

**POLİ(AKRİLAMİT-ko-AKRİLİKASİT)/POLİETİLENİMİN
VE POLİ(METİLMETAKRİLAT-ko-GLİSİDİLMETAKRİLAT)
DESTEKLERİ KULLANILARAK KOLESTEROL OKSİDAZ
ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU**

Berrin AKKAYA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2006
ANKARA**

**POLİ(AKRİLAMİT-ko-AKRİLİKASİT)/POLİETİLENİMİN
VE POLİ(METİLMETAKRİLAT-ko-GLİSİDİLMETAKRİLAT)
DESTEKLERİ KULLANILARAK KOLESTEROL OKSİDAZ
ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU**

Berrin AKKAYA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2006
ANKARA**

Berrin AKKAYA tarafından hazırlanan Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Polietilenimin ve Poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) Destekleri Kullanılarak Kolesterol Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylıyorum.



Yrd.Doç.Dr. Hayrettin Tümtürk
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir

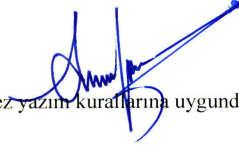
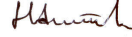
Başkan : Prof. Dr. Serpil AKSOY

Üye : Prof. Dr. Mehlika PULAT

Üye : Doç. Dr. Dilek ŞOLPAN ÖZBAY

Üye : Yrd. Doç. Dr. Haydar ALTINOK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hayrettin Tümtürk



Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

**POLİ(AKRİLAMİT-ko-AKRİLİKASİT)/POLİETİLENİMİN
VE POLİ(METİLMETAKRİLAT-ko-GLİSİDİLMETAKRİLAT) DESTEKLERİ
KULLANILARAK KOLESTEROL OKSİDAZ
ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

Berrin AKKAYA

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2006**

ÖZET

Bu çalışmada, kolesterol oksidaz enzimi, poli (akrilamit–ko–akrilik asit)/polietilenimin ve poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) destekleri karbodiimid ve epiklorhidrin kullanılarak aktiveleştirilip kovalent olarak immobilize edilmiştir. Serbest enzim için K_m ve V_{mak} değerleri sırasıyla 0,756mM ve 1,115 mM.dak⁻¹ bulunmuştur. CDI kullanılarak aktiveleştirilen immobilize enzim için $K_m=2,72$ mM, $V_{mak}=0,908$ mM.dakika⁻¹ ve epiklorhidrin kullanılarak aktiveleştirilen immobilize enzim için $K_m= 2,37$ mM, $V_{mak}=1,495$ mM.dakika⁻¹ olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzimler için optimum sıcaklık 35°C ve 37°C olarak tespit edilmiştir. Serbest enzim, ECH ve CDI kullanılarak aktiveleştirilen immobilize enzim için optimum pH sırasıyla 7, 7 ve 7,5 olarak bulunmuştur. 40°C ve 45°C’de inaktivasyon sabitleri sırasıyla serbest enzim için $k_i=0,0442$ dak⁻¹, $k_i=0,0664$ dak⁻¹, ECH kullanılarak aktiveleştirilen immobilize enzim için $k_i=0,0398$ dak⁻¹, $k_i=0,0407$ dak⁻¹ ve CDI kullanılarak aktiveleştirilen immobilize enzim için $k_i=0,0285$ dak⁻¹, $k_i=0,0352$ dak⁻¹ olarak bulunmuştur. Serbest enzim 20 gün sonunda aktifliğini tamamen kaybederken ECH ve CDI kullanılarak aktiveleştirilen immobilize enzimler sırasıyla %88, %94 aktifliğini

korumuştur. ECH ve CDI kullanılarak aktifleştirilen immobilize enzimlerin 60 kez kullanım sonunda aktiflikleri sırasıyla %56, %83 olarak bulunmuştur.

Bilim Kodu : 201.1.117

Anahtar Kelimeler : İmmobilizasyon, kolesterol oksidaz, poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/polietilenimin, poli(metil metakrilat-ko-glisidil metakrilat)

Sayfa Adedi : 76

Tez Yöneticisi : Yrd.Doç.Dr. Hayrettin Tümtürk

**IMMOBILIZATION OF CHOLESTEROL OXIDASE BY
POLY (ACRYLAMIDE-co-ACRYLICACID)/POLYETHYLENEIMINE AND
POLY(METHYLMETACRYLATE-co-GLYCIDYLMETHACRYLATE)
(M.Sc.Thesis)**

BERRİN AKKAYA

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
January 2006**

ABSTRACT

In this study, cholesterol oxidase was covalently immobilized on poly(methylmetacrylate-co-glycidylmethacrylate) and poly(acrylamide-co-acrylicacid)/polyethyleneimine which were activated by using epichlorohydrin and carbodiimide. Kinetic parameters were calculated as 0,756, 2,37 and 2,72mM for K_m and 1,115, 1,495 and 0,908mM.min⁻¹ for V_{max} in the case of free enzyme, p(MMA-co-GMA) and p(AAm-co-AA)/PEI bound enzymes, respectively. The optimum temperatures for free and immobilized enzymes were observed as 35°C and 37°C, respectively. For free and covalently immobilized enzymes on p(MMA-co-GMA) and p(AAm-co-AA)/PEI optimum pH were found as, 7-, 7 and 7,5, respectively. At 40°C, inactivation constants of free, activated ECH and CDI were calculated as 0,0442, 0,0398, 0,0285min⁻¹ they were also calculated as 0,0664, 0,0407, 0,0352min⁻¹ respectively at 45°C. After storage for 20 days the enzyme activities were found to be %88 and %94 of the initial activity values for ECH and CDI activated matrices respectively. On the other hand the free enzyme lost its activity completely in 20 days. In the repeated batch experiments ,60 uses in 2 days, retention of %56 and %83 of the original enzymes activities were

observed for ECH-activated p(MMA-co-GMA) and CDI p(AAm-co-AA)/PEI immobilized enzymes.

Science Code : 201.1.117

Key Words : Immobilization, cholesterol oxidase, poly (acrylamide-co-acrylicacid)/polyethyleneimine, poly(methylmetacrylate-co-glycidylmethacrylate)

Page Number : 76

Adviser : Asst.Prof.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım , yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK'e, bugüne kadar öğrenim hayatımda üstün sabır, anlayış ve destekleriyle beni yalnız bırakmayan, yaşamı boyunca her konuda beni destekleyen her zaman moral kaynağım olan çok değerli aileme, çalışmalarımın her aşamasında beni yalnız bırakmayan, sonsuz desteği ve dostluğu ile her zaman yanımda olan değerli dostum Evrim PURMA'ya, çalışmalarım boyunca yardımları ve arkadaşlıkları ile her zaman yanımda olan değerli dostlarım Gül TUNÇ, Özlem ÇOLAK, Ayşe YAYLAOĞLU'na, çalışmalarım boyunca yardımları için Nagihan KARACA, Ayşe YAHŞİ, Filiz KARA, Uzman Ferhat ŞAHİN ve Araş.Gör.Gökhan DEMİREL'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. ENZİMLER.....	3
2.1. Enzimlerde Seçicilik	4
2.2. Enzim Aktivitesi	5
2.3. Kolesterol Oksidaz Enzimi	6
2.3.1. Kolesterol oksidazın kaynakları	7
2.3.2. Reaksiyon mekanizması	9
2.3.3. Substrat spesifikliğı	10
2.3.4. Kolesterol	11
2.3.5. Kolesterol oksidazın uygulama alanları.....	13
2.3.6. Analitik uygulamaları.....	14
3. ENZİM İMMOBİLİZASYONU	15
3.1. Destek Seçimi.....	20
3.1.1. Polimerler.....	21
3.2. İmmobilizasyon Yöntemleri.....	26

	Sayfa
3.2.1. Kimyasal yöntemler.....	28
3.2.2. Fiziksel yöntemler	31
3.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması	35
4. DENEYSEL KISIM	37
4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
4.2. Kullanılan Aletler	41
4.3. Kolesterol ve Kolesterol Oksidaz Enziminin Hazırlanması	41
4.4. Kolesterol Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	41
4.5. Enzim İmmobilizasyonu	42
4.5.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)polietilenimin kullanılarak enzim immobilizasyonu.....	42
4.5.2. Poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) kullanılarak enzim immobilizasyonu.....	46
4.6. Aktiflik Tayini.	48
4.6.1. Serbest COD ın aktiflik tayini	48
4.6.2. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın aktiflik tayini.....	49
4.6.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktiflik tayini.....	49
4.7. Aktifliğe pH Etkisi	49
4.7.1. Serbest COD ın aktifliğine pH nın etkisi	49
4.7.2. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine pH nın etkisi	50
4.7.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine pH nın etkisi	50

	Sayfa
4.8. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi	50
4.8.1. Serbest COD ın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	50
4.8.2. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	50
4.8.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	51
4.9. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi.....	51
4.9.1. Serbest COD ın aktifliğine substrat derişiminin etkisi	51
4.9.2. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine substrat derişiminin etkisi	51
4.9.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine substrat derişiminin etkisi	51
4.10. Depolama Kararlılığı	52
4.10.1. Serbest COD ın depolama kararlılığı	52
4.10.2. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın depolama kararlılığı.....	52
4.10.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın depolama kararlılığı.....	52
4.11 Tekrar Kullanılabilirlik.....	52
4.11.1. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın tekrar kullanılabilirliği	52
4.11.2. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın tekrar kullanılabilirliği	53
4.12. Termal İnaktivasyon.....	53
4.12.1. Serbest COD ın termal inaktivasyonu	53
4.12.2. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın termal inaktivasyonu	53

	Sayfa
4.12.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın termal inaktivasyonu	53
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	54
5.1. Aktifliğe pH nın Etkisi	54
5.2. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi	56
5.3. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi.....	58
5.4. Serbest ve İmmobilize COD ın Depolanma Kararlılığı	60
5.5. İmmobilize COD ın Tekrar Kullanılabilirliği	63
5.6. Terman İnaktivasyon.....	65
6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	68
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	76

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Çeşitli kaynaklardan elde edilen enzimlerin özelliklerinin Karşılaştırılması.	9
Çizelge 2.2. Kolesterol oksidaz enziminin substrat spesifikliğı	11
Çizelge 3.1. Yaygın olarak kullanılan destekler.	21
Çizelge 3.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması.	36
Çizelge 5.1. Serbest ve immobilize kolesterol oksidazın farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon sabitleri.....	67

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kolesterol oksidaz enziminin üç boyutlu yapısı	7
Şekil 2.2. Kolesterol oksidaz enziminin reaksiyon mekanizması.....	10
Şekil 3.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri	27
Şekil 4.1. Kolesterol kalibrasyon grafiği	42
Şekil 4.2. Kimyasal yöntemle sentezlenen p(AAm-ko-AA)/PEI IPN'lerinin olası reaksiyon mekanizması.....	44
Şekil 4.3. P(AAm-ko-AA)/PEI, IPN'lerinin gösterimi	45
Şekil 4.4. P(AAm-ko-AA)/PEI desteğinin karbodiimid ile aktifleştirilmesi	45
Şekil 4.5. Kimyasal yöntemle sentezlenen p(MMA-ko-GMA) hidrojellerinin olası reaksiyon mekanizması	47
Şekil 4.6. P(MMA-ko-GMA) desteğinin epiklorhidrin ile aktifleştirilmesi	48
Şekil 5.1. Serbest ve immobilize kolesterol oksidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi.....	55
Şekil 5.2. Serbest ve immobilize kolesterol oksidazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi	57
Şekil 5.3. Serbest ve immobilize kolesterol oksidazın Lineweaver- Burk grafiği	60
Şekil 5.4. Serbest ve immobilize kolesterol oksidazın maksimum aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi	62
Şekil 5.5. İmmobilize kolesterol oksidazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	64
Şekil 5.6. Serbest ve immobilize kolesterol oksidazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi.....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklama

kDa

Kilodalton

k_i

İnaktivasyon sabiti

K_m

Michaelis sabiti

μm

Mikro metre

UV

Ultraviyole

V_{mak}

Maksimum hız

α

Alfa

β

Beta

Kısaltmalar

Açıklama

AA

Akrilit asit

AAm

Akrilamit

APS

Amonyum persülfat

BAAm

N,N'-metilen-bis-akrilamit

CDI

Karbodiimid

COD

Kolesterol oksidaz

ECH

Epiklorhidrin

EDGMA

1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)karbodiimid

FAD

Flavin adenin denükleotit

GLU

Glutamin

GMA

Glisidil metakrilat

HDL

Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HEMA

Hidroksimetil metakrilat

Kısaltmalar**Açıklama****HIS**

Histidin

IPN

İnter polimer kompleksleri

LDL

Düşük yoğunluklu lipoprotein

MMA

Metil metakrilat

PEI

Polietilenimin

TEMED

N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

WAT

Su

1. GİRİŞ

Enzimlerin kullanımı çok eski çağlara dayanır. İlk çağlarda insanlar bilinçsiz olarak ekmek hamuru, peynir, kımız, yoğurt gibi gıdaların hazırlanmasında enzimlerin işlevlerinden yararlanmışlardır. Enzimlerin yapısı ve tepkime mekanizmalarının aydınlatılmasıyla enzimler gıda, ilaç, kozmetik, tekstil, temizlik maddeleri gibi çeşitli endüstriyel maddelerin üretiminde, üretime yönelik çeşitli tepkimelerin katalizlenmesinde ve fizyolojik rahatsızlıkların tedavisinden tıpta tanı çalışmalarına kadar uzanan yeni birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır (1). Enzimoloji konusundaki gelişmeler 1897’de Büchner’in canlı maya hücrelerinden ilk aktif enzimi ekstre etmesiyle başlamıştır. Büchner bu çalışmasıyla enzimlerin katalitik aktivitelerini içinde bulundukları hücrelerin yaşamsallığına bağlı olmaksızın farklı ortamlarda da devam ettirdiğini göstermiştir. 1926’da Sumner enzimlerin protein yapısında olduğunu ortaya koymuş ve ilk enzim saflaştırmasını gerçekleştirmiştir (2).

Enzimler canlı hücrelerden elde edilmiş proteinlerdir. Değişik avantajlarından dolayı enzimler çeşitli kimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılmaktadır. Bitki , hayvan dokuları ve mikroorganizmalardan elde edilen çok sayıdaki enzim yapılarına ve kontrol ettikleri reaksiyon mekanizmalarına göre karakterize edilmişlerdir. Karakterize edilen bu enzimlerin ticari ve saf şekillerinin bulunması endüstriyel uygulamalarda kullanılmalarını sağlamaktadır. Enzimlerin spesifik olmaları ve reaksiyonları katalizleme kabiliyetleri onların biyokimyasal, endüstriyel ve analitik alanlarda uygulamalarını cazip hale getirmektedir (3).

Doğal enzimler yüksek molekül kütlesine sahip proteinler olup genellikle suda çözünürler. Ancak çözelti halinde kararlılıklarının sınırlı olması, ortamdan ayrılmasının çok zor olması, reaksiyon denetimlerini güçleştirmelerini ve enzimlerin tekrar kullanımlarının mümkün olmaması immobilize enzim düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Sonuçta immobilizasyon ile enzimlerin ısısal,

mekanik ve kimyasal kararlılıklarının arttırılması ile tekrar kullanılabilirmeleri mümkün kılınmıştır (4).

Bu çalışmada kolesterol oksidaz enzimi polimerik destekler üzerine kovalent bağlanma metoduyla immobilize edildi. Bu amaçla poli(akrilamit-ko-akrilikasit)/polietilenimin ve poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetilakrilat) polimerleri hazırlandı. Bu destek materyalleri karbodiimid ve epiklorhidrin kullanılarak aktifleştirildi ve kolesterol oksidaz enzimi kovalent bağlanma metodu ile immobilize edildi. Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine etki eden sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, depolama süresi gibi çeşitli parametrelerin etkisi ve enzimin tekrar kullanılabilirliği incelendi.

2. ENZİMLER

Enzimler canlı hücrede meydana gelen kimyasal reaksiyonları katalizleyen veya düzenleyen proteinlerdir. Organizmadaki organik moleküllerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve sonumum gibi fizyolojik olaylar enzimler yardımıyla yürütülmektedir. Bu nedenle hayat enzimatik reaksiyonların tümüdür denilebilir.

Enzimler dört temel açıdan çok güçlü katalizörlerdir.

1. Enzimler son derece etkilidirler. Sıradan kimyasal katalizörlere göre reaksiyonu 10^8 – 10^{11} kez daha hızlı gerçekleştirebilmektedirler. Enzimler gösterdikleri bu hıza ulaşırken pH, sıcaklık, basınç açısından oldukça ılımlı koşullarda çalışabilmeyi mümkün kılarlar. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar fazla enerji gerektirmezler. Ayrıca en kolay bulunan, en ucuz, en emniyetli çözücü olan su içerisinde çalışmak enzimler için mümkün olmaktadır. Mesela amonyak elde etmek için kullanılan Haber prosesinde azot bağlamak için 200-1000 atm basınç ve 500°C sıcaklık gereklidir. Ama azot bağlayan bir bakterinin bu işlemi yaparken yüksek basınç ve sıcaklığa ihtiyacı yoktur.
2. Enzimler kimyasal katalizörlere göre çok daha değişik kimyasal reaksiyonları katalizleyebilirler.
3. Enzimler reaksiyonun tipine ve substrata son derece spesifiktirler. Böylece yüksek verim ve çok az sayıda yan ürün meydana gelir.
4. Enzimlerin çok çeşitli doğal kontrol mekanizmaları vardır. Enzimlerin aktivitesi, içinde bulundukları şartlara göre düzenlenebilir. Ayrıca kontrol edici küçük moleküllerde enzimatik aktiviteyi azaltabilir yada arttırabilir (5).

Enzimler tepkimenin başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürürler. Bir enzim daima bir çeşit reaksiyonu kontrol eder. Substrat yüzeyi arttıkça enzim aktivitesi de artar. Enzimler sulu ortamda etkinlik gösterirler.

Hücre içinde üretilmelerine rağmen hücre dışında da etki gösterebilirler. Enzimlerin kontrol ettiği tepkimelerin çoğu çift yönlüdür. Protein yapılı olmalarında dolayı proteinlerin etkilendiği faktörlerden etkilenirler (6).

Enzimlerde proteini oluşturan amino asitlerin sayısı, diziliş sırası ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir. Bu düzen enzimin substrata seçiciliğini sağlar. Bazı enzimler yalnızca proteinden oluşurken bazıları protein yanında protein olmayan bir kısım içerirler. Bu tip enzimlerde enzimin protein kısmına “Apoenzim”, protein olmayan kısmına, enzimden kolayca ayrılabiliriyorsa “Koenzim” veya “Kofaktör”, sıkıca bağlı ise “Prostatik grup” adı verilir. Koenzimler genellikle vitamin türevleri, organik moleküller ve inorganik metal anyon veya katyonlardan oluşur. Apoenzim ve koenzim birlikte “Haloenzim” diye adlandırılır. Haloenzimin büyük bir kısmını apoenzim oluşturur. Apoenzim tek başına katalitik aktivite göstermez. Enzimin katalitik olma özelliğini veren koenzim tek başına, gerçek enzime göre çok daha düşük aktivite gösterir. Enzimin gerçek aktivitesi sadece koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda gözlenir (7).

Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli amino asitlerin oluşturduğu bir kısım bulunur. Protein zincirinin bu bölgesi enzimin katalitik ektisinden sorumlu olup “Aktif bölge” olarak tanımlanır. Substrat ve eğer varsa koenzim, bu merkeze hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar veya kovalent bağlar ile bağlanır. Substratın dönüşümüne katılan ve katalitik prosesi yürüten amino asitler de aktif merkezden sayılırlar (6).

