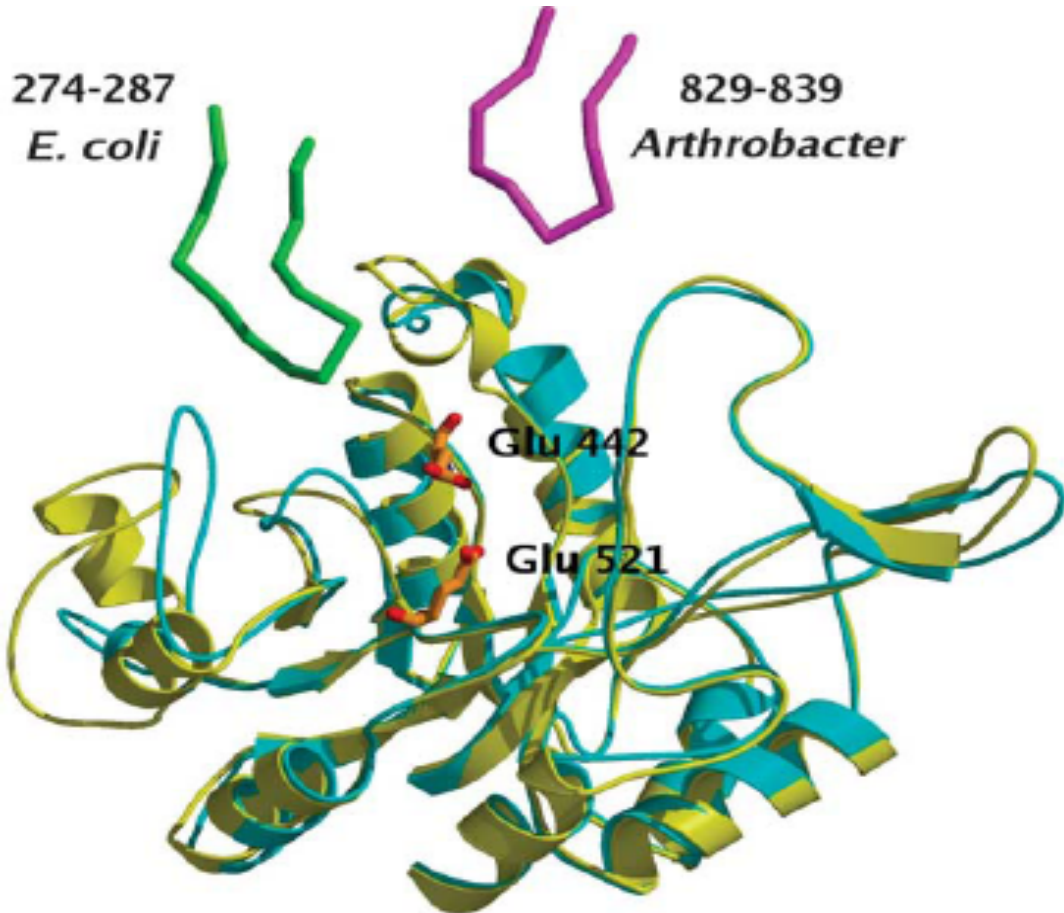
2.1.3. Enzimlerin uygulama alanları

Enzimlerin endüstriyel analitik ve tıbbi uygulamaları gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Enzimlerin katalitik potansiyelleri yalnız analitik amaçlar için değil aynı zamanda sentetik amaçlar ve modifikasyonlar için de değerlendirilmektedir. Bu çerçevede başta gıda sektörü olmak üzere, ilaç sanayi, kimya sanayi, deri ve tekstil sanayi gibi birçok sanayi dalında enzimler geniş uygulama alanları bulmuşlardır.

Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 30-35'i deterjan sanayinde, % 20-25'i nişasta ile ilgili alanlarda, % 20'si süt ve süt ürünleri sanayinde kullanılmaktadır. %1-5 arasında değişen oranlarda bira, meyve ve şarap, unlu mamuller, tekstil, kağıt, deri ve yem sanayinde kullanılmaktadırlar.

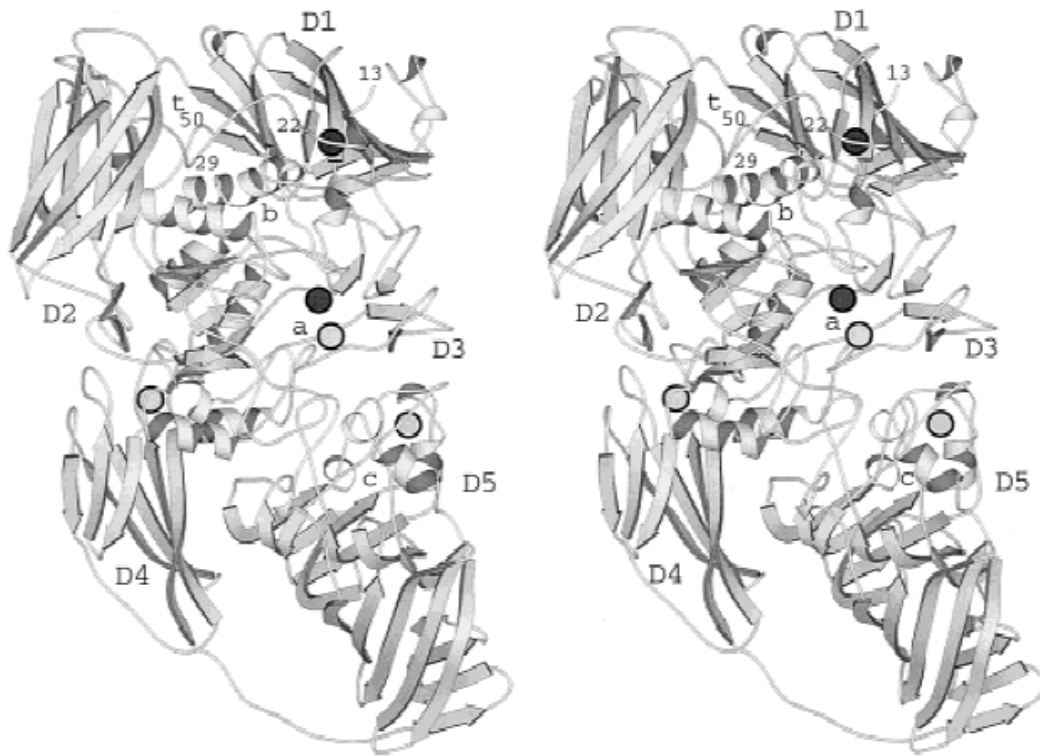
2.2. β -Galaktosidaz Enzimi ve Özellikleri

Günümüzde enzimlerin üç boyutlu yapıları, X-ışınları kristalografisi ile ayrıntılı bir şekilde görüntülenebilmektedir. β -galaktosidazın üç boyutlu yapısı Şekil 2.1' de gösterilmiştir. *Arthrobacter sp.*C2-2 β -galaktosidaz enzimi için sarı renk ile TIM alanları, kırmızı renk ile F zincirinin 829-839 kalıntıları gösterilmiştir. *E.coli* β -galaktosidaz enzimi için ise TIM alanları mavi ile D 274-287 zincirinin kalıntıları da yeşil ile gösterilmiştir. Glu 442 ve C221- β -Gal'ın Glu 521 katalitik kalıntıları ise kavun içi renk ile gösterilmiştir. İki farklı kaynaklardan elde edilen β -galaktosidaz enziminin TIM alanına yüklenmiştir. Her iki β -galaktosidazdaki farklı hekzamerik ve tetramerik oligomerizasyon, TIM alanına ve β -galaktosidazın aktif merkezine yakın olacak şekilde, komşu monomerlerin farklı bölümlerini meydana getirir [3].



Şekil 2.1. β -Galaktosidazın üç boyutlu yapısı

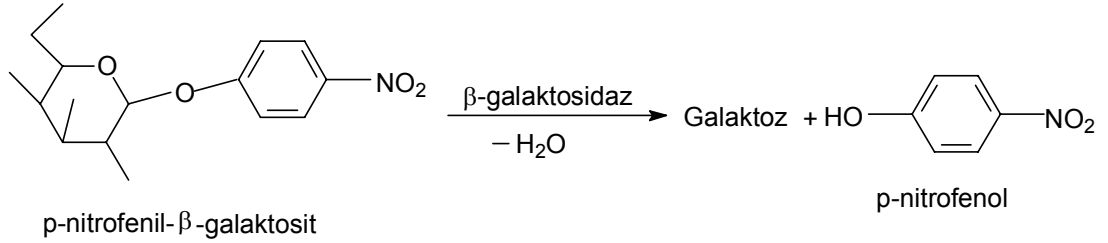
β -Galaktosidaz Na^+ ve Mg^{+2} iyonları içeren bir metalo enzimdir. Şekil 2.2 de β -galaktosidaz enziminin üç boyutlu yapısında Na^+ ve Mg^{+2} iyonları gösterilmiştir. Sodyum iyonları açık gri renkteki daire ile gösterilmiştir. Aktif merkezde tanımlanan magnezyum iyonu ise (a ile gösterilen) koyu renkteki daire ile gösterilmiştir [4].



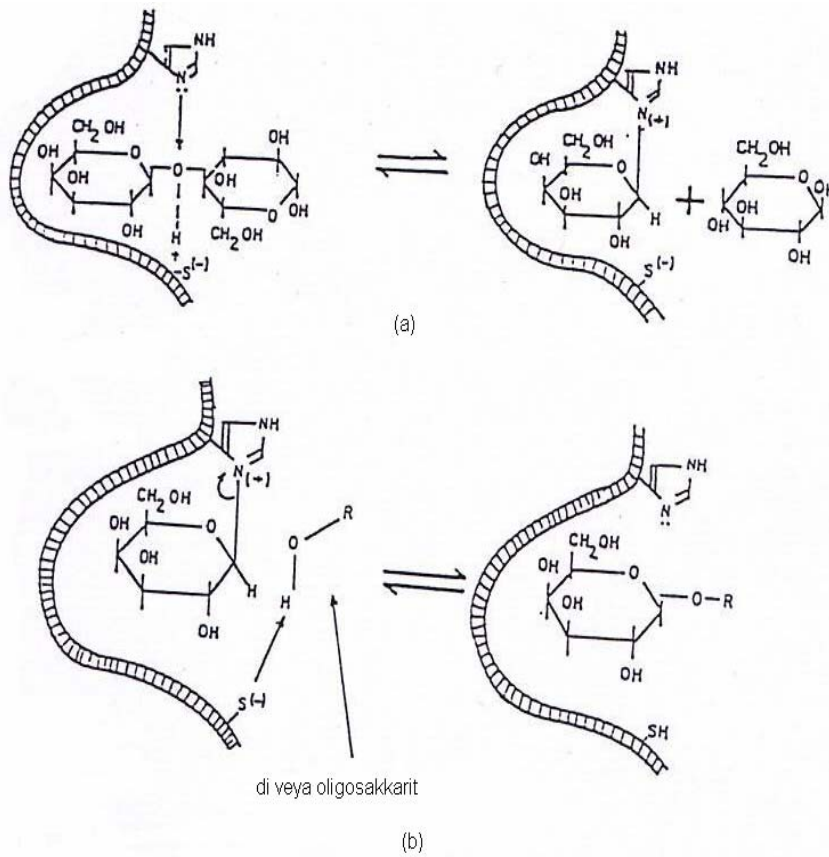
Şekil 2.2. β -Galaktosidaz enziminin üç boyutlu yapısında Na^+ ve Mg^{+2} iyonlarının gösterimi

β -Galaktosidaz, β -glikozidik bağ içeren oligo ve polisakkaritlerin hidrolizinden görevlidir. β -Galaktosidaz enzimi bir disakkarit olan laktozu onun bileşenleri olan monosakkaritlere glukoz ve galaktoza hidroliz eder. Yani, başka bir deyişle süt şekerini üzüm şekerine çeviren bağırsak enzimi olarak da tanımlanabilir. Laktozun glukoz ve galaktoza parçalanması, gıda teknolojisi ve beslenme açısından büyük öneme sahiptir. Çünkü hidrolizin temel ürünleri daha tatlı, daha çözünebilir, daha kolay fermente edilebilir ve ince bağırsak tarafından doğrudan absorbe edilebilir niteliktedir [5,6].

β -Galaktosidaz, substrat olarak p-nitrofenil- β -galaktosid kullandığında ortamdan su ayrılarak ürün olarak galaktoz ve p-nitrofenolü oluşturur.



β -Galaktosidaz enziminin katalizlediği reaksiyon



Şekil 2.3. Nötral pH'da β -galaktosidaz enziminin bilinen mekanizması
a) Galaktosil-enzim kompleksi ve glukozun (ROH) oluşumu
b) Serbest galaktoz formunun oluşumu için bir akseptöre (ROH) galaktosil transferi

Çizelge 2.1.Substrat spesifikliği

Substrat	K_m (mol / L)	V_{mak} (μ mol/dak /mg enzim)
α -Nitrophenil- β -D-galaktosik	$1,61 \times 10^{-4}$	178
P-Nitrophenil- β -D-galaktosid	$5,31 \times 10^{-5}$	22,4
Metilsalisilik- β -D-galaktosid	$2,50 \times 10^{-3}$	4,2
Fenil- β -D-galaktosit	$1,47 \times 10^{-3}$	10,4
α -Laktoz	$1,90 \times 10^{-3}$	6,55
β -Laktoz	$8,32 \times 10^{-3}$	12,8
(o-nitrophenil) - β -D – galaktosit	$1,20 \times 10^{-4}$	0,00

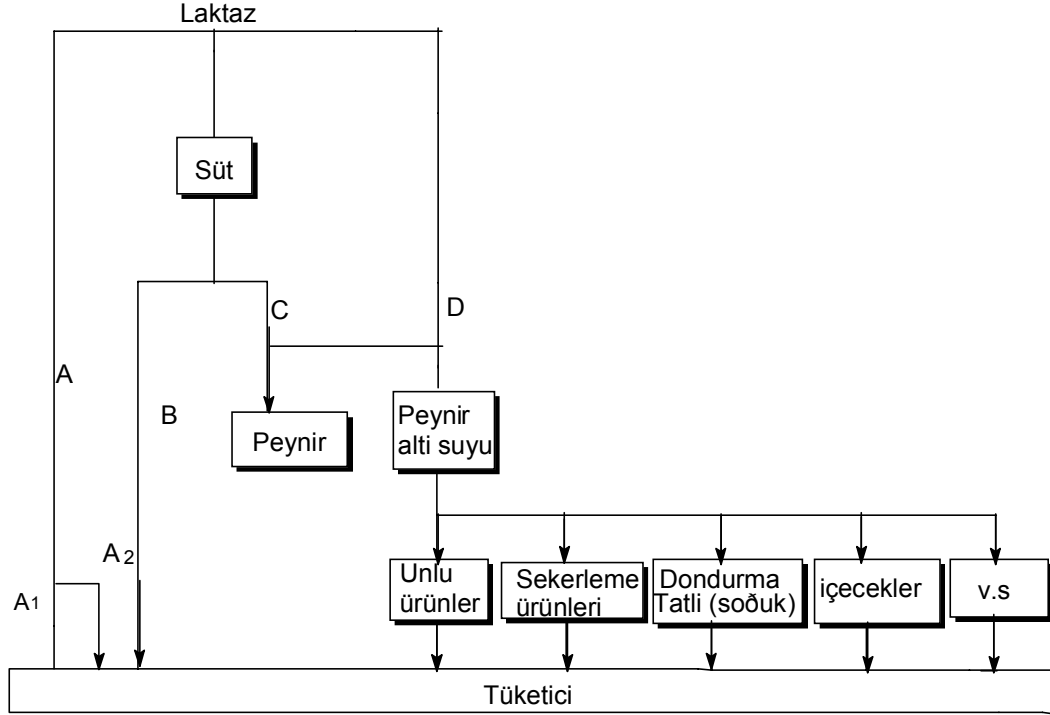
 β -Galaktosidazın Doğada Bulunuşu

β -galaktosidaz bitkilerde, hayvan dokularında ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Çizelge 2.2 'de β -galaktosidaz enziminin kaynakları verilmektedir.

Çizelge 2.2. β -galaktosidaz enziminin bulunduğu kaynaklar

Bitkiler	Şeftali, kayısı, badem, kefir taneleri, yaban gülü ve kahve
Hayvan organları	İnce bağırsak, beyin ve deri dokusu
Mayalar	Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis Candida pseudotropical Brettanomyces anomolus Wingea robersii
Bakteri	Escherichia coli, Thermus aquaticus, acillus sp. Bacillus megaterium streptococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus helveticus, Bacillus circulans, Bacillus stearothermophilus Lactobacillus sporogenes
Küf	Neurospora crassa, Mucor pucillus, Alternaria palmi Asperigillus foetidus, Mucor miehei, Curvularia inaequalis Asperigillus niger, Fusarium moniliforme Asperigillus flavus, Alternaria alternata Asperigillus oryzae Asperigillus phoenicis

β -Galaktosidazın uygulama alanları



Şekil 2.4. Endüstride β -galaktosidaz (laktazın) enziminin uygulanması

A_1 (Farmasotik uygulamalar) : Laktazın ağız yoluyla alınması; asitli laktaz direkt olarak sindirilirken, nötral laktaz ise direkt olarak sindirilemez.

A_2, B : Tüketici tarafından direkt olarak süte laktazın uygulanması; nötral laktaz tüketici tarafından süte eklenmektedir. Buzdolabında bir gece bekletildikten sonra kullanılan laktaz miktarına bağlı olarak süt kısmen veya tamamen hidrolizlenir.

C, D : Gıda endüstrisinde uygulamaları

β -galaktosidaz kullanılarak geliştirilmiş bazı süt ürünlerini şu şekilde sıralayabiliriz:

- Düşük laktozlu süt

- Laktozu hidrolizlenmiş sütte yoğurt üretimi
- Laktozu hidrolizlenmiş sütte peynir üretimi
- Düşük laktozlu konsantre dondurma
- Peynir altı suyu laktozundan tatlı şurup üretimi

2.3. Enzimlerin İmmobilizasyonu

Enzimlerin, reaksiyonları spesifik ve yüksek bir hızla katalizlemelerinden faydalanmak amacıyla onları canlı organizma dışında kullanabilmek düşüncesi bilim adamlarını harekete geçirmiştir. İlk olarak 1926 yılında Sumner tarafından üreaz enzimi kristal halde elde edilmiştir. Daha sonraları çok sayıda enzim çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve oldukça saf preparatlar şeklinde ve çoğu kristalize halde piyasaya sürülmüştür.

Enzim saflaştırılması özel teknikler gerektirdiğinden maliyetide oldukça yüksektir. Bunun yanı sıra, serbest enzimin aktifliğini kaybetmeden istenildiği anda reaksiyon ortamından uzaklaştırılması çok güçtür. Bu durum pahalı olan enzimlerin tekrar tekrar kullanılmasına engel olur. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması durumunda ise zaten enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürünlerin bu kirlilikten arıtılması için kompleks ayırma işlemlerine gerek vardır ki bu da maliyeti bir kat daha artırır. Yukarı da sayılan teknik ve ekonomik problemlerden dolayı serbest enzim yerine tutuklanmış enzim kullanılmasının daha uygun olabileceği düşünülmüş ve bu amaçla tutuklanmış enzim sistemlerinin hazırlanması ve teknolojiye kullanımı son senelerde büyük önem kazanmıştır [7].

İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, " tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış, çözünmez hale getirilmiş " demektir. Enzimlerin ya da mikroorganizmaların fiziksel ve / veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar

ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara tutturulmasıdır [8,37].

2.3.1. Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri çok farklı kaynaklarda değişik şekillerde sınıflandırılmalarına karşın kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir.

1) Kimyasal yöntemler

a) Kovalent bağlama

b) Çapraz bağlama

2) Fiziksel yöntemler

a) Adsorpsiyon ile immobilizasyon

b) Hapsetme ile immobilizasyon

-Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi

-Kafes tipi hapsetme yöntemi

Kovalent Bağlanmayla Immobilizasyon

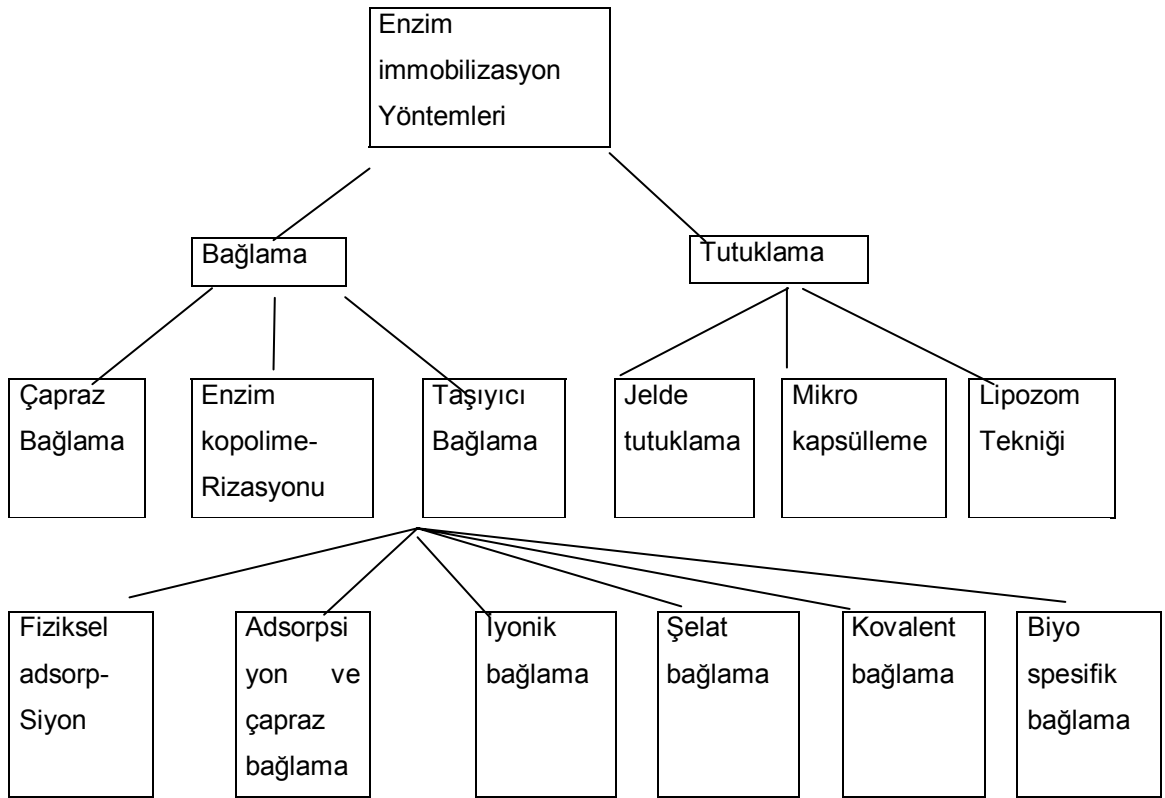
Kovalent bağlama, genellikle enzim yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Enzim immobilizasyonunda, enzimin özellikleri, aktif ucun yapısı, pH, sıcaklık ve organik çözücüler gibi faktörlerden dolayı sınırlı sayıda yöntem kullanılabilir.

Kovalent bağlama ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamak destek maddesinin aktive edilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir. Destek maddesi; karboksil, hidroksil, amino gibi fonksiyonel gruplar taşımalıdır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak epiklorhidrin, karbodiimit, gibi çeşitli aktifleyici maddeler kullanılabilir.

Kovalent bağlama yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması nedeniyle her türlü ortamda kullanılabilir. Enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması kolaydır. Ayrıca enzim molekülü ve destek materyali birlikte genellikle ısı kararlılık gösterirler. Yöntemin dezavantajı, destek materyali ile enzim arasında sıkı etkileşim enzimin doğal konformasyonunu bozar [9].

Hapsetme ile immobilizasyon

Bu yöntemde enzimler, suda çözünmeyen polimerik matriks veya yarı geçirgen membranlarda hapsedilirler. Bu amaçla kalsiyum aljinat, κ -karojen gibi polimerler kullanılır. Değişik çeşitleri vardır. Polimer matriks içinde immobilizasyon için, enzim çözeltisi polimer çözeltisiyle polimerleşmeden önce karıştırılır. Polimerleşme esnasında enzim molekülleri polimere bağlanmaz ama fiziksel olarak polimerin içinde kalır. Kimyasal bir bağlanma olmaması yöntemin önemli avantajıdır. Yöntemin dezavantajı substratın polimer kılıfı geçerek polimerin boşluklarına yerleşmiş enzim molekülüne ulaşmasındaki (difüzyonundaki) güçlüğüdür, dolayısıyla difüzyon problemi vardır. Anlaşılabileceği gibi substratın büyük molekülü olması halinde yöntem sonuç vermez. Yöntem küçük molekülü substratlar için uygundur [10-12].



Şekil 2.5. Enzim immobilizasyonunda kullanılan immobilizasyon yöntemleri

2.3.2. İmmobilize edilen enzimden beklenen özellikler

- Yüksek kararlılık
- Sürekli üretime olanak vermesi
- Tekrar kullanılabilirlik
- Yüksek saflık
- Ekonomiklik

2.3.3. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Günümüze kadar birçok enzim için birçok farklı immobilizasyon yöntemi uygulanmış ve önerilmiştir. Ancak enzimlerin birbirlerinden çok farklı kimyasal karakteristikleri ve bileşenleri olması, ayrıca kullanılan substrat ve ürünün farklı kimyasal özellikleri olması nedeniyle bütün enzimler için ve bütün şartlarda uygulanabilecek kesin bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Ayrıca her immobilizasyon yönteminin uygulama şartlarına göre avantajları ve dezavantajları vardır [13]. Bu nedenle immobilizasyon işlemi sırasında veya immobilizasyondan sonra aktif merkezin zarar görmeyeceği bir yöntem seçilmelidir. Böyle bir seçimin sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir [13,14]. Çizelge 2.3'de immobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

Karakteristik	Kovalent Bağlama	Adsorbsiyon	Çapraz Bağlama	Tutuklama
Destek Maddesi	Agaroz Selüloz PVC İyon değiştirici reçine Gözenekli cam	İyon değiştirici reçine Aktif kömür Slika jel Kil Gözenekli cam	Fonksiyonel olarak inert proteinler	Aljinat Karageenan Kolojen Poliakrilamit Jelatin Silikon kauçuk poliüretan
Bağlanmanın Doğası	Kimyasal bağlanma	Tersinir, pH'a göre değişken, iyonik şiddetin yüksek olması ile enzim ayrılabilir	Gluteraldehit Bisizosiyanat Bisdiazobenzidin ile çapraz bağlanma	Fiziksel hapsetme
Hazırlama	Zor	Kolay	Orta	Zor
Enzim Aktivitesi	Yüksek	Orta	Düşük	Düşük
Substrat Spesifikliğı	Değişebilir	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
Rejenerasyon	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil
Desteğın Tekrar Kullanılabilirliğı	Nadiren	Mümkün	İmkansız	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Yüksek	Düşük	Orta	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Orta	Düşük	Düşük	Yüksek

2.3.4. Enzim immobilizasyon yönteminin seçimi

Yapılan immobilizasyonun başarılı olabilmesi için aşağıdaki faktörlere dikkat edilmelidir [15].

- 1- Enzim, immobilizasyon reaksiyonun gerçekleştirileceği koşullarda kararlı olmalıdır.
- 2- Enzimin aktif uçları, çapraz bağlayıcı reaktiflerle reaksiyona girmemelidir. Çapraz bağlayıcı reaktif, enzimin aktif ucuna nüfuz etmemesi için olabildiğince büyük olmalıdır.
- 3- Mümkün olabildiğince enzimin aktif ucu korunmalıdır. Sülfidril enzimleri gibi, glutatyon veya sistein ile reaksiyona sokularak korunabilir ve daha sonra tekrar aktifleştirilebilir.
- 4- İmmobilizasyon sonunda bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulanan yıkama işlemi enzimi etkilememelidir.
- 5- İmmobilize enzim, bazı kimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılacak ise immobilizasyon metodu seçilmeden önce reaksiyon doğası göz önünde bulundurulmalıdır.
- 6- Destek materyalinin mekanik özellikleri, özellikle fiziksel formu ve mekanik kararlılığına dikkat edilmelidir.

2.3.5. Enzim destek materyali

Enzim immobilizasyonunda destek olarak doğal ve sentetik birçok organik ve anorganik materyal kullanılmaktadır. Çizelge 2.4'de enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyalleri verilmiştir.

Çizelge 2.4. Enzim immobilizasyonun da kullanılan bazı destek materyalleri

Doğal Polimer	Sentetik Polimer	Anorganik
Selüloz	Stiren esaslı polimerler	Kil
Nişasta	Akrilamit esaslı polimerler	Cam
Aljinat	Naylon	Silikajel
Karragenan	Vinil ve allil polimerler	Ponza taşı
Kollagen	Akrilat esaslı polimerler	Aktif karbon
Jelatin	İyon değiştirici reçineler	Metaller
Albümin	Maleik anhidrit polimerleri	Metal oksitler
İpek		Bentonit

Enzim destek materyalinde aranan nitelikler

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Mekanik ısı kararlılığı ve uygun partikül formu,
- Kimyasal ve termal ısı kararlılığı,
- Kovalent bağlamada kullanılacak destekler yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımali,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik.

2.3.6. Sodyum aljinat

Aljinik asit kahverengi alglerin hücre duvarlarında bulunan lineer asidik bir polisakkarittir. Aljinik asidin elde edildiği belli başlı algler aşağıda verilmiştir;

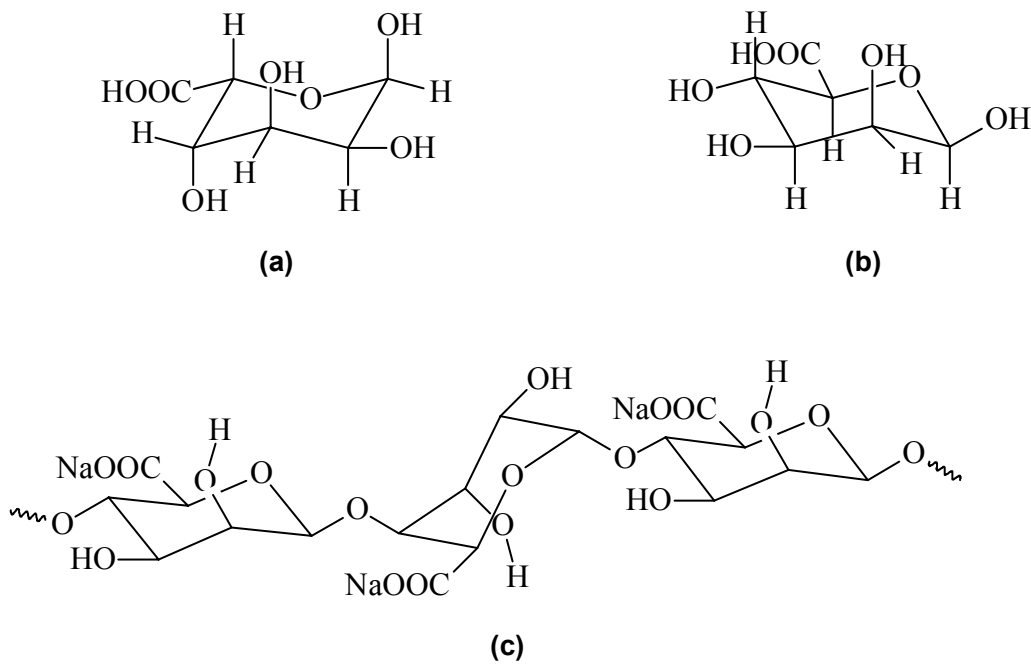
- *Laminariales,*
- *Fucales,*
- *Eisenia bicyclis,*
- *Ecklonia,*
- *Ascophyllum,*
- *L. Digitata,*
- *L. Cloustoni,*
- *Macrocystis pyrifera,*
- *Lessonia,*

Bu yosunlardaki aljinik asit içeriği %20-40 arasında değişmekle birlikte, hücre zarının temel bileşenini oluşturur [16].

Aljinik asit 1881 yılında, Stanford tarafından kahverengi su yosunlarından (İrlanda yosunu) ekstraksiyonla elde edilmiştir [13]. Aljinik asit; üronik asidin iki türünün birleşmesiyle meydana gelen heteroblok bir kopolimerdir. β -1,4-D-Mannuronik Asit (M) ve α -1,4-L-Gluronik Asit (G)'nin gelişigüzel birleşmesi ile meydana gelir [17]. Farklı seviyelerde de olsa, bütün aljinat moleküllerinde her iki homopolimerik sıra birlikte bulunur [18]. Mannuronik asit-gluronik asit oranı (M/G) türe, mevsime ve algin yetiştiği bölgeye göre değişmektedir [19]. Genelde G bloğu oranı yüksek olan aljinatlar basınca dayanıklı fakat kırılğan iken G bloğu düşük aljinatlar basınca az dayanıklı ama esnek karakterdedirler.

Aljinik asit genellikle sodyum, potasyum, amonyum tuzları ve propilen glikol esterleri şeklinde bulunur. Aljinik asit ve kalsiyum aljinatın sudaki çözünürlüğü

son derece sınırlı iken sodyum, potasyum, amonyum tuzları ile propilen glikol esterleri suda kolaylıkla çözünebilirler. Sodyum Aljinat, kokusuz tatsız bir toz olup suda çözündüğünde viskoz koloidal bir çözelti oluşturur. Şekil 2.6.'de β -1,4-D-Mannuronik Asit, α -1,4-L-Gluronik Asit ve sodyum aljinat'ın kimyasal formülü görülmektedir.



Şekil 2.6. (a) β -1,4-D-Mannuronik Asit
 (b) α -1,4-L-Gluronik Asit
 (c) sodyum aljinat'ın kimyasal yapısı

Aljinat yüksek molekül ağırlığı, suda çözünürlüğünün iyi olması ve biyoyoumluluğu nedeniyle birçok uygulama alanı vardır. Gıda endüstrisinde stabilizatör ve koyulaştırıcı olarak kullanıldığı gibi, kozmetik, kağıt, plastik ve ilaç endüstrisinde sıkça kullanılmaktadır [19]. Ayrıca aljinatın iki değerlikli metal çözeltileri içerisine damlatılmasıyla meydana getirilen aljinat bilyeleri, ağır metal içeren atık suların arıtılması çalışmalarında kullanılmaktadır [20,21].

Genellikle hücrelerin immobilizasyonunda kullanılan bu metod enzimler için kullanıldığında bazı özel tekniklerin kullanılması gerekir. Aljinat ile enzimlerin

immobilizasyonunda; Sodyum aljinat çözeltisine enzim ilave edildikten sonra, bu çözelti 0,2 M CaCl_2 çözeltisine damla damla ilave edilir. Sodyum aljinat CaCl_2 ile temas ettiğinde Na - Ca değişimi nedeniyle suda çözünmeyen kalsiyum aljinat kürecikleri meydana gelir. Enzim molekülleri serbest halde bu kürecikler içinde bulunur. Zamanla enzim molekülleri bu kürelerden dışarı sızarlar. Bu durumu önlemek için çapraz bağlayıcılar (glutaraldehit, hekzametilen diamin gibi) kullanılmaktadır [23-25].

3. β -GALAKTOSİDAZIN İMMOBİLİZASYONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

Hernaiz ve Crount (2000) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus circulans* β -galaktosidazı N-asetilglukoz amin üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde 2.kez kullanımından sonra enzim aktifliğinin % 90'nını koruduğu, 30.kez kullanımından sonra ise aktifliğinin % 80'ini kaybettiği rapor edilmiştir [26].

Göktuğ ve arkadaşlarının (2005) yaptığı başka bir çalışmada, *Aspergillus niger* mantarından elde edilen β -galaktosidaz aljinat üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve immobilize enzim için optimum pH değeri değişmemiş ve 4,5 olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değeri değişmemiş ve 50°C olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada serbest enzim için $K_m = 42$ mM, $V_{mak} = 1,30$ mg.dak⁻¹, immobilize enzim için $K_m = 51$ mM, $V_{mak} = 0,7$ mg.dak⁻¹ olarak bulunmuştur. immobilize enzimin 35 gün sonra enzim aktifliğinin %56'sını koruduğu rapor edilmiştir [27].

Quinn ve arkadaşlarının (2001) yaptığı diğer bir çalışmada ise *Kluyveromyces lactis* β -galaktosidazı grafit üzerine glutaraldehit yardımıyla çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest enzim için $K_m = 1,74$ mM, $V_{mak} = 77,45$ dak⁻¹mg⁻¹, immobilize enzim için ise bu değerler $K_m = 9,34$ mM, $V_{mak} = 8,77 \cdot 10^{-3}$ dak⁻¹mg⁻¹ olarak bulunmuştur. Serbest enzim için optimum sıcaklık değeri 35°C iken immobilize enzim için bu değer 55°C olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada serbest enzim için optimum pH değeri 5,5 iken immobilize enzim için optimum pH değeri 7,7 olarak bulunmuştur [28].

Tanrıseven ve arkadaşlarının (2002) yaptığı diğer bir çalışmada ise *Aspergillus oryzae* β -galaktosidazı jelatin-glutaraldehit üzerine çapraz

bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değeri değişmemiş ve 50°C olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH değeri değişmemiş ve 4,5 olarak bulunmuştur [29].

Ladero ve arkadaşlarının (2001) yaptığı başka bir çalışmada, *Escherichia coli* β -galaktosidazı silika alümina üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edildiğinde optimum pH değeri serbest enzim için 7,5; bu değer immobilize enzim için 8,0 olarak bulunmuştur [30].

Weixia ve arkadaşlarının (1999) yaptığı çalışmada *Cicer arietinum* β -galaktosidazı selüloz üzerine immobilize edildiğinde serbest enzimin 50°C'nin üzerinde yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur. Immobilize β -galaktosidaz için ise 60°C de aktivitesinin % 70'ini, serbest β -galaktosidazın ise aktifliğinin % 30'unu koruduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada β -galaktosidazı glutaraldehit üzerine immobilize edildiğinde optimum sıcaklık değeri serbest enzim için 55°C, immobilize enzim için ise 60°C olarak bulunmuştur ve optimum pH değeri serbest enzim için 5,0 bu değer immobilize enzim için 6 olarak bulunmuştur [31].

Ateş ve Metmetoğlu'nun (1997) bir çalışmasında *Aspergillus oryzae* β -galaktosidazı kobalt aljinat küreleri içerisinde hapsetme yöntemiyle immobilize edildiğinde optimum pH değeri serbest enzim için 4,0; immobilize enzim için ise bu değer 4,9 olarak bulunmuştur. Immobilize enzim 4.kez kullanımından sonra enzim aktifliğinin %50'sini koruduğu rapor edilmiştir [32].

Carpio ve arkadaşlarının (2000) bir çalışmasında ise, *Kluyveromyces lactis* mayasından elde edilen β -galaktosidaz selüloz jelatin üzerine çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değeri 40°C olarak bulunmuştur [33].

El-Masry ve arkadaşlarının (2001) çalışmasında ise; *Aspergillus oryzae* β -galaktosidazı poli(glisidilmetakrilat) üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest enzim için $K_m=21,4$ mM, $V_{mak}=3,20$ $\mu\text{mol.dak}^{-1}$, immobilize enzim için ise bu değerler $K_m= 72$ mM $V_{mak}= 2,00$ $\mu\text{mol.dak}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Immobilize enzim 17. kez kullanımından sonra enzim aktifliğinin %80'ini koruduğu; optimum sıcaklık serbest enzim için 50°C, immobilize enzim için 60°C olarak bulunmuştur [34].

Benevides ve arkadaşlarının (2003) çalışmasında ise; *Thermus acillus sp.* β -galaktosidazı kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest β -galaktosidaz için $K_m= 3,1$ mM, $V_{mak}= 48$ IU/mg, immobilize enzimler için $K_m= 7,7-6,6$ mM, $V_{mak}= 45-47$ IU/mg olarak bulunmuştur [35].

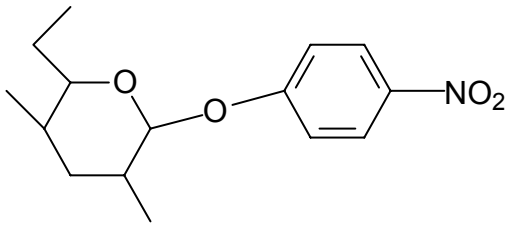
Shinoda ve Goto 'nun (1998) çalışmasında ise *Escherichia coli* β -galaktosidazı perflurokarbon üzerine çapraz bağlanma yöntemiyle immobilize edildiğinde serbest enzim için $K_m= 0,69$ mol.m^{-3} , $V_{mak}= 5,48.10^{-3}$ $\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$, immobilize enzim için ise bu değerler $K_m= 1,12$ mol.m^{-3} $V_{mak}= 1,87.10^{-4}$ $\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$ olarak bulunmuştur [36].

4. DENEYSEL KISIM

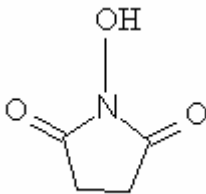
4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

β-galaktosidaz: (EC.3.2.1.23 9.4 U/mg E.Coli bakterisinden elde edilen) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.

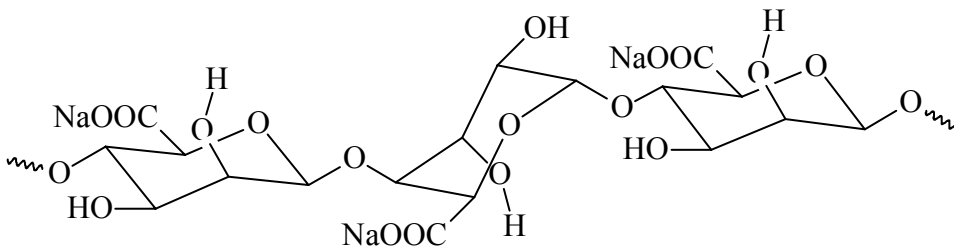
p-nitrofenil- β-D-galaktopironosit: Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



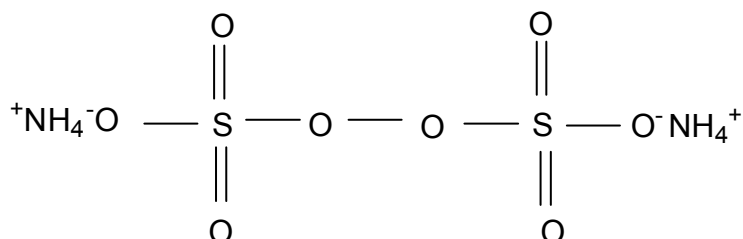
N-hidroksisüksinimide : ($C_4H_5NO_3$, MA:115,09 g/mol), Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.



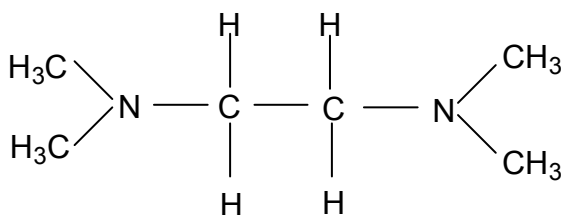
Sodyum aljinat : Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



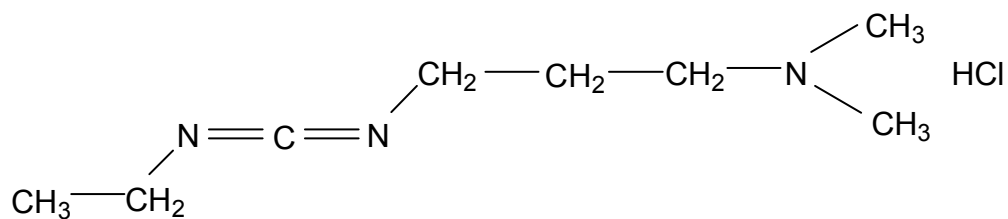
Amonyum persülfat : $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$, MA:228,19 g/mol) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



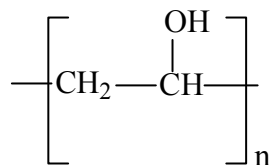
N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED) : $(\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2)$, MA:116,21 g/mol) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.



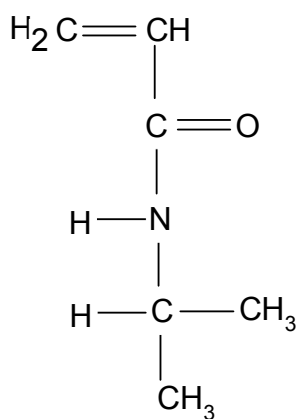
1-etil (3-3 dimetilaminopropil) karbodiimit hidroklorür:
(MA:191,7 g/mol) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.



Polivinilalkol (PVA): Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.
MA:85,000-124,000 g/mol aralığında
d= 1,269 g/ml



N-izopropil akrilamit : (C₆H₁₁NO, MA:113,16 g/mol) Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.



Fosforik asit : (H₃PO₄, MA: 60 g/mol)

Borik asit : (H₃BO₄, MA: 61,83 g/mol)

Sodyum karbonat : (Na₂CO₃, MA: 118 g/mol) Merck firmasından elde edildi.

Kalsiyum klorür : (CaCl₂, MA: 74 g/mol)

Sodyum hidroksit : (NaOH, MA: 40 g/mol)

Asetik asit: (CH₃COOH, MA: 97,99 g/mol)

4.2. Kullanılan Aletler

Spektrofotometre : UNICAM U.V / Vis Spektrofotometre

pH metre : Orion pH metre 420 A

Çalkalamalı su banyosu : ST 402 NÜVE marka sıcaklık kontrollü su banyosu

4.3. Kullanılan Çözeltiler

1. NaOH çözeltisi: 2 M 50 mL NaOH çözeltisi hazırlamak için 3,84 g NaOH bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL ye tamamlandı.

2. Na₂CO₃ çözeltisi: 0,1 M 50 mL Na₂CO₃ çözeltisi hazırlamak için 0,53 g Na₂CO₃ bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL ye tamamlandı.

3. Britton-Robinson (B-R) tamponu: 2,3 mL buzlu asetik asit, 2,7 mL fosforik asit, 2,4720 g borik asit, üç katı saf suyla sulandırıldıktan sonra hacmi saf su ile 1,0 L ye tamamlandı. Bu çözeltiden 50 mL alınarak 2,0 M NaOH ile pH 2,0-9,0 arasında ayarlandı.