2.1. Enzimlerde Seçicilik

Enzimler yüksek seçiciliğe sahip katalizörlerdir. Bu seçiciliği beş kısımda incelemek mümkündür (7).

- **Mutlak Seçicilik :** Bu durumda enzim belirli bir substratı katalizleyerek belirli bir ürüne dönüştürür. Örneğin üreaz, üreyi hidrolizlerken ve maltaz, maltozu monosakkaritlerine parçalarken bu türden seçicilik gösterirler.
- **Grup Seçiciliği :** Grup seçiciliği gösteren enzimler yapısında belirli bir grup bulunduran tüm substratları katalizler. Protein parçalayan proteolitik enzimlerin çoğu grup seçiciliği gösterir.
- **Tepkime yada Bağ Seçiciliği :** Bu gruptaki enzimler belirli bir tepkime türünü katalizler ve substrat yapısında bulunan belirli bir bağa seçicidir. Lipit bağı içeren organik esterlerin hidrolizini katalizleyen lipazlar bu tür seçiciliğe örnek oluştururlar.
- **Sterokimyasal Seçicilik :** Bu gruptaki enzimler substratın belirli bir sterokimyasal şeklini katalizler. Diğer sterokimyasal şekillere karşı etkisizdir. Laktik dehidrojenaz, laktik asidin yükseltgenmesinde L-Laktik asidi yükseltirken, D-Laktik aside karşı katalitik aktivite göstermez.
- **Bütün bu seçiciliklerden farklı olarak diğer bir seçicilik türü aynı enzimin farklı kaynaklardan elde edilmiş analoglarının aynı substrata farklı etkiler göstermesi şeklindedir.** Örneğin polipeptit bağlarının hidrolizini katalizleyen kemotripsin ve tripsin aynı fonksiyonel gruplara sahip oldukları halde her bir enzimin aktif bölgesindeki yardımcı bağlarındaki farklılık nedeniyle, kemotripsin hidrofobik amino asit gruplarının karboksil bağlarını hidrolizlerken, tripsin lizin ve arginin gibi bazik aminoasitlerdeki karboksil bağlarını hidrolizler.

Enzim substrat etkileşmesi moleküler seviyede henüz tam olarak açıklanabilmiş değildir. Bu konuda farklı modeller oluşturulmuştur.

2.2. Enzim Aktivitesi

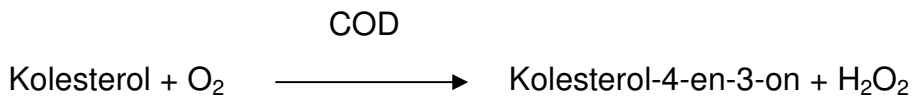
Enzim aktivite birimi (1 E.U.) yaygın olarak standart koşullarda 1 dakikada 1µmol substratı dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Bu tanım Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından 1965 yılında kabul edilmiştir (8).

Ancak gıda endüstrisinde kullanılan enzimlerin birçoğu için bu tanım farklı şekillerdedir, çünkü bu enzimler hammaddedir ve enzimatik olarak aktif protein miktarını ölçmek olanaksızdır. Bu nedenle konsantre ham enzim preparatları için aktivite mL enzim başına enzim birimi (EU) (EU / mL enzim) olarak veya preparatın içerdiği protein miktarı tayin edilmişse mg toplam protein başına EU (EU / mg toplam protein) olarak da tanımlanabilir (7).

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler, enzimler tarafından katalizlenen tepkimelerin aktivitesini dolayısıyla hızını etkileyen faktörler; enzim derişimi, substrat derişimi, sıcaklık, pH, iyonik aktivite, inhibitör veya aktivatörlerin derişimi, tepkime ürünlerinin derişimi ve özellikleri, sistemdeki akışkan kuvvetler, ışık ve diğer fiziksel faktörler olarak sıralanabilir. Bu faktörlerin enzim tepkimeleri üzerine olan etkilerini saptamak için etkisi ölçülmek istenen faktör dışındaki koşullar sabit tutularak sadece bu faktörün farklı değerlerindeki enzim tepkime hızları ölçülür (1).

2.3. Kolesterol Oksidaz Enzimi

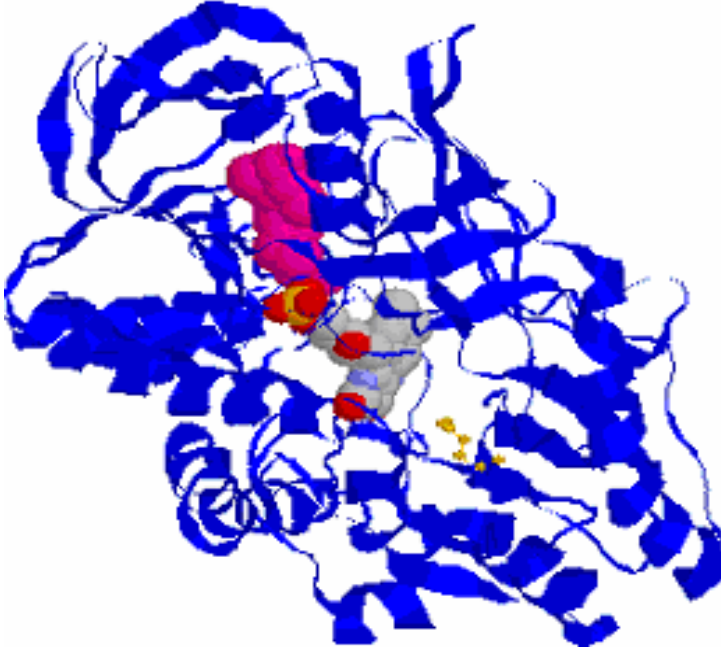
Kolesterol oksidaz çeşitli mikroorganizmalardan saflaştırılan iki işlevli bir enzimdir. Bu enzim bir aktif alanda iki reaksiyonu katalizler. İlk reaksiyonda kolesterolün, yükseltgenmesini, ikinci reaksiyonda ise oluşan yükseltgenme ürününün kolest-4-en-3-on'a izomerleşmesini sağlar ve H_2O_2 açığa çıkar (9-13).



1975'ten beri kolorimetrik tayin ile serum içindeki serbest kolesterol hesaplanmasında bu enzim kullanılmaktadır(9,14,15). Serum içindeki toplam kolesterolün hesaplanması klinik teşhisler için gereklidir. Kolesterolün yüksek değeri bazı damarların çeperlerinde birikerek damarların tıkanmasına, tiroit bezinin az çalışmasından kaynaklanan tiroit bozukluğuna, böbrek tubuluslarının dejenerasyonun yol açtığı bir hastalığına, şeker

hastalığına(diyabet) ve sarılık hastalığına neden olur. Düşük değeri ise boynun önünde bulunan tiroit bezinin fazla çalışmasından ileri gelen bir bozukluğa ve kansızlığa sebep olur (16,17).

Kolesterol oksidaz steroidlerin izomerizasyonunu ve oksidasyonunu sağlayan FAD 'a bağlı bir enzimdir(9,11). Enzim molekülünde 492 tane amino asit kalıntısı vardır. Aktif merkezdeki amino asitler His447, Wat541, Glu361'dir.En önemli amino asit kalıntısı Glu361'dir. Glu361 mekanizmadaki izomerizasyon basamağında bir proton alıcısı gibi görev yapar. Şekil.2.1.'de Glu361 küçük sarı toplar olarak gösterilmiştir. Proteine bağlı FAD, enzimin mavi renkte gösterilen α -heliks ile çevrenmiştir (16).



Şekil 2.1. Kolesterol oksidaz enziminin üç boyutlu yapısı

2.3.1. Kolesterol oksidazın kaynakları

Kolesterol oksidaz farklı ortamlarda bulunan mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Bunların sınıflandırılması yıllar boyunca geliştirilmiştir. İlk defa Turfitt, *Nocardia erythropolis* mikrobundan enzimi izole etmiş ve kolesterolün

yükseltgenmesi üzerine etkilerini incelemiştir. Stadtman ve arkadaşları ekstrakte edilen serbest enzimin (mycobacteriumdan elde edilen) inkübasyonundan 4-kolest-3-on 'u elde etmişlerdir. Bu gelişmelerden sonra bir çok mikroorganizmalarda bu enzim bulunmuştur. Kolesterol oksidazın elde edildiği mikroorganizmalar aşağıda verilmiştir (18,19).

- *Corynebactericum*
- *Arthrobacter*
- *Nocardia erythropolis* ve *Rhodococcus eryhcopolis*
- *Nocardia rhdochrous* ve *Rhodococcus rhdochrous*
- *Mycbacterium*
- *Pseudomonas*
- *Schizopyllum commune*
- *Brevibacterium cholesterolicum*
- *Streptovercillium cholesterolicum*
- *Streptomyces violascens*
- *Rhodococcus*

Streptomyces bakterisinden elde edilen kolesterol oksidazın özellikleri (17):

Sistematik adı	: E.C.1.3.3.6 kolesterol : oksijen oksidoredüktaz
Görünümü	: Donmuş toz hali sarıdır.
Molekül ağırlığı	: Yaklaşık 59 kDa (jel filtrasyonu ile)
İzoelektrik noktası	: $5,1 \pm 0,1$ ve $5,4 \pm 0,1$
İnhibitörleri	: İyonik deterjanlar , Hg^{++} , Ag^{++}
Optimum pH	: 6,5 – 7,5
Optimum sıcaklık	: 37 ° C
pH kararlılığı	: 4,0 – 9,0
Termal kararlılığı	: 70 ° C ' nin altında
Kararlılığı	: 37 ° C de en az bir ay

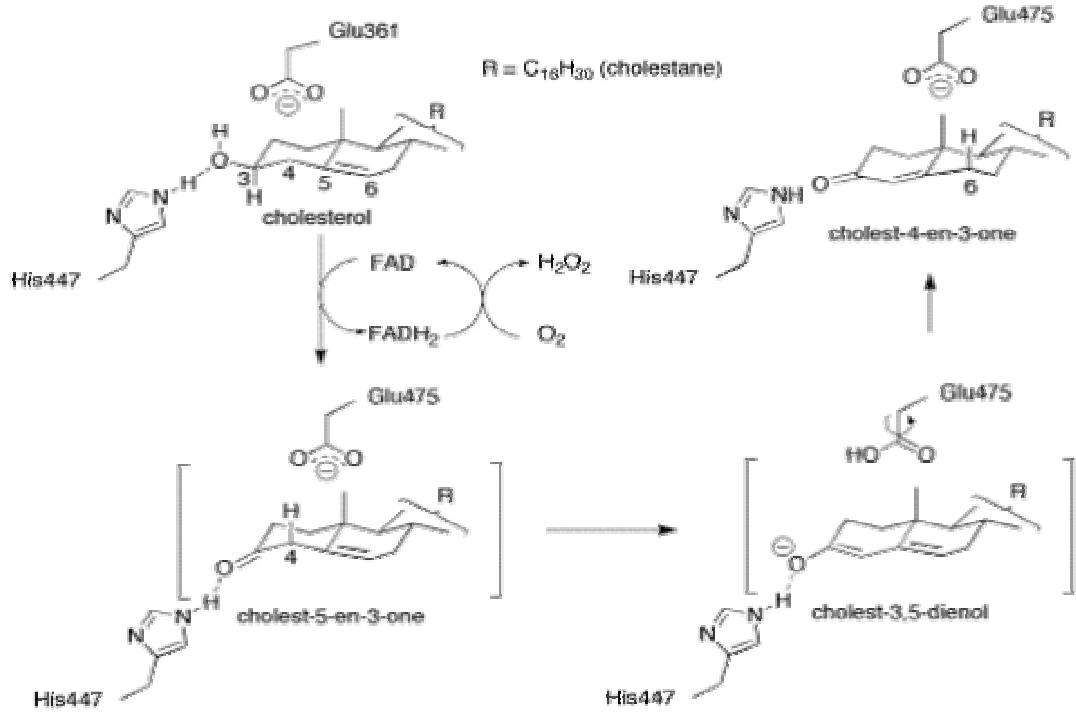
Farklı kaynaklardan elde edilen enzimin özelliklerinde farklılıklar görülür (18).

Çizelge 2.1. Çeşitli kaynaklardan elde edilen enzimlerin özelliklerinin karşılaştırılması

Bakteri adı	Optimum pH	Optimum sıcaklık	Km	Ma	İnhibitör- leri
Nocardia	7	32 ° C	55-45-69 ± 0,3 mM	—	—
Rhodococcus	—	—	—	80-40 kDa	—
Brevibacterium Sterolicum	7	37 ° C	—	55k Da	—
Streptomyces	7	37 ° C	4,5- 6,7.10 ⁻⁴ M	59 kDa	İyonik deterjan- lar, Hg ⁺⁺ , Ag ⁺⁺
Pseudomonas	7	37 ° C	—	56 kDa	Fe ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ , Hg ⁺⁺

2.3.2. Reaksiyon mekanizması

Kolesterol oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon mekanizması aşağıda gösterildiği gibidir. Katalizleme iki safhada gerçekleşir. İlk reaksiyon kolesterolün kolest-5-en-3-on'a yükseltgenmesi, ikinci reaksiyon ise kolest-5-en-3-on' un kolest-4-en-3-on ' a izomerizasyon reaksiyonudur (19).



Şekil 2.2. Kolesterol oksidaz enziminin reaksiyon mekanizması

2.3.3. Substrat spesifikliği

Nocardia, *Brevibacterium*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*’ dan elde edilen kolesterol oksidazın substrat spesifikliği deneyleri detaylı olarak yapılmıştır. *Nocardia*, *Brevibacterium*, *Schizophyllum*, *Streptomyces*’dan elde edilen kolesterol oksidazın substrat olarak kolesterolü kullanması halinde oksidasyon oranları karşılaştırılmıştır. Smith ve Brooks bunların substrat spesifikliğini detaylı olarak açıklamışlardır.

Pseudomonas’dan elde edilen enzimin substrat spesifikliği ile ilgili çok az şey bilinmektedir. Enzim ile farklı steroidlerin bağıl yükseltgenme oranları ölçümü hidrojen peroksit oluşumuyla mümkündür. Diğer kaynaklardan elde edilen kolesterol oksidaz enziminin aktivitesi için 3 β -hidroksi konfigürasyonu önemlidir. Farklı kaynaklardan elde edilen enzimin substrat spesifikliği de farklılık gösterir.

Substrat olarak dehidrokolesterol kullanıldığında bağıl olarak %78 oranında yükseltgenme gözlenmiştir. Bu aynı zamanda *Streptomyces Violascens* ve *Streptovorticillum Cholesterilium*'dan elde edilen enzimler içinde tercih edilen bir substrattır. *Nocardia*'dan elde edilen enzim için dehidroizoandesteron substrat olarak etki göstermediği halde, *Streptomyces Violascens* ve *Streptovorticillum Cholesterilium*'dan elde edilen enzimlerde substrat olarak aktiflik göstermiştir. *Pseudomonas*'dan elde edilen kolesterol oksidazın substrat spesifikliğı tabloda verilmiştir (18).

Çizelge 2.2. Kolesterol oksidaz enziminin substrat spesifikliğı

Substrat (0,5 mM)	Bağıl aktivite (%)
Kolesterol	100
Dehidrokolesterol	78
Ergosterol	51
Stigmasterol	40
Stigmastanol	32
7-dehidrokolesterol	24
Testesteron	0
5-kolesten	0
Dehidroizoandesteron	0
Kolestiril linoleyt	0

2.3.4. Kolesterol

Kolesterol 3-hidroksi-5-dehidro kolestan olup, hayvansal organizmalarda en çok bulunan bir steroldür. İnsan vücudunda bulunan kolesterolün bir kısmı besinler ile dışarıdan alınırken büyük bir kısmı da yağ asitleriyle esterleşmiş haldedir. Kolesterol, kan plazmasında yağlar ve yağ asitlerinin taşınmasında rol alır ve diğer steroid bileşiklerinin sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılır (14,15).

Kolesterol yaşam için gerekli olan mum kıvamında yağimsı bir maddedir. Beyin, sinirler, kalp, bağırsaklar, kaslar, karaciğer başta olmak üzere tüm vücutta yaygın olarak bulunur. Vücut kolesterolü kullanarak hormon, D vitamini ve yağları sindiren safra asitlerini üretir. Bu işlemler için kanda çok az miktarda kolesterol bulunması yeterlidir. Kanda fazla miktarda kolesterol bulunması kolesterolün kan damarlarında birikmesine, damarların daralmasına, sertleşmesine yol açar. Kolesterol hangi organın damarlarında birikirse o organa ait hastalıklar ortaya çıkar. Örneğin kalbi besleyen atar damarlarda kolesterol birikimi olursa, göğüs ağrısı, kalp krizi gibi sorunlar oluşur. Böbrek damarlarındaki birikim ise yüksek tansiyon ve böbrek yetmezliğine yol açabilir.

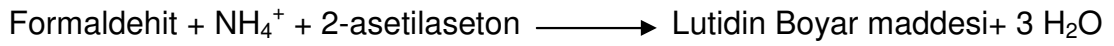
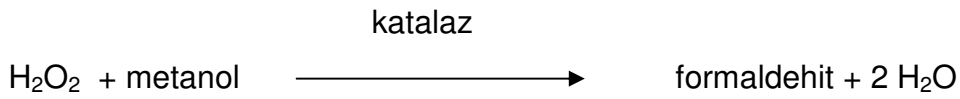
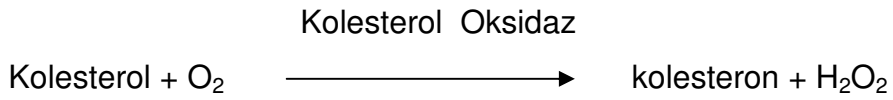
Kolesterol normal koşullarda kanda çözünmez. Kanda çözünmesi için karaciğerde bir proteinle birleşmesi gerekir. Bu kolesterol ve protein birleşimine lipoprotein adı verilir. İki çeşit lipoprotein vardır.

- Düşük yoğunluklu lipoproteinler(LDL): Kan kolesterolünün yaklaşık %70'ini taşımaktadırlar. Kan damarları duvarlarına girebilmek için yeterince küçüktürler ve damarlara zarar verirler. Kötü kolesterol olarak adlandırılırlar.
- Yüksek yoğunluklu lipoproteinler(HDL): Vücudun kullanmadığı kolesterolü karaciğerden safraya boşaltmak üzere taşır. Kolesterolün bir cins ters naklini yaptığı için iyi kolesterol olarak adlandırılırlar.

Kanda kolesterol ve LDL kolesterolün yüksek olması yüksek risk oluşturmaktadır. Ayrıca HDL kolesterolün düşük olması da bir risktir. Normal şartlarda insan kan plazmasında 130-260mg/100 mL kolesterol bulunur. Bunun üzerindeki değerler yüksek kolesterol seviyesi olarak bilinir (20).

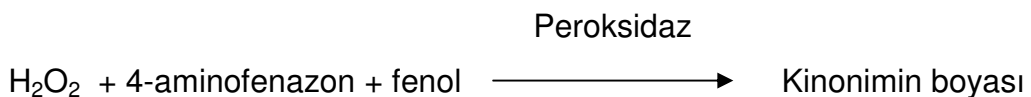
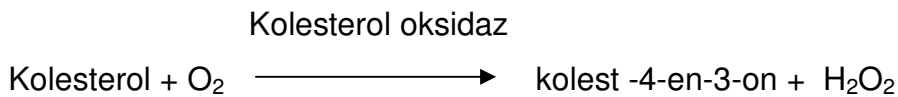
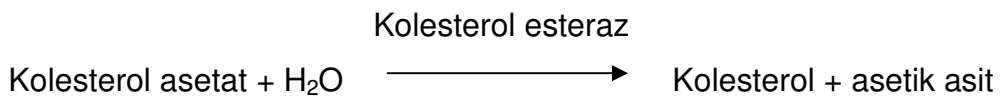
2.3.5. Kolesterol oksidazın uygulama alanları

- Gıda analizlerinde kolesterol tayini amacıyla kullanılır.



Katkı maddesi olarak yumurta sarısı içeren gıdalarda kolesterol tayini amacı ile kullanılır (6).

- Klinik analizlerde kolesterolün belirlenmesi amacıyla kullanılır. Kolesterol esterase, kolesterol oksidaz ve peroksidaza bağlı enzimatik kolorimetrik metot kolay duyarlı ve özeldir. Bu yüzden de rutin analizler için uygundur. Buda aşağıdaki kimyasal reaksiyonlara dayandırılmaktadır.



Bu örnekteki ilk reaksiyonda kolesterol esterleri kolesterol esterase tarafından kolesterol ve yağ asitlerine hidrolizlenir. İkinci reaksiyonda kolesterol, kolesterol oksidaz tarafından kolest-4-en-3-on ve H₂O₂' ye yükseltgenir.

H_2O_2 , peroksidaz katalizörlüğünde 4-aminofenazon ve fenol varlığında renkli 4-(p-benzokinon-monoimino)fenazon oluşumunu sağlar. İndikatör ve stokiyometrik olarak eşleşmiş reaksiyonlar yardımıyla kolesterol derişimine ulaşılır (21).

- Etkin enzim güçlü bir böcek öldürücüdür ve endüstriyel tarımda zararlı böcekleri kontrol eden bir maddedir (22).

2.3.6. Analitik uygulamaları

Analitik inceleme olarak kolesterol oksidazın kullanımı için birçok yeni uygulamalar vardır.

- Farklı örnek türlerinde kolesterolün saptanması için kullanılır. Bu örnekler
 - Toplam ve esterleşmiş serum
 - Yüksek ve düşük yoğunluklu (HDL-LDL) lipoprotein ölçümü
- Hücrelerdeki kolesterol tayini ve enzimlerin yol açtığı hücre zarlarının parçalanmasının tespit edilmesi
- İnsan safrası ve safra taşlarındaki toplam kolesterol tayini
- Kemilüminesans ve floresans metotlarıyla kolesterol tayin etme
- Biyosensör yapımı ve enzimin polimer matriksine modifiye edilmesi

Genelde kolesterol tayini için bir çok metot H_2O_2 ölçümüne dayanır. Bu nedenle bu metotlar doğrudan olmayan metotlardır. Bunun nedenleri çeşitlidir. Birinci olarak H_2O_2 ' in renk yapıcı bileşenlerle eşleşmesi sonucunda yüksek seviyede renk verici maddeler oluşur. Buda daha hassas kolesterol ölçümü elde edilmesini sağlar. İkinci olarak H_2O_2 ' nin redoks tepkimesi açık bir şekilde saptanır. Buda kolay voltametrik ve amperometrik ölçüm yapılmasını sağlar (18).

3. ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Enzimler özel bazı bioorganik reaksiyonların oluşumunu hızlandıran ve verimini arttıran protein yapısında molekülleridir. Çok yüksek katalizleme gücüne sahip olan protein yapısındaki enzimler metabolizmaya katılan madde moleküllerini etkinleştirirler. Şekerlerden alkolün teşekkülü, peynir yapılması, şarabın sirkeleşmesi ve idrarda amonyak teşekkülü gibi enzimatik olaylar çok eski zamanlardan beri bilinmektedir (6).

Protein yapılarından dolayı enzimler ısı, ışık, basınç, kuvvetli asit ve baz etkisi ile bozunurlar. Aslında her enzimin kendine özgü sıcaklık, pH ve basınç koşulları bulunmakla beraber etkinlik optimumu 40°C dolaylarındadır.

Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin, aktivitesini yitirmeden geri kazanılması oldukça zor ve pahalı bir proses gerektirir. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek zor olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar (6,24-27).

Bilim adamları tüm bu sorunları olumlu yönde çözümleyebilmek, enzimleri endüstriyel ve biyoteknolojik alanda daha çekici hale getirmek için, daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yönelmişlerdir. Böylece enzimlerin ısısal, mekanik ve kimyasal kararlılıklarını arttırma ve birçok kez kullanılabilme düşüncesi immobilize enzim olgusunu

doğurmuştur. Özellikle son yıllarda gıda ve ilaç sanayilerinde, analitik kimya uygulamalarında saf ürün elde etmek amacıyla katalizör olarak kullanılan enzimlerin immobilize edilerek teknolojiye de kullanılmaları büyük önem kazanmıştır. Özellikle son 30 yılda enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmış olup bu alanda yapılan yayınların sayısı yıldan yıla artmaktadır.

Enzimler suda çözünmeyen bir matrisle bağlandıklarında , matrisin içinde tutuklandıklarında veya katalitik etkileri kaybolmadan birbirlerine bağlandıklarında immobilize olurlar. Immobilize enzimlerin özellikleri kullanılan metoda ve matrisin yapısına bağlı olarak değişebilir.

İmmobilizasyon işlemi ile:

1. Immobilize enzimin optimum pH ' ı değişebilir.
2. K_m değeri immobilizasyondan etkilenebilir
3. Enzimin optimum sıcaklığında artışlar olabilir.
4. Matris enzim için yeni bir ortam oluşturarak enzimin aktivitesini değişik yollardan etkiler. Enzimin aktif bölgesi değişikliğe uğrayabilir veya matrisin substratın hareketini engelleyebilir (6).

Matris enzim için yeni bir ortam oluşturarak enzimin aktivitesini değişik yollarla etkiler. Kelime anlamı olarak hareketi sınırlandırma anlamına gelen "immobilizasyon" tutuklanmış enzim moleküllerinin sürekli bir işlemde kullanılmasıdır.

Enzim moleküllerinin tutuklanma işlemi :

1. Enzimin suda çözünmeyen polimere kovalent olarak bağlanması
2. Suda çözünmeyen organik veya inorganik desteklerde adsorpsiyonu
3. Suda çözünmeyen jel matrisler veya yarı geçirgen mikrokapsüller içinde tutulması suretiyle yapılmaktadır. Her durumda enzimin yerleşmesi için suda çözünmeyen bir materyal gereklidir (6).

Son yıllarda immobilizasyon teknolojsinin önemi hızla artmakta olan araştırma alanlarının başlıcalarındandır. Uygun destek maddelerine ilaç, protein, enzim, mikroorganizma, bitki yada hayvan hücreleri yüksek düzeylerde tutuklanıp yapay organ sistemleri biyosensör ve reaktör uygulamaları ile kontrollü ilaç salınım sistemlerinde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır.

Tarihte ilk enzim immobilizasyonu Nelson ve Grifftin (1916) tarafından adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Modern anlamda ise ilk olarak Grubhofer ve Schleith (1954) tarafından bazı immobilize enzim türevleri hazırlanarak kinetik parametreleri incelenmiştir. Daha sonra bu alandaki çalışmalar dünyanın her tarafında popülerite kazanmış olup enzimler değişik amaç ile immobilize edilmiştir (28).

Başta Amerika Birleşik Devletleri ve Japonya olmak üzere birçok ülkede immobilize enzimler yardımıyla üretim yapan fabrikalar kurulmuştur. Ülkemizde ise bu konuda endüstriyel boyutta herhangi bir uygulamaya henüz rastlanmamıştır (6,28).

Enzimlerin adlandırılmasında olduğu gibi immobilize enzimler için kullanılan terimlerde de bir kargaşa meydana gelmiştir. Suda çözünmeyen enzim, bağlanmış enzim, matrikse bağlı enzim, tutuklanmış enzim gibi terimler de kullanılmıştır. 1971 yılında yapılan 3.Biyoteknoloji Biyomühendislik Sempozyumu ve 1.Enzim Mühendisliği Konferansında “immobilize enzim” terimi tavsiye edilmiş böylece modifiye enzimlerin isimlendirilmesine açıklık getirilmiştir. İmmobilize enzim çerçeve bir isim olup tüm değerleri kapsarken “tutuklanmış”, “çözünmez hale getirilmiş”, “bağlanmış” gibi terimler yalnız alt bir immobilizasyon yöntemini ifade etmektedirler (6).

Enzim immobilizasyonunda dikkat edilmesi gereken hususlar; enzim immobilize edilirken aktif merkezin bu işlemlerden kesinlikle etkilenmemesi gerekir. Aktif merkezde iki bölge vardır. Bunlardan biri katalitik merkez diğeri

ise substrat spesifikliği sağlayan merkezdir. Aktif merkezdeki amino asitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değişirse katalitik aktivite düşer ve substrat spesifikliği değişir. İmmobilizasyonun sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir. Enzim ile destek arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise bu bağlanmanın aktif merkez üzerinde gerçekleşmeyeceği destekler seçilmeli veya immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Bu koruma görevi bazen kompetitif inkübatör tarafından sağlanır. İmmobilizasyon işlemi ılıman koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yüksek basınç , kuvvetli asidik veya bazik ortam , organik çözücüler veya yüksek tuz konsatrasyonu ile muamele denatürasyona dolayısıyla aktivite kaybına neden olur (6).

İmmobilizasyon yöntemi seçiminde :

- Güvenirlik
- Enzim aktivitesinin korunması
- Maliyet
- İmmobilize enzimin kararlılığı

dikkat edilmesi gereken 4 ana husustur.

Enzimatik aktivitenin korunması çok önemli olup, özellikle kovalent bağlanma ile immobilizasyonda enzim ile destek arasında oluşan bağların aktiviteyi ve kararlılığı doğrudan etkilediği göz önünde bulundurulmalıdır.

Destek seçiminde ise, immobilizasyon yöntemi birim hacimdeki aktivite ve istenen mekanik özellikler üzerinde durulur. İyonik veya kovalent bağlanma ile gerçekleştirilen immobilizasyonda desteknün fonksiyonel gruplar içermesi zorunludur. Yüklü desteklerin kullanılması enzimin optimum pH'sının 1-2 birim, K_m değerinin ise 10 katı kadar değişimine sebep olabilir. Substrat büyük ise tutuklanma yöntemleri ve poröz destekler uygun değildir. Gözeneksiz destekler için enzim aktivitesi, destek partikülün dış yüzeyi ile orantılıdır.

İmmobilizasyon sırasında enzim molekülü konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. İmmobilize enzimin zincir hareketleri çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar aşağıda verilmiştir.

- İmmobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi
- Destek ile enzimin karşılıklı etkileşmesi
- Aktifleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesi gibi.

Enzimler içinde bulundukları çevre tarafından etkilenirler. Enzimin katı destek üzerinde immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikroçevreyi etkileyebilir. Buda enzmin görünen davranışları üzerinde bazı değişiklikler oluşturur (36).

İmmobilize enzimlerin en önemli avantajları şu şekilde sıralanabilir (6,30-32).

1. İmmobilize enzimler , reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılabilir. (süzme, santrifüjleme gibi) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
2. İmmobilize enzimler, çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı dayanıklıdır.
3. İmmobilize enzimler birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
4. İmmobilize enzimler doğal enzime göre daha karardır.
5. İmmobilize enzimlerde ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
6. İmmobilize enzimler, birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
7. İmmobilize enzimler bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilirler.
8. İmmobilize enzimlerde kendi kendini parçalama olasılığı azdır.

Enzimin immobilize edilmesinin bazı dezavantajları da vardır. Bunların başlıcaları aşağıda özetlenmiştir (33).

1. İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir veya kaybolabilir.

2. Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
3. Enzim desteklerinin maliyeti yüksektir.

3.1. Destek Seçimi

Enzime göre destek seçimi çok önemlidir. Destek seçiminde partikül büyüklüğü, toplam yüzey, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve desteğin kimyasal bileşimi kriterleri esas alınır. Bağlanmış enzim miktarı ve enzimin immobilizasyon sonrasındaki aktivitesi desteğin yapısına bağlıdır. Genel olarak desteğin hidrofil karakteri ve yüzeyi arttıkça birim destek başına bağlı enzimin miktarı da artar.

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Destek membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Destekte olması gereken özellikler aşağıda verilmiştir (31,32).

- Hidrofil karakter
- Suda çözünmeme
- Gözenekli (poröz) yapı
- Mekanik kararlılık ve uygun partikül formu
- Kimyasal ve termal kararlılık
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik
- Zehirsizlik
- Rejenere olabilme
- Kovalent bağlanmada kullanılacak destekler ılıman koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı

Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan destekler çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Yaygın olarak kullanılan destekler

Anorganik	Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Kil , cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamit
Bentonit	Dekstran	Naylon
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerler
Titandioksit	Karragenan	Oksiranlar
Zirkonyumdioksit	Kollojen	Metakrilat
Nikeloksit	Kitin ve kitosan	İyon değiştirici reçineler
Pomza taşı	Jelatin	Maleikanhidritpolimerleri
Aktif karbon	Albümin	
Metaller	İpek	
Metal oksitler	Aljinat	

3.1.1. Polimerler

Polimerler (makromolekül), küçük ve basit bir kimyasal birimin pek çok sayıda tekrarlanmasıyla oluşan büyük bir moleküldür. Polimer moleküllerini oluşturmak üzere birbirleriyle kimyasal bağlarla bağlanan küçük moleküllere monomer adı verilir. Monomerlerin birbirine bağlanabilmeleri için üzerlerinde vinil, karboksil vb. gibi fonksiyonel gruplar olmalıdır. Monomer birimlerinden başlayarak polimer moleküllerinin elde edilmesine yol açan reaksiyonlara polimerizasyon reaksiyonları denir. Polimer oluşturan yapı birimleri hemen hemen monomere benzer. Bir polimer molekülünde bu yapı birimlerinden (tekrarlanabilir ünite) yüzlercesi bir aradadır ve bu nedenle polimerler yüksek molekül ağırlığına sahiptir.

Yüksek polimerler kovalent bir yapı gösterir. Polimerlerin kovalent yapıli makromoleküllerden oluştuğu varsayımı 1920 yılında Staudinger tarafından ileri sürölmüşür. Polimerlerin oluşmasını düzenleyen temel bilimsel ilkeleri 1925-1935 yılları arasında bulunmuştur. Polimer maddelerinin çeşitli

özellikleri dolayısıyla endüstriyel ölçülerde kullanıma başlanması ise bu yüzyılın başlarında gerçekleşmiştir (34,35).

Polimerlerin en belirgin özellikleri şu şekilde özetlenebilir (36).

- Molekül ağırlıkları genellikle birkaç bin ile birkaç milyon arasında değişir.
- Belirli tekrarlanan ünitelerden oluşurlar.
- Polimer sentez reaksiyonları çok fazla sayıda basamaklardan oluşur.
- Polimer genel olarak disperstir, yani belirli bir polimer örneğinde çeşitli zincir uzunluğunda polimer molekülleri vardır.

Polimerlerin sınıflandırılması farklı biçimlerde yapılabilir.

- Doğada bulunmasına göre (doğal , yapay)
- Organik veya inorganik oluşuna göre (organik , inorganik)
- Sentez tepkimesine göre (basamaklı , katılma)
- Zincirin kimyasal ve fiziksel durumuna göre (doğrusal , dallanmış , çapraz bağlı)
- Isıya karşı davranışına göre (termoplastik , termoset)
- Zincir yapısına göre (homopolimer , kopolimer)

Tek tür monomerlerden oluşan polimer homopolimer, birden çok türde monomerlerden oluşan polimer ise kopolimer olarak tanımlanır. Monomerlerin zincir üzerinde sıralanma şekline bağlı olarak kopolimerler; rastgele, ardışık, blok ve aşırı olarak sınıflandırılırlar. Bu tür kopolimer türlerinin çapraz bağlı biçimleri de vardır. Pamuk, yün, ipek, kağıt, deri ve kauçuk gibi günlük yaşamda kullandığımız doğal organik polimerler canlı ürünü olup yapıları son derece karmaşıktır (34).

Doğal polimerler, doğada kendiliğinden oluşan polimerlerdir. İnsanlar her dönemde bu polimerleri değişik alanlarda kullanmışlardır. Çok farklı doğal

polimerler vardır. Bitki ve ağaçların yapısını oluşturan selüloz doğada en bol bulunan polimerdir. Selüloz gibi genelde doğada bulunan polimerlerin önemli bir kısmı canlıların yapısında yer alır. Yün, saç, tırnak protein yapısındaki doğal polimerlere örnektir.

Bazı durumlarda uygun işlemlerle doğal polimerlerin kimyasal yapıları değiştirilir ve başka özelliklere sahip polimerler hazırlanır. Örneğin çözünmez karakterdeki selülozun hidroksil gruplarının tamamına yakınının asetillenmesiyle, çözünebilen selüloz nitrat oluşur. Doğal polimerlerden çıkılarak yapılarının değiştirilmesiyle elde edilen bu tür polimerlere yarı-sentetik polimer adı verilir.

Sentetik polimerler ise uygun monomer veya çıkış maddeleri kullanılarak insanlar tarafından hazırlanır(35). Sentetik polimerler fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak sıklıkla kullanılırlar. Sentetik polimerler mikroorganizmaların saldırılarına karşı dirençlidirler ve saflıklarını korurlar. Yaygın olarak kullanılan sentetik destekler polistiren, vinil ve allil polimerler, poliamitler, poliakrilatlar, polimetakrilatlar ve bunların türevleridir.

Hidrojeller , sulu ortamda şişebilen ve üç boyutlu çapraz bağlı hidrofilik özellikte ağ yapılı polimerlerdir. Yapılarına çözücü alma kapasitesi kendi kütlelerinin en az %20'si kadardır. Hidrojeli oluşturan ağ yapı çapraz bağlar ile birbirine bağlanmış polielektrolit zincirlerden oluşur. Bu zincirlerde substitue grup olarak genellikle karboksilik asit grupları bulunur. Polimer zincirleri üzerindeki negatif yükler birbirini iterler ve genişlerler. Karboksil grupları ayrıca hidrojen bağları ile suyla etkileşirler. Çapraz bağların varlığı polimer zincirlerinin çözünmeksizin jelin şişmesini sağlar. Son zamanlarda hidrojellerin geniş bir kullanım alanının olduğu ortaya çıkmıştır. Kontrollü ilaç salınımı, kontak lens, göz hekimliği, kan torbalarının yapımında kullanılması gibi pek çok uygulama alanı vardır. Hidrojeller, elastik yoğunlukları,

yumuşaklıkları, yüksek su hacmi ile biyouyumluluğu gibi özelliklere sahip olmaları nedeniyle neredeyse canlı dokulara benzerler (37).

Hazırlama yöntemlerine göre 4 tür hidrojel bulunmaktadır.

- Homopolimerik hidrojeller: Tek bir hidrofilik monomerin çapraz bağlanması ile oluşurlar.
- Kopolimerik hidrojeller: İki komonomerin çapraz bağlanması ile hazırlanırlar. Ancak monomerlerden biri hidrofilik yapıda olmalıdır.
- Çoklu polimerik hidrojeller: İki yada daha fazla komonomerin reaksiyonu ile oluşurlar .
- İç içe geçmiş ağ yapılı hidrojeller (IPN, interpenetrating network) : Çapraz bağlı iki polimerik örgünün fiziksel olarak karışması ile oluşmaktadır.

Makromoleküler zincirler, çözelti içinde, ideal durum dışında bir takım etkileşimlere uğrayabilirler. Elektrostatik etkileşimle, hidrojen bağları, yük aktarımı gibi ikincil bağlanma kuvvetlerinin sebep olduğu, iki yada ikiden fazla farklı makromoleküler zincirinin birleşmesiyle elde edilen bileşikler genellikle “inter polimer kompleksleri” olarak adlandırılır (38). İnter polimer kompleksi oluşumunu etkileyen en önemli faktörler

- pH
 - Polimer zincir uzunluğu , yapısal düzgünlük
 - Termodinamik özellikleri (entalpi , entropi)
 - Seçimlilik ve yer değiştirme reaksiyonları
 - Katı hal özelliklerindeki değişimler
 - İyonlarla etkileşim özellikleri
- şeklinde sıralanabilir.