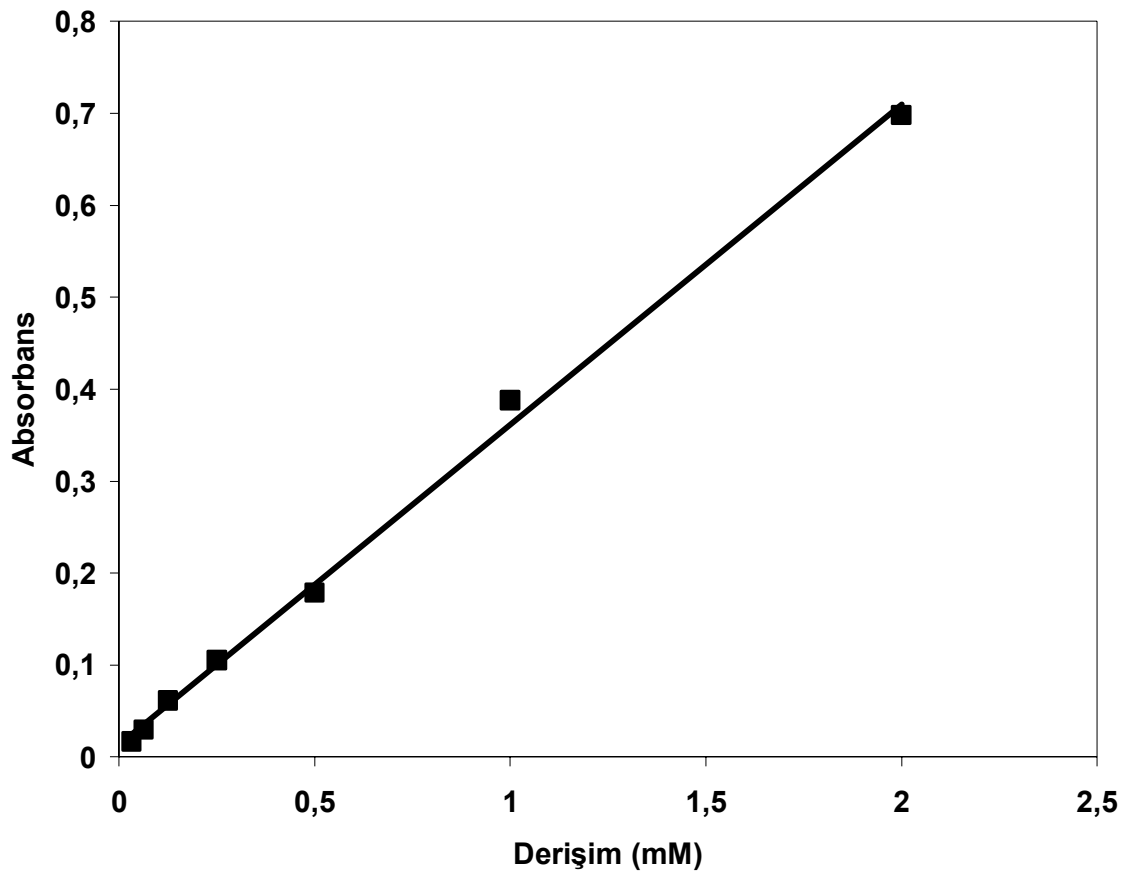
4. P-Nitrofenil-β-D-galaktosid substrat çözeltisi: 5 mM p-nitrofenil-β-D-galaktopironosit substrat çözeltisi hazırlamak için 0,0015 g p-nitrofenil-β-D-galaktopironosit bir miktar BR tamponunda çözüldükten sonra hacmi tampon çözeltisi ile 10 mL ye tamamlandı.

5. Kalsiyum klorür çözeltisi: 0,3 M 500 mL CaCl₂ çözeltisi hazırlamak için 11,1 g CaCl₂ bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf suyla 500 mL ye tamamlandı.

6. Kalsiyum klorür çözeltisi: 0,03 M 500 mL CaCl_2 çözeltisi hazırlamak için 1,11 g CaCl_2 bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf suyla 500 mL ye tamamlandı.
7. Sodyum aljinat çözeltisi: (kütlegece %1 lik) 0,25 g sodyum aljinat 25 mg saf suda çözüldü.
8. Poli(vinil alkol) çözeltisi: 1g poli (vinil alkol) tartılarak 50 mL saf suda çözüldü.
9. N-İzopropil akrilamid çözeltisi: 0,7 g N-İzopropil akrilamid 10 mL saf suda çözüldü.
10. Poli(N-İzopropil akrilamid) eldesi ve çözeltisi: 0,7 g N-izopropil akrilamid 10 mL saf suda çözülerek üzerine 10 mg amonyum persülfat ve 10 damla N,N,N',N'-tetraetilendiamin (TEMED) ilave edilip iyice karışması sağlandıktan sonra saf sıcak 10 ml suya yavaşça dökülerek katı çökelek oluşturuldu. Oluşan çökelek alınarak 25 mL saf soğuk suda çözünmesiyle hazırlandı.
11. Karbodiimit çözeltisi: 100 mg karbodiimit 100 mL saf suda çözüldü.
12. N-hidroksisüksinimid çözeltisi: 100 mL N-hidroksisüksinimid 100 mg saf suda çözüldü.
13. Karbodiimit ve N-hidroksisüksinimid çözeltisi: 50 mg karbodiimit ve 50 mg N-hidroksisüksinimid 100 mL saf suda çözüldü.

4.4. P-Nitrofenil- β -D-Galaktosid Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiği hazırlamak amacıyla çeşitli derişimlerde (2,00-0,031 mM) p-nitrofenil- β -D-galaktosid çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin 398 nm de U.V spektrofotometresi kullanılarak absorbens değerleri ölüldü. P-Nitrofenil- β -D-galaktosid derişimlerine karşı gelen absorbens değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizildi (şekil 4.1).



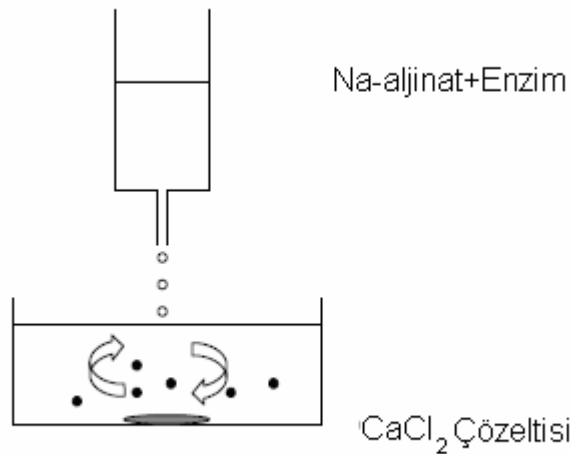
şekil 4.1. P-Nitrofenil β -D-galaktosid kalibrasyon grafiği

4.5. Enzim İmmobilizasyonu

4.5.1. Hapsetme yöntemiyle enzim immobilizasyonu

Kalsiyum aljinat-Poli(vinil alkol) kürelerine hapsetme yöntemiyle enzim immobilizasyonu

Sodyum aljinat (kütlege % 1 lik ,0,5 g) 50 mg saf suda çözüldü. Her biri aynı miktarda sodyum aljinat çözeltisi (10 mL) ve farklı miktarlarda poli(vinil alkol) çözeltileri (1g PVA/50 mL saf su); (10, 5, 3, 1, 0 mL) içeren beş farklı örneğe eşit miktarlarda 3 mL enzim çözeltisi (0,0015g / 10 mL BRT' de çözüldü) ilave edilerek iyice karışması sağlandı ve her bir çeşidin toplam hacmi BR tamponuyla 23mL'ye tamamlandı. Ardından oluşturulan homojen karışımlar 0,3 M CaCl_2 çözeltisine damlatılarak ilave edildi (Şekil 4.2). Na-aljinat, CaCl_2 ile temas ettiğinde sodyum-kalsiyum değişimi nedeniyle suda çözünmeyen Ca-aljinat poli(vinil alkol) küreleri içerisinde, enzim molekülleri hapsedilerek immobilize edildi. Oluşan polimerik küreler daha sonra kullanılmak üzere 4°C de saf su içinde bekletildi.



Şekil 4.2. Enzimlerin Ca-aljinat ile immobilizasyonu

Çizelge 4.1. Farklı bileşimlerde CaAlj-PVA kürelerinin hazırlanması

Örnek	Kalsiyum-Aljinat Miktarı (mL)	Enzim Miktarı (mL)	PVA Miktarı (mL)	BRT Miktarı (mL)
CaAlj-PVA1	10	3	10	0
CaAlj-PVA2	10	3	5	5
CaAlj-PVA3	10	3	3	7
CaAlj-PVA4	10	3	1	9
CaAlj	10	3	0	10

Kalsiyum aljinat-Poli(N-izopropilakrilamit) kürelerine hapsetme yöntemiyle enzim immobilizasyonu

Sodyum aljinat (kütlece % 1 lik ,0,5 g) 50 mg saf suda çözüldü. Her biri aynı miktarda sodyum aljinat çözeltisi (10 mL) ve farklı miktarlarda poli(N-İzopropilakrilamit) çözeltileri (10, 5, 3, 1, 0 mL) içeren beş farklı örneğe eşit miktarlarda 3 mL enzim çözeltisi (0,0015g / 10 mL BRT' de çözüldü) ilave edilerek iyice karışması sağlandı ve her bir çeşidin toplam hacmi BR tamponuyla 23mL' ye tamamlandı. Ardından oluşturulan homojen karışımlar 0,3 M CaCl_2 çözeltisine damlatılarak ilave edildi (Şekil 4.2.). Na-aljinat, CaCl_2 ile temas ettiğinde sodyum-kalsiyum değişimi nedeniyle suda çözünmeyen Ca-aljinat poli(N-İzopropilakrilamit) küreleri içerisinde enzim molekülleri hapsedilerek immobilize edildi. Oluşan polimerik küreler daha sonra kullanılmak üzere 4°C de saf su içinde bekletildi.

Çizelge 4.2. Farklı bileşimlerde CaAlj-P(NIPA) kürelerinin hazırlanması

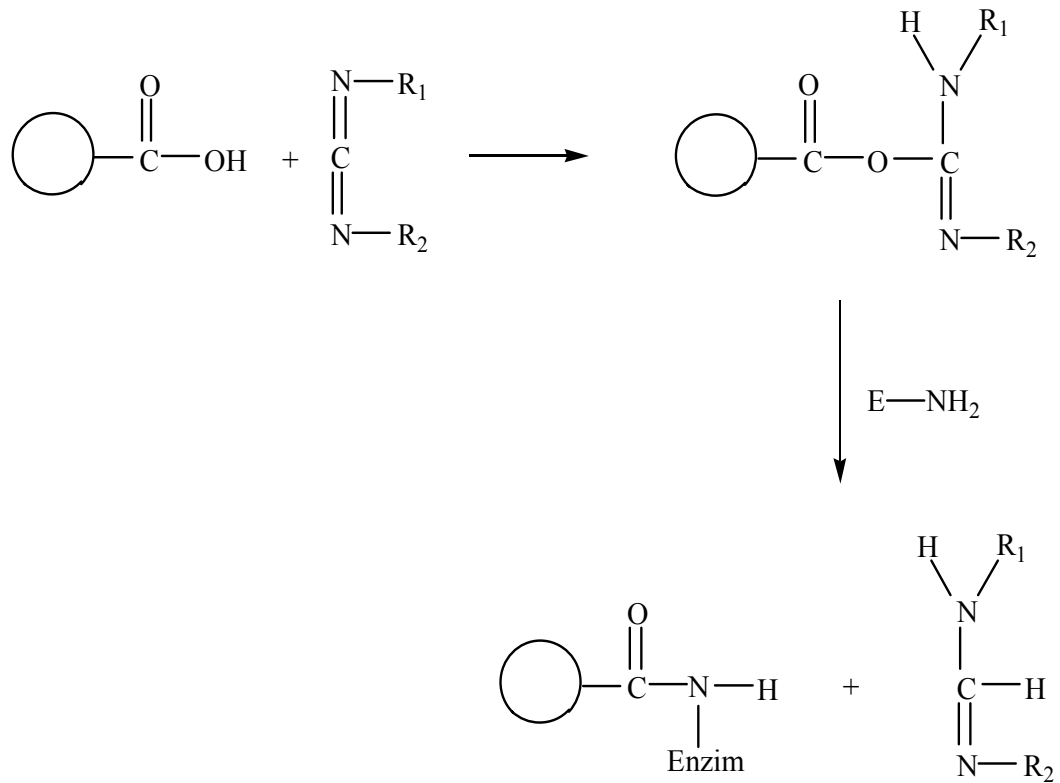
Örnek	Kalsiyum-Aljinat Miktarı (mL)	Enzim Miktarı (mL)	P(NIPA) Miktarı (mL)	BRT Miktarı (mL)
CaAlj-P(NIPA)1	10	3	10	0
CaAlj-P(NIPA)2	10	3	5	5
CaAlj-P(NIPA)3	10	3	3	7
CaAlj-P(NIPA)4	10	3	1	9
CaAlj	10	3	0	10

4.5.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle enzim immobilizasyonu

Karbodiimit kullanarak enzim immobilizasyonu

Sodyum aljinat (küttelece % 1' lik ,0,5 g) 50 mg saf suda çözüldü ve oluşan çözeltiden 10 mL alınarak üzerine 5 mL PVA çözeltisi eklenip iyice karıştırıldı. Daha sonra 0,3 M CaCl_2 çözeltisine damlatılarak ilave edildi (Şekil 4.2). Na-aljinat, CaCl_2 ile temas ettiğinde soydum-kalsiyum değişimi nedeniyle suda çözünmeyen Ca-aljinat polimerik küreleri elde edildi. Yüzey aktifleştirme işlemi karbodiimit ile şu şekilde gerçekleştirildi. Ca-aljinat polimerik küreleri karbodiimit çözeltisi (0,5 mM) içine ilave edildi ve oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 4 saat süreyle karıştırılarak bir gece aktifleşme işleminin tamamlanması için bekletildi. Daha sonra karbodiimit bağlanmış küreler üzerine enzim çözeltisi ilave edilerek dört saat süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Yüzey üzerine adsorbe olan enzimler deiyonize su ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra kullanılmak üzere 4°C de saf su içinde bekletildi. Aynı işlemler 5 ml PVA yerine 1 mL P(NIPA) çözeltisi konularak tekrarlandı.

Karboksil grubu taşıyan matrisler karbodiimitle kullanılarak aktif hale getirilip enzimlerin immobilizasyonunda kullanılabilirler. Bu immobilizasyon Şekil 4.3' de gösterilmektedir [37].

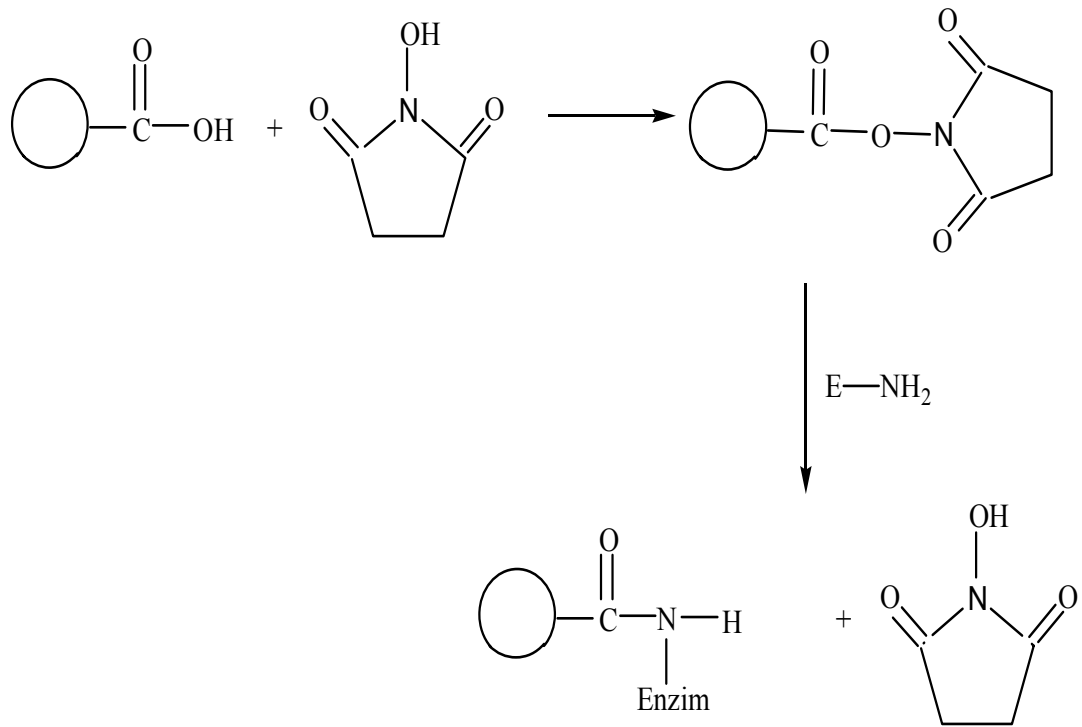


Şekil 4.3. Polimerik desteğin karbodiimitle aktifleştirilmesi ve polimerik desteğe enzim bağlanması

Hidroksisüksinimit kullanarak enzim immobilizasyonu

Sodyum aljinat (kütlege % 1 lik ,0,5 g) 50 mg saf suda çözüldü ve oluşan çözeltiden 10 mL alınarak üzerine 5 mL PVA çözeltisi eklenip iyice karıştırıldı. Daha sonra 0,3 M CaCl_2 çözeltisine damlatılarak ilave edildi (Şekil 4.2). Na-aljinat, CaCl_2 ile temas ettiğinde sodyum-kalsiyum değişimi nedeniyle suda çözünmeyen Ca-aljinat polimerik küreleri elde edildi. Yüzey aktifleştirme işlemi N-hidroksisüksinimit ile şu şekilde gerçekleştirildi. Ca-aljinat polimerik küreleri N-hidroksisüksinimit çözeltisi içine ilave edildi ve oda sıcaklığında

manyetik karıştırıcı ile 4 saat süreyle karıştırılarak bir gece aktifleştirme işleminin tamamlanması için bekletildi. Daha sonra hidroksisüksinimit bağlanmış küreler üzerine enzim çözeltisi ilave edilerek 4 saat süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Yüzey üzerine adsorbe olan enzimler deiyonize su ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra kullanılmak üzere 4°C de saf su içinde bekletildi. Aynı işlemler 5 ml PVA yerine 1 mL P(NIPA) çözeltisi konularak tekrarlandı.

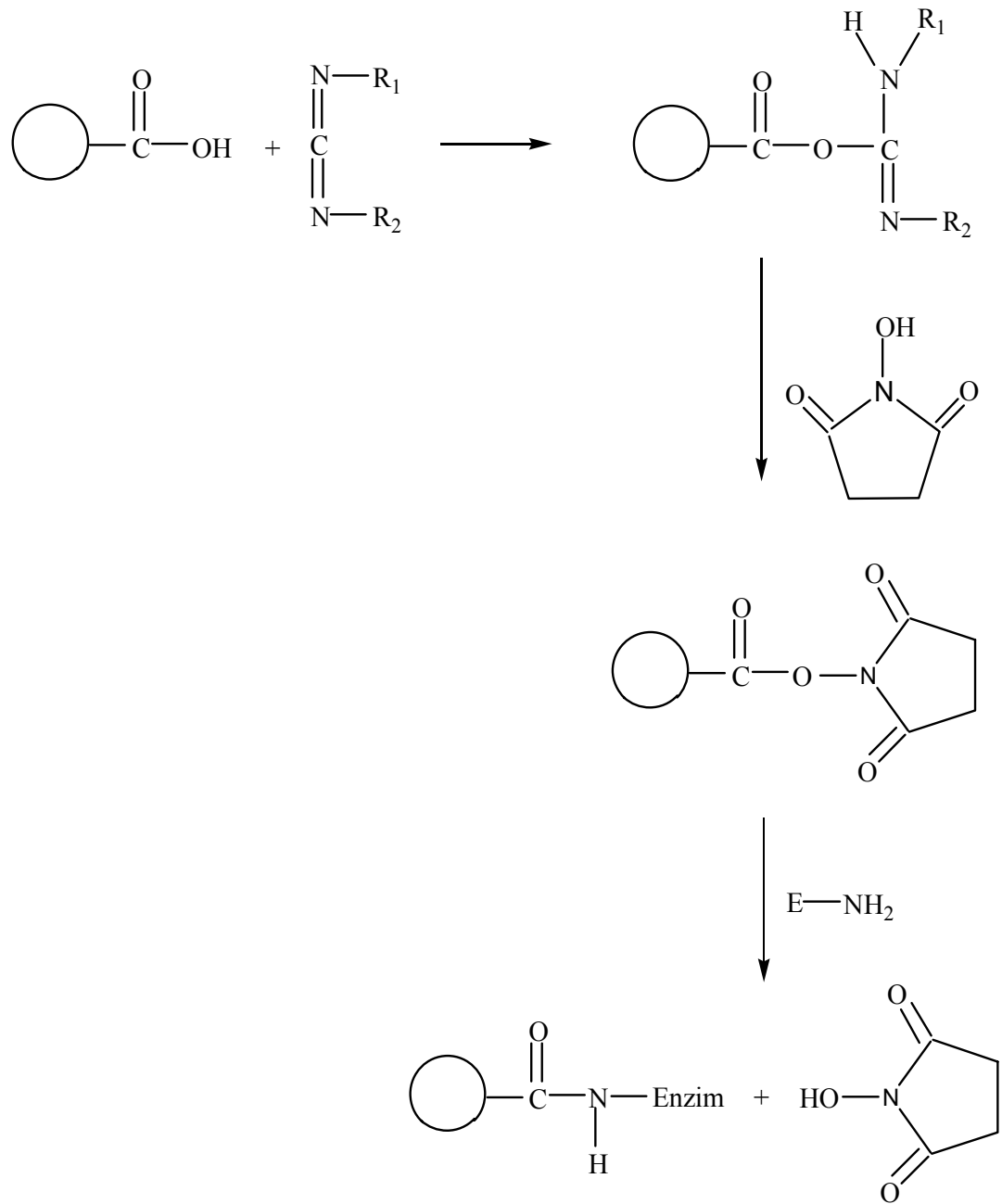


Şekil 4.4. Polimerik desteğin N-hidroksisüksinimit ile aktifleştirilmesi ve polimerik desteğe enzim bağlanması

Karbodiimitt ve N-hidroksisüksinimit kullanarak enzim immobilizasyonu

Sodyum aljinat (kütlece % 1' lik ,0,5 g) 50 mg saf suda çözüldü ve oluşan çözeltiden 10 mL alınarak üzerine 5 mL PVA çözeltisi eklenip iyice karıştırıldı. Daha sonra 0,3 M CaCl_2 çözeltisine damlatılarak ilave edildi (Şekil 4.2). Na-aljinat, CaCl_2 ile temas ettiğinde sodyum-kalsiyum değişimi nedeniyle suda çözünmeyen Ca-aljinat polimerik küreleri elde edildi. Yüzey aktifleştirme

işlemi karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit ile şu şekilde gerçekleştirildi. Ca-aljinat polimerik küreleri karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit (1:1) çözeltisi içine ilave edildi ve oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 4 saat süreyle karıştırılarak bir gece aktiveleştirme işleminin tamamlanması için bekletildi. Daha sonra karbodiimit ve hidroksisüksinimit bağlanmış küreler üzerine enzim çözeltisi ilave edilerek dört saat süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Yüzey üzerine adsorbe olan enzimler deiyonize su ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra kullanılmak üzere 4°C de saf su içinde bekletildi. Aynı işlemler 5 ml PVA yerine 1 mL P(NIPA) çözeltisi konularak tekrarlandı.



Şekil 4.5. Polimerik desteğin karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit ile aktifleştirilmesi ve polimerik desteğe enzim bağlanması

4.6. β -Galaktosidazın Aktiflik Tayini

4.6.1. Serbest β -galaktosidaz enziminin aktiflik tayini

β -Galaktosidazın aktifliği Hernaiz ve Crout tarafından tanımlanan metoda göre tayin edildi [26]. Bunun için reaksiyon balonuna 20 μ L enzim çözeltisi (0,0015 mM) ve 200 μ L P-nitrofenil- β -D-galaktosid (substrat çözeltisi, 5mM) eklendi ardından 30 °C de 10 dakika çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Su banyosundan alınarak balon içerisine 3,9 mL Na_2CO_3 çözeltisi ilave edildi. Ardından U.V. spektrofotometresi yardımı ile 398 nm de BR tamponuna (pH:5) karşı absorbansı değeri ölçüldü. Tepkime hızı, ölçülen absorbans değerleri ve kalibrasyon eğrisinin eğiminden faydalanarak aşağıdaki bağıntıya göre hesaplandı.

$$\text{Hiz(V)} = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{398}}{\Delta t} * \frac{\Delta C}{\Delta A_{398}}$$

Bu eşitlikte ΔC , g/ mL olarak P-nitrofenil- β -D-Galaktosid derişimindeki değışimi gösterir, ΔA_{398} ($A_0 - A_t$) absorbanstaki, Δt zamandaki değışimi gösterir.

β -Galaktosidaz için 1 ünite enzim veya birim aktiflik, pH 5 de 10 dakikada ve 30 °C de 1 μ mol p-nitrofenil- β -D-galaktosidi parçalayan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

4.6.2. Immobilize β -galaktosidaz enziminin aktiflik tayini

İmmobilize β -galaktosidaz enziminin aktifliği Bölüm 4.6.1' de belirtilen işlemler serbest enzim yerine üç adet immobilize enzimden oluşan küre kullanılarak aynı şekilde tayin edildi.

4.7. Enzim Aktifliğine pH Etkisi

4.7.1. Serbest β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisi

Serbest β -galaktosidaz enziminin aktifliğine pH etkisini incelemek amacı ile çeşitli pH değerlerinde (3,5 - 7,0) BR tamponunda çözünen enzim ve p-nitrofenil- β -D-galaktosid (200 μ L, 5 mM) çözeltileriyle Bölüm 4.6.1'de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilmek suretiyle enzim aktifliği tayin edildi.

4.7.2. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacı ile çeşitli pH larda (3,5-7,0) Bölüm 4.6.1'de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

4.7.3. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine pH etkisini incelemek amacı ile çeşitli pH larda (3,5-7,0) Bölüm 4.6.1'de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

4.8. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

4.8.1. Serbest β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile çeşitli sıcaklık değerlerinde (25°C-45°C) Bölüm 4.6.1'de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

4.8.2. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

İmmobilize edilen β -galaktosidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile çeşitli sıcaklık değerlerinde (25 °C- 45°C) Bölüm 4.6.1’de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

4.8.3. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

İmmobilize edilen β -galaktosidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile çeşitli sıcaklık değerlerinde (25 °C- 45°C) Bölüm 4.6.1’de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

4.9. Enzim Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

4.9.1. Serbest β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest β -galaktosidaz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile farklı derişimlerde (2,000-0,031 mM) hazırlanan substrat çözeltileri ile Bölüm 4.6.1’de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflikleri tayin edildi.

4.9.2. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

İmmobilize β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile farklı derişimlerde (2,000-0,031 mM) hazırlanan substrat çözeltileri ile Bölüm 4.6.1’de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflikleri tayin edildi.

4.9.3. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

İmmobilize β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile farklı derişimlerde (2,000-0,031 mM) hazırlanan substrat çözeltileri ile Bölüm 4.6.1’de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayin edildi.

4.10. Depolama Kararlılığı

4.10.1. Serbest β -galaktosidaz enziminin depolanma kararlılığı

Serbest β -galaktosidaz enziminin depolama kararlılığı incelemek amacı ile BR tamponunda (pH:5) hazırlanan enzim çözeltisi buzdolabında 4°C de saklandı. Enzim çözeltilerinden belirli aralıklarda alınan örneklerle Bölüm 4.6.1’de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflikleri tayin edildi.

4.10.2. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı

Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin depolama kararlılığını incelemek amacı ile buzdolabında 4 °C de saf suda (ıslak) bir steril petri kabında saklandı. Belirli aralıklarda alınan örneklerden yola çıkarak Bölüm 4.6.1’de belirtilen yöntem uygulanmak suretiyle aktiflikleri tayin edildi.

4.10.3. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı

Karbodiimit kullanılarak immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin depolama kararlılığını incelemek amacı ile buzdolabında 4 °C de saf suda (ıslak) steril petri kabında saklandı. Belirli aralıklarda alınan örneklerden yola çıkarak Bölüm 4.6.1’de belirtilen yöntem uygulanmak suretiyle aktiflikleri tayin edildi.

4.11. Tekrar Kullanılabilirlik

4.11.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın tekrar kullanılabilirliği

İmmobilize β -galaktosidaz enziminin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla belli aralıklarla Bölüm 4.6.1’de verilen yöntem ile enzim aktiflikleri tayin edildi.

4.11.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın tekrar kullanılabilirliği

İmmobilize β -galaktosidaz enziminin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla belli aralıklarla Bölüm 4.6.1’de verilen yöntem ile enzim aktiflikleri tayin edildi.

4.12. Termal İnaktivasyon

4.12.1. Serbest β -galaktosidaz enziminin termal inaktivasyonu

Serbest β -galaktosidaz enziminin termal inaktivasyonunu değerlendirmek amacı ile 45°C sıcaklıkta farklı zaman aralıklarında (10-20-30-40-50-60 dakika) tutulan enzim çözeltilerinin aktiflikleri Bölüm 4.6.1’de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek enzim aktiflikleri tayin edildi.

4.12.2. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın termal inaktivasyonu

Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin termal inaktivasyonunu incelemek amacı ile 45°C sıcaklıkta farklı zaman aralıklarında (10-20-30-40-50-60 dakika) tutulan örnekler kullanılarak Bölüm 4.6.1’de belirtilen yöntem yardımıyla aktiflikleri tayin edildi.

4.12.3. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın termal inaktivasyonu

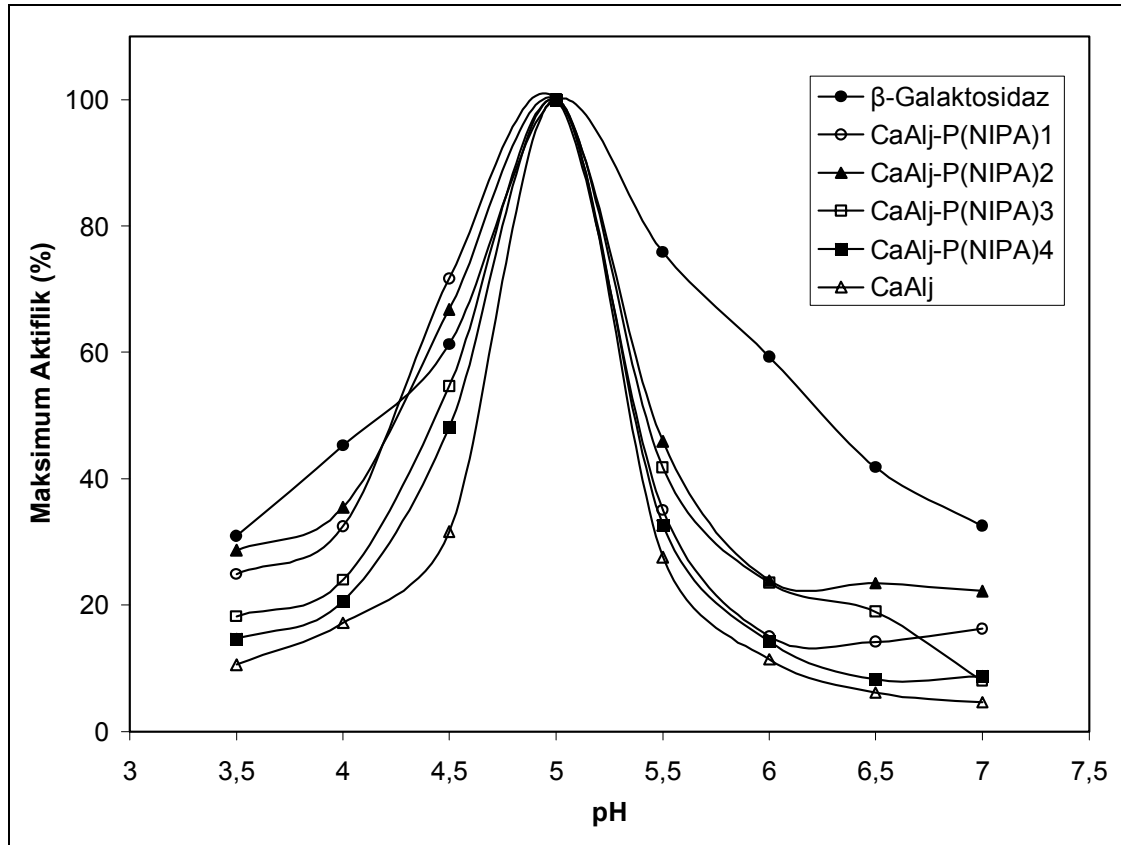
Karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit kullanılarak immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin termal inaktivasyonunu incelemek amacı ile 45°C sıcaklıkta farklı zaman aralıklarında (10-20-30-40-50-60 dakika) tutulan örnekler kullanılarak Bölüm 4.6.1'de belirtilen yöntem yardımıyla aktiflikleri tayin edildi.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. Aktifliğe pH Etkisi

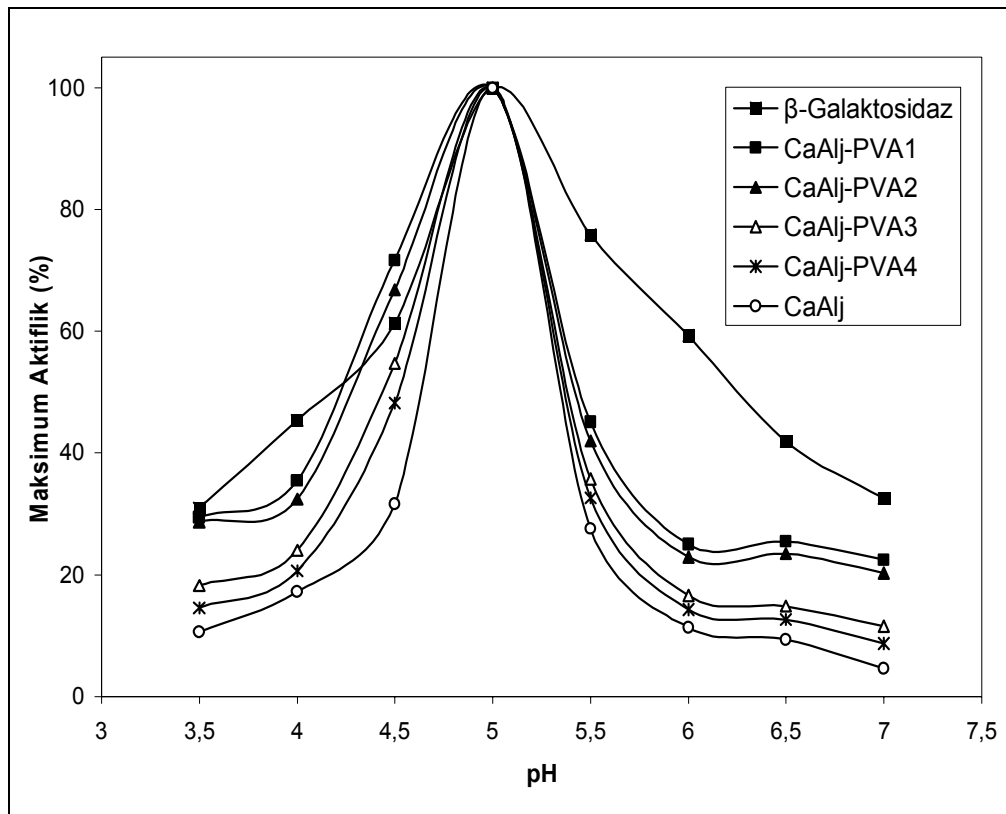
5.1.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisi

Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişim grafiği Şekil 5.1 verildi. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimi için optimum pH değeri değişmedi ve 5,0 olarak bulundu.



Şekil 5.1. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsedme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişim grafiği Şekil 5.2' de verildi. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsedme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimi için optimum pH değeri değişmedi ve 5,0 olarak bulundu.



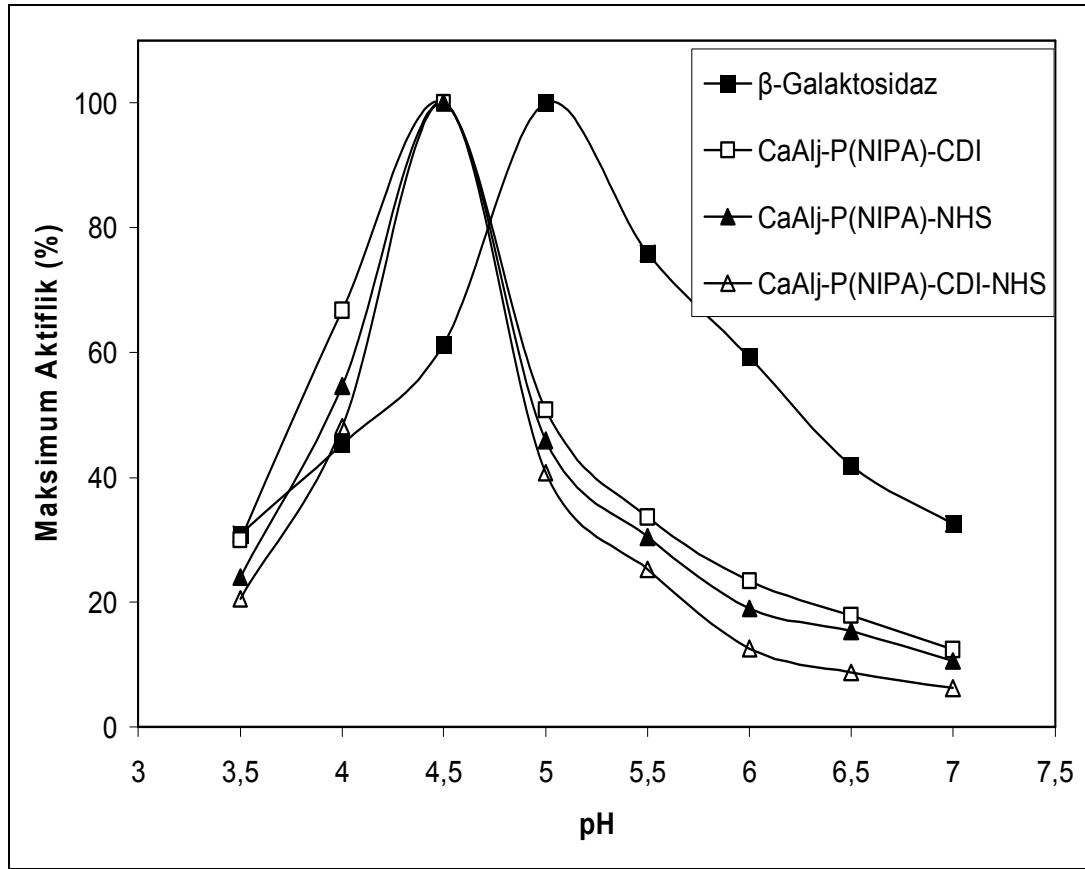
Şekil 5.2. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsedme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

Enzimler protein yapısındaki moleküller oldukları için katalitik aktiflikleri çevre koşullarından önemli ölçüde etkilenmektedir. Bunlardan biriside ortamın pH'sıdır. Bir enzimin optimum pH, reaksiyon süresi, sıcaklık, substrat yapısı ve derişim, kullanılan tampon türü ve derişim ortamının iyonik şiddeti, enzimin saflığı gibi bir seri deneysel parametreye bağımlı bir değişkendir. Biyokimyasal tepkimeler invivo koşullarda gerçekleştiğinden pH enzimin yük durumunu dolayısıyla da aktivitesini etkiler.

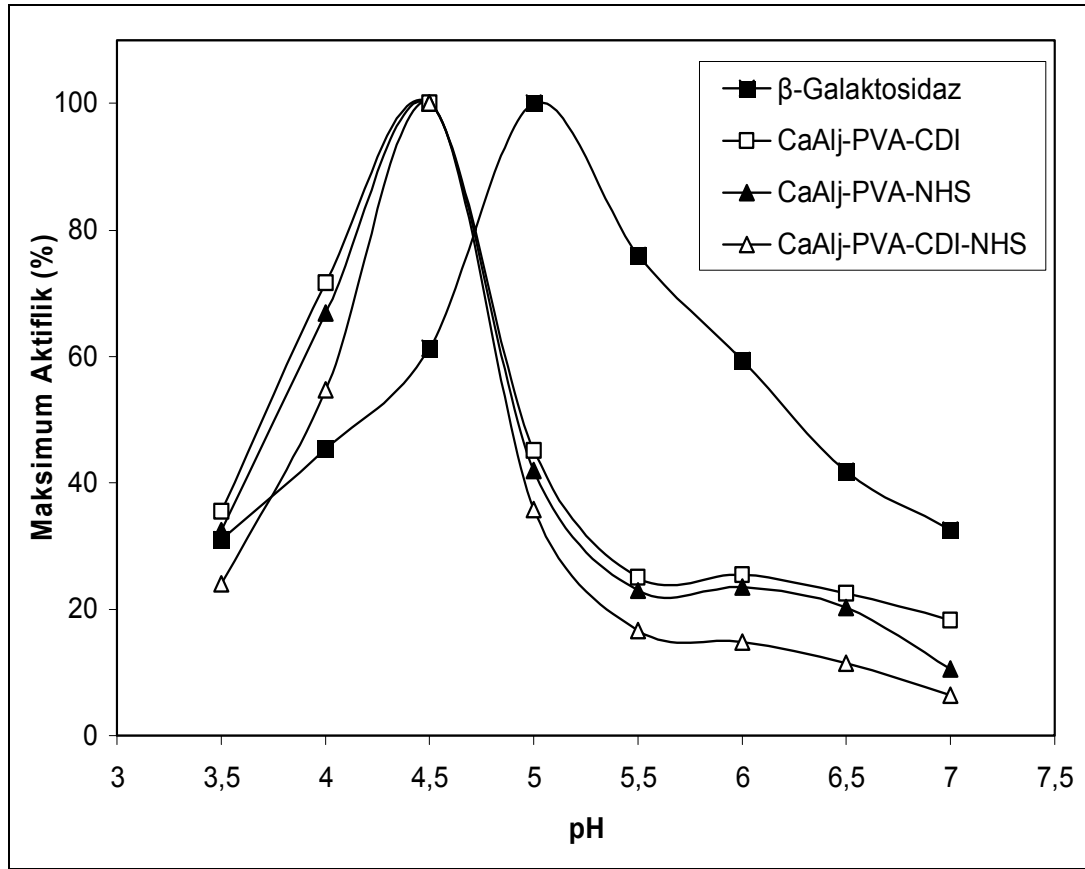
pH etkisi özellikle şu sonuçlara neden olmaktadır: enzimin tersinir olmayan denatürasyonu ve optimum pH bölgesi dışında koenzim veya prostetik grupların aktif merkezden ayrılmasıdır. H^+ iyonu derişimindeki değişme özellikle aktif merkezinde asidik veya bazik gruplar taşıyan enzimler, hidrolaz için çok etkindir ve enzimin aktiflik gösterdiği pH skalası oldukça dardır. Pek çok enzimin optimum pH değeri 7,0 civarındadır. Çok asidik veya çok bazik ortamlarda enzim denatüre olacağından reaksiyon hızı tersinmez olarak azalır ve sıfıra kadar düşebilir. Şekillerden de görüldüğü gibi serbest β -galaktosidazın aktifliğinde asidik ve bazik bölgelerde azalmalar gözlenmiştir. pH daki kayma aynı zamanda enzim tepkimesinin tipine ve matriksin yapısına da bağlıdır. Diffüzyonel sınırlamalar nedeniyle de ana çözeltinin pH sı tepkimenin meydana geldiği matriks çevresinin pH değerinden oldukça farklı olabilir [38]. Diğer taraftan, enzim ile polimerik destek maddesi arasında oluşabilecek farklı etkileşim kuvvetlerinde (hidrojen bağı oluşumu, dipol-dipol etkileşimi gibi) pH değerini etkilediği bilinmektedir [39].

5.1.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisi

Serbest ve farklı polimerler kullanılarak kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisini incelemek amacı ile Bölüm 4.6.1 de anlatılan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerlerinin pH ile değişimi Şekil 5.3 ve Şekil 5.4' de verildi. Serbest β -galaktosidaz enzimi için optimum pH değerleri 5,0 olarak bulundu. CaAlj-PVA ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimi için optimum pH değerleri 4,5 olarak bulundu. Immobilize edilen enzimin pH değerlerinin 4,5' a kaymasının nedeni ise immobilize edilen sistemlerinde matriks ile enzim arasındaki ikincil etkileşimler (hidrojen bağı, iyonik polar etkileşimler) sonucu olabilir.



Şekil 5.3. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi



Şekil 5.4. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

5.2. Enzim Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Enzimlerin katalitik aktifliği sıcaklığa bağlıdır. Enzimlerde katalitik aktiflik limit sıcaklıklarının üzerindeki değerlerde enzim protein yapısında meydana gelen denatürasyondan dolayı aktiflikte düşme gözlenir. Sıcaklığın artması, moleküllerin kinetik enerjisini artırdığından dolayı tüm kimyasal tepkimelerin ve biyokimyasal tepkimelerin hızlarını artırır. Genelde sıcaklığın 10 °C artmasıyla, tepkime hızları da yaklaşık olarak iki kat artar. Sıcaklık arttıkça enzim molekülünün önce tersiyer yapısı, sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapısı) bozulur. Bu olaylardan enzimin aktif merkezi de etkilenir ve enzim aktifliğini yitirir [39].