Makromoleküler zincirlerin, ideal hal dışında çözelti içerisinde etkileşim halinde olabileceği daha öncede belirtilmişti. İnter polimer komplekslerini, genel olarak ana etkileşim kuvvetlerine göre 4 gruba ayırmak mümkündür.

1. Polielektrolit kompleksler
2. Hidrojen bağlı kompleksler
3. Stereo kompleksler
4. Yük transfer kompleksleri

Polielektrolit kompleksler, zıt yüklü polielektrolitlerin, yani polianyonlar ve polikasyonların karıştırılmasıyla coulomb kuvvetlerinden kaynaklanan etkileşimler sonucu oluşurlar. Polielektrolit kompleksler genellikle ya polikasyonlar ve polianyonların sulu çözeltilerinin karıştırılmasıyla yada uygun fonksiyonel gruplar içeren monomerlerin polimerizasyonuyla elde edilirler. Polielektrolit komplekslerin oluşumu, bileşenlerin karakteristik özelliklerinden (yük yoğunluğu ve polimer zincirinin sertliği, iyonik bölgelerin pozisyonu) ve kimyasal çevreden (pH, iyonik kuvvet, sıcaklık, derişim) etkilenir. Ayrıca poliekeltrolit etkileşimlerin incelenmesi, bazı biyolojik topluluklara benzerliklerinden dolayı, biyolojik olayların anlaşılmasına yardımcı olabilir (39). Bu tür komplekslere örnek olarak kitosan ve poli(2-akriloamido-2-metilpropanslfonik asit), poli(etilenglikol) ve poli(metakrilikasit) verilebilir (40,41).

Hidrojen bağı içeren kompleksler, proton alan ve proton veren birimler taşıyan polimerlerin bileşiminden oluşurlar. Bu tür komplekslerin oluşumu polielektrolit komplekslerde kullanılan yöntemler ile incelenir. Infrared, Raman ve NMR gibi spektroskopik gibi metotlar, H-bağlı komplekslerin incelenmesinde sıkça kullanılan yöntemlerdir. Bu tür kompleksleşmeye örnek olarak, poli(karboksilik asit) ve poli(oksietilen), poli(vinilalkol) ve poli(akrilamit) verilebilir (39,42).

Stereo kompleksler genel olarak Van der Waals kuvvetleriyle, izotaktik ve sindiotaktik polimer çift türlerinin etkileşimi sonucunda oluşur. Bu tür kompleksler, yüksek düzeyde özel yapısal düzenlilik gösterirler. Polar organik çözücülerde kompleks, bir çözelti, olarak elde edilir ve kompozisyonu ([izotaktik])/[sindiotaktik] birimlerinin mol oranı) yaklaşık 1/2 kadardır. Tersine

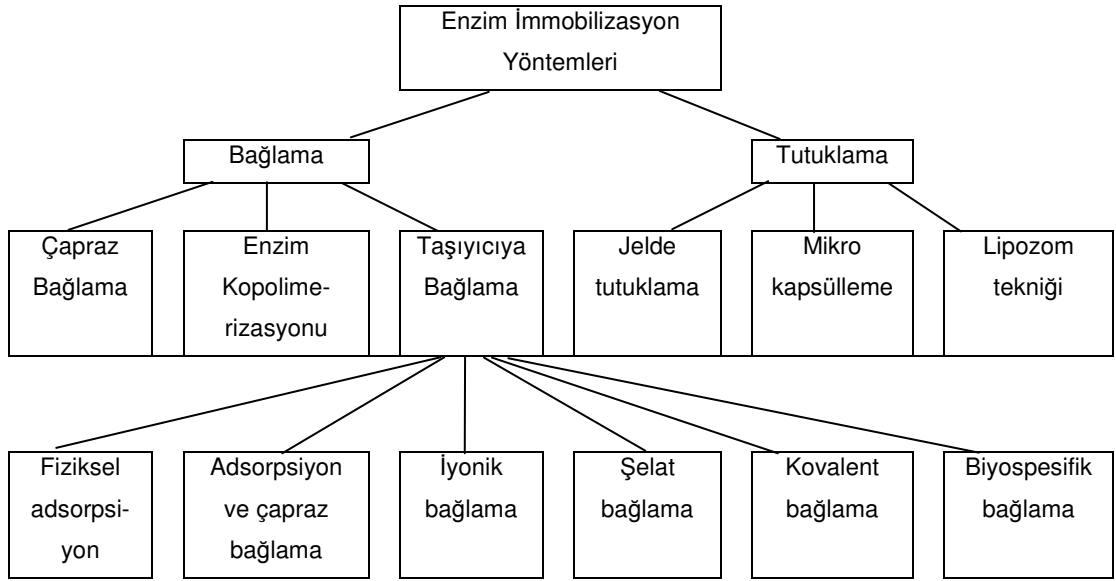
apolar çözücülerde kompleks jel olarak elde edilir, ancak kompozisyonu yine $1/2$ 'dir (39).

Yük aktarım kompleksleri, elektron alan ve elektron veren polimerlerin yer aldığı sistemlerde yük transferleri sırasında meydana gelen etkileşimler yoluyla oluşur. Bu tür kompleksler genellikle, UV-Görünür bölge spektrumlarıyla karakterize edilirler. Tekrarlanan birim oranı hemen hemen eşit orandadır. Bu tür intermoleküler komplekslerin oluşumu üzerine bugüne değin sadece birkaç teorik çalışma yapılmıştır. Yük aktarım komplekslerine örnek olarak, poli(akrilik asit)-metal-poli(akrilamit) üçlü komplekslerinin elektriksel özelliklerinin ve yapısal karakterizasyonunun incelenmesi verilebilir. Bu çalışmada kullanılan metal iyonlar Er^{3+} ve La^{3+} 'tür. Bu konu ile diğer bir çalışma ise poli(akrilik asit), poli(N-vinil-2-pirolidon) ile yapılmıştır (43,44).

3.2. İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon enzim moleküllerinin hareketini veya serbest difüzyonunun sınırlayan bir proses olarak tanımlanabilir. Genellikle bu proses suda çözünmeyen bir desteğe bağlanması ile gerçekleşir.

1960'lı yıllardan bu yana enzimlerin immobilizasyonu için birçok immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Genel olarak enzimlerin immobilizasyon yöntemleri şekilde verilmiştir (5,6).



Şekil 3.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile destek arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği destekler seçilmeli yada immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır (45).

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

1. Kimyasal Yöntemler

- Kovalent bağlanma
- Çapraz bağlanma

2. Fiziksel Yöntemler

- Adsorpsiyon ile immobilizasyon
- Hapsetme ile immobilizasyon
 - Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi
 - Kafes tipi hapsetme yöntemi

3.2.1. Kimyasal yöntemler

Bu yöntem, suda çözünmeyen aktifleştirilmiş polimer ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu veya birden fazla enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumunu gerektirir. Bu yöntem çoğunlukla tersinmezdir yani serbest enzimin yeniden geri kazanılması mümkün değildir (46,47).

Kimyasal yöntemle immobilizasyonla birlikte enzimin kimyasal ve fiziksel özellikleri de değişebilir. Bazı organik fonksiyonel gruplar çıkarılarak , farklı yapıda ve aktivitede gruplar elde edilebilir. Böylece immobilize edilmiş enzimlerin, serbest haldeki özelliklerine göre değişmeler gözlenebilir. Kararlılık ve dayanıklılık açısından pek çok üstünlükleri ortaya çıkarken kinetik özelliklerinde de farklılıklar görülür.

Kimyasal bağlanma yönteminde suda çözünmeyen fonksiyonlu polimer ile bir veya daha çok enzim molekülü arasında en az bir kovalent bağın meydana gelmesi gerekmektedir (46).

Kimyasal yöntem ile immobilize edilmiş enzimin serbest haline göre farklı aktiviteye sahip olmasında, seçilen enzim ve destek maddesinden başka spesifik birleşme şartları da önem taşır. Bir enzimin desteğine başarılı bir şekilde bağlanabilmesi ve aktivasyonun sağlanabilmesi için enzim ile desteğin çok özel uygulamalardan geçmesi gereklidir (48). Elde edilen enzim-destek sistemi, serbest enzime göre daha düşük katalitik etkinlik gösterebilmektedir (49). Bu durumun büyük molekül ağırlıklı substratların ve makromoleküllerin sterik engellenmesinden ileri geldiği öne sürülmüştür(50).

Kimyasal bağlanma ile immobilizasyonun üstünlüğü, immobilize enzimin çok kararlı olması, destek maddesinin çok dayanıklı olması gibi önemli avantajları vardır. Bunun yanında immobilizasyon veriminin sınırlı olması, reaksiyon şartlarının çok özel olması , kimyasal olarak inert olan destek maddelerine

uygulanamaması gibi bazı dezavantajları da vardır (46). Kimyasal bağlanma ile immobilizasyon iki grupta incelenir.

- o Kovalent bağlanma
- o Çapraz bağlanma

Kovalent bağlanma

Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzim immobilizasyonunda sık kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin sağladığı yararlar, enzim türevlerinin kararlı olması ve enzimin çözeltiye geçmemesi olarak sıralanabilir.

Kolavent bağlı enzim sistemleri ile ilgili ilk çalışmalar Gruphofer ve Schleith tarafından 1953 yılında diazoaktiflenmiş poliamino stirene; α -amilaz, pepsin ve ribonükleazın immobilizasyonu ile başlamıştır.

Kovalent bağlanma genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Kovalent bağlı destek-enzim kompleksinin aktifliği doğal enziminkinden farklı olabilir. Bu farkın büyüklüğü destek materyalin biçim ve büyüklüğüne, etkileşme metodunun doğasına, destek materyalin bileşimine, enzimin yapısına ve reaksiyon sırasındaki spesifik şartlara bağlıdır (51).

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon, destek yüzeylerde uygun bir yöntemle etkin bölgeler oluşturarak enzim molekülleri ile destek yüzeyler arasında kovalent bağ oluşturur. Enzim molekülleri destek yüzeye α ve β – amino gruplar, karboksil, hidroksil, imizadol, sülfidrilgrupları, fenol halkaları gibi bazı özel fonksiyonel gruplar üzerinden bağlanır. Bu gruplardan –SH ve β -amino grupları destek yüzeyindeki uygun gruplar ile doğrudan tepkimeye girebilir. Bunun yanında –OH grupları gibi bazı grupların destek grupla tepkimeye girmeden önce aktive edilmeleri gerekir.

Bağlanması istenilen grubun aktivasyonu destek yüzeyinde gerçekleşir, böylelikle katalitik aktivite azalma riski ortadan kaldırılır. Grupların aktivasyonu için, -OH gruplarının siyanojen bromür (CNBr) ile aktivasyonu veya -COOH gruplarının klorla aktivasyonu örnek olarak verilebilir.

Kovalent bağlanma yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması, böylece her türlü akış ortamından kullanılabilirliğidir. 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 arasındaki sıkı etkileşim enzimin doğal konformasyonunu bozabilir (52).

Çapraz bağlanma

Küçük molekülü iki veya daha çok fonksiyonlu maddeler (reaktifler), enzim molekülleri ile aralarında bağ yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. Molekül içi bağlanmalar yanında moleüller arası bağlanmalarda söz konusudur (53).

Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve oluşturulması zordur(29). Enzim aktifliği; reaksiyon süresi, iyonik şiddet, pH, sıcaklık, çapraz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır.

Bu yöntemin en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Yöntemin dezavantajı ise moleüller arası çapraz bağlanma reaksiyonun kontrol edilmesindeki güçlüklerdir. Çapraz bağlanma reaksiyonu çok ılımlı şartlarda

gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Bunun yanı sıra çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdır. Bu sebeplerden dolayı sık kullanılan bir yöntem değildir (6).

3.2.2. Fiziksel yöntemler

Fiziksel yöntemler kovalent bağ oluşmasına dayanmayan ,enzimin belirli bir yere tutturulmasını içerir. Enzim immobilizasyonu elektrostatik etkileşme, iyonik bağ oluşumu, proteinler arası etkileşme gibi belirli fiziksel kuvvetlere bağlı kalmaktadır. İmmobilizasyon, enzimin destek maddesindeki mikro bölmeler içerisinde veya gözenekli membranlarda tutturulmasıyla sağlanır. Bu yöntemi, kovalent bağlanma ve çapraz bağlanma ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün kimyasal olarak herhangi bir desteye bağlanmamış olmasıdır. Prensipte fiziksel immobilizasyon metotları tamamen tersinirdir. Bunun yanı sıra pek çok özel metotta, belirlenen ideal davranışlar görülmez ve önemli ölçüde tersinmez bağ oluşumu gözlenir. Bu arada çok değişkenli ve kesin bir şekilde sınıflandırılması mümkün olmayan immobilizasyon türleri mevcuttur (6).

Adsorpsiyon ile immobilizasyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve basit yöntemdir. Adsorpsiyonun asıl amacı enzim immobilizasyonu olmayıp enzim saflaştırmaktır. Ancak son 20-25 yıldan beri suda çözünmeyen desteklerde adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonunda oldukça sık kullanıldığı görülmektedir (54).

Yöntem; yüzey aktif, suda çözünmeyen katı matriksin (adsorban) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin katı matriks üzerinde fiziksel adsorpsiyonuna veya iyonik bağlanmasına dayanır. Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyondan sorumlu kuvvetler hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik

etkileşmelerdir. İyonik bağlanma ile immobilizasyon proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karşıt yükleri arasında çekim kuvvetine dayanır.

Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işleminden geçirilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar, aktifkarbon, gözenekli cam, diatometoprağı, CaCO_3 , kül, paladyum, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluta ve kalsiyum fosfattır (29). Bir enzimin suda çözünmeyen destekte adsorpsiyonu pH, çözücü, iyon şiddeti, enzim adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere çok bağlıdır.

Metodun dezavantajı, enzim ile adsorban (destek maddesi) arasındaki zayıf bağlardan dolayı adsorplanan enzimin kullanım esnasında destekten uzaklaşabilmesidir. Bu yöntemde enzim aktifliğini büyük ölçüde veya tamamen korur. Ayrıca adsorpsiyon ile immobilizasyon tersinirdir ve buda destek maddesinin ve enzimin başka amaçlar için tekrar kullanımını sağlar.

Hapsetme ile İmmobilizasyon

Bu yöntem polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesine dayanır. Enzim sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer oluşumu; ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınlarıyla başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir. Bu yöntem her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için kullanılabilir. Hapsetme ile immobilizasyon yöntemi mikrokapsül ve kafes tipi immobilizasyon olmak üzere iki gruba ayrılır (51).

Mikrokapsül ile Hapsetme

Mikrokapsül ile hapsetme metodu gözenekleri 10-1000µm çaplı, yarı geçirgen membranlar içinde enzim moleküllerinin hapsedilmesine dayanır.

Yarı geçirgen membran, büyük protein ve enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürünlerin serbestçe girip çıkmasına izin verir.

Yarı geçirgen mikrokapsüllerin hazırlanmasında iki genel metot uygulanmaktadır. Bunlardan birincisi koagülasyona dayalı olup kimyasal bir reaksiyon içermeyen basit bir yöntemdir. Faz ayrımı polimerizasyonu olarak adlandırılır. Çözücü içerisinde enzim ve membran maddesi çözülür ve bu çözelti mikrodamlacıklar halinde maddeye aktarılır. Bu yöntem ile yapılan immobilizasyonda, enzim aktivitesinde büyük ölçüde bir artış sağlanmaktadır (55). Tekniğin spesifik olmayışı ve basitliğinden dolayı bütün enzimlere uygulanabilmektedir.

Diğer mikrokapsülleme metodu, kimyasal özellik taşıyan ara yüzey polimerizasyon metodudur. Bu metotda çöktürücü madde içinde enzim çözeltisinin mikrodamlacıkları hazırlanır. İki sıvının birleşme noktasında polimerleşme görülür. Yarı geçirgen mikrokapsül membranı, iyi bilinen poliamit (nylon) sistemi ile yapılır ve çok çeşitli diaminlerle, diasit halojenürleri kullanılarak amit kopolimerleri elde edilir (55). Bu yarı geçirgen mikrokapsül membranlarının gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır.

Mikrokapsülleme ile hapsetme yönteminde herhangi bir modifikasyon olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine çok yakındır. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır (56). Yüzey-hacim oranının büyük olması mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat reaksiyonunu artırır. Yöntemin dezavantajları, mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein konsantrasyonuna gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler için sınırlı olmasıdır. Bu dezavantajlara rağmen enzimler daha çok mikrokapsülleme ile immobilize edilmektedirler.

Kafes Tipi İmmobilizasyon

Bu yöntem, enzim çözeltisi içinde yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin oluşturulması temeline dayanır. Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın olduğu ortamda enziminde bulunması ile enzim çapraz bağlanma sonucu oluşan odacıklarda tutuklanır. Bu amaçla en çok kullanılan polimerler N,N-metilenbisakrilamit ile çapraz bağlanmış poliakrilamittir.

Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Yöntemde enzim içeren monomer veya polimer çözeltilerine UV veya gama ışınları uygulanarak yüksek oranda çapraz bağlı bir polimer şebekesi oluşturulur.

Kafes tipi immobilizasyonda, enzim moleküllerinin tutuklanabilmesi ve substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşması için çapraz bağ yüzdesi ayarlanmalıdır. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması sonucunda substratın enzim aktif merkezlerine ulaşması engellebilir veya substrat enzimin zincir yapısını zorlayıp aktivitesini kaybetmesine neden olabilir.

Bu yöntemin avantajları

- Çok kolay uygulanabiliyor olması
- Gerçek bir fiziksel yöntem olması
- Çok az miktar enzim ile gerçekleşebilmesi
- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama ve UV ışınları enzim yapısını ve aktifliğini kimyasal proseslerden daha az etkilemesi
- Ortamdaki çapraz bağlayıcı ve monomer konsantrasyonunu değiştirmek suretiyle farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafes üretilbilmesi
- Polimerleşmenin genelde hem kolay hem de hızlı bir şekilde gerçekleşebilmesidir. (57-59)

Yöntemin dezavantajları ise; immobilizasyon işleminde, jel oluşumu sırasında yürüyebilecek kimyasal olayların ve reaksiyon sıcaklığının enzimi inaktif hale getirmesi olanağının bulunmasıdır. Ayrıca çapraz bağlı polimerin ağ örgüsü arasından enzimin sızma ihtimali de mevcuttur. Immobilizasyon işlemi sırasında deney koşullarına çok sıkı bağlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir.

3.5. Immobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

Günümüze kadar birçok enzim için 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. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen her farklı enzim için ve her farklı durumda bir veya birkaç değişik yöntem önerilebilir. Tablo'da immobilizasyon yöntemlerinin birbirine karşı kıyaslamaları gösterilmiştir (6,3).

Çizelge 3.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

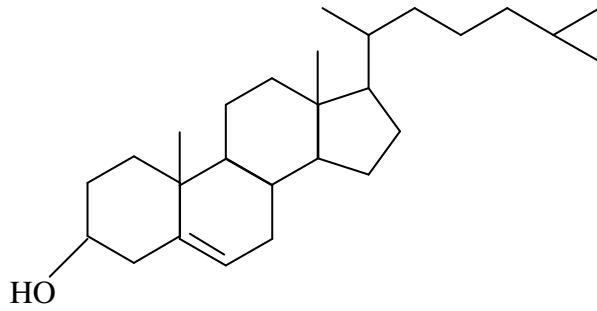
	Fiziki	İyonik	Çapraz	Kovalent	Hapsetme
Özellik	Adsorpsiyon	Bağlanma	Bağlanma	Bağlanma	Yöntemi
Hazırlama	Kolay	Kolay	Zor	Zor	Zor
Bağlanma	Zayıf	Orta	Güçlü	Güçlü	Güçlü
Gücü					
Enzim	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek
Aktivitesi					
Desteğin	Mümkün	Mümkün	İmkansız	Nadiren	İmkansız
Tekrar					
Kullanılabilirliği					
İmmobilizasyon	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Düşük
Maliyeti					
Kararlılık	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Genel	Düşük	Orta	Düşük	Orta	Yüksek
Uygulanabilirlik					

4. DENEYSEL KISIM

4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

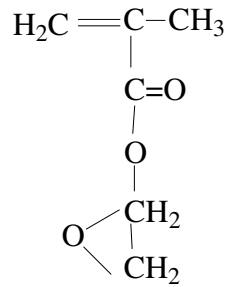
- Kolesterol Oksidaz (Kolesterol:oksijen oksidoredüktaz, EC.1.3.3.6)
(*Pseudomonas fluorescens*‘ den elde edilen COD) Sigma(St Louis)
firmasından temin edildi.

- Kolesterol



Molekül kütlesi: 386,66 g/mol

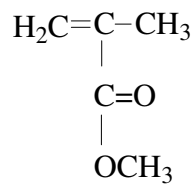
- Glisidil metakrilat (GMA)



Molekül kütlesi : 142,16 g/mol

Yoğunluğu: 1,075 g/mL

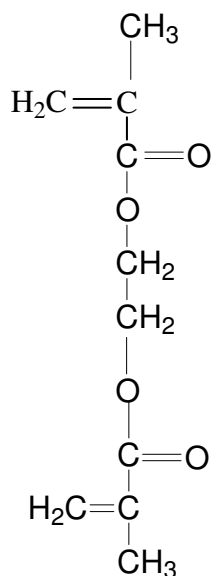
- Metil metakrilat (MMA)



Molekül kütlesi : 100,12 g/mol

Yoğunluğu : 0,936 g/mL

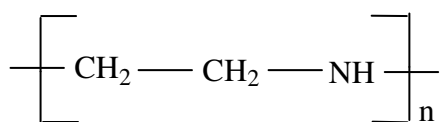
- 1,2-Etilenglikoldimetakrilat (EGDMA)



Molekül kütlesi : 198,22 g/mol

Yoğunluğu : 1,051 g/mL

- Polietilenimin



Molekül kütlesi : 750 000 g/mol

n=600 000 , Yoğunluğu = 1.08 g/mL

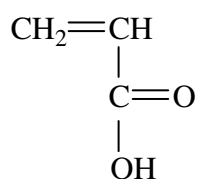
- 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)karbodiimid(EDAC)

Molekül kütlesi : 191,7 g/mol

- Triton X-100

Yoğunluğu: 1,065 g/mL

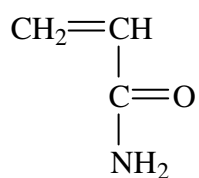
- Akrilik asit (AA)



Molekül kütlesi : 100 g/mol

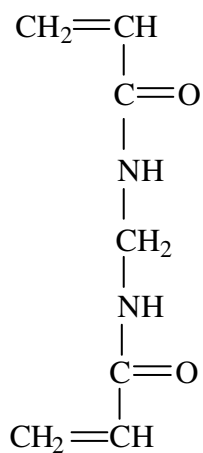
Aldrich firmasından temin edildiler.

- Akrilamit (AAm)



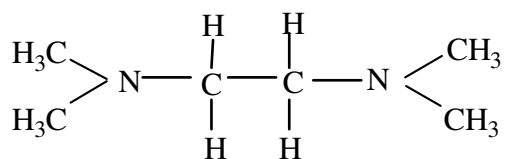
Molekül kütlesi : 198 g/mol

- N,N'-metilen-bis-akrilamit (BAAm)



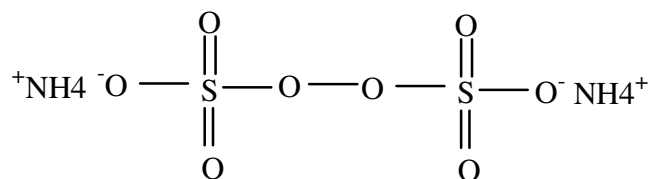
Molekül kütlesi : 154,2 g/mol

- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED)



Molekül kütlesi : 116,2 g/mol

- Amonyum persülfat (APS)



Molekül kütlesi : 228 g/mol

Yoğunluğu : 1,98 g/mol

- Epiklorhidrin $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$

Molekül kütlesi : 92,53 g/mol

- Propan 2-ol : $\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$

Molekül kütlesi : 60,10 g/mol

Yoğunluğu: 0,78 g/mL

- Fosforik asit : H_3PO_4

Molekül kütlesi: 97,99 g/mol

- Sodyum dihidrojen fosfat : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Molekül kütlesi : 156,01 g/mol

- Disodyum hidrojenfosfat : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Molekül Kütlesi : 177,99 g/mol

- Sodyum hidroksit : NaOH

Molekül kütlesi: 40 g/mol

Merck(Almanya) firmasından temin edildiler.

- Metanol : CH_4O

Molekül Kütlesi : 32,04 g/mol

Yoğunluğu : 0,79 g/mL

Fluka(Almanya)firmasından temin edildi.

4.2. Kullanılan Aletler

UV-spektrofotometre : UNICAM UV/Vis Spektrofotometre

pH : Orion pH metre 420 A

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

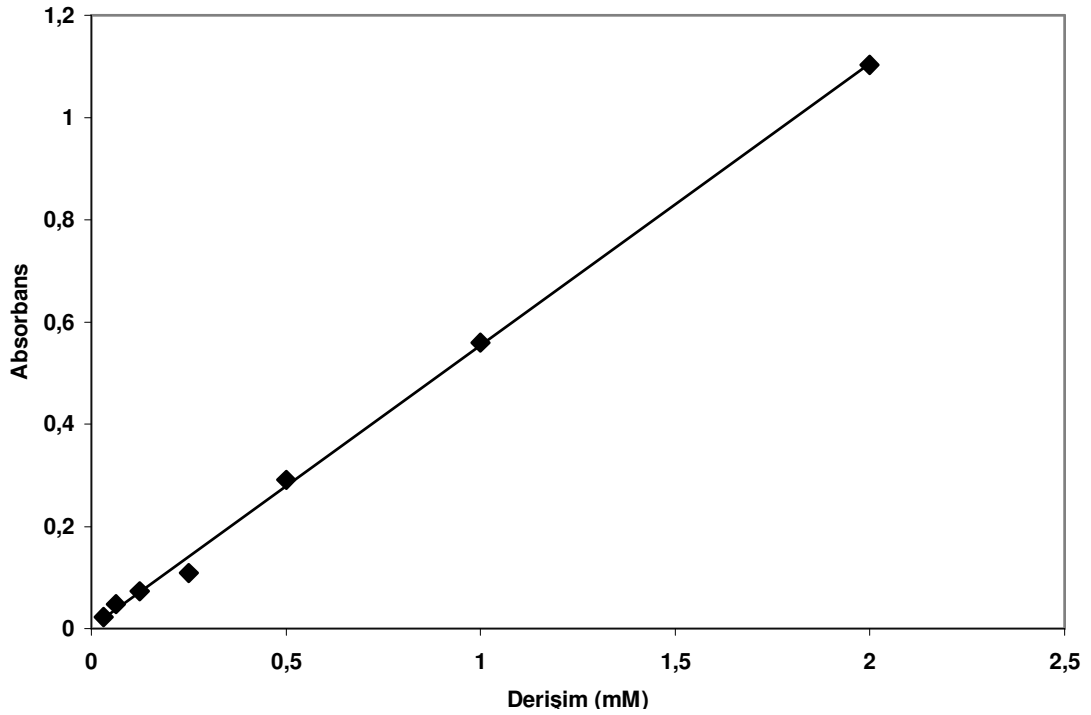
4.3. Kolesterol ve COD Enzimi Çözeltilerinin Hazırlanması

2 mM , 25 mL kolesterol çözeltisi hazırlamak için 0,0193 g kolesterol, 2,56 mL propan 2-ol içerisinde çözüldü. Üzerine 0,4 mL Triton X-100 ilave edildi. Hazırlanan çözeltinin homojenliğini sağlamak amacıyla çözelti iyice karıştırıldı. Daha sonra fosfat tamponu (pH = 7, 0,1 M) ile hacmi 25 mL' ye tamamlandı ve +4 °C' da saklandı (60).

Kolesterol oksidaz çözeltisi ise, $1 \cdot 10^{-4}$ mg kolesterol oksidaz enziminin (4,2 Unit/mg) 50 mL saf su içerisinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

4.4. Kolesterolün Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kolesterolün kalibrasyon eğrisinin hazırlanması amacıyla çeşitli derişimlerde ($2 - 3 \cdot 10^{-2}$ mM) kolesterol çözeltileri hazırlandı. Farklı derişimlerde hazırlanan kolesterol çözeltilerinden 0,4 mL alınıp her birinin içerisinde fosfat tamponu (0,1 M, 3 mL, pH = 7) ve 0,03 mL enzim çözeltisi ilave edilerek 35 °C 'de 2 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası UV Spektrofotometresi yardımıyla 240 nm'de saf sudan oluşan kör çözeltisine karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kolesterol derişimine karşı gelen absorbans değerleri grafiğe alınarak kalibrasyon grafiği çizildi.



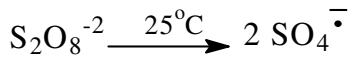
Şekil 4.1. Kolesterol kalibrasyon grafiğı

4.5. Enzim İmmobilizasyonu

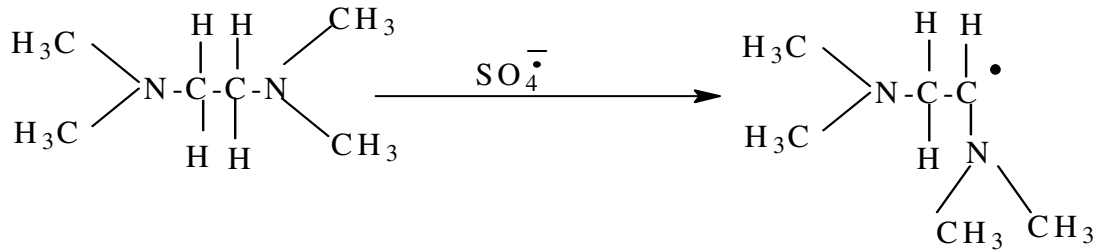
4.5.1. Poli(akrilamit-ko-akrilikasit)/polietilenimin kullanılarak enzim immobilizasyonu

Bu çalışmada, COD (kolesterol oksidaz) enziminin kovalent olarak immobilizasyonu amacı ile, öncelikle poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/polietilenimin tam iç içe geçmiş polimerik ağ yapıları (IPN) sentezlenmiş ve daha sonra kolesterol oksidaz enzimi bu destekler üzerine immobilize edilmiştir. IPN sentezi aşağıdaki şekilde serbest radikalik kopolimerizasyon reaksiyonuna göre gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, 1,5 g akrilamit (AAm), 1,5 mL akrilik asit (AA) ve 1,2 mL polietilen imin (PEI) (0,11 g/mL) 12 mL su içine ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra, bu karışıma 0,45 g *N,N'*-metilen-bis-akrilamit (BAAm) çapraz bağlayıcı olarak ilave edilmiştir. Bu polimerizasyon reaksiyonunda, redoks başlatıcı olarak amonyum persülfat

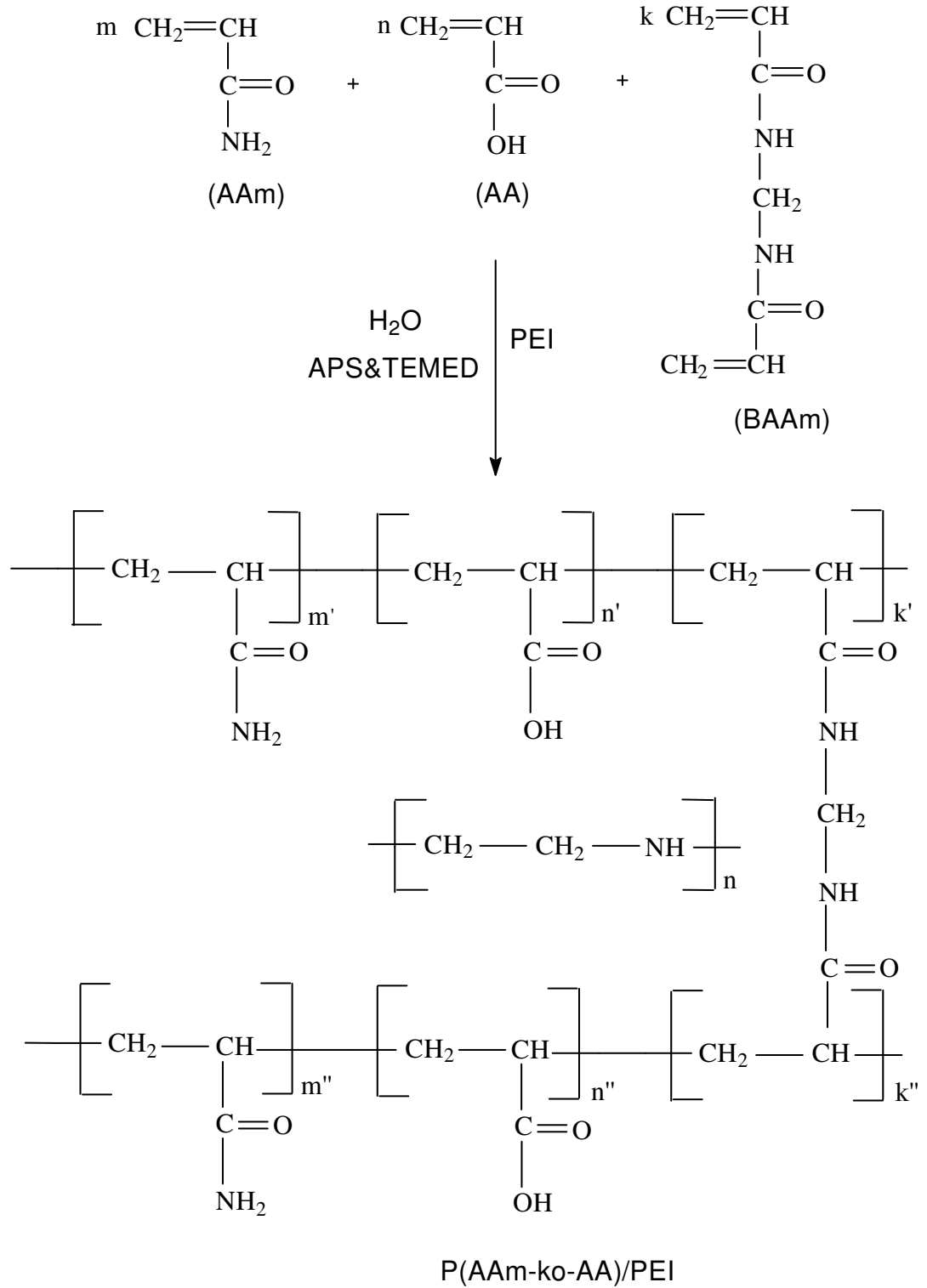
(APS) ve N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) kullanılmıştır. Bu amaç ile hazırlanan çözeltiye 0,03 g APS ve 1 mL TEMED ilave edilmiş daha sonra hızlıca petri kaplarına bu karışımlar boşaltılmıştır. Petri kapları oda sıcaklığında polimerizasyon reaksiyonunun gerçekleşmesi için 1 gün bekletilmiştir. Reaksiyondan sonra elde edilen IPN'ler 5x5x5 cm³ olacak şekilde kesilmiştir. Reaksiyona girmemiş monomerlerin ve çapraz bağlanmamış polimerlerin ortamdaki uzaklaştırılması için elde edilen küpler saf su içinde 1 hafta bekletilmiştir. Şekil 4.3. te çapraz bağlı P(AA-ko-AA) polimeri siyah renkte, PEI polimeri ise gri renkte gösterilmiştir.



APS 25°C'de serbest radikaller oluşturur.



APS ve TEMED reaksiyona girerek çiftleşmemiş tek elektron içeren aktif TEMED molekülü oluşturur.

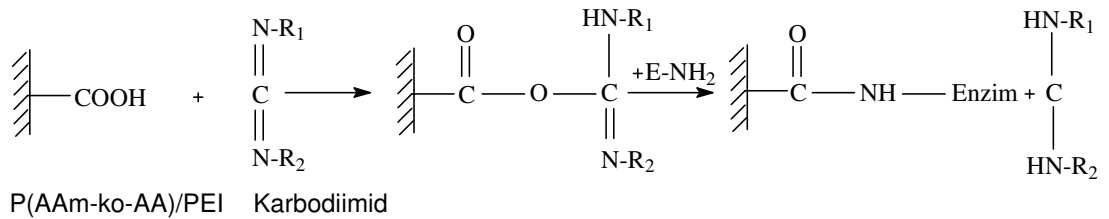


Şekil 4.2. Kimyasal yöntemle sentezlenen p(AAm-ko-AA)/PEI, IPN'lerinin olası reaksiyon mekanizması



Şekil 4.3. P(AAm-ko-AA)/PEI ,IPN'lerinin gösterimi

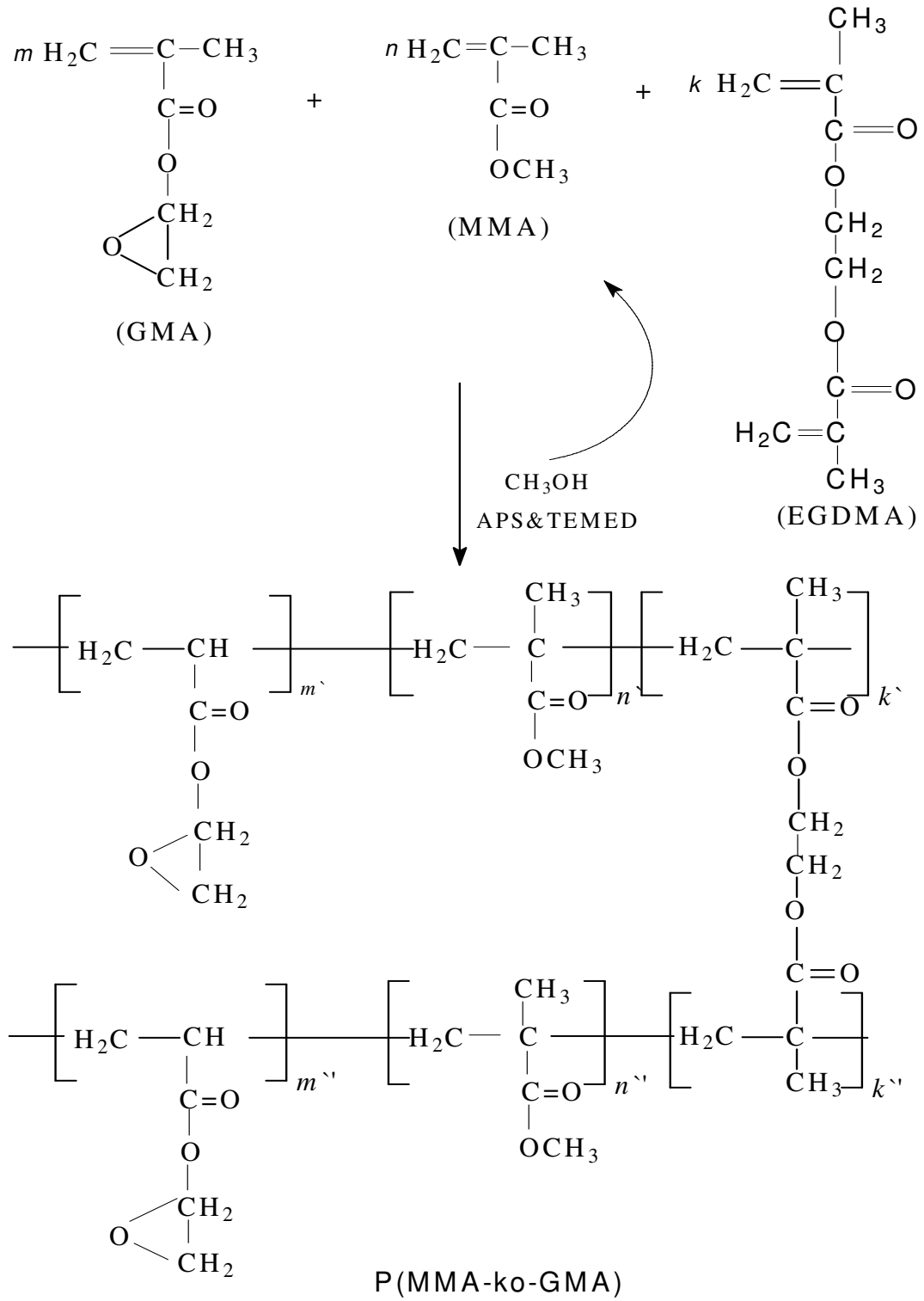
Elde edilen IPN' lere enzim immobilizasyonu 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) karbodiimid (EDAC) yardımı ile kovalent olarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 100 mL saf su içine 20 gram hazırlanılan polimer ve 0,1 gram EDAC ilave edilmiştir. Bu karışım manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 24 saat süre ile iyi karıştırılmıştır. Bu süre sonunda polimerler saf su ile yıkanmıştır. Yüzey aktivasyonu sonrasında, modifiye edilmiş polimerler 50 mL enzim çözeltisi (1.10^{-4} mg/50mL) içine ilave edilmiştir. Bu karışım oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmış ve daha sonra yüzeyler üzerine kovalent olarak bağlanmamış enzimlerin uzaklaştırılması için polimerler saf su ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra, enzim immobilize edilmiş polimerler kullanılıncaya kadar tampon çözeltide $+4^{\circ}\text{C}$ 'da saklanmıştır.