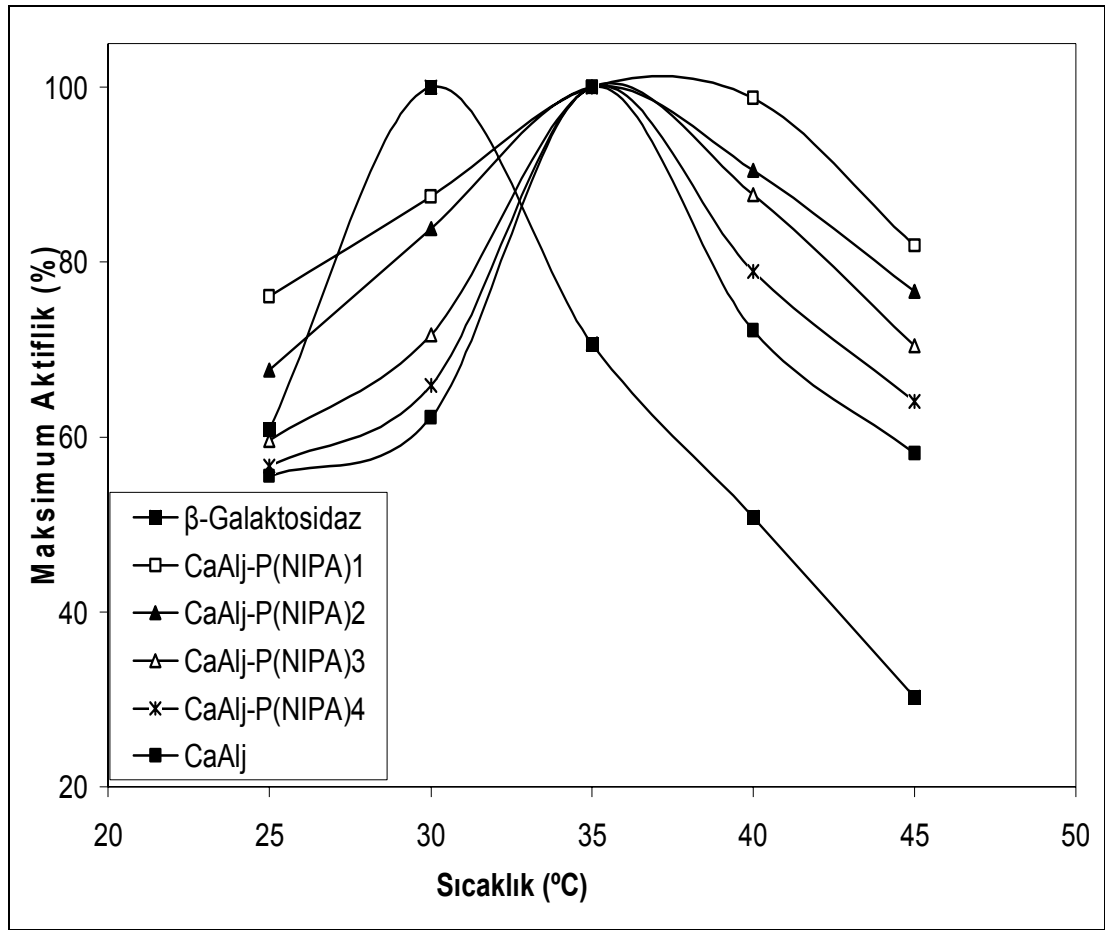
Serbest ve immobilize enzimlerin aktifliklerine sıcaklığın etkisi genellikle optimum eğrileri çizilerek izlenmektedir. Maksimum aktifliğin sıcaklıkla değişimini gösteren bu grafikten enzim için optimum sıcaklık değeri belirlenir.

Genellikle inkübasyon süresi arttıkça termal denatürasyon nedeniyle optimum sıcaklık değeri düşer. İmmobilizasyon sonrasında enzimin optimum sıcaklığı genellikle değişir.

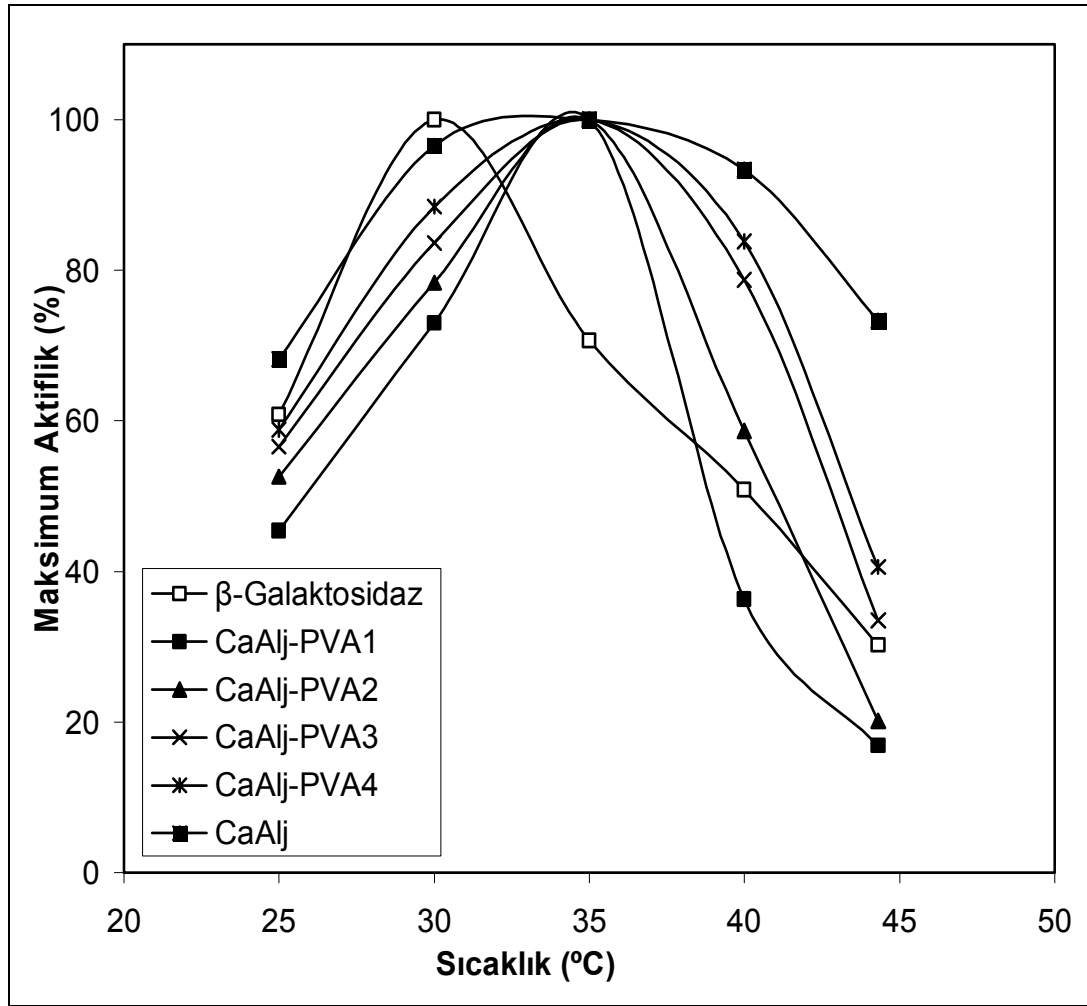
Enzimler protein yapısında büyük ve oldukça komplike moleküllerdir. Aktifliğin korunması için üç boyutlu yapısı korunmalıdır. Aktiviteye etki eden önemli parametrelerden biride sıcaklıktır. Reaksiyon hızı sıcaklık arttıkça artar. Fakat belirli sıcaklıktan sonra enzim proteinin denatürasyonundan dolayı aktiflikte düşme olur. Enzimin maksimum aktiflik gösterdiği sıcaklık (optimum sıcaklık) özellikle operasyonel bir parametre olması açısından önemlidir.

5.2.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile Bölüm 4.6.1' de anlatılan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerlerinin sıcaklık ile değişiminden elde edilen sonuçlar Şekil 5.5 - 5.6' da verildi. Serbest β -galaktosidaz için optimum sıcaklık değeri 30°C olarak bulundu. CaAlj-PVA ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin ise optimum sıcaklık değerleri 35°C olarak bulundu.



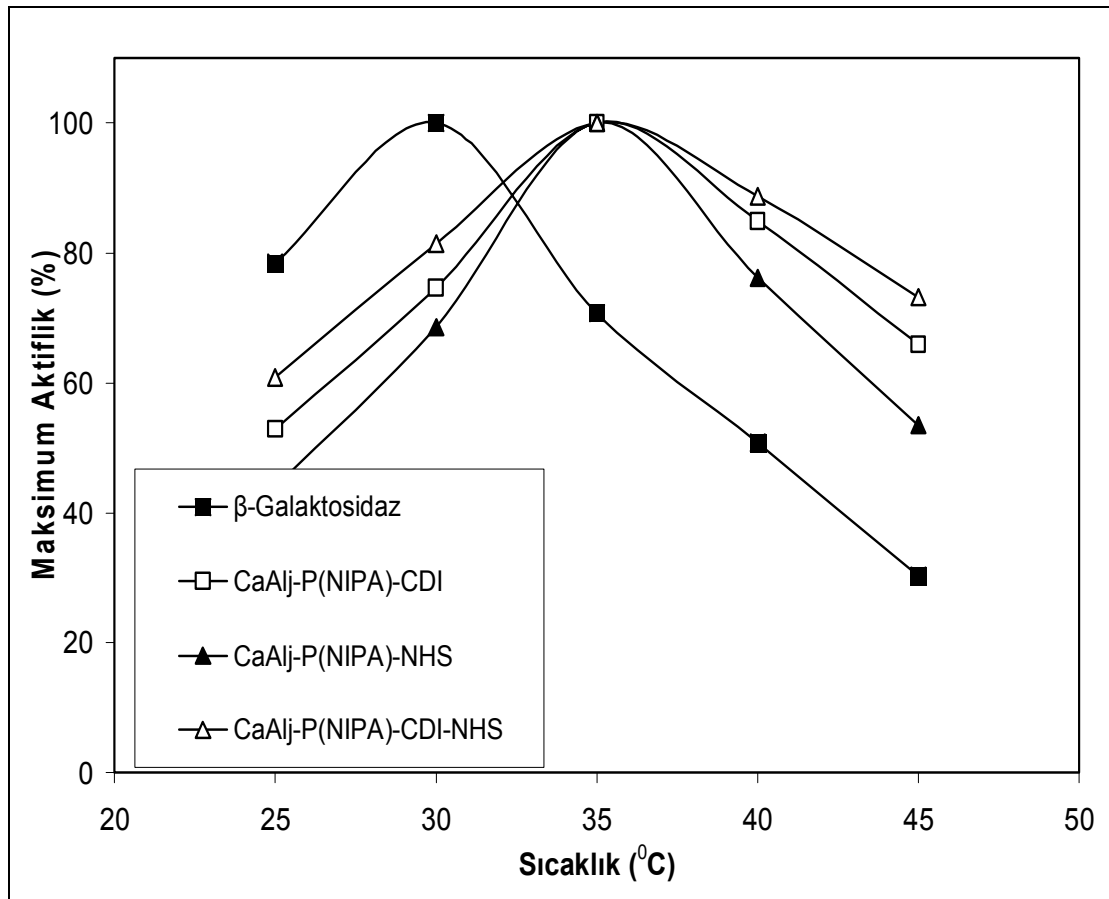
Şekil 5.5. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi



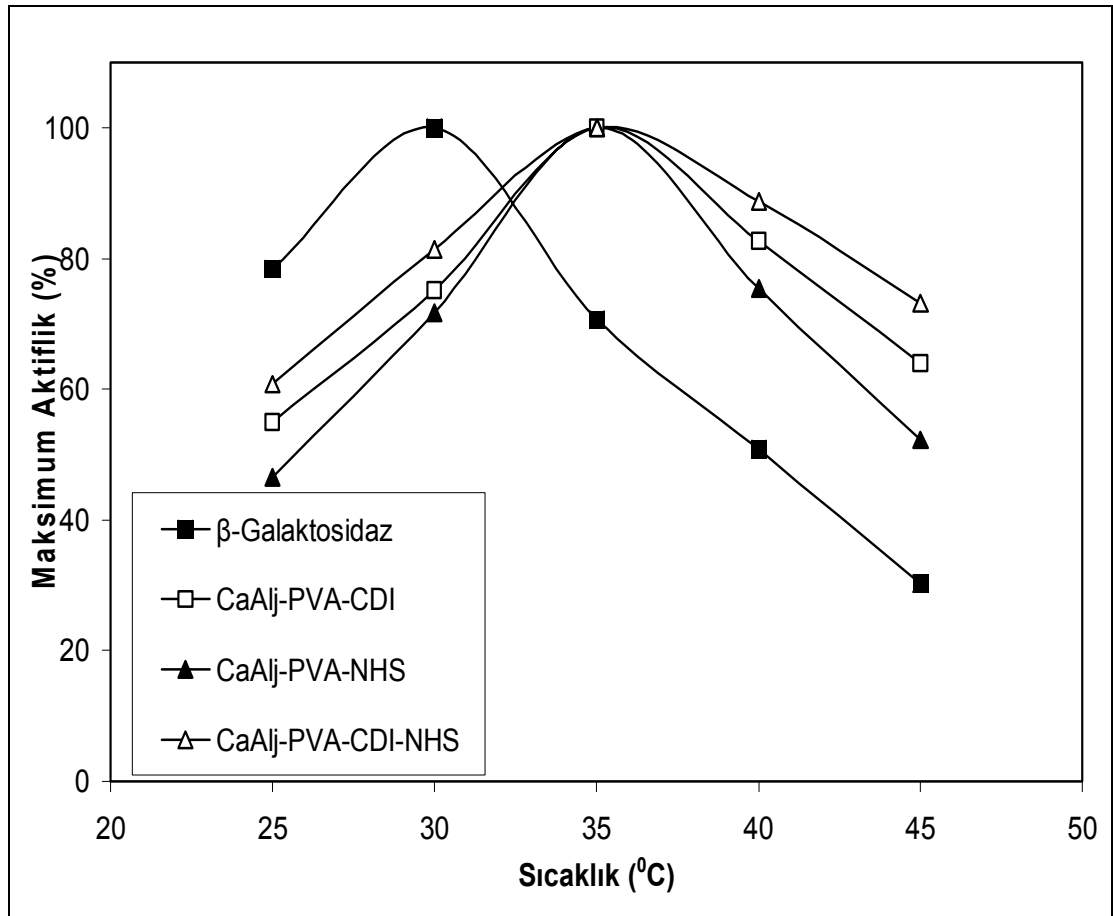
Şekil 5.6. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β-galaktosidazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi

5.2.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest ve kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile Bölüm 4.6.1' de anlatılan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerlerinin sıcaklık ile değişiminden elde edilen sonuçlar Şekil 5.7 - 5.8' de verildi. Serbest β -galaktosidaz için optimum sıcaklık değeri 30°C olarak bulundu. CaAlj-PVA ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin ise optimum sıcaklık değerleri 35°C olarak bulundu.



Şekil 5.7. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi



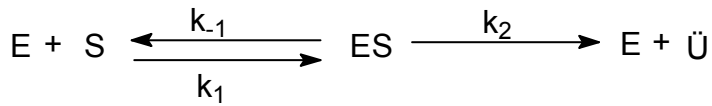
Şekil 5.8. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi

Serbest β -galaktosidaz enziminin optimum sıcaklık değeri 30°C iken CaAlj-PVA ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme ve kovalent bağlanma yöntemleriyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimlerinin optimum pH değeri 35°C ye yükseldi. Dolayısıyla serbest enzime göre immobilize enzim sıcaklığa karşı daha dayanıklı hale geldi. Enzim ile polimerik destek arasında kovalent bağların oluşması enzim hareketlerinde konformasyonel sınırlamaların doğmasına neden olabilir ve optimum sıcaklıkta artış gözlemlenebilir. Dolayısıyla enzim katalitik aktifliğini gösterebilmek için daha büyük aktifleşme enerjisine sahip olabilir.

5.3. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi incelenmiş ve çeşitli substrat derişimlerinde (2,000-0,0312 mM) hesaplanan K_m ve V_{mak} değerleri çizelgelerde verilmiştir.

Enzim-substrat (ES) reaksiyonu aşağıda gösterildiği gibidir.



Bu eşitlikte E= Enzim, S= Substrat, ES= Enzim-substrat kompleksi, $\ddot{U}$ = Ürünü gösterir.

Enzim reaksiyon hızı Michaelis-Menten Eşitliği ile verilir.

$$V = \frac{V_{mak} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{Michaelis-Menten Eşitliği} \quad (5.1)$$

Michaelis-Menten Eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk bağıntısı elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{mak}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{mak}} \quad (5.2)$$

Bu eşitliklerde; V= Başlangıç hızı, V_{mak} = Maksimum hızı, K_m =Michaelis sabiti, S=substrat derişimi olarak belirtilir.

İmmobilizasyon sırasında enzim proteinindeki konformasyonel değişiklikler, sterik etkiler, mikroçevre etkileri ve difüzyon etkileri immobilize enzimlerin serbest enziminkinden farklı kinetik davranışlar göstermesine neden olurlar.

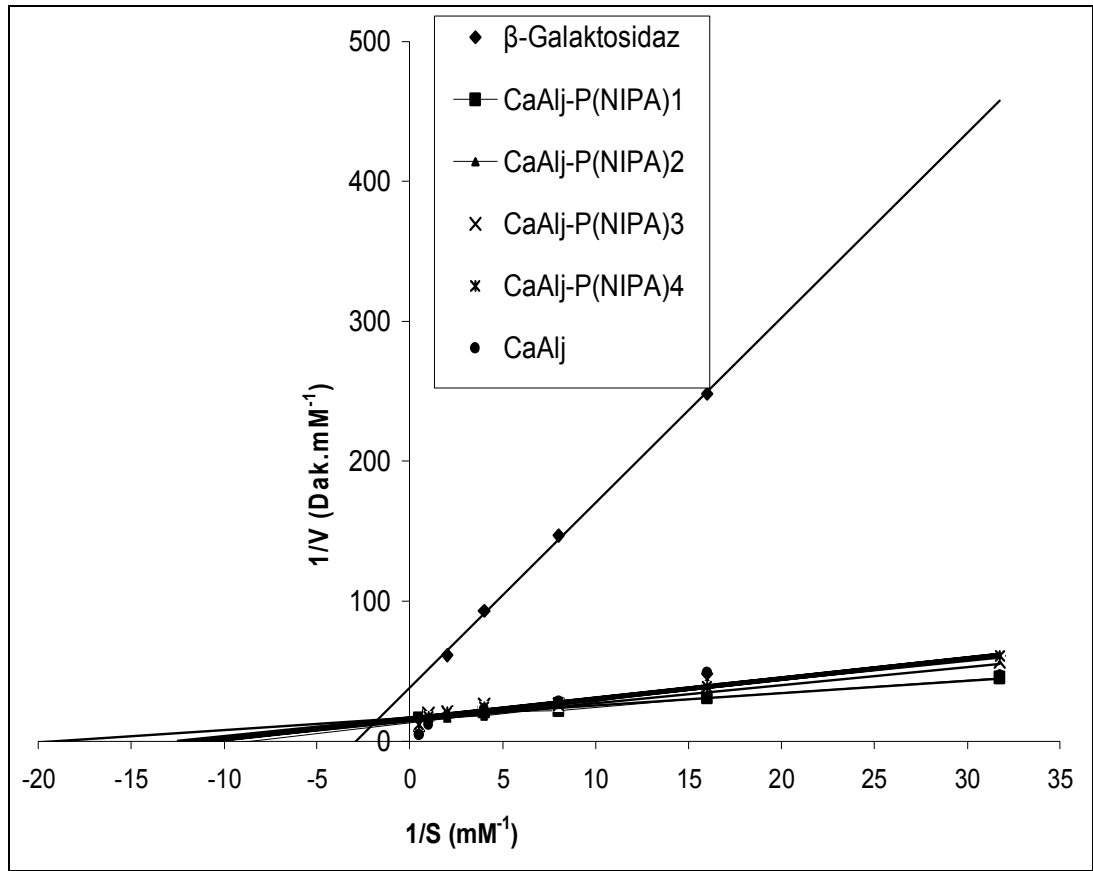
O nedenle immobilize enzimlerin kinetik davranışlarının incelenmesi, kinetik sabitlerin tayini ve serbest enzimle kıyaslanması oldukça önemlidir.

Bu değerlerin üzerindeki derişimlerde aktiflikte belirgin değışiklikler gözlenmemektedir.

İmmobilize enzimin K_m değeri serbest enzime göre daha yüksektir. K_m 'deki bu artışın nedeni, uygulanan immobilizasyon işleminde enzimin yapısal bir değışikliğı uğramasının doğal bir sonucu olabileceğı ya da substratın immobilize enzimin aktif merkezine yaklaşmasının zor olduğı şeklinde açıklanabilir.

5.3.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğıne substrat derişiminin etkisi.

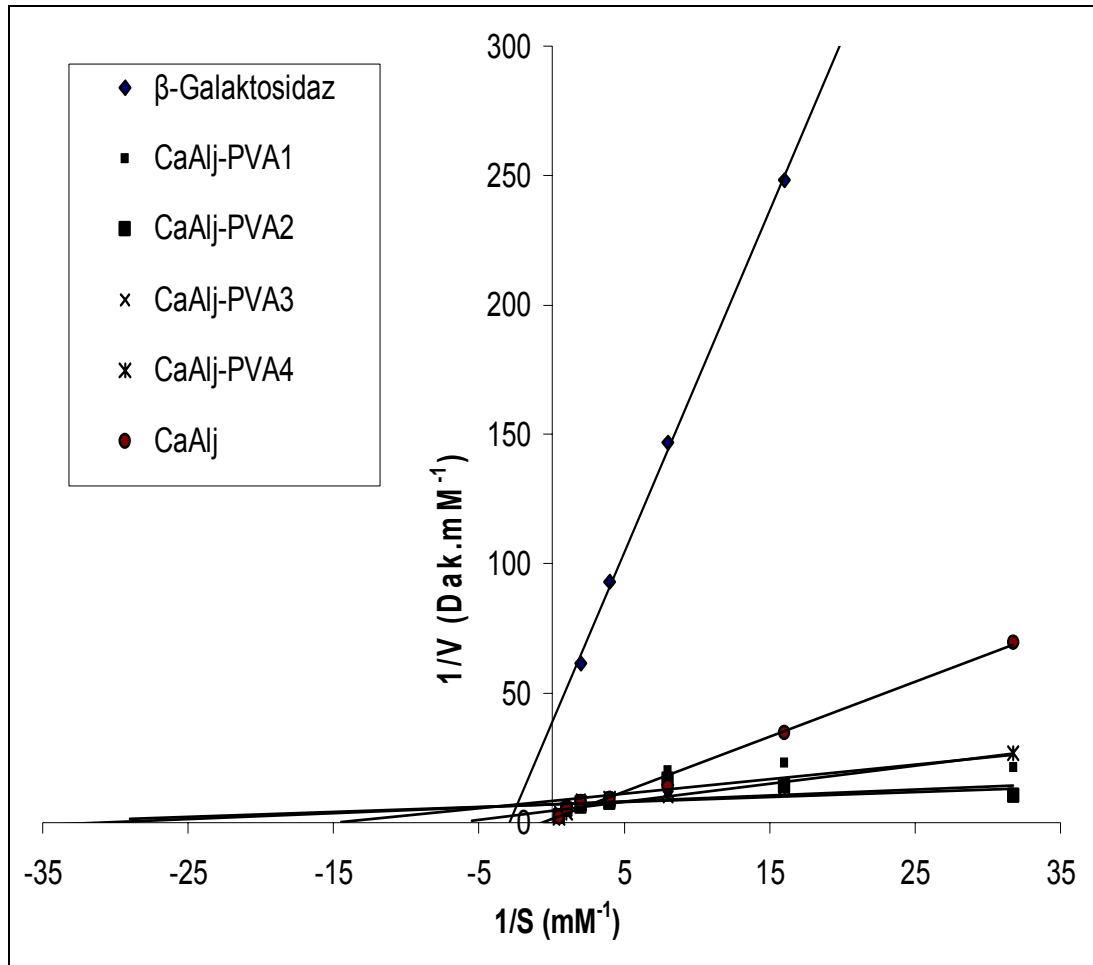
Serbest ve hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğıne substrat derişiminin etkisini araştırmak amacıyla 2,000-0,031 mM p-nitrofenil- β -D-galaktosid derişim aralığı kullanılarak hazırlanan substrat çözeltileriyle Bölüm 4.6.1' de anlatılan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda elde edilen absorbans değerlerinden ve kalibrasyon grafiklerinin yardımıyla hesaplanan reaksiyon hızlarından yararlanılarak çizilen Lineweaver-Burk doğruları Şekil 5.9-5.10' da verildi. Grafikten immobilize enzimlerin kinetik parametreleri yani K_m ve V_{mak} değerleri hesaplandı ve Çizelge 5.1-5.2' de verildi. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen sistemlerde difüzyonel etkiler sebebiyle K_m ve V_{mak} değerlerinde değışiklikler gözlendi.