Şekil 4.4. P(AAm-ko-AA)/PEI desteğinin karbodiimid ile aktifleştirilmesi

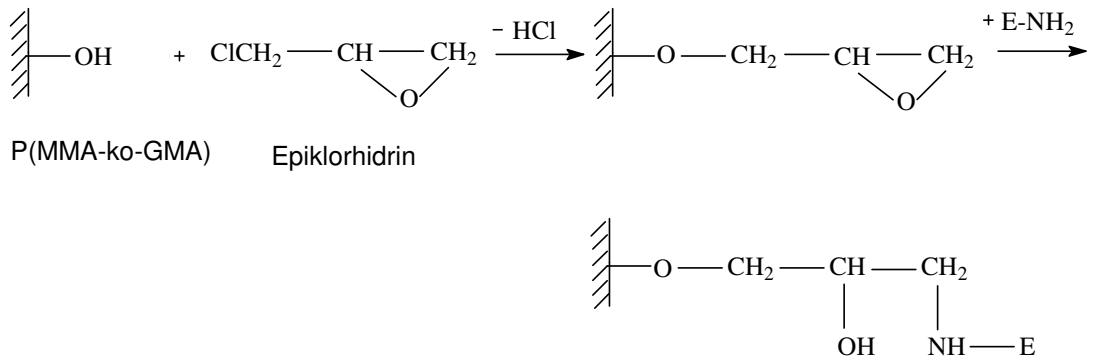
4.5.2. Poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) kullanılarak enzim immobilizasyonu

Bu çalışmada öncelikli olarak poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) hidrojenleri sentezlenmiş daha sonra hazırlanan polimer üzerine enzim kovalent olarak immobilize edilmiştir. P(MMA-ko-GMA) hidrojenleri; MMA ve GMA monomerleri ile etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcısının serbest radikal kopolimerizasyon reaksiyonu ile sentezlenmiştir. Hidrojenlerin sentezi için % 22 hacim oranı olan MMA ve % 7,5 hacim oranı olan GMA monomerleri, yüzde hacim oranı 1,88 olan çapraz bağlayıcı EGDMA ile 3 mL metanolde çözülmüştür. Bu çözeltilere 2 mL APS ve 4 mL TEMED stok çözeltilerinden ilave edildikten sonra 4 mm çaplı PVC plastik pipetlere konulmuştur. Polimerleşmenin tamamlanması için 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra plastik pipetlerden çıkarılan jeller polimerleşmeden kalan monomerlerin ve safsızlıkların uzaklaşması için 3 gün saf su içerisinde bekletilmiştir. Bu jeller yaklaşık 1 cm uzunluğunda kesilerek 50 °C ' de vakum etüvünde kurutulmuştur.



Şekil 4.5. Kimyasal yöntemle sentezlenen P(MMA-ko-GMA) hidrojellerinin olası reaksiyon mekanizması

Elde edilen hidrojelere enzim immobilizasyonu epiklorhidrin yardımı ile kovalent olarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 30 mL epiklorhidrin içine hazırlanan polimer ilave edilmiştir. Bu karışım manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 24 saat süre ile iyice karıştırılmıştır. Yüzey aktivasyonu sonrasında, modifiye edilmiş polimerler 50 mL enzim çözeltisi (1.10^{-4} mg/50mL) içine ilave edilmiştir. Bu karışım oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmış ve daha sonra yüzeyler üzerine kovalent olarak bağlanmamış enzimlerin uzaklaştırılması için polimerler saf su ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra, enzim immobilize edilmiş polimerler kullanılıncaya kadar tampon çözeltide $+4^{\circ}\text{C}$ 'da saklanmıştır.



Şekil 4.6. P(MMA-ko-GMA) desteğinin epiklorhidrin ile aktifleştirilmesi

4.6. Aktiflik Tayini

4.6.1. Serbest COD ın aktiflik tayini

Aktiflik tayini, 3 mL fosfat tamponu, 0,4 mL kolesterol çözeltisi içeren karışıma 0,030 mL enzim çözeltisi (1.10^{-4} mg/50mL) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon 35°C 'da çalkalamalı su banyosunda 2 dakika gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda oluşan kompleksin UV Spektrofotometresi kullanılarak 240 nm'de saf sudan hazırlanan kör çözeltisine karşı absorbansı tayin edilmiştir. Aktiflik, ölçülen absorbans

değerlerinden ve kolesterol kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır.

$$HIZ(V) = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{240}}{\Delta t} \times \frac{\Delta C}{\Delta A_{240}} \quad [4.1]$$

Bu eşitlikte C, g/mL olarak kolesterol derişimini göstermektedir.

COD için 1 ünite enzim veya birim aktiflik, pH = 7,0' da 2 dakikada 35⁰C' da 1 mikromol kolesterolden, kolesterol 4-en-3-on oluşturan enzim miktarıdır.

4.6.2. Karboiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın aktiflik tayini

Karbodiimid kullanılarak immobilize edilmiş COD ın aktiflik tayini 4.6.1'de belirtildiği gibi yapılmıştır.

4.6.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktiflik tayini

Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktiflik tayini kısım 4.6.1'de açıklandığı gibi yapılmıştır.

4.7. Aktifliğe pH Etkisi

4.7.1. Serbest COD ın aktifliğine pH nın etkisi

Serbest COD ın aktifliğine pH'nın etkisini araştırmak amacıyla çeşitli pH'larda (4.0–10.0) fosfat tamponu ile hazırlanan substrat ve enzim çözeltileri kullanılarak 4.6.1'de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflikler tayin edilmiştir.

4.7.2. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine pH'nın etkisi

Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine pH'nın etkisini araştırmak amacıyla çeşitli pH'larda (4.0–10.0) fosfat tamponu ile hazırlanan substrat ve enzim çözeltileri kullanılarak kısım 4.6.1'de açıklandığı gibi aktiflikler tayin edilmiştir.

4.7.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine pH'nın etkisi

Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine pH'nın etkisini incelemek üzere çeşitli pH'larda (4.0–10.0) fosfat tamponu ile hazırlanan substrat ve enzim çözeltileri kullanılarak 4.6.1'de belirtildiği gibi aktiflikler tayin edilmiştir.

4.8. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi

4.8.1. Serbest COD ın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest COD ın aktifliğine sıcaklığın etkisini araştırmak amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (27°C–45°C) reaksiyonlar 4.6.1'de verildiği şekilde gerçekleştirilerek aktiflikler tayin edilmiştir.

4.8.2. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (27°C–45°C) kısım 4.6.1'de verildiği gibi aktiflikler tayin edilmiştir.

4.8.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (27°C–45°C) reaksiyonlar 4.6.1’de verildiği şekilde gerçekleştirilerek aktiflikler tayin edilmiştir.

4.9. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi

4.9.1. Serbest COD ın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest COD ın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli derişimlerde ($2-3 \cdot 10^{-2}$ mM) hazırlanan kolesterol çözeltileri kullanılarak reaksiyonlar 4.6.1’de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiş ve aktiflikler tayin edilmiştir.

4.9.2. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli derişimlerde ($2-3 \cdot 10^{-2}$ mM) hazırlanan kolesterol çözeltileri kullanılmış ve 4.6.1’de belirtildiği gibi aktiflikler tayin edilmiştir.

4.9.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine substrat derişiminin etkisini araştırmak amacıyla çeşitli derişimlerde ($2-3 \cdot 10^{-2}$ mM) hazırlanan kolesterol çözeltileri kullanılarak reaksiyonlar 4.6.1’de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiş ve aktiflikler tayin edilmiştir.

4.10. Depolama Kararlılığı

4.10.1. Serbest COD ın depolama kararlılığı

Serbest COD ın depolama kararlılığını incelemek amacıyla saf suda hazırlanan enzim çözeltisi buzdolabında +4°C' de saklanmıştır. Belirli aralıklarla enzim çözeltisinden alınan örneklerle kısım 4.6.1'de açıklandığı gibi aktiflik tayinleri yapılmıştır.

4.10.2. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın depolama kararlılığı

Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın depolama kararlılığını incelemek amacıyla buzdolabında +4°C' de saklanan immobilize enzim belirli aralıklarla alınarak kısım 4.6.1'de açıklandığı gibi aktiflikler tayin edilmiştir.

4.10.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın depolama kararlılığı

Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın depolama kararlılığını incelemek amacıyla buzdolabında +4°C' de saklanan immobilize enzim belirli aralıklarla alınarak kısım 4.6.1'de açıklandığı gibi aktiflikler tayin edilmiştir.

4.11. Tekrar Kullanılabilirlik

4.11.1. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın tekrar kullanılabilirliği

Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla hazırlanan polimerler +4°C' de buzdolabında saklanmış ve immobilize enzimin aktifliği 4.6.1'de belirtildiği gibi 60 kez tekrarlanan deneylerle ölçülmüştür.

4.11.2. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın tekrar kullanılabilirliği

Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın tekrar kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla hazırlanan polimerler +4°C' de buzdolabında saklanmış ve immobilize enzimin aktifliği 4.6.1'de belirtildiği gibi 60 kez tekrarlanan deneylerle ölçülmüştür.

4.12. Termal İnaktivasyon

4.12.1. Serbest COD ın termal inaktivasyonu

Serbest COD ın termal inaktivasyonunu incelemek üzere farklı sıcaklıklarda (40°C–55°C) ve farklı zaman aralıklarında (2–20 dakika) tutulan enzim çözeltilerinin aktiflikleri 4.6.1' de belirtildiği gibi tayin edilmiştir

4.12.2. Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın termal inaktivasyonu

Karbodiimid kullanılarak immobilize edilen COD ın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (40°C–55°C) ve farklı zaman aralıklarında (2–20 dakika) tutulan immobilize enzimlerin aktiflikleri 4.6.1' de belirtildiği gibi tayin edilmiştir

4.12.3. Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın termal inaktivasyonu

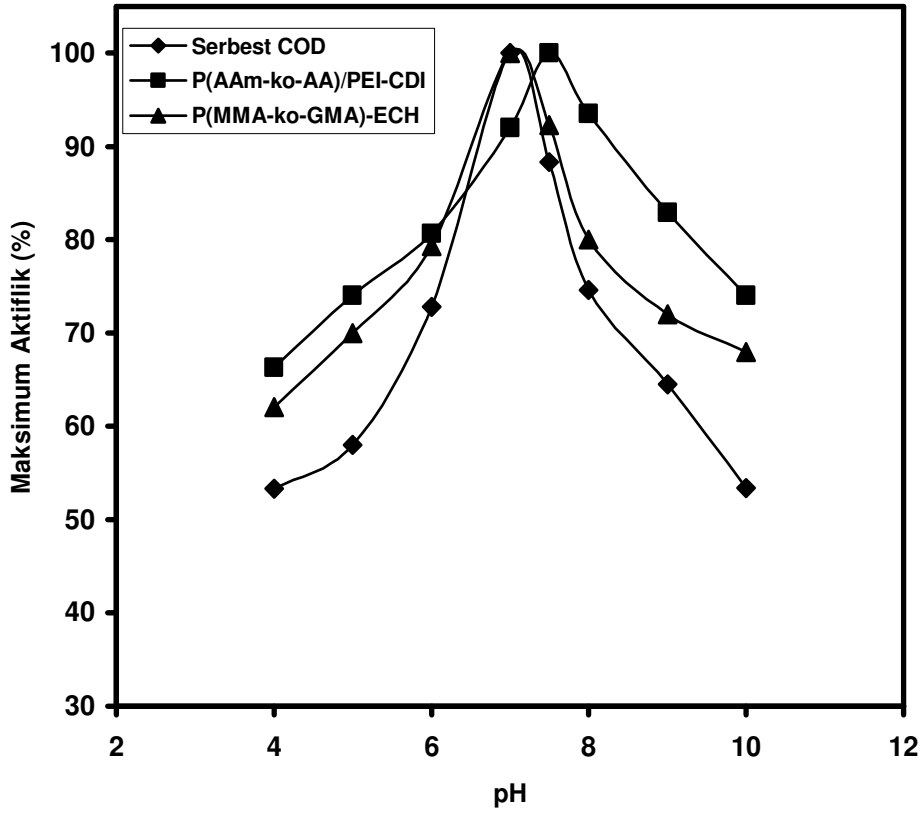
Epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen COD ın termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (40°C–55°C) ve farklı zaman aralıklarında (2–20 dakika) tutulan immobilize enzimlerin aktiflikleri 4.6.1' de belirtildiği gibi tayin edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. Aktifliğe pH'nın Etkisi

Çalışmamızda serbest ve P(AAm-ko-AA)/PEI-CDI ve P(MMA-ko-GMA)-ECH destekleri üzerine immobilize edilen enzimin aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla, çeşitli pH'larda gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda maksimum aktiflik değerlerinin pH ile değişimi Şekil 5.1'de verilmiştir. Serbest COD ve P(MMA-ko-GMA)-ECH kullanılarak kovalent olarak immobilize edilen enzim için optimum pH değeri 7 olarak bulunmuştur. P(AAm-ko-AA)/PEI-CDI desteği üzerine immobilize edilen enzimin ise optimum pH'sı 7,5 olarak bulunmuştur.

Poliyonik matriksler enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak kullanıldığında, enzimin mikroçevresi ile reaksiyonun ana çözeltisi arasında protonların farklı konsantrasyonlarda bulunmasına neden olurlar. Polianyonlar enzim etrafındaki protonları çekme eğiliminde iken, polikasyonlar bunları iter. Dolayısıyla polimerik destek çevresindeki pH ana çözeltiden farklı olur. pH'daki kayma aynı zamanda enzim reaksiyonunun tipine ve matriksin yapısına da bağlıdır. Diffüzyonel sınırlamalar nedeni ile de ana çözeltinin pH'sı reaksiyonun meydana geldiği matriks çevresininkinden oldukça farklı olabilir. Diğer taraftan enzim ile polimerik destek maddesi arasında oluşabilecek farklı etkileşim kuvvetlerinin de (hidrojen bağı oluşumu, dipol-dipol etkileşimi gibi) pH'yı etkilediği bilinmektedir. Sonuç olarak immobilize edilen enzim serbest enzime göre daha iyi bir pH kararlılığına sahip olması beklenen bir durumdur.



Şekil 5.1. Serbest ve immobilize kolesterol oksidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

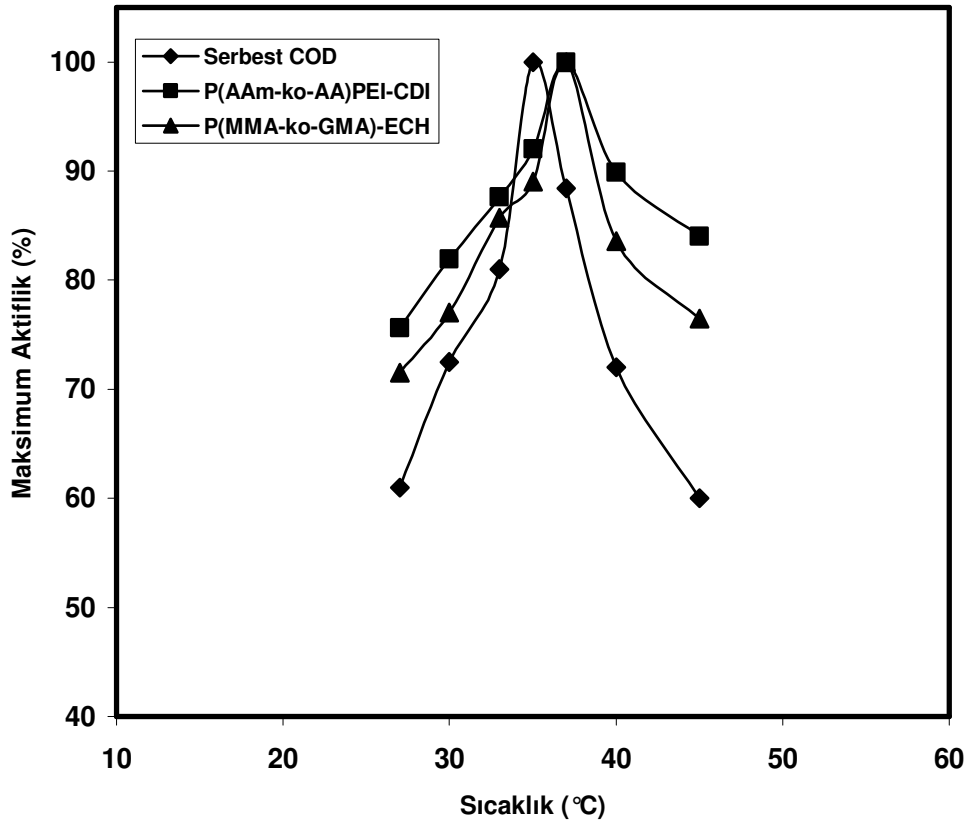
Enzimler elektrolit karakterli oldukları için enzim aktifliği pH ile değişim gösterir. Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik ve bazik grupların varlığı pH değişimi ile enzim substrat (ES) kompleksinin kararlılığını etkiler. Kararlı ES kompleksi oluştuğunda reaksiyon hızı maksimumdur. Bu nedenle serbest enzimler için reaksiyon hızının maksimum olduğu optimum pH değeri belirlenir. Şekil 5.1’ de görüldüğü gibi COD enziminin aktifliğinde asidik ve bazik bölgelerde bir azalma gözlenmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi p(MMA-ko-GMA)-ECH desteği üzerine kovalent olarak immobilize edilen enzimin optimum pH’sı serbest enzim ile aynıdır. P(AAm-ko-AA)/PEI-CDI desteği üzerine immobilize edilen enzimin pH değerinin 7,5’a kaymasının nedeni ise immobilize edilen enzim sistemlerinde matriks ile enzim arasındaki ikincil etkileşimler(hidrojen bağı, iyonik polar etkileşimler) sonucu olabilir.

Kolesterol oksidaz enziminin immobilizasyonunda optimum pH değerlerindeki kaymanın asidik veya bazik bölgelere doğru olduğu literatürlerde de verilmiştir. Yapılan bir çalışmada kolesterol oksidaz enzimi poli(HEMA-ko-GMA) desteği kullanılarak kovalent olarak immobilize edilmiş ve serbest ve immobilize enzimin pH değeri 7 olarak bulunmuştur (11). Başka bir çalışmada enzim polivinil reçinesi kullanılarak hapsetme yöntemi ile immobilize edilmiştir. Serbest enzimin pH kararlılığı 6-7,5 arasında iken hapsetme ile immobilize edilen enzimin pH kararlılığı 5-9 arasında bulunmuştur (61). Diğer bir çalışmada kolesterol oksidaz enzimi gluteraldehit aracılığı ile poliakrilonitril yüzeyine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Immobilize ve serbest enzimin optimum pH' sı 7 olarak bulunmuştur (62). Diğer bir çalışmada ise polipirolin film kullanılarak hapsetme ile immobilize edilmiş kolesterol oksidazın optimum pH'sı 7 olarak bulunmuştur (14).

5.2. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi

Serbest enzim ile p(AAm-ko-AA)/PEI-CDI ve p(MMA-ko-GMA)-ECH destekleri kullanılarak immobilize edilen enzimin aktifliğini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda elde edilen maksimum aktiflik değerleri Şekil 5.2'de verilmiştir. Serbest COD enzimi için maksimum aktiflik 35°C'de gözlenmiştir. Immobilize enzimler için optimum sıcaklık ise 37°C'de gözlenmiştir. Bu sıcaklıkların altında ve üzerinde enzim aktifliğinin azaldığı gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada polipirolin film üzerine hapsetme ile immobilize edilen kolesterol oksidaz enziminin optimum sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur(14). Diğer bir çalışmada *Streptomyces* bakterisinden elde edilen serbest kolesterol oksidaz enziminin optimum sıcaklığı 35°C olarak bulunurken poli(HEMA-ko-GMA) desteği kullanılarak immobilize edilen kolesterol oksidazın optimum sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur (11). Başka bir çalışmada polianilin film kullanılarak immobilize edilmiş kolesterol oksidazın optimum sıcaklığı 35°C olarak bulunmuştur (20).



Şekil 5.2. Serbest ve immobilize kolesterol oksidazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi

Protein yapısında olan enzimler belirli bir sıcaklıktan sonra (genelde 50°C'nin üzerinde) denatüre olmaya başlarlar. Sıcaklık arttıkça enzimlerin önce tersiyer yapısı sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapısı) bozulur. Bu olaydan enzimin aktif merkezi de etkilenir. Dolayısıyla enzim aktifliğini kaybeder. Enzim ile polimerik destek arasında kovalent bağların oluşması enzim hareketlerinde konformasyonel sınırlamaların doğmasına neden olabilir. Bununla ilgili olarak optimum sıcaklıkta artış gözlenebilir. Sonuçta enzim katalitik aktifliğini gösterebilmek için daha büyük aktifleşme enerjisine sahip olabilir. Şekil 5.2'de görüldüğü gibi immobilize COD'ın optimum sıcaklık değeri serbest enzime göre 2 °C yüksek sıcaklığa kaymıştır.

5.3. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest enzim ile p(AAm-ko-AA)/PEI-CDI ve p(MMA-ko-GMA)-ECH destekleri kullanılarak immobilize edilen COD ın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli derişimlerde (0,125mM–1mM) hazırlanan kolesterol çözeltileri kullanılarak 240 nm’de absorbens değerleri okundu. Kalibrasyon grafiğinden elde edilen eğim yardımıyla reaksiyon hızları belirlendi. Reaksiyon hızlarından yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 5.3). Grafik yardımıyla K_m , V_m değerleri hesaplandı.



Bu eşitlikte; E = enzim, S = substrat, ES = enzim-substrat kompleksi, $\ddot{U}$ = ürünü gösterir.

Enzim reaksiyon hızı Michaelis-Menten eşitliği ile verilir.

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

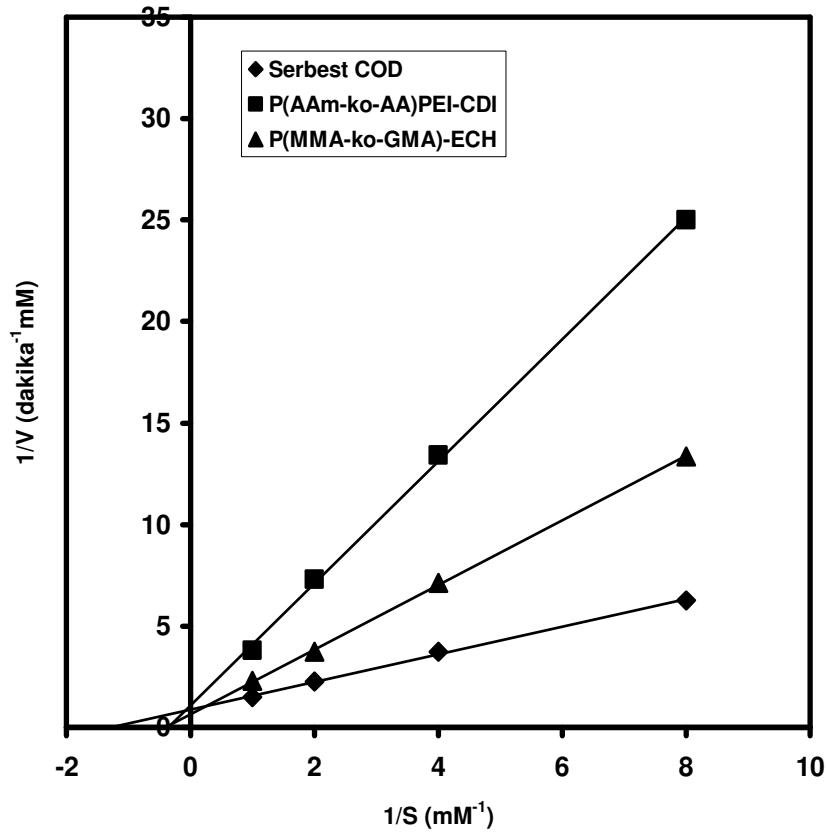
Michaelis-Menten eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk bağıntısı elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{mak}}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{mak}}} \quad [5.2]$$

Bu eşitlikte ; V = başlangıç hızı , V_{mak} = maksimum hız , K_m = Michaelis sabiti , S = substrat derişimi olarak belirlenir.

Serbest enzim için $K_m=0,756\text{mM}$, $V_m=1,115\text{ mM.dakika}^{-1}$, p(AAM-ko-AA)/PEI-CDI kullanılarak immobilize edilen enzim için $K_m= 2,72\text{mM}$, $V_m=0,908\text{ mM.dakika}^{-1}$ bulunurken p(MMA-ko-GMA)-ECH kullanılarak immobilize edilen enzim için $K_m=2,374\text{mM}$, $V_m = 1,495\text{ mM.dakika}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

P(AAM-ko-AA)/PEI-CDI ve p(MMA-ko-GMA)-ECH destekleri kullanılarak immobilize edilen enzimin K_m değeri serbest enzimin K_m değerinin yaklaşık 3 katıdır. Bu artışın sebepleri enzim ve substrat arasındaki etkileşim, enzimlerde yapısal değişimler ve diffüzyonel sınırlamalar nedeniyle olabilir. Serbest enzime göre katı bir destek üzerine immobilize enzimlerin farklı kinetik davranışlar göstermelerinin birkaç sebebi vardır. Bunlardan ilki, enzim molekülünde bazı konformasyonel (yapısal) değişiklik olmuş olabilir. İkinci olarak, immobilize edilen enzim çözeltide bulunan substrat ile farklı bir şekilde etkileşmiş olabilir. Kinetik davranış üzerine bu en önemli etkidir. Üçüncü olarak, çözelti ile destek arasında substratın bir paylaşımı vardır. Bunun sonucu olarak da enzimin yakınlarındaki substrat konsantrasyonu ana çözeltiden çok farklı olabilir.



Şekil 5.3. Serbest ve immobilize kolesterol oksidazın Lineweaver-Burk grafiği

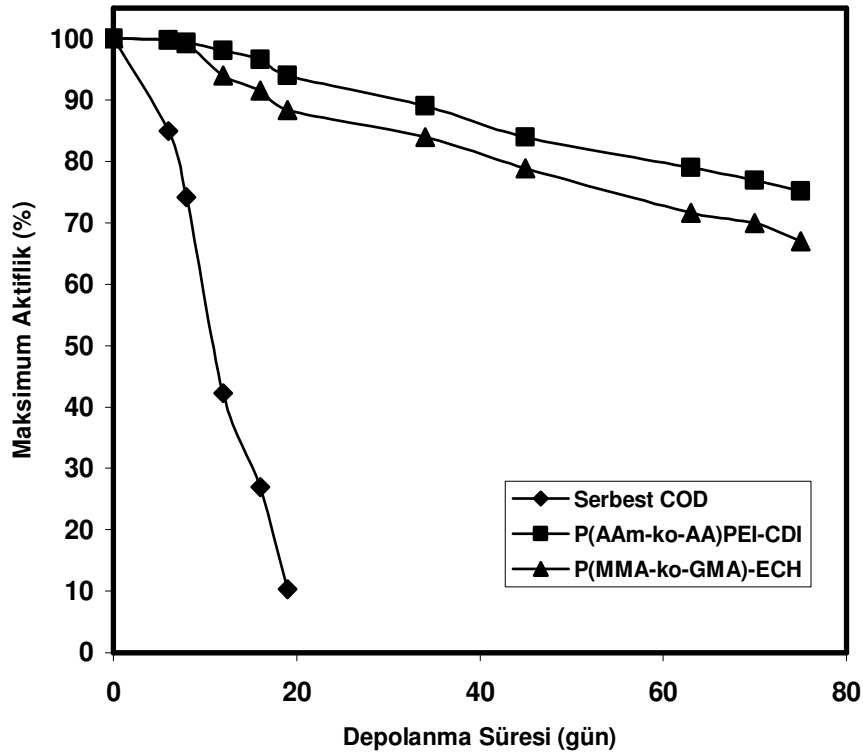
İmmobilize edilmiş enzimlerin K_m değerlerindeki artış literatürlerde verilmiştir. Yapılan bir çalışmada polianilin film kullanılan immobilize edilmiş kolesterol oksidaz için farklı koşullarda K_m değerleri $2,72 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $3,26 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $0,51 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $0,56 \text{ mmol.dm}^{-3}$ olarak bulunmuştur (20).

5.4. Serbest ve İmmobilize COD in Depolanma Kararlılığı

Serbest enzim ile p(AAm-ko-AA)/PEI-CDI ve p(MMA-ko-GMA)-ECH destekleri kullanılarak kovalent olarak immobilize edilmiş COD enziminin aktifliğine depolanma süresinin etkisini incelemek amacıyla hazırlanan örnekler $+4^\circ\text{C}$ ' de buzdolabında saklanmıştır. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin maksimum aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi şekil 5.4'de verilmiştir. 12 gün sonunda serbest enzimin aktifliğini %58 kaybettiği

gözlenirken, p(AAm-ko-AA)/PEI-CDI kullanılarak immobilize edilmiş enzim aktifliğini %98 korumuş, p(MMA-ko-GMA)-ECH kullanılarak immobilize edilmiş enzimin aktifliğini %94 koruduğu gözlenmiştir. 20 günün sonunda serbest enzim aktifliğini %90 civarında kaybederken, p(AAm-ko-AA)/PEI-CDI kullanılarak immobilize edilmiş enzimin %94, p(MMA-ko-GMA)-ECH kullanılarak immobilize edilmiş enzimin aktifliğini %88 koruduğu gözlenmiştir. 75 günün sonunda p(AAm-ko-AA)/PEI-CDI kullanılarak immobilize edilmiş enzimin aktifliğini %76 koruduğu gözlenirken, p(MMA-ko-GMA)-ECH kullanılarak immobilize edilmiş enzim aktifliğini %67 oranında korumuştur.

Enzimler çözelti içinde saklandıklarında zaman içinde konformasyon değişimine uğrarlar ve buna bağlı olarak aktifliklerinde bir azalma ve tümüyle yok olma gözlenebilir. Bu değişim ortamın pH' sına, iyonik şiddetine ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır. Enzim ile destek arasındaki iyonik etkileşim sonucunda immobilize enzim yüksek konformasyon kararlılığına sahip olabilir. Bunun sonucunda serbest enzime göre daha dayanıklı olabilir.



Şekil 5.4. Serbest ve immobilize edilen kolesterol oksidazın maksimum aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi

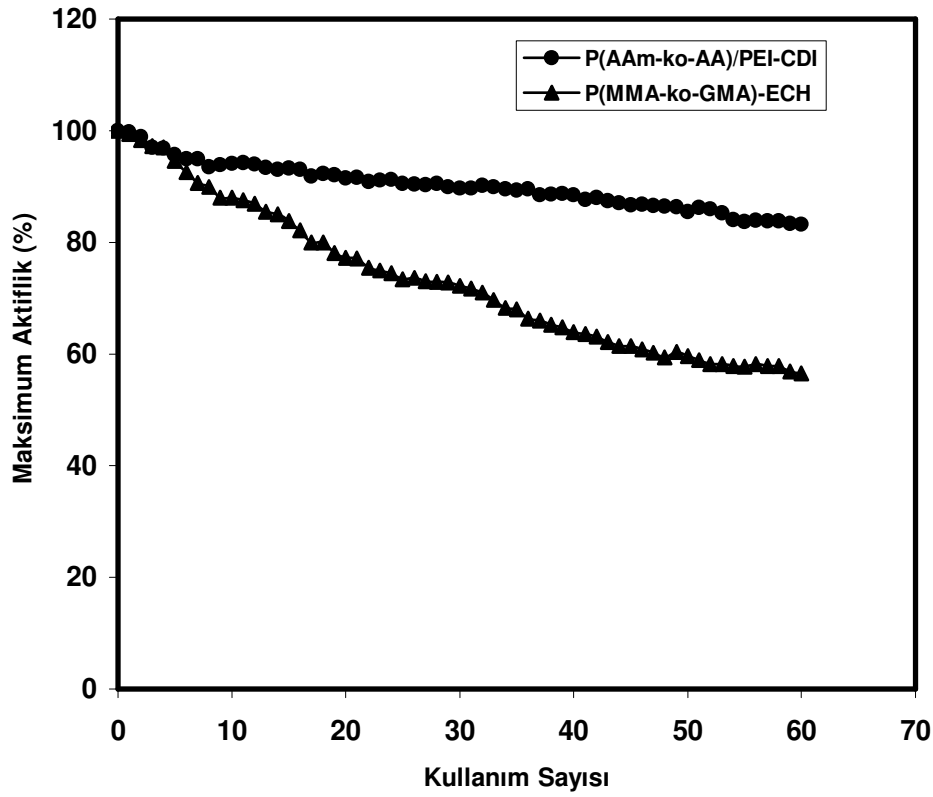
Yapılan bir çalışmada serbest enzim 20 gün içinde bütün aktivitesini kaybederken poli(HEMA-ko-GMA) desteği kullanılarak immobilize edilmiş enzim aktivitesini %65 oranında korumuştur. 60 gün sonunda immobilize enzim aktivitesini %43 kaybetmiştir (11). Polivinil reçine ile yapılan immobilizasyon çalışmasında ise serbest ve immobilize enzimler aktivitesini 10 güne kadar %10 kaybederken 10 gün sonunda aktivitedeki düşüş hızlanmıştır. Serbest enzim 40 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybederken immobilize enzimin aktivitesinde %70 oranında düşüş gözlenmiştir. Immobilize enzim 80 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir (61). Yapılan diğer bir çalışmada polipirolin film kullanılarak immobilize edilen enzim bir hafta sonra aktivitesini %98 oranında korumuştur. 21 gün sonunda aktivitesini %84 oranında korumuş bir ay sonunda ise aktivitesini %40 oranında kaybetmiştir (14). Başka bir çalışmada serbest enzim 20 gün sonunda aktivitesini yaklaşık %30 korurken poliakrilonitril

kullanılarak immobilize edilen enzim yaklaşık %70 oranında korumuştur. 60 gün sonunda serbest enzim aktivitesini %94 oranında kaybetmiş buna karşılık immobilize enzim aktivitesini %42 oranında korumuştur (62).

5.5. İmmobilize COD ın Tekrar Kullanılabilirliği

Serbest COD ın bir kez, immobilize enzimin ise aktifliğini koruduğu sürece pek çok kez kullanımı mümkündür. P(AAm-ko-AA)/PEI-CDI ve p(MMA-ko-GMA)-ECH destekleri kullanılarak kovalent olarak immobilize edilen COD enziminin tekrar kullanım sayısını incelemek amacıyla aktiflikleri tayin edilmiştir. Maksimum aktifliğin kullanım sayısı ile değişimi Şekil 5.5'te verilmiştir. P(AAm-ko-AA)/PEI-CDI kullanılarak immobilize edilen enzimin 10 kez kullanım sonunda aktifliğini %94 oranında korurken, 30 kez kullanım sonunda %89, 60 kez kullanım sonunda ise aktifliğini %83 koruduğu gözlenmiştir. P(MMA-ko-GMA)-ECH kullanılarak immobilize edilen enzimin aktifliğini 10 kez kullanım sonunda %88 koruduğu gözlenirken, 30 kez kullanım sonunda %72 aktifliğini koruduğu gözlenmiştir. 60 kez kullanım sonunda ise aktifliğini %56 oranında korumuştur.

Tekrar kullanım sayısı enzimlerin uygulama alanları için önemli bir parametredir. Bilindiği gibi serbest enzimlerin tek bir kez kullanımı söz konusu iken immobilize enzimlerin pek çok kez kullanımı mümkündür. Ancak immobilize enzimlerin tekrar kullanım sayısının artmasıyla aktivitesinde bir azalma gözlenir. Bunun nedeni, enzimlerin önce tersiyer yapısının daha sonra da sekonder (alfa sarmal) yapısının bozulmasından ileri gelir. Bunun sonucunda tekrar kullanım sayısı arttıkça enzimler aktivitelerinin bir kısmını yada tümünü kaybederler.