Şekil 5.9. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaza ait Lineweaver- Burk grafiği

Çizelge 5.1. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın kinetik parametreleri

Destek	K_m (mM)	V_{mak} (mM.dak ⁻¹)
Serbest β -Galaktosidaz	0,343	0,0259
CaAlj-P(NIPA)1	2,401	0,059
CaAlj-P(NIPA)2	1,543	0,077
CaAlj-P(NIPA)3	1,467	0,055
CaAlj-P(NIPA)4	1,210	0,091
CaAlj	1,088	0,088



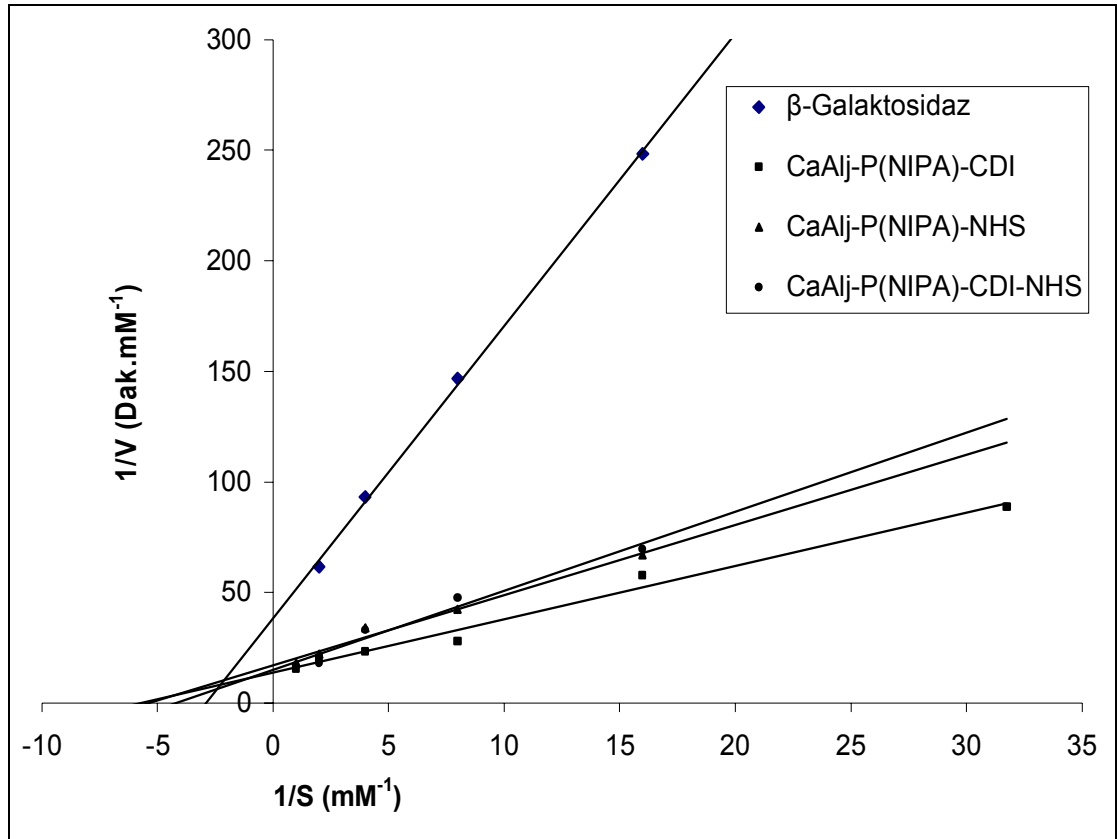
Şekil 5.10. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaza ait Lineweaver- Burk grafiği

Çizelge 5.2. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın kinetik parametreleri

Destek	K_m (mM)	V_{mak} (mM.dak ⁻¹)
Serbest β -Galaktosidaz	0,343	0,0259
CaAlj-PVA1	1,367	0,1212
CaAlj-PVA2	1,882	0,1448
CaAlj-PVA3	1,884	0,1436
CaAlj-PVA4	0,9627	0,2328
CaAlj	0,746	0,4371

5.3.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

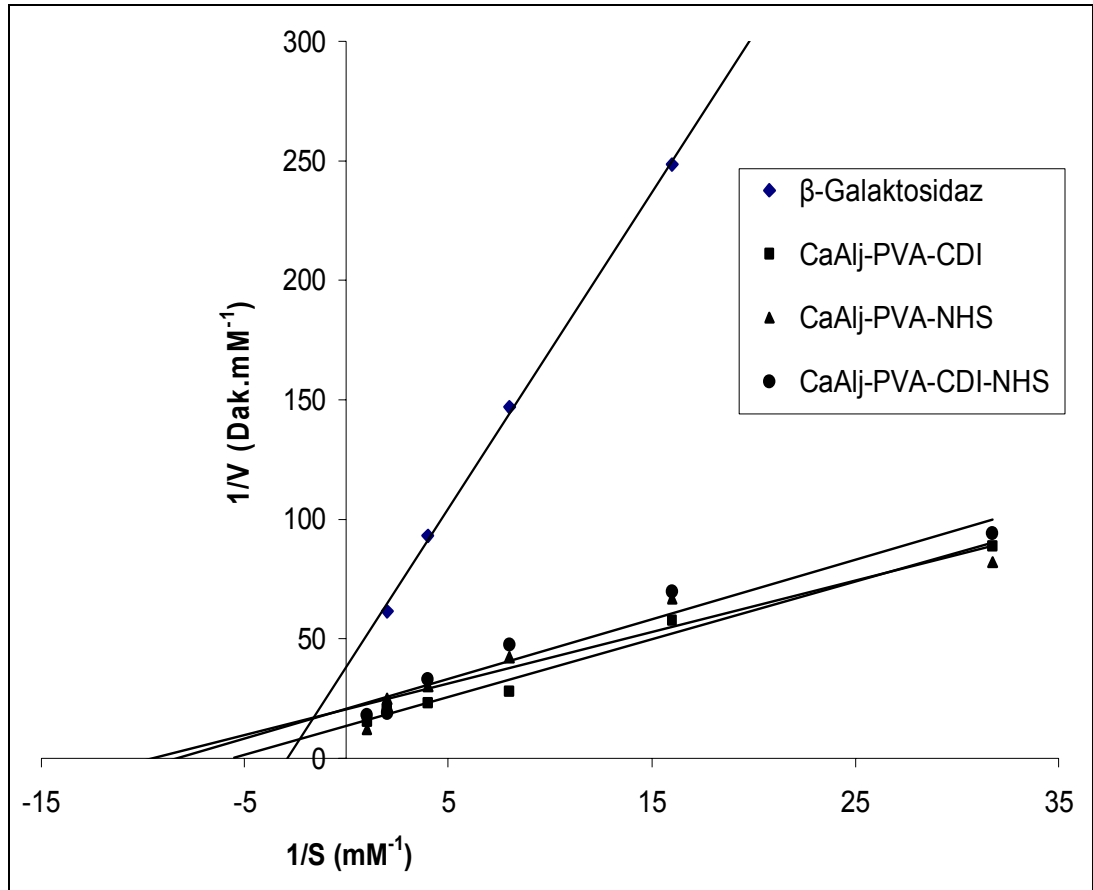
Serbest ve kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini araştırmak amacıyla çeşitli derişimlerde hazırlanan substrat çözeltileriyle Bölüm 4.6.1' de anlatılan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen reaksiyonlardan ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen eğimler yardımıyla hesaplanan reaksiyon hızlarından yararlanılarak Linewear- Burk grafiği Şekil 5.11 - 5.12' de verildi. Grafikten yararlanarak K_m ve V_{mak} değerleri hesaplandı ve Çizelge 5.3 - 5.4' de verildi. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen sistemlerde difüzyonel etkiler sebebiyle K_m ve V_{mak} değerlerinde değişiklikler gözlemlendi.



Şekil 5.11. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaza ait Linewear- Burk grafiği

Çizelge 5.3. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın kinetik parametreleri

Destek	K_m (mM)	V_{mak} (mM.dak ⁻¹)
Serbest β -Galaktosidaz	0,343	0,0259
CaAlj-(NIPA)-CDI	1,296	0,0103
CaAlj-(PNIPA)-NHS	0,957	0,0058
CaAlj-(PNIPA)-CDI-NHS	0,846	0,0049



Şekil 5.12. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaza ait Lineweaver- Burk grafiği

Çizelge 5.4. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -Galaktosidazın kinetik parametreleri

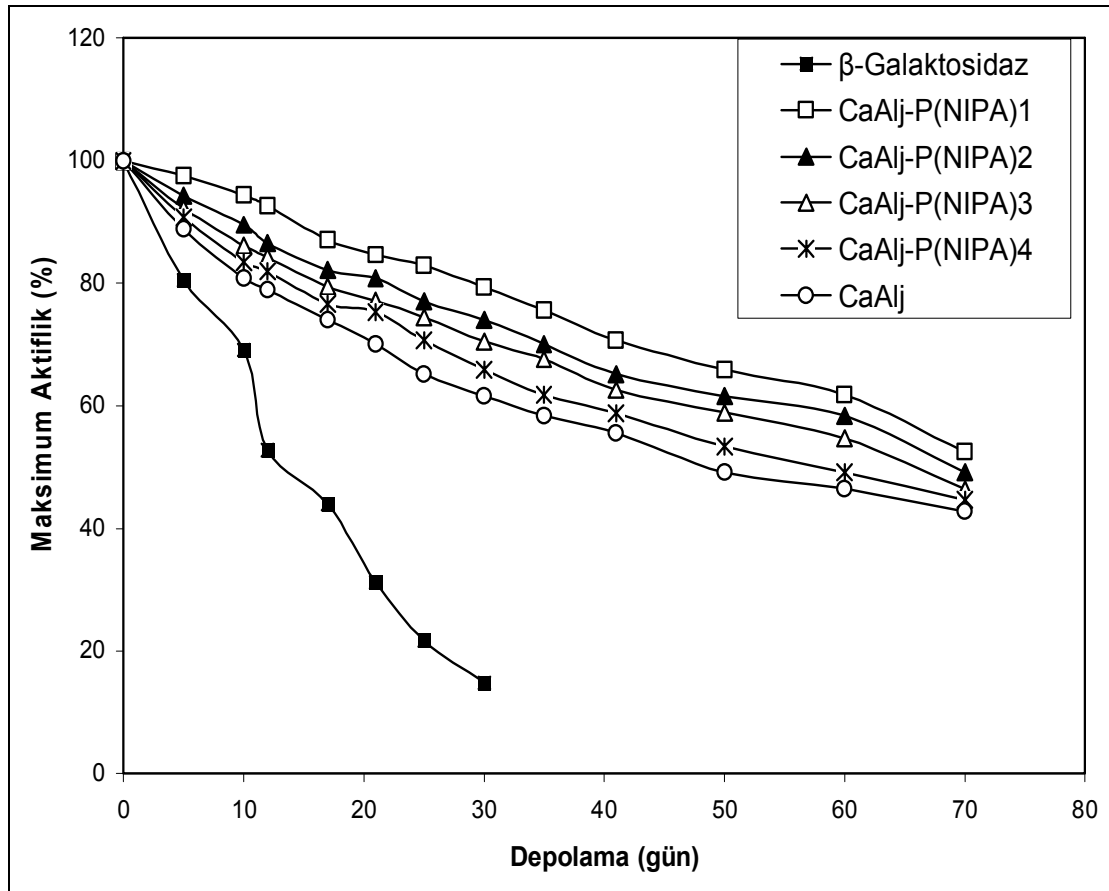
Destek	K_m (mM)	V_{mak} (mM.dak ⁻¹)
Serbest β -Galaktosidaz	0,343	0,0259
CaAlj-PVA-CDI	0,905	0,056
CaAlj-PVA-NHS	4,971	0,7908
CaAlj-PVA-CDI+NHS	3,364	0,7997

Serbest ve immobilize β -Galaktosidaz enzimlerinin $1/S$ nin $1/V$ ye karşı grafiğe geçirilmesiyle kinetik parametreleri hesaplandı. Serbest β -Galaktosidaz enzimi için K_m değeri 0,343 mM ve V_{mak} değeri 0,0259 mM.dak⁻¹ olarak bulundu. İmmobilizasyonla K_m değerlerinde bir artma gözlemlendi. Substrat ve polimerik destek arasındaki etkileşimle, substrat-enzim kompleks oluşum ihtimalini düşüren enzimdeki yapısal değişikliklerle, sterik etkilerle, diffüzyonel sınırlamalarla K_m değişebilir ve genellikle immobilizasyonla K_m değerlerinde artma gözlemlenebilir.

5.4. Serbest ve İmmobilize β -Galaktosidazın Depolama Kararlılığı

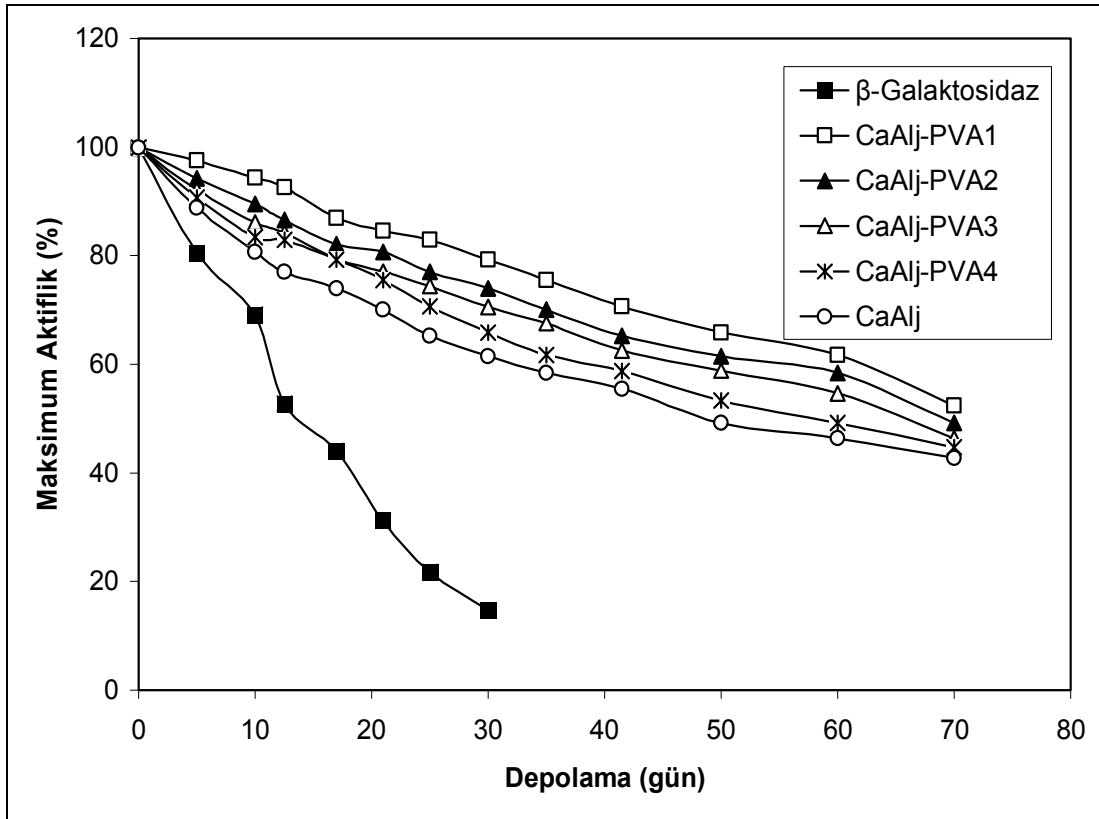
5.4.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı

Serbest ve hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı Bölüm 4.6.1' de açıklandığı gibi gerçekleştirildi ve sonuçlar Şekil 5.13 - 5.14' de verildi. Serbest β -Galaktosidazın depolama kararlılığı oldukça iyi olup 30. gün sonunda hala aktifliğinin yaklaşık %15'ini koruduğu görüldü. CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimlerinin ise 30. gün sonunda hala aktifliklerinin %62 - %82 arasında değişen oranlarda koruduğu belirlendi.



Şekil 5.13. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β-galaktosidazın depolama kararlılığı

CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β-galaktosidaz enzimlerinin ise 60. gün sonunda hala aktifliklerinin %50 - %60 arasında değişen oranlarda koruduğu belirlenmiştir.



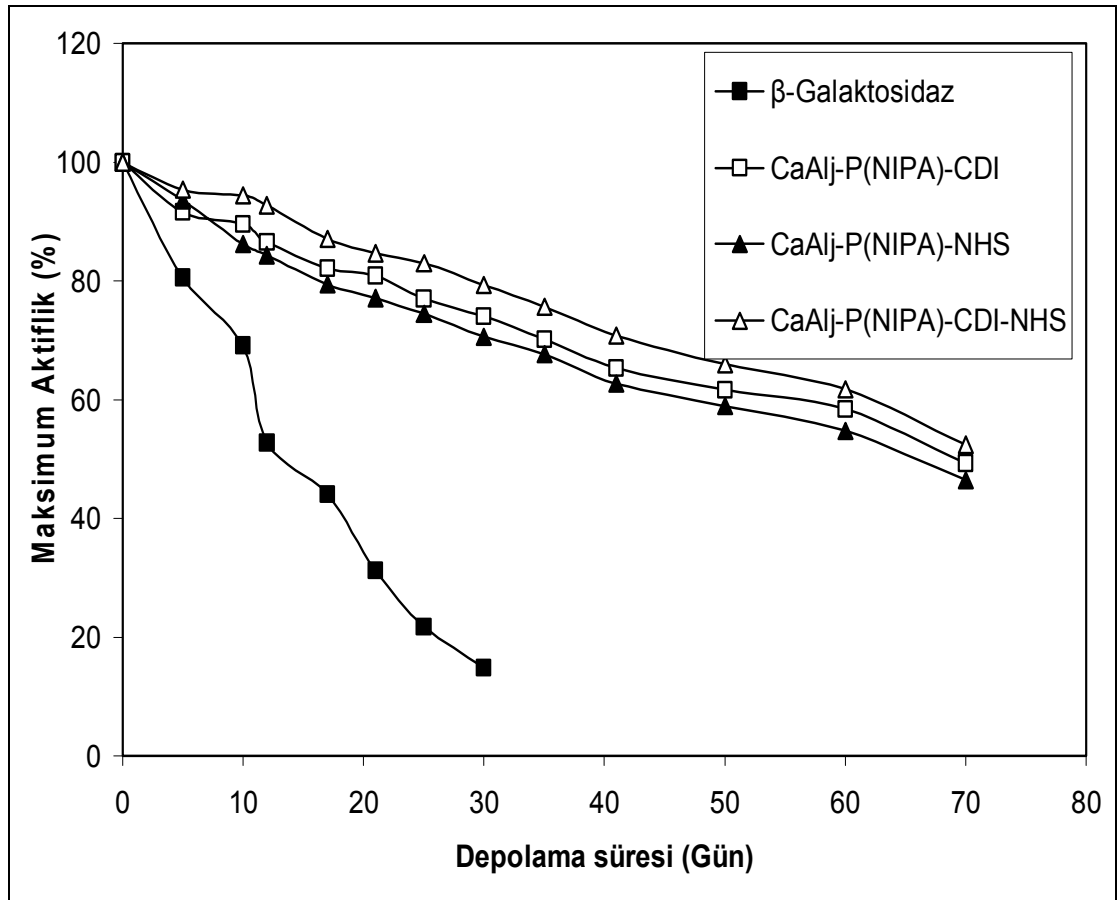
Şekil 5.14. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı

CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimlerinin ise 30. gün sonunda hala aktifliklerinin %61 - %80 arasında değişen oranlarda koruduğu belirlendi.

CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimlerinin ise 60. gün sonunda hala aktifliğinin %45 - %55 arasında değişen oranlarda koruduğu gözlemlendi.

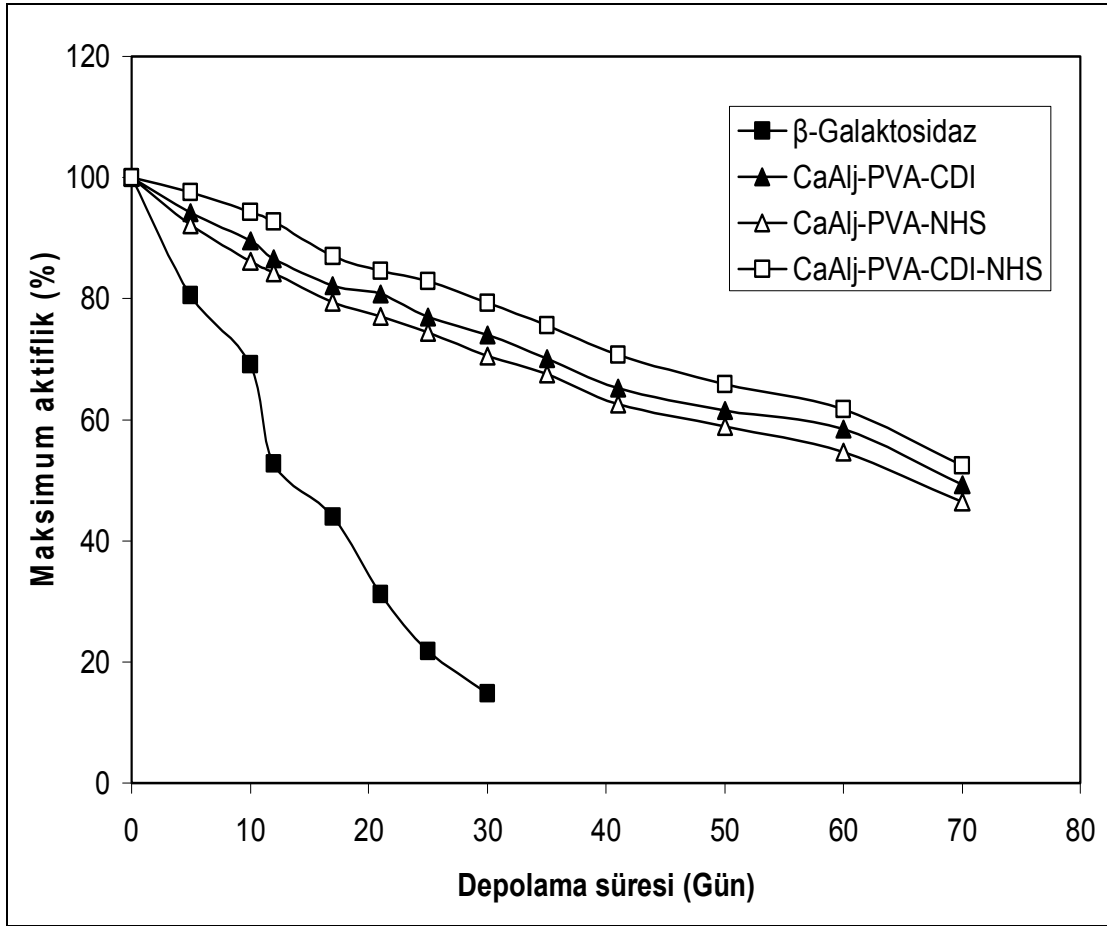
5.4.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı

Serbest ve kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı Bölüm 4.6.1' de açıklandığı gibi gerçekleştirildi ve sonuçlar Şekil 5.15 - 5.16' da verildi.



Şekil 5.15. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı

CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilip farklı aktifleştiricilerle aktifleştirilen β -galaktosidaz enzimlerin 60. gün sonunda hala aktifliklerini yaklaşık %60 oranında koruduğu belirlendi.



Şekil 5.16. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı

CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilip farklı aktifleştiricilerle aktifleştirilen β -galaktosidaz enzimlerinin 60. gün sonunda hala aktifliklerini yaklaşık %60 oranında koruduğu belirlendi.

Depolama kararlılığı enzimin saklama koşullarına bağlı bir parametredir. Genellikle suda çözünmez enzim preparatları ya da kuru olarak steril petri kaplarında ya da tampon çözeltilerin içinde süspansiyon şeklinde 4°C de saklanabilir. Kovalent bağlanma ve hapsedme yöntemleriyle immobilize edilen β -Galaktosidaz enzimi 4°C de deiyonize su içerisinde saklandığında enzimin aktifliğini uzun süre koruduğu gözlenmiştir.

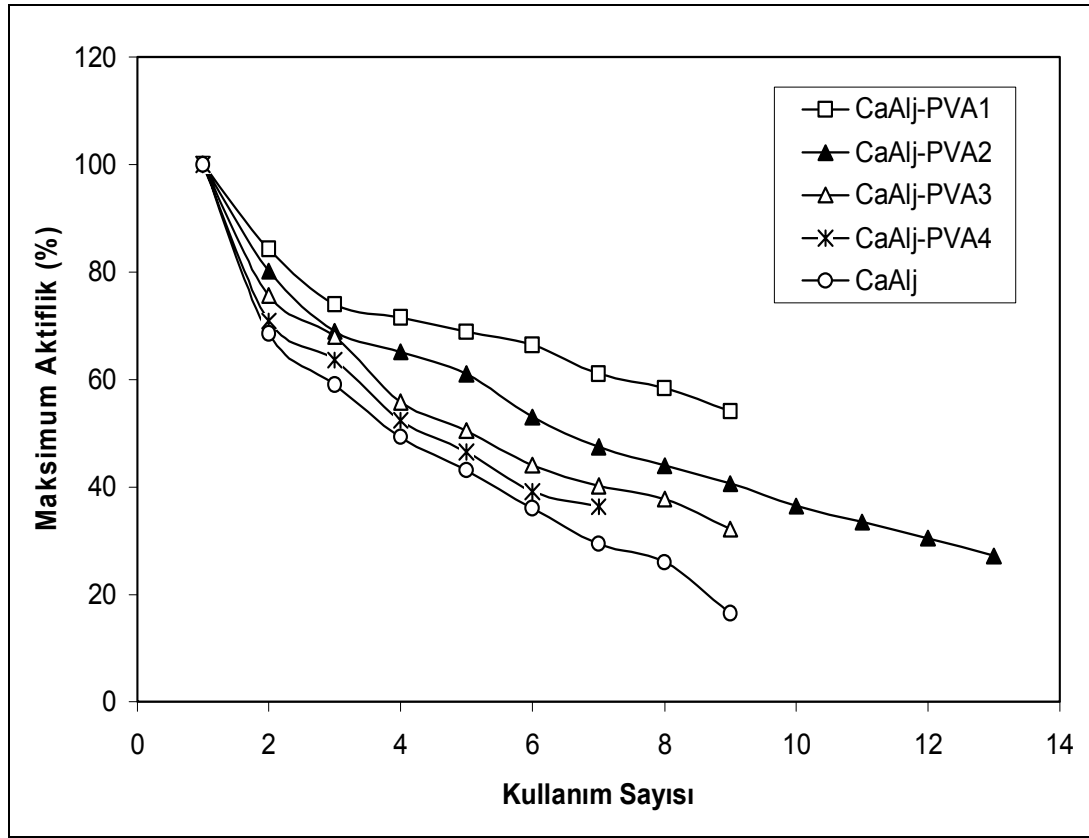
Genellikle enzimlerin immobilizasyonu sonunda enzimatik aktifliğinin artmasının normal bir durum olduğu belirtilmektedir. Bu durum enzimin o koşullarda sahip olduğu yapısal formundan kaynaklandığı düşünülebilir.

5.5. Enzim Aktifliğinin Tekrar Kullanım ile Değişimi

İmmobilize enzimlerin aktifliklerini etkileyen bir parametrede bunların bir çok kez ve uzun süre kullanılabilmesidir. Bu amaçla Bölüm 4.6.1’de açıklandığı gibi yapılan denemelerle, immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği araştırıldı. Bir gün içinde aynı immobilize enzim ile en fazla 30 kez çalışılabilir.

5.5.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğinin tekrar kullanım ile değişimi

Serbest β -Galaktosidaz bir kez, immobilize enzim ise aktifliğini koruduğu sürece pek çok kez kullanılabilir. Çalışmamızın birinci kısmında; hapsetme yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacı ile pH 5,0’da ve 30⁰C de Bölüm 4.6.1’ de verilen yöntem ile aktiflikler tayin edildi. CaAlj-PVA ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine immobilize edilen β -galaktosidaz enzimlerinin maksimum aktiflik ile tekrar kullanım sayıları Şekil 5.17 - 5.18’de, tekrar kullanım sayıları ise Çizelge 5.5 - 5.6’da verildi.

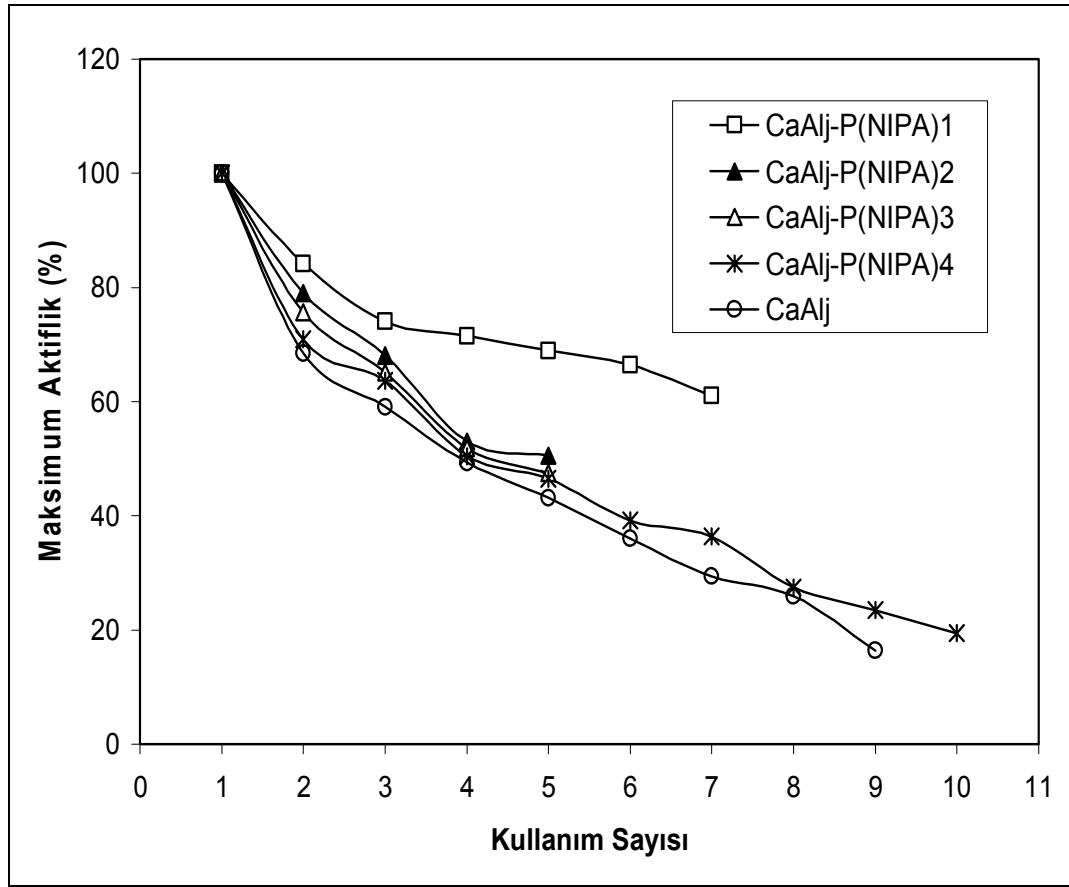


Şekil 5.17. CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanımı

Çizelge 5.5. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -Galaktosidazın tekrar kullanım sayıları

Örnek	Tekrar Kullanım Sayısı
CaAlj-PVA1	9
CaAlj-PVA2	13
CaAlj-PVA3	9
CaAlj-PVA4	7
CaAlj	9

Çizelge 5.5'de görüldüğü gibi, immobilize β -Galaktosidazın p-nitrofenil- β -D-galaktosid substrat olduğu koşullarda CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edildiğinde tekrar kullanım sayıları farklı bileşimler için 5 ile 10 arasında değiştiği en fazla 13 olduğu belirlendi.



Şekil 5.18. CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanımı

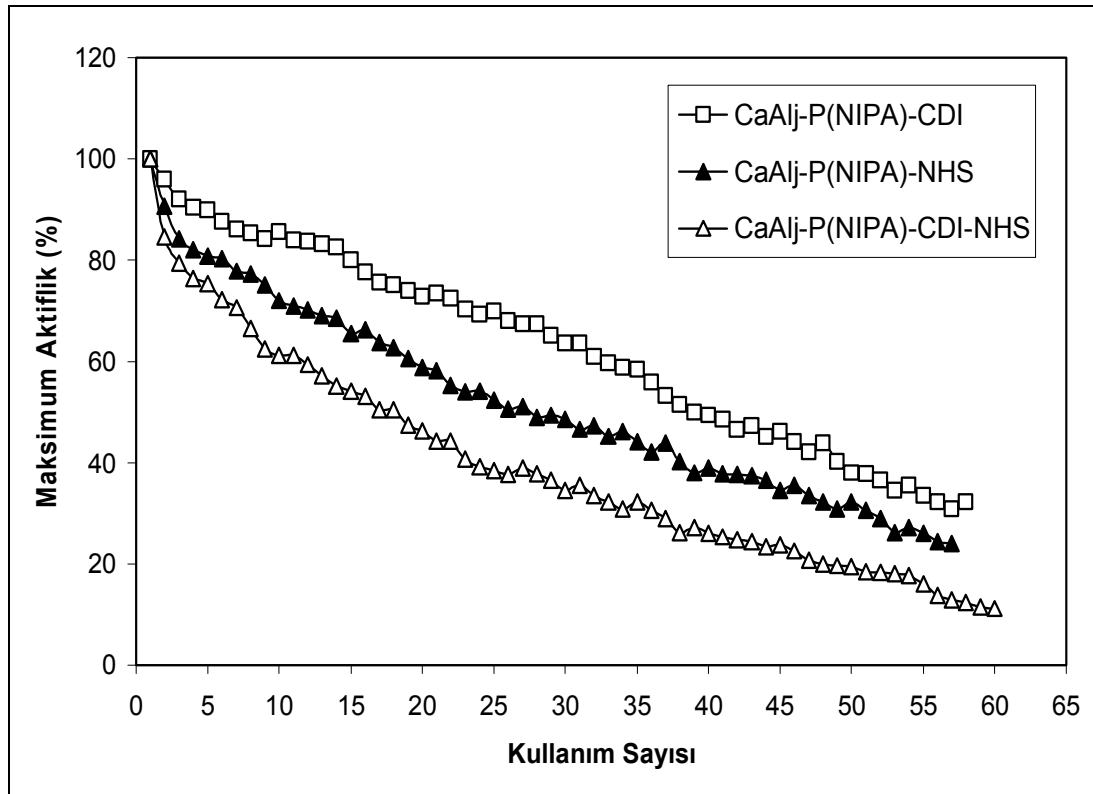
Çizelge 5.6. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -Galaktosidazın tekrar kullanım sayıları

Örnek	Tekrar Kullanım Sayısı
CaAlj-P(NIPA)1	7
CaAlj-P(NIPA)2	5
CaAlj-P(NIPA)3	5
CaAlj-P(NIPA)4	10
CaAlj	9

Çizelge 5.6'da görüldüğü gibi, immobilize β -Galaktosidazın P-nitrofenil- β -D-galaktosid substrat olduğu koşullarda CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -Galaktosidazın tekrar kullanım sayıları farklı bileşimler için 9-13 arasında değiştiği ve en fazla 10 olduğu belirlendi. Bu tekrar kullanılabilirlik sonuçları, enzimin birçok defada çok fazla aktiflik kaybı olmadan kullanılabileceğini göstermektedir.

5.5.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğinin tekrar kullanım ile değişimi

Çalışmamızın bu kısmında; karbodiimit, N-hidroksisüksinimit, karbodiimit ve N-hidroksisüksinimitin bir arada aktifleştirici olarak kullanılmasıyla immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacı ile pH 5' de ve 30°C da Bölüm 4.6.1' de verilen yöntem ile aktiflikler tayin edilmek suretiyle belirlendi. Immobilize enzimlerin maksimum aktifliği ile tekrar kullanım sayılarının değişimi Şekil 5.19 -5.20' de verildi. Immobilize enzimlerin tekrar kullanım sayıları Çizelge 5.7 - 5.8' de verildi.

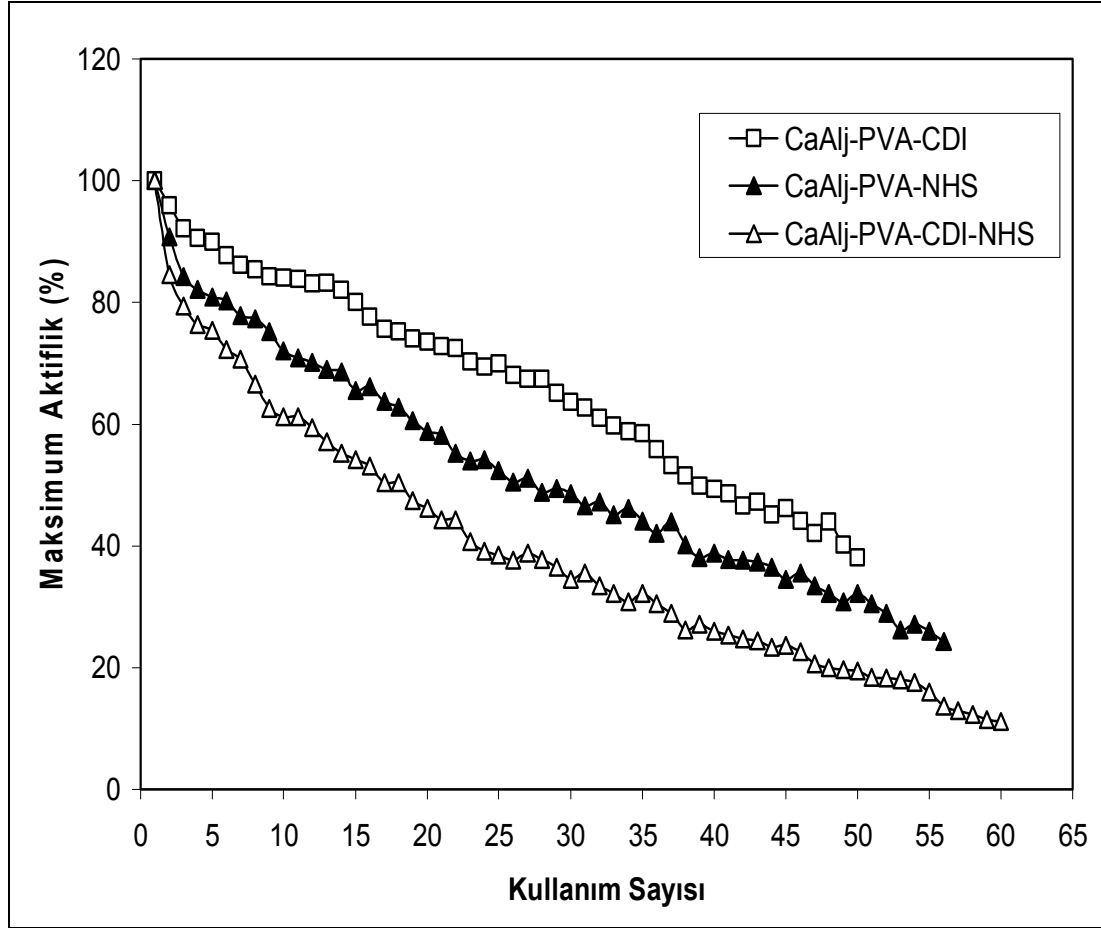


Şekil 5.19. CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanımı

Çizelge 5.7. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın tekrar kullanım sayıları

Örnek	Tekrar Kullanım Sayısı
CaAlj-P(NIPA)-CDI	50
CaAlj-P(NIPA)-NHS	56
CaAlj-P(NIPA)-CDI-NHS	60

Çizelge 5.8'de görüldüğü gibi, immobilize β -galaktosidazın p-nitrofenil- β -D-galaktosid substrat olduğu koşullarda CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edildiğinde tekrar kullanım sayıları farklı aktifleştirciler için 60 civarında olduğu belirlendi. Bu tekrar kullanılabilirlik sonuçları, enzimin birçok defada çok fazla aktiflik kaybı olmadan kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 5.20. CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanım sayıları

Çizelge 5.8. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin tekrar kullanım sayıları

Örnek	Tekrar Kullanım Sayısı
CaAlj-PVA-CDI	58
CaAlj-PVA-NHS	57
CaAlj-PVA-CDI-NHS	60

Çizelge 5.7’de görüldüğü gibi, immobilize β -galaktosidazın P-nitrofenil- β -D-galaktosid substrat olduğu koşullarda CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edildiğinde tekrar kullanım sayıları farklı aktifleştirciler için 60 civarında olduğu belirlendi.

5.6. Termal İnaktivasyon

Serbest ve immobilize β -galaktosidazın termal inaktivasyonunu incelemek amacı ile 45° C sıcaklıkta farklı zaman aralıklarında (10-60 dakika) inkübe edilen enzim çözeltilerinin Bölüm 4.6.1’ deki reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflikleri tayin edildi.

Birinci dereceden inaktivasyon sabitleri, k_i aşağıdaki eşitlikler yardımıyla hesaplandı.

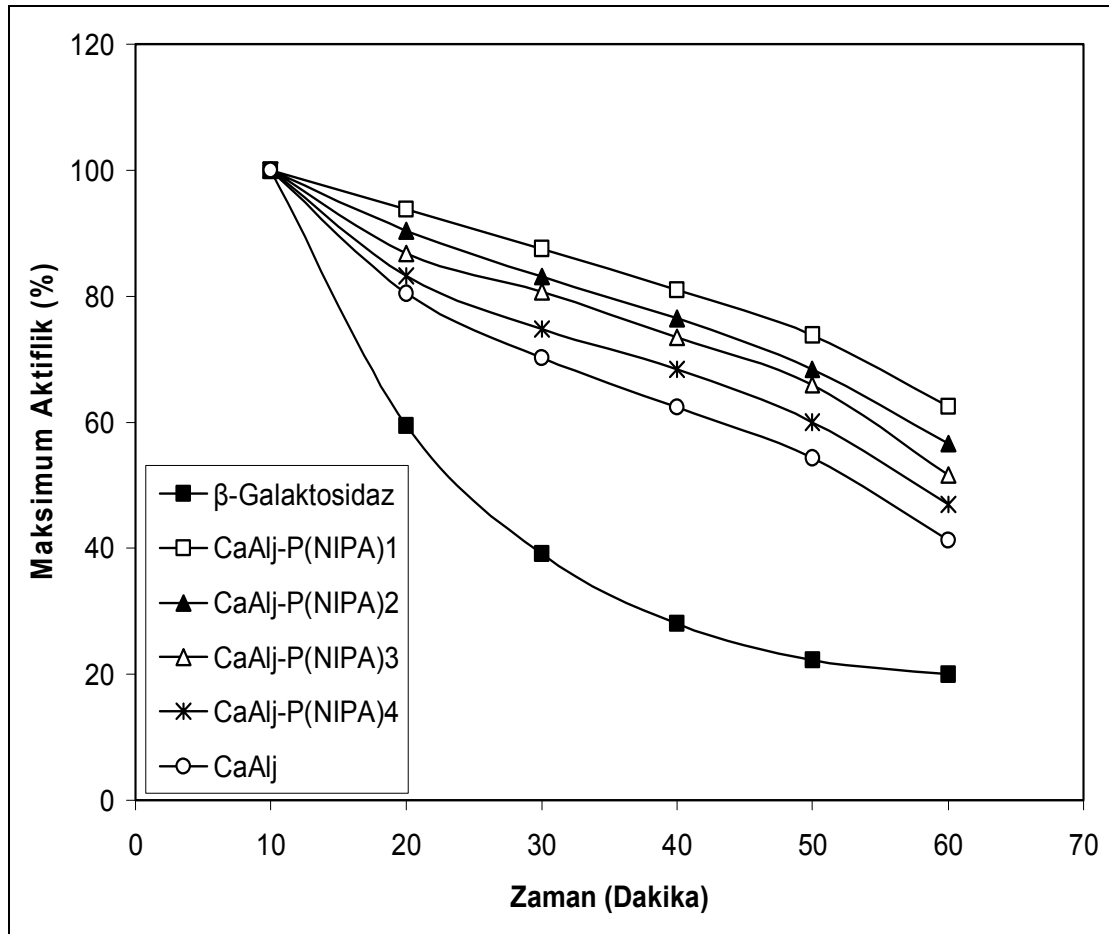
$$- \frac{dA_0}{dt} = k_i \times A_0 \quad (5.3)$$

$$\ln A_t = \ln A_0 - k_i \times t \quad (5.4)$$

Bu eşitlikte, A_0 başlangıç aktifliği, A_t t süre sonraki aktifliği belirtir.

5.6.1. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın termal inaktivasyonu

45° C sıcaklıkta farklı zaman aralıklarında serbest ve immobilize enzimlerin maksimum aktifliğinin zamanla değişimi Şekil 5.21 - 5.22’ de gösterildi. Çizilen $\ln A$ -t grafiği yardımıyla hesaplanan inaktivasyon sabitleri Çizelge 5.9 - 5.10’da verildi.

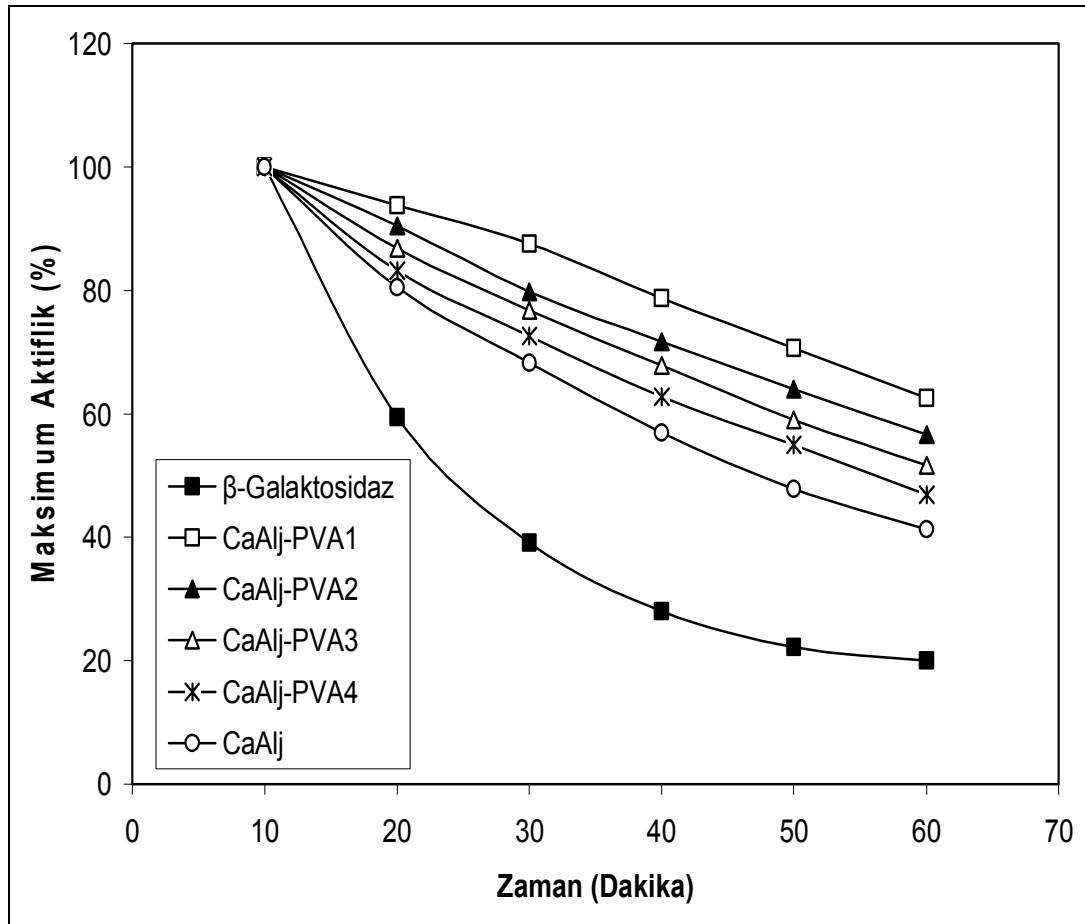


Şekil 5.21. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi

β -galaktosidaz enziminin 45°C de 60 dakikalık inkübasyon sonunda başlangıç aktifliğinin %20 sini koruduğu görüldü. CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimlerinin 45°C de 60 dakikalık inkübasyon sonunda sonra başlangıç aktifliklerinin farklı bileşimlerine bağlı olarak %45 - %70 arasında koruduğu gözlemlendi. Bu grafikten yararlanılarak çizilen $\ln A-t$ grafiği yardımıyla hesaplanan inaktivasyon hız sabitleri (k_i) Çizelge 5.9' da verildi.

Çizelge 5.9. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın 45°C'daki inaktivasyon hız sabitleri

Örnek	k_i (dakika ⁻¹)
Serbest β -galaktosidaz	0,0289
CaAlj-P(NIPA)1	0,0100
CaAlj-P(NIPA)2	0,0103
CaAlj-P(NIPA)3	0,0110
CaAlj-P(NIPA)4	0,0112
CaAlj	0,0135



Şekil 5.22. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi

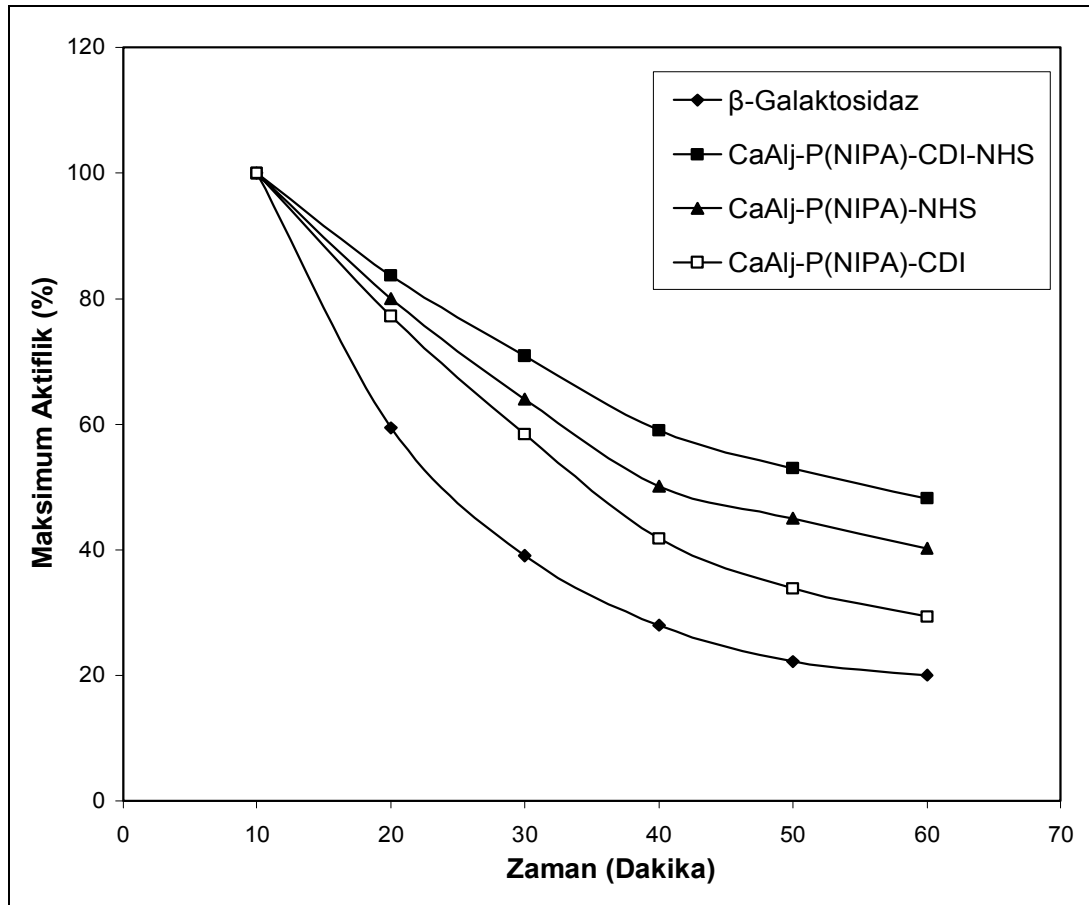
CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimlerinin 45°C de 60 dakikalık inkübasyon sonunda sonra başlangıç aktifliklerinin farklı bileşimlerine bağlı olarak %53 - %65 arasında değişen oranlarda koruduğu gözlemlendi. Bu grafikten yararlanılarak çizilen $\ln A-t$ grafiği yardımıyla hesaplanan 45°C da hesaplanan inaktivasyon hız sabitleri (k_i) Çizelge 5.10' da verildi.

Çizelge 5.10. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın 45°C deki inaktivasyon hız sabitleri

Örnek	k_i (dakika ⁻¹)
Serbest β -galaktosidaz	0,0289
CaAlj-PVA1	0,0050
CaAlj-PVA2	0,0080
CaAlj-PVA3	0,0111
CaAlj-PVA4	0,0126
CaAlj	0,0135

5.6.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın termal inaktivasyonu

45° C sıcaklıkta ve farklı zaman aralıklarında serbest ve immobilize enzimlerin maksimum aktifliğinin zamanla değişimi Şekil 5.23 - 5.24' de gösterildi. Çizilen $\ln A-t$ grafiği yardımıyla hesaplanan inaktivasyon sabitleri Çizelge 5.11 – 5.12' de verildi.

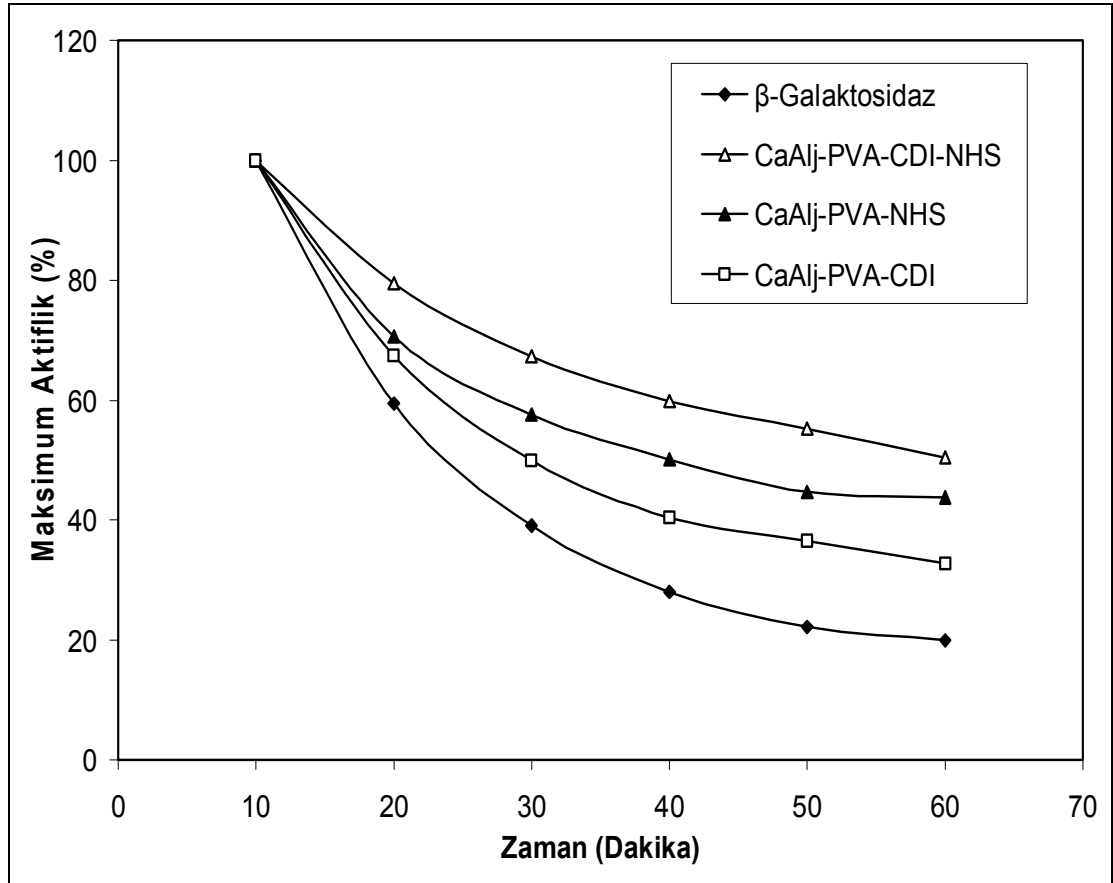


Şekil 5.23. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi

CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimlerinin 45°C de 60 dakikalık inkübasyon sonunda başlangıç aktifliklerinin karbodiimitle aktifleştirildiğinde %48, N-hidroksisüksinimitle aktifleştirildiğinde %40, karbodiimitle ve N-hidroksisüksinimitle aktifleştirildiğinde %20 oranında koruduğu gözlemlendi. Bu grafiklerden yararlanılarak çizilen lnA-t grafiği yardımıyla hesaplanan 45°C deki inaktivasyon hız sabitleri (k_i) Çizelge 5.11' de verildi.

Çizelge 5.11. Serbest ve CaAlj-P(NIPA) kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın 45° C deki inaktivasyon hız sabitleri

Örnek	k_i (dakika ⁻¹)
Serbest β -galaktosidaz	0,0289
CaAlj-P(NIPA)-CDI	0,0192
CaAlj-P(NIPA)-NHS	0,0165
CaAlj-P(NIPA)-CDI-NHS	0,0119



Şekil 5.24. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi

CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimlerinin 45°C de 60 dakikalık inkübasyon sonunda sonra başlangıç aktifliklerinin karbodiimitle aktifleştirildiğinde %51, N-

hidroksisüksinimitle aktifleştirildiğinde %44, karbodiimitle ve N-hidroksisüksinimitle aktifleştirildiğinde %35 oranında koruduğu gözlemlendi. Bu grafiklerden yararlanılarak çizilen $\ln A-t$ grafiği yardımıyla hesaplanan 45°C deki inaktivasyon hız sabitleri (k_i) Çizelge 5.12' de verildi.

Çizelge 5.12. Serbest ve CaAlj-PVA kürelerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın 45° C deki inaktivasyon hız sabitleri

Örnek	k_i (dakika ⁻¹)
Serbest β -galaktosidaz	0,0289
CaAlj-PVA-CDI	0,0216
CaAlj-PVA-NHS	0,0165
CaAlj-PVA-CDI-NHS	0,0100

Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin k_i değerinin serbest β -galaktosidaz enziminin aynı sıcaklıkta k_i değerinden büyük olduğu görüldü. Buda immobilize enzimlerin serbest enzime göre denatürasyona karşı daha dirençli olduğu söylenebilir.

6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Serbest ve immobilize β -galaktosidaz enziminin aktivitesine etki eden çeşitli parametreler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. Serbest β -galaktosidaz için optimum pH değeri 5,0 olarak bulundu. Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β -galaktosidaz için optimum pH değeri 4,5 olarak ölçülürken hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimleri için optimum pH değeri değişmedi.

2. Serbest β -galaktosidaz için optimum sıcaklık 30° C olarak bulunmuştur. Kovalent bağlanma ve hapsetme yöntemleriyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimleri için optimum sıcaklık değeri 35° C kaydı.

3. Serbest β -galaktosidaz için K_m değeri 0,343 mM olarak bulundu. Hapsetme ve kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β -galaktosidaz enzimleri için K_m değerleri 0,746 mM -0,497 mM arasında değiştiği görüldü.

4. Serbest β -galaktosidaz için V_{mak} değeri 0,0259 mM.dak⁻¹, hapsetme ve kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β -galaktosidaz enzimleri için ise V_{mak} değerleri 0,0049mM.dak⁻¹-0,7997mM.dak⁻¹ arasında değiştiği görüldü.

6. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enziminin tekrar kullanım sayısının en fazla 13 olarak bulunurken kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimlerinin tekrar kullanım sayısının en fazla 60 olarak bulundu.

7. Serbest β -galaktosidaz 60 dakikada aktifliğinin (45°C) yaklaşık % 20 sini korudu. Hapsetme yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimleri 60

dakikada aktifliklerini yaklaşık %45 - %70 arasında korurken, kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimleri 60 dakikada aktifliklerini yaklaşık %20 - %51 arasında koruduğu gözlemlendi.

KAYNAKLAR

1. Telefoncu, A. "Enjimoloji", **Ege Üniversitesi Fen Fakültesi**, İzmir, 1-305 (1977).
2. Murray, R. K., Granner D.K., Mayes P.A., "Harper'ın Biyokimyası", **Barış Kitabevi**, 73-74, 341-349 (1993).
3. Kraulis, P. J. "MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures", **Journal Appl. Crystallog**, 24: 946–950 (1991).
4. Merritt, E. A., Bacon, D. J., "Raster3D: photorealistic molecular graphics", **Methods Enzymoloji**, 277: 505–524 (1997).
5. Lartillot, S., "İmmobilization of lactase an silica gel: study of lactase hydrolysis wing the immobilized material", **Biochemical Education**, 21(3): 157-159 (1993).
6. Boze, H., Moulin, G., Galzy, P., "Uptake of galactose and kluyveramyces lactis; biochemical characteristic and attempted genetical analysis", **Journal General Microbiology**, 133:15-23(1987).
7. Bickerstaff, G. F., "Immobilization of enzymes and cells", **Humana press**, Totowa, New Jersey, 33:199-205 (1997).
8. Zaborsky, O., "Immobilized enzymes", **1-3 CRC Pres**, Ohio, 58:287-292 (1974).
9. Scouten, W.H. , Mosbach, K. , " Methods in Enzymology", **Academic Press**, Orlando, 135: 30-65 (1987) .
10. Bickerstaff, G. F., "İmmobilization of enzymes and cells", **Humana press**, Totowa, New Jersey, 19: 87-385 (1997).
11. Söylemez, Z., Fadiloğlu, S., "Laboratory manual FE 460 enzyme purification and immobilization", **Gaziantep University Faculty of Engineering Department of Food Engineering**, Gaziantep, 47 – 52 (1996).
12. Woodward, J., "İmmobilised cells and enzymes", **Oxford**, İngiltere, 42-48 (1985).
13. Kahn, K., " Theoretical Study of Intermediates in the Urate Oxidase Reaction" , **Bioorganic Chemistry**, 27: 351-362 (1999).

14. Zaborsky.O., "Immobilized Enzyme", **CRC Pres**, Ohio, 1-3 (1973).
15. Trevan, M.D., "Techniques of immobilization in immobilized Enzyme", **John Wiley and Sons**, New York, 1-11 (1980).
16. Sağ, Y., "Atık sulardaki ağır metal iyonlarının giderilmesi ve geri kazanılması için en uygun biyosorptent türünün seçilmesi", Doktora Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 10-35 (1993).
17. Salamone, J.C., "Polymeric Materials Encyclopedia", **CRC Press**, New York, 1:149-154 (1996).
18. Kierstan, M.P.J., Bucke, C., "The Immobilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles and Enzymes in Calcium Alginate", **Biotechnology and Bioengineering**, 19: 87-397 (1977).
19. Görennek, G., "Aljinat Kürecikler İçinde Katalaz İmmobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İzmir, 21-24 (1999).
20. Chen, H., Tendeyong, F., Yiacoumi, S., "Equilibrium and Studies of Copper Ion Uptake by Calcium Alginate", **Environmental Science Technology**, 31: 1433-1439 (1997).
21. Chen, D., Lewondowski, Z., Roe, F., Surapaneni, P., "Diffusivity of Cu^{2+} in Calcium Alginate Gel Beads", **Biotechnology and Bioengineering**, 41: 755-760 (1993).
22. Bülbül, G., "Atık Sulardaki Fenol Kirliliğinin Serbest ve Kalsiyum Aljinat'a Tutuklanmış *P. putida* ile Giderilmesinin Kesikli Karıştırılmalı ve Dolgulu Kolon Reaktörlerde İncelenmesi", **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 12-14 (1995).
23. Bickerstaff, G. F., "İmmobilization of enzymes and cells", **Humana press**, Totowa, New Jersey, 20-26 (1997).
24. Söylemez, Z., Fadiloğlu, S., "Laboratory manual FE 460 enzyme purification and immobilization", **Gaziantep University Faculty of Engineering Department of Food Engineering**, Gaziantep, 47 – 52 (1996).
25. Woodward, J., "İmmobilized cells and enzymes", **Oxford**, England, 98-106 (1985).

26. Hernaiz M. J., Crout H. G., "A highly selective synthesis of N-acetyllactosamine catalyzed by immobilised β -galactosidase from *Bacillus circulans*", ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 10: 403-408 (2000).
27. Göktuğ, T., Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E., "Glucose oxidase- β -galactosidase hybrid biosensor based on glassy carbon electrode modified with mercury for lactose determination", ***Analytica Chimica Acta***, 24: 109-111 (2005).
28. Zhou, Q.Z.K., Chen, X.D. "Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*", ***Biochemical Engineering Journal***, 9: 33-40 (2001).
29. Tanrıseven, A., Doğan Ş., "A novel method for the immobilization of β -galactosidase", ***Process Biochemistry***, 38: 27-30 (2002).
30. Ladero, M., Santos A., Garcia, J.L., Garcia, O.F., "Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modelling", ***Enzyme and Microbial Technology***, 29: 181-193 (2001).
31. Weixia, T., Sufong, S., Shaoli, N., Xuyuan, L., "Immobilization of β -galactosidase from *Cicer arietinum* (gra-chicken bean) and its catalytic actions", ***Food Chemistry***, 64: 495-500 (1999).
32. Ateş, S., Metmetoğlu, Ü., "A new method immobilization of β galactosidase and its utilization in a plug flow reactor", ***Process Biochemistry***, 32: 433-436 (1997).
33. Carpio, C. , Gonzalez, P., "Bone-bound enzymes for food industry application", ***Food Chemistry***, 68: 403-409 (2000).
34. El-Masry M. M., Maio A., Martelli P. L., Casadio R., Mousatafa A. B., Rossi S., Mita D. G., "Influence of the immobilization process on the activity of β -galactosidase bound to nylon membranes grafted with glycidyl methacrylate", ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*** 16: 175-189 (2001).
35. Benevides C.Ch. , Cesar M., Manuel F., Alejandro V. , José L., Alfonso V., José M. Roberto F. L., "The immobilization of a thermophili β galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products", ***Enzyme and Microbial Technology***, 33:199-205 (2003).

36. Shinoda, Y.B.N., Goto, S., "Hydrolysis of O-nitrophenyl-[3-D galactoside by an enzyme immobilized on perfluorocarbon in a tapered column reactor", ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, 10:127-135 (1998).
37. Bickerstaff, G. F., "Immobilization of Enzymes and cells", ***Humana press***, Totowa, New Jersey 5-9 (1997).
38. Arica, Y. M., Hasirci, V. N., "Immobilization of glucose oxidase comparison of entrapment and covalent bonding", ***Journal Chemistry, Technology Bioterfaces***, 58: 287-292 (1993).
39. Chen, K. C., Wu, J. K., "Substrate protection of immobilized glucose isomerase", ***Biotechnology Bioengineering***, 30: 817-824 (1987).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖCAL, Banu Lütfiye
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 20.03.1981 Ankara
 Medeni hali: : Bekar
 Telefon : 0 (555) 414 13 38
 e-mail : banu.ocal@mynet.com.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2007
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Öğretmenliği	2005
Lisans	Osmangazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2003
Lise	Ankara Anadolu Lisesi	1999

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2006-2007	Gazi Üniversitesi	Öğrenci Asistanlığı
2006-2007	Sınav Dershanesi	Kimya Öğretmeni
2004-2006	Özel Depar Dershanesi	Kimya Öğretmeni

Yabancı Dil

Fransızca

Yayınlar

Hobiler

Yüzmek, sinema, tiyatro