Şekil 5.5. İmmobilize kolesterol oksidazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

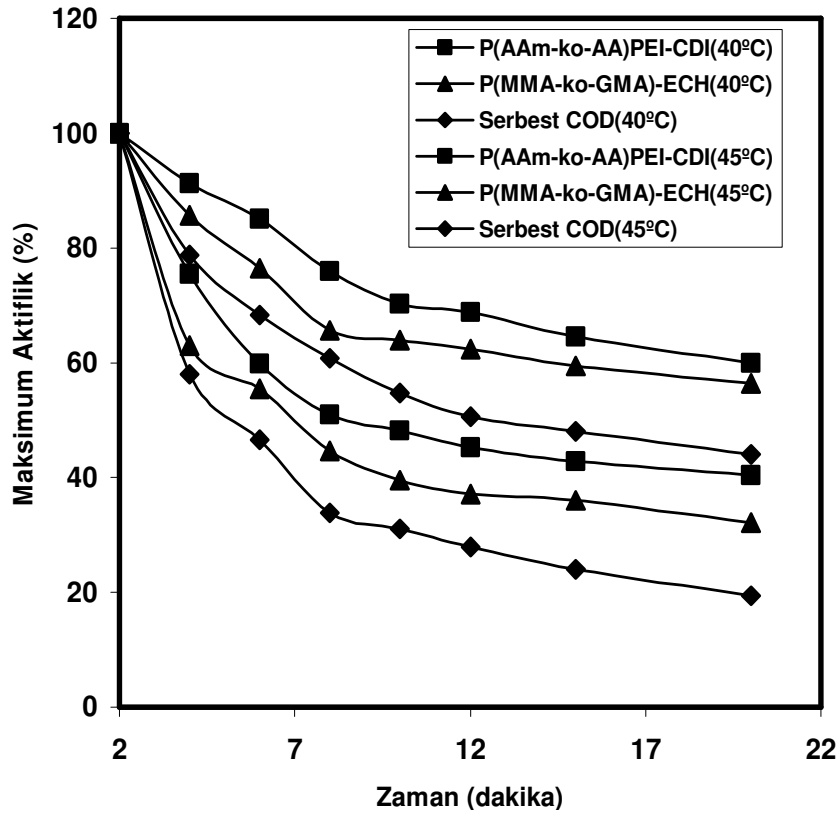
Yapılan bir çalışmada poli(HEMA-ko-GMA) desteği üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş enzimin tekrar kullanımı incelenmiş ve 16 kez kullanım sonunda aktivitenin hemen hemen aynı kaldığı gözlenmiştir. 30 kez kullanım sonunda ise immobilize enzimin aktivitesinin %24 oranında düştüğü gözlenmiştir (11). Başka bir çalışmada ise poliakrilonitril kullanılarak immobilize edilmiş kolesterol oksidaz enziminin tekrar kullanım sayısı incelenmiş ve immobilize enzimin 3 kullanımdan sonra aktivitesini %100 koruduğu gözlenmiştir. Aktivitenin 10 kullanımdan sonra %63'e, 20 kullanımdan sonra %32'ye ve 30 kullanımdan sonra %11'e düştüğü gözlenmiştir (62).

5.6. Termal İnaktivasyon

Serbest COD ve p(AAm-ko-AA)/PEI-CDI ve p(MMA-ko-GMA)-ECH destekleri kullanılarak kovalent olarak immobilize edilen enzimin maksimum aktifliğinin zamanla değişimini incelemek amacıyla hazırlanan çözeltilerin, değişik zaman aralıklarında (2–20 dakika), değişik sıcaklıklarda (40°C–45°C) aktiflikleri tayin edildi. Şekil 5.6'da farklı sıcaklık ve farklı zaman aralıklarındaki serbest ve kovalent olarak immobilize edilen enzimlerin maksimum aktifliğinin zamanla değişimi gösterilmiştir. Çizilen $\ln A - t$ grafiği yardımıyla hesaplanan inaktivasyon sabitleri Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Serbest COD enzimi 40°C'de 20 dakika tutulduğunda aktivitesini yaklaşık %44, p(AAm-ko-AA)/PEI-CDI desteği kullanılarak immobilize edilen enzimin aktivitesini %60, p(MMA-ko-GMA)-ECH kullanılarak immobilize edilen enzimin aktivitesini %56 koruduğu gözlenmiştir. Serbest COD enzimi 45°C'de 20 dakika tutulduğunda yaklaşık %20 aktivite göstermiştir. P(AAm-ko-AA)/PEI-CDI desteği kullanılarak immobilize edilen enzimin aktivitesini %40, p(MMA-ko-GMA)-ECH kullanılarak immobilize edilen enzimin aktivitesini %32 koruduğu gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada 50°C'de 100 dakika tutulan serbest enzim %63 aktiflik gösterirken p(HEMA-ko-GMA) kullanılarak immobilize edilen enzim %88 aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (11).



Şekil 5.6. Serbest ve immobilize kolesterol oksidazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi

Enzimler sıcaklık ve süre arttıkça konformasyon değişimine uğrarlar ve buna bağlı olarak aktivitelerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlenebilir. Şekil 5.6'da görüldüğü gibi immobilize enzimler serbest enzime göre daha yavaş inaktive olmuştur. Immobilize enzimlerin kuarterner yapıları korunmuştur. Enzimlerdeki denatürasyon enzimlerin peptit zincirlerinin üç boyutlu yapısında gerçekleşmiş olabilir. Çizelge 5.1'de ise sıcaklık arttıkça k_i değerinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca immobilize enzimin k_i değeri serbest enzime göre daha yüksektir.

Çizelge 5.1 Serbest ve immobilize kolesterol oksidazın farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon sabitleri

Örnek	İnaktivasyon sabitleri(k_i dak ⁻¹)	
	40°C	45°C
Serbest COD	0,0442	0,0664
P(AAm-ko-AA)PEI-CDI	0,0285	0,0352
P(MMA-ko-GMA)-ECH	0,0398	0,0407

Enzimin ısı kararlılığı artarsa bu enzimlerin potansiyel kullanımı artacaktır. Bir dizi immobilize enzimin yükselen termal kararlılığı incelenmiş ve kovalent immobilize yöntemlerinde enzimin üçüncül yapısını koruduğu gözlenmiştir.

6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kolesterol oksidaz enziminin polimerik destekler kullanılarak kovalent immobilizasyonu çalışmalarında, enzim aktifliğine etki eden çeşitli parametreler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. Serbest kolesterol oksidaz için optimum pH değeri 7 olarak bulunmuştur. Poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat)-epiklorhidrin desteği kullanılarak immobilize edilen enzimin pH değeri değişmemiştir. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/polietilenimin-karbodiimid ile immobilize edilen enzimin pH değeri 0,5 birim kaymış ve 7,5 olarak bulunmuştur.
2. Serbest kolesterol oksidaz için optimum sıcaklık değeri 35°C olarak bulunmuştur. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/polietilenimin-karbodiimid ve poli (metil metakrilat – ko – glisidil metakrilat) - epiklorhidrin destekleri kullanılarak immobilize edilen enzimin optimum sıcaklık değeri ise 37°C olarak bulunmuştur.
3. Serbest kolesterol oksidaz için K_m değeri 0,756mM olarak bulunmuştur. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/polietilenimin-karbodiimid ve poli (metilmetakrilat – ko – glisidil metakrilat) - epiklorhidrin destekleri ile immobilize edilen enzim için K_m değerleri sırasıyla 2,72mM, 2,37mM olarak bulunmuştur.
4. Serbest kolesterol oksidaz için V_m değeri 1,115 mM.dakika⁻¹ olarak bulunmuştur. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/polietilenimin-karbodiimid ile immobilize edilen enzimin V_m değeri 0,908 mM.dakika⁻¹ bulunurken poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat)-epiklorhidrin ile immobilize edilen enzim için V_m değeri 1,495 mM.dakika⁻¹ olarak bulunmuştur.

5. Serbest kolesterol oksidaz enzimi 4°C' de depolandığında 20 günün sonunda aktifliğini %90 kaybederken, 75 günün sonunda poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/polietilenimin-karbodiimid kullanılarak immobilize edilen enzim aktifliğini %75, poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat)-epiklorhidrin ile immobilize edilen enzim aktifliğini %67 koruduğu bulunmuştur.
6. Serbest kolesterol oksidaz enzimi 40°C' de 20 dakika tutulduğunda aktifliğini %44 korurken, poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/polietilenimin-karbodiimid desteği kullanılarak immobilize edilen enzimin aktivitesini %60 , poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat)-epiklorhidrin ile immobilize edilen enzimin aktivitesini %56 koruduğu bulunmuştur. Serbest kolesterol oksidaz enzimi 45°C' de 20 dakika tutulduğunda aktifliğini %20 korumuştur. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/polietilenimin-karbodiimid desteği kullanılarak immobilize edilen enzimin aktivitesini %40 korurken, poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat)-epiklorhidrin kullanılarak immobilize edilen enzimin aktivitesini %32 koruduğu gözlenmiştir.
7. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/polietilenimin-karbodiimid ile immobilize edilen enzimin 10 kez kullanım sonunda aktifliğini %94 , 30 kez kullanım sonunda %89, 60 kez kullanım sonunda ise aktifliğini %83 koruduğu gözlenirken, poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat)-epiklorhidrin ile immobilize edilen enzimin aktifliğini 10 kez kullanım sonunda %88, 30 kez kullanım sonunda %72, 60 kez kullanım sonunda ise aktifliğini %56 oranında koruduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Bailey, J., E. and Ollis, F., D., "Biochemical Engineering Fundamentals 2nd ed.", **McGraw Hill International Editions**, 984 (1986).
2. Geminos, G. and Greenfield, P.F., "An enzymatic technique for the detection of dextran in cane juice and prediction of viscosity increases", **International Sugar Journal**, 80:227-231 (1978).
3. Zaborsky.O., "Immobilized Enzyme", **CRC Pres**, Ohio, 1-3 (1973).
4. Kutay, F., "Enzimler", İnsan Biyokimyası, Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y., **Palme Yayıncılık**, Ankara, 197-202 (2002).
5. Wiseman, A., "Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd ed.", **John Wiley&Sons Chicester**, İngiltere, 12 (1986).
6. Telefoncu A., "İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri", **Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu**, İzmir, 1-16, 193-249, (1986).
7. Fennema, O.R., "Food Chemistry, 2nd ed.", **Macel Dekker Inc.**, New York, 994 (1985).
8. Lehninger, A., L., "Biochemistry, 2nd ed.", **Worth Publishers**, New York, 1103 (1979).
9. Fujishiro, K., Uchida, H., Shimokawa, K., Nakano, M., Sano, F., Ohta, T., Kayahara, N., Aisaka, K., Uwajima, T., "Purification and propperties on a new brevibacterium sterolicum cholesterol oxidase produce by e.coli mm294/pnh10", **FEMS Microbiology Letters**, 215:243-248 (2002).
10. Yin, Y., Liu, P., Anderson, G.W.R. and Sompson, S., N., "Construction of a catalytical inactive cholesterol oxidase mutant:inversigation of the interplay between active side-residues glutamate 361 and histidine 447", **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 402:235-242 (2002).
11. Akgöl, S., Bayramoğlu, G., Kacar, Y., Denizli, A., Arıca, M.Y., "Poly(hdyroxyethyl methacrylate-co-glycidly methacrylate) reactive membrane utilised for cholesterol oxidase immobilisation", **Polymer International**, 51:1316-1322 (2002).
12. Nishiya, Y., Hirayama, N., "Alteration of substrate affinity of streptomyces cholesterol oxidase application to the rate assay of cholesterol serum", **Clinica Chimica Acta**, 287:111-122 (1999).

13. Lario, I.P., Sampson, N. and Verielink, A., "Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: what atomic resolution crytallography reveals about enzyme mechanism and the role of the fad cofactor in redoks activity", **Journal Molecular Bio.**, 326:1635-1650 (2003).
14. Singh, S., Chaubey, A., Malhotra, B.D., "Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conduction polypyrrole films", **Analytica Chimica Acta**, 502:229-234 (2004).
15. Isobe, K., Shoji, K., Nakanishi, Y., Yokoe, M. and Wakao, N., "purification and some properties of cholesterol oxidase stable in detergents frod γ -probacterium Y-134", **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 95 (3): 257-263 (2003).
16. Coulombe, R., Yue, K., Q., Ghisla, S. and Vrielink, A., "Oxygen access to the active side of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an arg-glu pair", **The Journal Of Biological Chemistry**, 276 (32): 30435-30441 (2001).
17. Suman, Pundir, C.S., "Co-immobilizastion of cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase onto alcylamine glass beads for measurement of total cholesterol in serum", **Current Applied Physics**, 3:129-133 (2003).
18. MacLachlan, J., Wotherspoon, A.T.L., Ansell, R.O., Brooks, C.J.W., "Cholesterol oxidase:sources, physical properties and analytical applications", **Journal of Steroid Biochemistry&Molecular Biology**, 72:69-195 (2000).
19. Bokoch, M.P., Devadoss, A., Palencsar, M.S., Burgess, J.D., "Steady-state oxidation of cholesterol catalyzed by cholesterol oxidase in lipid bilayer membranes on platinum electrodes", **Analytice Chimica Acta**, 519:47-55 (2004).
20. Wang, H., Mu, S., "Bioelectrochemical characteristics of cholesterol immobilized in a polyaniline film", **Sensor and Actuators B**, 56:22-30 (1999).
21. Raghavan, V., Ramanathan, K., Sundaram, P.V., Danielsson, B., "An enzyme thermistor-based assay for total and free cholesterol", **Clinica Chimica Acta**, 289:145-158 (1999).
22. Shen, Z., Corbin, D.R., Greenplate, T.J., Grebenok, R.J., Galbraith, D.W. and Purcell, J.P., "Studies on the mode of action of cholesterol oxidase on insect midgut membranes", **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 34:429-442 (1997).

23. Bongiovanni, C., Feri, T., Poscia, A., Varalli, M., Santucci, R., Desideri, A., "An electrochemical multienzymatic biosensor for determination of cholesterol", **Bioelectrochemistry**, 54:17-22 (2001).
24. Tahrán, L. and Uslan, A., "Characterization and operational stability of immobilised catalase", **Process Biochemistry**, 14:345-373 (1990).
25. Tahrán, L., Ardiç, Z., Uslan, A., "The use of perlite for catalase immobilization", **Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi**, 37 (1989).
26. Özdemir, İ., "Değişik inorganik taşıyıcılarda katalaz immobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Malatya, 1-14 (1994).
27. Howard, H., Weetall, "Storage stability of water-insoluble enzymes covalently coupled to organic and inorganic carriers", **Biochemical Biophysics Acta**, 212:1-7 (1970).
28. Aksoy, C., Yanardağ, R., "Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 1-10 (2003).
29. Boz, B.G., "Üreaz enziminin polianilin'e immobilizasyonu ile üreye duyarlı enzim mikroelettrotunun hazırlanması", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 28-55 (2001).
30. Çelebi, S., Çağlar, A., "Niçin İmmobilize Enzimler", **Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu**, İzmir, 145-216 (1986).
31. Monsan, P., Combes, D., "Enzyme Stabilization By Immobilization, Methods In Enzymology", **Academic Press**, New York, 137 (1988).
32. Shan, Y., Shan, D., "Immobilized enzymes; industrial biocatalysts", **The Industrial Journal of Hospital Pharmacy**, 29 (2) :51-58 (1992).
33. Trevon, M.D., "Techniques Of Immobilization In Immobilized Enzyme", **John Wiley and Sons**, New York, 1-11 (1985).
34. Baysal, B., "Polimer Kimyası Cilt 1.", **ODTÜ**, Ankara, 1-6 (1981).
35. Saçak, M., "Polimer Kimyası Cilt 2", **Gazi Kitabevi**, Ankara, 1-4 (2002).
36. Rempp, P., Merrill, E.W., "Polymers", Polymer Synthesis 2nd ed, **Hutting & Wepf**, USA, 331-320 (1991).
37. Ş., Murat, Avcı, E., N., "Radiation synthesis of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)-κ-carrageenan hydrogels and their use in wound dressing

- applications. I. Preliminary laboratory tests", **Wiley Periodicals, Inc., J. Biomed. Mater Res**, 74:A 187-196 (2005).
38. Lipatov, Y., S., "Polymer blends and interpenetrating polymer networks at the interface with solids", **Prog. Polymer Science**, 27:1721-1801 (2002).
 39. Tsuchida, E., Takeoka, S., "Interpolymer complexes and their ion-conduction", *Macromolecular complexes in chemistry and biology*, Eds: Dublin, Back/Davis/Schuls/Thies, **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, 183-185 (1994).
 40. Stailova, O., Koseva, N., Mnalova, N., Rashkov, I., "Polyelectrolyte complex between chitosan and poly(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid)", **Polymer Bulletin**, 43:67-73 (1999).
 41. Lowman, A., M., Cowans, B., A., Peppas, N., A., "Investigation of interpolymer complexation in swollen polyelectrolyte networks using solid-state NMR spectroscopy", **Journal of Polymer Science Part: B**, 38:2823-2831 (2000).
 42. Zhong, Z., Guo, Q., "Crosslinkable interpolymer complexes of novolac resin and poly(ethyleneoxide)", **Journal of Polymer Science Part: A**, 36:401-411 (1998).
 43. Moharram, M., A., El-Gendy, H., M., "Infrared spectroscopy and electrical properties of ternary poly(acrylic acid)-metal-poly(acrylamide) complexes", **Journal of Applied Polymer Science**, 85:2699-2705 (2002).
 44. Saraç, A., S., Sönmez, G., Ustamehmetoğlu, B., Mustafaev, M., I., "Water-soluble polypyrroles by matrix polymerization: interpolymer complexes", **Journal of Polymer Science Part: A**, 35:1255-1263 (1997).
 45. Chase, H., A. and Yang, Y., "Immobilization of α -amylase on poly(vinylalcohol)-coated perfluoro polymer supports for use in enzyme reactors", **Biotechnology and Biochemistry**, 28:145-154 (1998).
 46. Zaborsky, O., "Adsorption Immobilize Enzyme", **CRC Press**, Ohio, 75 (1973).
 47. Srere, P., A., Uyeda, K., "Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices methods in enzymology". ed. by Mosboch, K., **Academic Press, Inc.**, New York, 44, 11-19 (1987).
 48. Zaborsky, O., "Covalent attachment to water-insoluble functionalized polymers", *Immobilized enzyme*, **CRC Press**, Ohio, 5-27 (1974).

49. Valentova, M., M., Svec, F., Stamberg, J., Vodrazka, Z., "Comparisaon of different methods of glucose oxidase immobilization", **Biohechnology Bioengineering**, 23:1093-2104 (1981).
50. Axen, R., Ernback, S., "Chemical fixation of enzyme to cyanogen halide activated polysaccharide carrier", **Europa Journal Biochemistry**, 18:351-357 (1971).
51. Dumitriv, S., Papu, M., Dumitriv, M., "Polymeric biomterials as enzyme and drup carriers", **Journal Bioactive and Compotible Polymers**, 3:243-312 (1988).
52. Gerharts, W., "Enzyme in Industry", Production And Applications, **UCH Velosgesellschaft Mblt**, Weinheim, 35-43 (1990).
53. Zaborsky, O., "In Biomedical Application Of Immobilized Enzymes Proteins", Chang T.M.S., **Plenum**, New York, 1 (1997).
54. Jones, J., B., Sh., C., S., Periman, D., "Techniques in chemistry", Mosboch, K., **Interscience Publisher**, New York, 10,969 (1976).
55. Chang, T., M., S., "Microcapsules of artifical cells", **Science**, 146:524-530 (1964).
56. Chang, T., M., S., "Microencapsulation of enzymes and biological methods in enzymology", **Academis Press Inc.**, New York, 44:201-218(1976).
57. Arica, Y., M., Hasirci, V., N., "Immobilization for the production of membranes", **Biometerials**, 8:439 (1987).
58. Saburo, F., Atsuo.T., "Application of biocatalyst immobilized by polymer methods", **Enzyme Engineering**, Plenum Pres, New York, 3 (1985).
59. Kaetsu., I., Kamura, M., Yoshida, M., "Enzyme immobilization by radiation induced polimerization of HEMA at low temperature", **Biotechnology Bioengeering**, 21:847-861 (1979).
60. Kumar, A., Malhotra, R., Malhotra, B., D., Grover, S., K., "Co-immobilization of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase in a sol-gel film", **Analytica Chimica Acta**, 414:43-50 (2000).
61. Kumar, H., Kumar, A., Kumari, P., Jyotimai, S., Tulsani, N., B., "Immobilization of cholesterol oxidase on formvar using organic solvents", **Biotechnology Application Biochemistry**, 30:231-233 (1999).

62. Lin, C-C., Yang, M-C., "Cholesterol oxidation using hollow fiber dialyzer immobilized with cholesterol oxidase: effect of storage and reuse", ***Biomaterials***, 24:549-557 (2003).

ÖZGEÇMİŞ

Berrin Akkaya, 1980 yılında Bursa'da doğdu. Lise öğrenimini Bursa'da tamamladı. 2003 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü bitirdi. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladı.