

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CoFe₂O₄ MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN
SENTEZİ FONKSİYONELLEŞTİRİLMESİ VE
GLUKOZ OKSİDAZ İMMOBİLİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seher ALTUN YILMAZ

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : FİZİKOKİMYA
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mahmut ÖZACAR

Aralık 2018

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CoFe₂O₄ MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN
SENTEZİ FONKSİYONELLEŞTİRİLMESİ VE
GLUKOZ OKSİDAZ İMMOBİLİZASYONU**

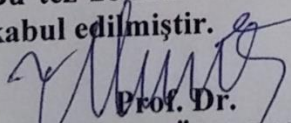
YÜKSEK LİSANS TEZİ

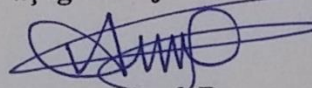
Seher ALTUN YILMAZ

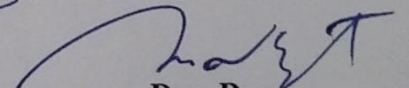
Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : FİZİKOKİMYA

Bu tez 28.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

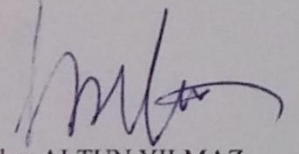

Prof. Dr.
Mahmut ÖZACAR
Jüri Başkanı


Prof. Dr.
Ali Rıza ÖZKAYA
Üye


Doç. Dr.
Mehmet NEBİOĞLU
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.



Seher ALTUN YILMAZ

28.12.2018

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Mahmut ÖZACAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarından dolayı Arş. Gör. Bekir ÇAKIROĞLU, Arş. Gör. Dr. Nuray GÜY ve Öğr. Gör. Dr. Keziban ATACAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: FBYLTEZ 2017-50-01-078) teşekkür ederim.

Eğitime önem veren ve eğitim hayatım boyunca bana her zaman güvenen, yüksek lisans eğitimime başlamam da maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili babam Bahaddin ALTUN'a, değerini şimdilerde daha iyi anlayabildiğim, emeklerinin karşılığını ödeyemeyeceğim canım annem Nazife ALTUN'a ve hayatımın en büyük iyikilerinden ve destekçilerinden olan, beni her zaman gururlandıran, tez çalışmamda da desteğini esirgemeyen sevgili kardeşim Betül ALTUN'a teşekkür ederim.

Hayatıma girdiğinden beri gücüme güç katan, eş kelimesini anlamlandıran, hayatımın her anında olduğu gibi tez çalışmamda da desteğini esirgemeyen sevgili eşim İsmet YILMAZ'a ve bir yıldır hayatımızı daha da anlamlandıran, şimdiden bana en büyük fedakarlığı gösteren sevgili kızım Erva YILMAZ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xii
 BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
 BÖLÜM 2.	
MANYETİK NANOPARTİKÜLLERE ENZİM İMMOBİLİZASYONU	3
2.1. Manyetik Nanopartiküller	3
2.1.1. Manyetit	4
2.1.2. Ferritler	5
2.2. Kobalt Ferrit	7
2.3. Kobalt Ferritin Sentez Yöntemleri ve Kullanım Alanları	8
2.4. Polifenoller	11
2.4.1. Gallik asit ve kullanım alanları	12
2.4.2. Tannik asit ve kullanım alanları	13
2.5. Enzimler ve Genel Özellikleri	14
2.5.1. Enzimatik (Kinetik) reaksiyonlar üzerine etki eden faktörler	16
2.5.2. Enzim immobilizasyonu ve immobilizasyon yöntemleri	20
2.5.2.1. Bağlama yöntemleri	22

2.5.2.2. Tutuklama ya da hapsetme yöntemleri	26
2.6. Manyetik Partiküllere Enzim İmmobilizasyonu	28
2.7. İmmobilizasyonun Enzim Aktivitesine ve Kararlılığına Etkisi	30
2.8. Glukoz Oksidaz ve İmmobilizasyonu	31
 BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	
3.1. Materyal ve Kimyasallar	33
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Kobalt ferrit sentezi	33
3.2.2. Kobalt ferritin tannik asit ile modifikasyonu	33
3.2.3. Tannik asit ile modifiye edilmiş kobalt ferrite glukoz oksidaz immobilizasyonu	34
3.3. Hazırlanan Malzemelerin Karakterizasyonu	34
3.4. Serbest ve İmmobilize Enzim İçin Aktivite Çalışmaları	34
3.4.1. pH etkisi	35
3.4.2. Sıcaklık etkisi	35
3.4.3. Depolama kararlılığı	35
3.4.4. Tekrar kullanılabilirlik	36
	36
 BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI	37
4.1. CFO'nun TA ile Yüzey Modifikasyonu ve CFO-TA Üzerine GOx İmmobilizasyonu	37
4.2. CFO, CFO-TA ve CFO-TA-GOx'in Karakterizasyonu	37
4.2.1. X ışınlarının difraksiyon analizi.....	37
4.2.2. Mikroyapısal analiz	38
4.2.3. Manyetik ölçümler	40
4.2.4. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi	40
4.2.5. Zeta potansiyeli	42
4.2.6. Termogravimetrik analizleri	43

4.3. Serbest ve İmmobilize Glukoz Oksidaz Çalışmaları	45
4.3.1. pH'ın katalitik aktivite üzerine etkileri	45
4.3.2. Sıcaklığın katalitik aktivite üzerine etkileri	47
4.3.3. Serbest ve immobilize glukoz oksidaz ile kinetik çalışmalar	48
4.3.4. Glukoz oksidazın depolama ve operasyonel kararlılığı	49
BÖLÜM 5.	
SONUÇ VE ÖNERİLER	51
5.1. Sonuçlar	51
5.2. Öneriler	52
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	62

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	: Hematit, demir (III) oksit
$\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$	: Baryum ferrit
BSA	: Bovin serum albumin
C	: Konsantrasyon
CFO	: Kobalt ferrit
Co	: Kobalt
CoFe_2O_4	: Kobalt ferrit
DDW	: Çift damıtılmış su
dk	: Dakika
DNSA	: Dinitrosalisilik aist
E	: Enzim konsantrasyonu / Enzim molekülü
EDS	: Enerji dağılımlı spektroskopi
emu	: elektromagnetik birim, $\text{emu/g} = \text{unit A.m}^2/\text{kg}$
FAD	: Flavin adenin dinükleotit
Fe	: Demir
Fe_3O_4	: Manyetit (Ferrit)
FESEM	: Alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	: Gram
GA	: Gallik asit
GOx	: Glukoz oksidaz
GOx-an	: Aspergillus niger glukozu
GOx-pa	: Penisilium amagasakiense glukozu

HIP	: Sıcak izostatik basınç
IEP (pI)	: İzoelektronik nokta
IME	: İmmobilize enzim
IU	: Uluslararası ünite (International Unite)
K	: Kelvin
kDa	: Kilo Dalton
K_M	: Michaelis-Menten hız sabiti
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
MNP	: Manyetik nanopartikül
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
M	: Metal iyonu
mg	: miligram
mL	: mililitre
mM	: milimolar
Mn	: Mangan
MNP	: Manyetik nanopartikül
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH_4OH	: Amonyum hidroksit
Ni	: Nikel
nm	: Nanometre, 10^{-9} m
NP	: Nanopartikül
O	: Oksijen
Oe	: Magnetizasyon (hacim başına moment), $\text{Oe}=\text{emu cm}^{-3}$
FTÇ	: Fosfat tampon çözeltisi
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
Pt	: Platin

rpm	: Dakika başına dönme sayısı
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SiO ₂	: Silisyum dioksit
SPS	: Spar plazma sinterleme
SS	: Standart sapma
t	: Zaman
T	: Sıcaklık
T	: Taşıyıcı
TA	: Tannik asit
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
TGA	: Termogravimetrik analiz
U	: Ünite (Unit)
U/mL	: Enzim aktivite birimi (unit/mililitre)
UV	: Ultra viyole
V	: Reaksiyon hızı
V _{max}	: Maksimum reaksiyon hızı
VSM	: Titreşen örnek magnetometresi
XRD	: X-ışını kırınımı
Zn	: Çinko

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Nano boyutta Fe_3O_4	4
Şekil 2.2. Manyetitin ters spinel kristal yapısı	5
Şekil 2.3. Baryum ferrit için birim hücre	7
Şekil 2.4. Spinel birime ait hücre yapının şematik modeli	8
Şekil 2.5. Gallik asitin kimyasal yapısı	12
Şekil 2.6. Tannik asitin (β -1,2,3,4,6-digalloyl-O-D-glucose) şematik gösterimi.	14
Şekil 2.7. Enzimlerin anahtar-kilit modeli örneği	17
Şekil 2.8. Enzim konsantrasyonunun enzimatik reaksiyon hızına etkisi	18
Şekil 2.9. Substrat konsantrasyonunun enzimatik reaksiyon hızına etkisi	19
Şekil 2.10. pH'nın enzimatik reaksiyon hızına etkisi	20
Şekil 2.11. En yaygın kullanılan immobilizasyon yöntemleri	22
Şekil 2.12. Kovalent bağlama	24
Şekil 2.13. Çarpaz bağlı immobilize enzimler	26
Şekil 2.14. Mikrokapsülleme	27
Şekil 2.15. Matrikste tutuklama	28
Şekil 2.16. Immobilizasyonun enzim aktivitesine etkisi	31
Şekil 4.1. CoFe_2O_4 'ün XRD paterni	38
Şekil 4.2. A) CFO, B) CFO-TA ve C) CFO-TA-GOx'un FESEM görüntüleri	39
Şekil 4.3. a) CFO, b) CFO-TA ve c) CFO-TA-GOx'in manyetizasyon eğrileri	40
Şekil 4.4. a) CFO, b) CFO-TA ve c) CFO-TA-GOx'in FTIR-ATR spektrumları	41
Şekil 4.5. CFO-TA ve CFO-TA-GOx'in zeta potansiyel eğrileri	43
Şekil 4.6. CFO üzerine GOx immobilizasyonunun ve GOx'un enzimatik aktivitesinin şematik açıklaması	43

Şekil 4.7. 25-1000 ° C sıcaklık aralığında (a) CFO, (b) CFO-TA ve (c) CFO-TA-GOx'un TGA eğrileri	44
Şekil 4.8. Serbest ve immobilize GOx aktiviteleri üzerine pH etkisi	45
Şekil 4.9. Proton ayrışmasının (a) polianyonik destek veya (b) polikasyonik destek durumunda immobilize enzim mikroçevresine etkisinin gösterilmesi	46
Şekil 4.10. Serbest ve immobilize GOx aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi	47
Şekil 4.11. Serbest ve immobilize GOx için Lineweaver – Burk grafiği (hata çubukları n = 3 için $\pm$ SS'yı gösterir)	49
Şekil 4.12. Serbest ve immobilize edilmiş GOx'in depolama kararlılığı	50
Şekil 4.13. İmmobilize GOx'in çalışma kararlılığı	50

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Yaygın olarak kullanılan taşıyıcılar	23
Tablo 2.2. Taşıyıcıya bağlamanın yarar ve sakıncaları	26
Tablo 2.3. İmmobilizasyon metotlarının karşılaştırılması	29
Tablo 2.4. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması	29
Tablo 2.5. Manyetik nanopartiküllere immobilize edilmiş enzimler ve biyoteknolojik uygulamaları	30
Tablo 4.1. Bu çalışmada GOx immobilizasyon özelliklerinin karşılaştırılması ve diğer çalışmalar	51

ÖZET

Anahtar kelimeler: Glukoz oksidaz, tannik asit, kobalt ferit, immobilizasyon, hidrotermal sentez, manyetik nanopartikül

Bu tez çalışmasında, enzim immobilizasyonu için yeni bir özellik gösteren tannik asit (TA) ile modifiye edilmiş CoFe_2O_4 (CFO) manyetik nanopartiküller kullanılarak glukoz oksidaz (GOx) immobilizasyonu üzerine bir çalışma sunulmaktadır. Güçlü protein ve tannik asit bağlanması kullanarak, glukoz oksidaz immobilizasyonu, farklı kimyasallar gerektiren, zor, pahalı, zaman alıcı ve enzim yapısına zarar veren karmaşık prosedürler gerektiren diğer immobilizasyon yöntemlerine kıyasla daha basit bir şekilde fiziksel adsorpsiyon yoluyla gerçekleştirilmiştir. CFO, hidrotermal yöntem ile sentezlenmiş ve glukoz oksidazı immobilize etmek için TA ile modifiye edilmiştir. İmmobilize edilmiş glukoz oksidaz, pH 6,5 ve 45 °C'de maksimum katalitik aktivite göstermiştir. Örnekler, CFO'nun yüzey modifikasyonunu ve glukoz oksidaz immobilizasyonunu doğrulamak için titreşen örnek magnetometresi (VSM), termogravimetrik analiz (TGA), zeta potansiyeli ve Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ile karakterize edilmiştir. Ayrıca, yüzey morfolojisi ve örneklerin kimyasal yapısını ortaya koymak için alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ve X-ışını kırınımı (XRD) yapılmıştır. Lineweaver – Burk grafiğine göre, glukoz oksidaz immobilizasyon sonrası glukozu karşı daha az duyarlılığa sahip olmuş ve immobilize ve serbest glukoz oksidazın Michelis-Menten sabiti (K_M) sırasıyla 50,05 mM ve 28,00 mM olarak bulunmuştur. İmmobilize edilmiş glukoz oksidaz, mükemmel yeniden kullanılabilirlik göstermiş ve 8 ardışık aktivite testi çalıştırıldıktan sonra bile, immobilize edilmiş glukoz oksidaz, yaklaşık olarak, ilk aktivitesinin %60'ını korumuştur.

SYNTHESIS, FUNCTIONALIZATION AND GLUCOSE OXIDASE IMMOBILIZATION OF CoFe_2O_4 MAGNETIC NANOPARTICLES

SUMMARY

Keywords: Glucose oxidase, tannic acid, cobalt ferrite, immobilization, hydrothermal synthesis, magnetic nanoparticles

This thesis presents a study of glucose oxidase (GOx) immobilization by employing tannic acid (TA) modified- CoFe_2O_4 (CFO) magnetic nanoparticles which demonstrates novel aspect for enzyme immobilization. By using the strong protein and tannic acid binding, GOx immobilization was carried out via physical adsorption in a simpler way compared with the other immobilization methods which require various chemicals and complicated procedures which is difficult, expensive, time-consuming, and destructive to the enzyme structure. CFO was synthesized by hydrothermal method and modified with TA to immobilize GOx. The immobilized GOx demonstrated maximum catalytic activity at pH 6,5 and 45 °C. The samples were characterized by vibrating sample magnetometer (VSM), thermogravimetric analysis (TGA), zeta potential, and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), all of which confirm the surface modification of CFO and GOx immobilization. Also, field emission scanning electron microscope (FESEM) and X-ray diffraction (XRD) were performed to demonstrate the surface morphology and chemical structure of samples. According to the Lineweaver–Burk plot, GOx possessed lower affinity to glucose after immobilization, and the Michelis–Menten constant (K_M) of immobilized and free GOx were found to be 50.05 mM and 28.00 mM, respectively. The immobilized GOx showed excellent reusability, and even after 8 consecutive activity assay runs, the immobilized GOx maintained ca. 60% of its initial activity.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Glukoz oksidaz (GOx) bir oksidoreduktazdır ve reaksiyonun aktivasyon enerjisini azaltarak glukonik asit ve hidrojen peroksitin kendiliğinden hidrolizleriyle lakton ve moleküler oksijeni kullanarak beta D-glukozun D-glukoz-6-lacton'a oksidasyonunu katalize eder [1]. Diğer oksidoreduktif enzimler gibi GOx, kofaktör olarak GOx'in aktif bölgesini bağlamak için flavin adenin dinükleotit (FAD)'e izin veren Rosmann tip katlanmış bir yapıya sahiptir [2]. İmmobilizasyon ile elde edilen GOx'in geliştirilmesi, maliyetteki düşüş ile GOx'in yeniden kullanımı açısından glukoz biyosensörleri için büyük önem taşımaktadır [3]. Uygun bir materyal üzerinde enzimlerin immobilizasyonu enzimlerin sertliğini artırabilir ve böylece yapısal değişikliklerin önlenmesiyle operasyonel şartlar altında kararlılık gelişir. Ayrıca, uygun ve doğru immobilizasyon yöntemi seçilerek, enzim immobilizasyonu endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal oluşumların önlenmesi ve üründe enzim kontaminasyonlarının engellenmesi ve reaksiyon ortamından kolay ayrılması gibi birçok avantaj sağlar [4]. Bir enzimin co-immobilizasyonu, tandem enzim katalizleri kullanarak umut vadeden uygulamalarda çalıştırılabilir [5]. Literatürde, nano ölçekli materyallerin farklı türleri, örneğin mikro gözenekli zarlar ve manyetik gözenekli biyoaktif camlar GOx immobilizasyonu için kullanılmaktadır [6-8].

Kübik spinel yapılı CoFe_2O_4 manyetik nanopartüküller (CFO), enzim immobilizasyonu için üstün biyouyumlu olma, kolay ayrılabilir materyaller, mükemmel manyetik özellik, yüksek kimyasal kararlılık ve önemli mekanik güç gibi cazip yönleri sahiptir [9]. Hidrotermal sentez manyetik nanopartüküller için partikül boyut dağılımı, etkili morfolojik kontrol ile düşük sıcaklıkta tercih edilen bir yöntemdir [10]. Bilgi depolama, elektronik cihazlar, tıbbi teşhisler ve manyetik rezonans görüntüleme gibi nanomanyetizmada ki çalışmalar ve uygulamalardan dolayı, MFe_2O_4 veya $\text{MO-Fe}_2\text{O}_3$ yapılı spinel demir tuzlarının (M olarak belirtilenler

Fe, Co, Ni, Zn, Mn, gibi metaller) büyük önemi vardır [11]. Özellikle, CFO tabanlı nanoboyutlu spinel ferrit malzemeler klinik uygulamalar, enzim immobilizasyonu ve ilaç taşıma çalışmaları için muazzam bir potansiyele sahiptir [10, 12-14]. Ayrıca, gözenekli CFO çeşitli uygulamalar için sentezlenmiştir [15]. Spinel ferrit nanopartiküller (NP) gelecekte çeşitli alanlarda daha çok kullanılacak gibi görünüyor.

Tannik asit (TA) suda çözünen bir polifenoldür ve esas olarak deri üretiminde bitki ekstraktı, farklı metal iyonları adsorpsiyonu için reçine üretimi ve su arıtımı için polimerik bir koagülant veya flokülant olarak kullanılır [16-18]. TA molekülleri alkaloidleri, jelatini ve başka protein moleküllerini çöktürdüğü için, bu özelliğinden dolayı çeşitli uygulama alanları için önemlidir. Proteinle ilgili uygulamalarda, kıvrımlı ve açık bir yapıya sahip olan proteinler, sıkıca katlanmış yapıları ile tercih edilirken polifenolik substratlar için açık yapılar katlanmış yapılara göre daha yüksek affiniteye sahiptir [19]. Ayrıca GOx, aktif bölgeden ayrı olan polisakkaridler ve polifenoller için bir bağlanma alanına sahiptir, bu da enzim immobilizasyonu için tercih edilmesini sağlar, çünkü enzimin aktif bölgesi immobilizasyondan minimum düzeyde etkilenir [3].

Bu tez çalışmasında, TA ile modifiye edilmiş CFO üzerine GOx immobilizasyonu araştırılmıştır. GOx immobilizasyonu için iyi manyetik özellikleri ve kimyasal dengeye sahip olmasından dolayı destekleyici materyal olarak CFO seçilmiştir. CFO hidrotermal yöntemle sentezlenmiş ve TA, fenolik hidroksil grupları ve manyetik nanopartiküllerin yüzeyinde ki Fe (III) arasında ki koordinasyon bağlar ile CFO üzerine modifiye (CFO-TA) edilmiştir. GOx, TA ve protein molekülleri arasındaki affinite kullanılarak CFO-TA üzerine immobilize (CFO-TA-GOx) edilmiştir. Hazırlanan örnekler XRD, FESEM, VSM, FTIR ve TGA ile karakterize edilmiştir. Serbest ve immobilize GOx'in relatif enzim aktiviteleri Dinitrosalisilik asit (DNSA) kolorimetrik yöntemine göre enzim aktifliğinin ölçülmesiyle karşılaştırılmıştır. Immobilizasyon başarıyla gerçekleştirilmiş ve enzim aktivitesi immobilizasyon işleminden sonra belli bir pH ve sıcaklık aralığında bir ölçüde iyileşmiştir [20].

BÖLÜM 2. MANYETİK NANOPARTİKÜLLERE ENZİM İMMOBİLİZASYONU

2.1. Manyetik Nanopartiküller

Farklı boyutlarda sentezlenen manyetik partiküller çok değişik kullanım alanlarına sahiptirler. Uygulama alanlarının fazla olması nedeni ile manyetik nanopartiküller (MNP) son yıllarda çok sayıda araştırmacı tarafından araştırılmaktadır. NP, 20 nm'nin altındaki boyutlarda oldukça geniş alanlarda uygulama sahası bulurlar. MNP'in uygulanan dış manyetik alan ile hareket ettirilebilmeleri ve bulundukları ortamlardan kolayca ayrılabilmesi nedeniyle birçok uygulama alanında büyük avantajlar sağlamaktadırlar. MNP çok farklı yapılarda sentezlenebilirler.

1. Manyetit; Fe_3O_4 (magnetit) ve $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit)
2. Metalik tozlar, Fe ve Co,
3. Spinel veta ters spinel yapıda ferritler, MgFe_2O_4 , MnFe_2O_4 ve CoFe_2O_4 vb,
4. Alaşımlar, CoPt_3 ve FePt [21].

Uygulamalarda kazandırdıkları avantajlar ve sağladıkları üstün özellikler sebebiyle sağlık ve biyomedikal alanlarda hızla yaygınlaşan araştırma konuları arasında yer almakta ve kullanım sahası bulmaya başlamakta olan MNP'in başlıca kullanım alanları şöyle sıralanabilir.

1. İn-vivo teşhis amaçlı
 - Manyetik rezonans görüntüleme
2. İn-vivo tedavi amaçlı
 - Kontrollü ilaç uygulamaları
 - Gen terapisinde taşıyıcıvektör ya da yönlendirme ve tetikleme ajanı

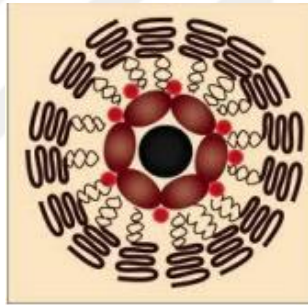
- Hipertemi (yüksek sıcaklıkla istenmeyen dokuların tahribatı)

3. İn-vitro teşhis amaçlı

- Farklı biyolojik moleküllerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması [22].

2.1.1. Manyetit

Manyetit (Fe_3O_4) bilinen ilk manyetik malzeme olup, milattan önce 1500’lü yıllarda keşfedilmiştir (Şekil 2.1.). Keşfinden bugüne kadar çok farklı manyetik malzemeler geliştirilmesine rağmen hala üzerinde çok sayıda çalışma yapılmaya devam edilmektedir. Manyetit, ters spinel kübik yapıya sahiptir. Ters spinel yapıda oksijen atomları merkeze bakacak şekilde yer alırken, yapıdaki Fe katyonları bazı bölgelerde 4, bazı bölgelerde 6 oksijen atomuyla çevrili halde bulunurlar. Oda sıcaklığında elektronlar Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları arasında geçiş yapmaktadırlar [21].

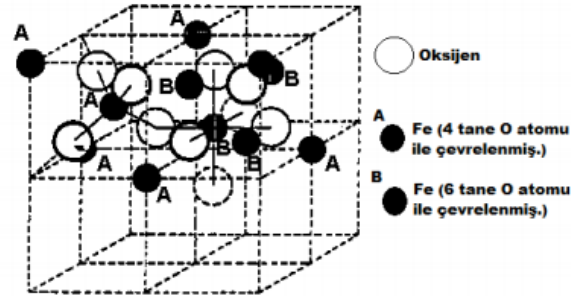


Şekil 2.1. Nano boyutta Fe_3O_4 [21].

Şekil 2.2.’de kristal yapısı gösterilen manyetit, oksijen iyonlarının küp içerisinde üç eksen boyunca birbiriyle karşılıklı pozisyonlarda düzenli bir şekilde yerleştiği kübik birim hücre merkezli şekil ile ters bir spinel kristal yapıya sahiptir. Birim hücrede, 32 tane O^{2-} anyonu, 16 tane Fe^{3+} katyonu ve 8 tane Fe^{2+} katyonu olmak üzere 56 atom yer almaktadır [23].

Manyetik yapı oksijen atomlarıyla birbirinden ayrılmış iki manyetik alt tabakadan (A ve B tabakaları) meydana gelir. İki tabaka arasındaki etkileşimler oksijen anyonları ile sağlanır. Bu etkileşimlere “dolaylı” veya “süper değiş-tokuş etkileşimler” adı verilir. Süper değiş-tokuş etkileşimleri çok güçlü olduğundan A ve B tabakaları

arasında spinlerin paralel olmayan düzenlenmesine neden olur. Bu nedenle A ve B tabakasının manyetik momentleri eşit olmaz ve net bir manyetik moment oluşur [23].



Şekil 2.2. Manyetitin ters spinel kristal yapısı [23]

Manyetit; poliyol, birlikte çöktürme, sonokimyasal sentez, mikroemülsiyon, hidrotermal ve mikrodalga hidrotermal teknikler olmak üzere çok sayıda farklı yöntemlerle sentezlenebilir. Manyetit sentezinde en çok kullanılan yöntemlerden biri Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının birlikte çöktürmesidir. Bunun nedeni bu yöntemin kolay uygulanabilir ve veriminin yüksek olmasıdır. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin boyutu, morfolojisi ve bileşimi kullanılan demir tuzlarının türü (örn; klorür, sülfat, nitrat, perklorür), kullanılan bazın türü (NaOH , KOH , NH_3) $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ mol oranı, ortamın pH'sı ve iyonik gücüne göre farklılıklar göstermektedir. Denklem (2.1)'deki birlikte çöktürme reaksiyonundan görülebileceği gibi, manyetit sentezi Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının sulu çözeltisine (1:2 mol oranında) baz eklenmesiyle gerçekleşir [21].



2.1.2. Ferritler

Ferrit yapıdaki manyetik malzemeler demir (III) oksit ile birlikte geçiş metali oksitlerini içeren bileşiklerdir. Ferritler, yumuşak ve sert ferritler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Ferritlerin yapısında demir oksit (Fe_2O_3) ve çeşitli ilave metal iyonları bulunur. Fe_2O_3 ile birleşen iyonlar kristal yapıyı ve ferritin tipini belirler. Yumuşak ferritler, manyetik alandan çıkarıldıktan sonra manyetik özelliklerini yavaş yavaş kaybettikleri geçici manyetik özellik sergilerler. Sert ferritler ise sürekli manyetik özellik gösterirler ve bunu kaybetmezler. Yumuşak ferritlerin çoğu ters

spinel yapıda olup, MFe_2O_3 veya MFe_2O_4 genel bileşimine sahiptirler. Burada M iki değerlikli metal iyonunu, (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} veya Co^{2+} vb.) temsil etmektedir. Yumuşak ferritler, dakikada birçok kez manyetizasyon ve demanyetizasyon edilebildikleri için, alternatif akım güç ve yüksek frekans işlemleri gerektiren uygulamalar için tercih edilirler.

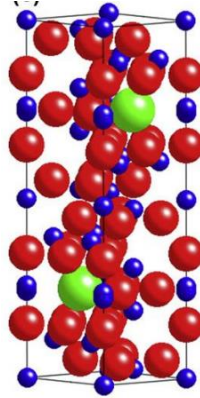
Bilgi iletişim teknolojisindeki çok hızlı gelişmeler yüzünden son zamanlarda yumuşak manyetik maddelerin yüksek frekanslı işlemlerine olan talep artmıştır. Bunun nedeni, manyetik ferrit nanoparçacıkların kalıcı mıknatıslar, manyetik sıvılar, manyetik ilaç salınımı ve yüksek yoğunluklu kayıt cihazları gibi bir takım teknolojik alanlardaki yaygın kullanımı ile birlikte düşük maliyetli ve yüksek performanslı oluşlarıdır.

Ferrit materyaller ayrıca çok yaygın olarak yüksek manyetik geçirgenlik ve yüksek elektriksel öz direnç özelliklerinden dolayı çeşitli elektronik aletlerde örneğin indüktörlerde ve/veya elektronik dalga emicilerde (nispeten birkaç yüz MHz civarındaki yüksek frekans bölgesinde) kullanılırlar. Bununla birlikte daha yüksek frekans (birkaç GHz) bölgelerinde geçirgenlik performansını artırmak için çalışmalar yapılmaktadır [24].

Kapalı formülü $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ şeklinde olan baryum ferrit temele tetrahedral kesim (A kesimi) ve octahedral kesim (B kesimi) olmak üzere iki alt örgünün kendini tekrarlamasından oluşur (Şekil 2.3.). Yüksek kalıcı mıknatıslanma ve koersivite değerlerinden dolayı geçmişte manyetik hafıza bantlarında kullanılmıştır. Ancak tek domain büyüklüğü yüksek olduğundan (48 nm) yüksek yoğunluklu depolamaya uygun değildir ve günümüzde bu amaçla kullanılmamaktadır.

Kimyasal olarak son derece kararlı bir yapıya sahip olan baryum ferrit bu nedenle başka malzemelere genellikle kimyasal olarak bağlanmaz. Seramik olduğundan düşük genleşme katsayısına sahiptir bu nedenle yüksek sıcaklık farklarına dayanıklıdır ancak zorlanma altında kırılğan bir malzemedir. Bu nedenlerden dolayı mikrodalga soğurma uygulamalarına uygun olmasına karşın yüzeye doğrudan

uygulanamaz ve ancak bağlayıcı bir matris içerisinde dağıtılarak kullanılması gerekir [25].

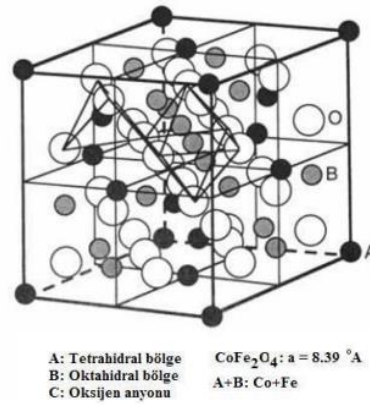


Şekil 2.3. Baryum ferrit için birim hücre [25]

2.2. Kobalt Ferrit

Çeşitli ferritler arasında kobalt ferritin (CoFe_2O_4) özel bir yeri vardır. Onu özel kılan özellikleri, yüksek anizotropi sabiti ($2,65 \times 10^6 - 5,1 \times 10^6 \text{ erg/cm}^3$), orta derecedeki doyum manyetizasyonu ($M_s = 80 \text{ emu/g}$), yüksek koersivitedir (40 nm boyutundaki bir tek domain CoFe_2O_4 'in oda sıcaklığındaki değeri 4,3 kOe'dir). Diğer MNP ile kıyaslanınca kobalt ferrit daha güçlü ve özellikli bağlar ile serum albumin proteinlerine bağlanabilmektedir. CoFe_2O_4 NP yaygın olarak manyeto-optik kayıt aletlerinde, yüksek yoğunluklu veri depolama aletlerinde, stres sensörleri ve diğer yüksek frekans uygulamalarında kullanılmaktadır.

Kübik CoFe_2O_4 , oksijenin bir yüzey merkezli yapı oluşturduğu, ters bir kübik spinel yapıya sahip yaygın bir manyetik ferrittir. Co^{2+} dört yüzlü veya sekiz yüzlü alanları kaplamaktadır (Şekil 2.4.). Pek çok manyetik gruplaşmanın sağlanabilmesi için CoFe_2O_4 materyalinin manyetik düzeni, Co^{2+} 'ın kimyasal yapısını düzenleyerek kontrol edilebilir [24].



Şekil 2.4. Spinel birime ait hücre yapının şematik modeli [24]

2.3. CoFe_2O_4 Sentez Yöntemleri ve Kullanım Alanları

CoFe_2O_4 için bazı sentez teknikleri:

- Yanma reaksiyonları
- Hidrotermal yöntemi
- Termal dekompozisyon
- Ball milling
- Polyol metodu
- Birlikte çökelme metodu
- Mikro emülsiyon
- Sol-jel metodu
- Sıcak izostatik basınç (HIP) ve spar plazma sinterleme (SPS) metotları [24].

Mikroemülsiyon, birbiri içerisinde çözünmeyen iki sıvı içinde meydana gelmektedir. Örneğin su ve yağ molekülleri birbirine karıştırıldığında, her iki malzemede birbiri içinde çözünmeyen kararlı askılar oluştururlar. Su içerisinde yağ mikroemülsiyonlarında oluşan mikrodamlacıklara “misel”, yağ içerisinde su mikroemülsiyonlarında oluşan mikrodamlacıklara da “ters misel” adı verilir. Mikroemülsiyon sentezleme yönteminde, su-yağ karışımında sulu çözelti kısmı, karışıma konulan Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} ve Mn^{2+} gibi metal tuzlarını ve bunları çöktürmek için sodyum hidroksit (NaOH), amonyum hidroksit (NH_4OH) gibi bazları içermektedir. Çözeltideki yağ fazı su içinde çözünmeyen organik sıvıyı

oluşturmaktadır. Yağ fazı için polar olmayan organik çözücüler (hegzan, heptan, tolüen gibi) kullanılmaktadır. Birbiri içerisinde çözünmeyen bu sıvıların yüzeyleri arasında büyük gerilimler oluşur. Mikroemülsiyonu kararlı hale getirebilmek için yüzey aktif malzemeler kullanılır. Yüzey aktif maddeler bir ucu hidrofobik diğer ucu hidrofiliktir ve bu sayede yüzey aktif malzeme iki sıvı faz arasında bir sınır oluşturmaktadır.

Bu yöntemle küresel, dikdörtgen ve küp şeklinde NP elde edilebilir. Mikroemülsiyon yönteminde NP'in dağılımları, kristalize olmaları ve parçacık boyutu iyi bir şekilde kontrol edilebilir. Ancak mikroemülsiyonda elde edilen ürün termal parçalama ve ortak çöktürmeye göre oldukça azdır ve üretim hızı düşüktür. Büyük miktarda NP sentezleyebilmek için çok miktarda çözücüye gerek vardır ve bu yüzden çok kullanışlı bir yöntem değildir.

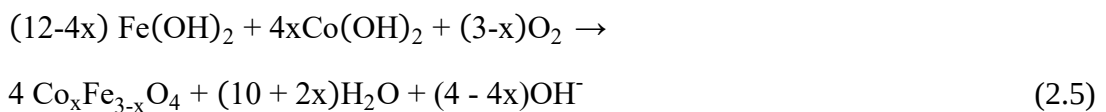
Termal parçalama, organik bazlı bir yöntemdir. Küçük boyutlarda monodisperse süperparamanyetik NP, yüksek sıcaklıkta termal parçalama yöntemi ile sentezlenebilir. Yüzey aktif madde içeren organometalik bileşikler yüksek kaynama noktasına sahip organik çözücü ortamında parçalanmasıyla çok daha küçük manyetik nanokristaller sentezlenebilir. Parçacık boyutunu ve morfolojisini belirleyen parametreler arasında; reaksiyon süresi, reaksiyon sıcaklığı, kullanılan öncül madde, kullanılan çözücünün cinsi, kullanılan yüzey aktif madde ve miktarı incelenebilir. Öncül madde organometalik bileşikler metilasetilasetonatlar, karboniller veya kupferronatlar olabilir. Karbonillerde olduğu gibi, eğer öncül madde içindeki metal sıfır değerlikli ise termal parçalama ilk olarak nanometal oluşumuna neden olur fakat iki basamaklı işlemlerde oksit nanoparçacık üretimi gerçekleştirilebilir. Organik çözücüde dispers olan NP termal parçalama yöntemiyle sentezlenebilir, ancak biyoteknolojik uygulamalarda suda çözünebilir MNP tercih edilir.

Çözelti fazında gerçekleşen bir sentez tekniği olan hidrotermal sentez, yüksek basınç ve yüksek sıcaklıkta metal tuzlarının hidroliz ve dehidratasyonuna dayanır. Kimyasallar sıvı fazda yüksek basınçla dayanıklı olan kaba konulur ve 100 ile 300 °C aralığında belli bir süre ısıtılırlar. Kabın içerisinde bulunan su kaynama sıcaklığının

üzerinde bulunması durumunda içeride yüksek basınç oluşur. Çünkü kabın hacmi sabittir. Reaksiyon süresi, sıcaklık, basınç gibi parametreler NP'in kristal yapısını, kimyasal yapısını ve saflığını etkileyebilmektedir. Ayrıca bu parametreler NP'in büyümesini kontrol etmek için ve yüksek çekirdeklenme hızını sabitlemek için ayarlanabilir. Hidrotermal sentezde meydana gelen işlemler üretim sonrası bir işlem gerektirmez ve organik çözücü içermez. Bu nedenle çevreye bir zararı yoktur. Bu yöntemin dezavantajı ürün miktarının oldukça az olmasıdır ve NP kristallerinin büyümesi durumunda parçacıkların süpermanyetik özelliğini kaybetme ihtimalidir.

Co^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının bazik ortamda güçlü bir karıştırıcı altında çöktürülmesi esasına dayanır. Bu yöntem ile MNP'in sentezi için pek çok teknik geliştirilmiştir. Bu teknikler içerisinde en çok kullanılanı, en etkili, ekonomik ve basit olanı ortak çöktürmedir. Bu sentezleme tekniğinin en büyük avantajı fazla miktarda ürün vermesidir. Reaksiyon süresi diğer tekniklere göre daha kısadır ve reaksiyon oda sıcaklığında veya yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilebilir.

Kobalt ferrit NP ortak çöktürme yöntemiyle Co^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının bazik ortamda güçlü bir karıştırıcı altında çöktürülmesiyle elde edilir. Ortak çöktürme yönteminde reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ortamın pH'ı 8 ile 14 arasında olmalıdır. Bu yöntemle elde edilen NP'in boyutları, $\text{Co}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ oranı, kullanılan tuz, sıcaklık, baz tipi, pH ve iyonik şiddete bağlı olarak değişir. O_2 'li ortak çöktürmede son ürün elde edilene kadar birçok ara basamak gerçekleşir. Bu reaksiyonlar,





olarak verilebilir. Reaksiyonlardan da anlaşılıyor ki, kobalt ferrit oluşabilmesi için baz konsantrasyonu tüm reaksiyonların oluşmasına yeterli olmalıdır.

Ortak çöktürme yönteminin sağladığı en büyük avantaj fazla miktarda NP sentezlenebilmesidir. Ancak parçacık boyutunun kontrolü sınırlıdır. Bunun sebebi, kristal gelişimin yalnızca kinetik faktörler tarafından kontrol edilmesidir. Ortak çöktürme işlemi iki basamakta meydana gelir. Oluşan basamaklardan birincisi çekirdeklenmedir. Çözeltilerin derişimi kritik süper doyuma ulaştığında NP çekirdekleri oluşmaya başlar. İkinci basamak ise büyümedir. Bu basamakta oluşan çekirdekler büyür ve kristaller oluşur. Elde edilen kobalt ferrit NP'in monodisperse olması bu iki basamağın birbirinden ayrılması ile mümkündür. Sentezi etkileyen parametrelerin kontrolü bunu sağlayabilir. Bu parametreler arasında, reaksiyon sıcaklığı, $\text{Co}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ oranı, Co^{2+} iyon konsantrasyonu, reaksiyon süresi, karıştırma hızı sayılabilir [26].

2.4. Polifenoller

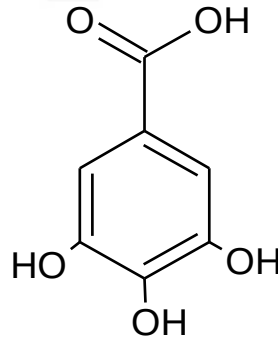
Her molekülde birden fazla fenol grubu taşıyan bileşikler polifenoller olarak adlandırılır [27,28]. Polifenoller genelde sebze ve meyvelerde bulunurlar ve metabolizmada yan ürün olarak ortaya çıkarlar. Bu bileşikler antioksidan, antikarsinojenik aktivite ve gıda kalitesine olan etkilerinden dolayı önemlidirler. Polifenoller potansiyel antioksidan bileşiklerdir ve insan sağlığına muhtemel faydaları vardır. Antioksidan polifenollerin en önemli işlevleri serbest radikalleri süpürerek, metalleri tutuklayarak ve lipid peroksidasyonunu önleyerek oksidatif stres parametrelerini ortadan kaldırmasıdır. Polifenoller çok sayıda hidroksil grubu içerir, bu ise bileşiğe potansiyel metal şelatlama özelliği kazandırır ve böylece zararlı bileşenleri yakalayabilir, eksik elektronlarını doyurabilir veya reaksiyon zincirini kırabilir.

Polifenolik bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri temizleme, metal iyonlarla kompleks bileşikler oluşturma ve singlet oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu bileşikler, proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin (lipit, karbonhidrat, nükleik asitler) serbest radikaller tarafından oksidasyonunu engellemek için yapılarındaki hidroksil gruplarında bulunan hidrojeni kolayca verebilmektedirler [29].

2.4.1. Gallik asit ve kullanım alanları

Gallik asit (GA; 3,4,5-trihidroksi-benzoik asit), polihidroksifenolik bileşik olarak, serbest form ya da daha yaygın olarak gallotanin denilen tanin içeriğinde bulunan, insanlarda çok iyi metabolize edilebilen bir moleküldür.

Şekil 2.5.'de kimyasal yapısı gösterilen, moleküler ağırlığı 170,12 g/mol, erime noktası 250 °C ve suda çözünürlüğü 20 °C'de %1,1 olan GA sarımsı beyaz renkli bir kristaldir [28].



Şekil 2.5. Gallik asitin kimyasal yapısı

Besin olarak alınan taze sebze ve meyvelerin bazı kanser türlerine karşı koruyucu etki gösterdikleri ile ilgili önemli bilgiler mevcuttur. Genellikle bu koruyucu etki, besinlerdeki antioksidan özelliğe sahip bileşiklerden kaynaklanmaktadır.

Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar, bitkilerden elde edilen GA gibi polifenolik bileşiklerin hem antioksidan etki hem de farklı bir mekanizma ile antikanserojen etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Bilhassa şarap ve çay gibi içeceklerin in vitro ve in vivo koşullarda antioksidatif etki gösterdiği bildirilmiştir. GA kimya ve ilaç endüstrisinin yanında propil gallat, pirogallol, trimetoprim ve fotosensitif reçinelerin üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca boya, ilaç ve kimyasal madde üretim endüstrisinde de yararlanılmaktadır.

GA'nın farklı kullanım alanları vardır. I. Dünya Savaşı sırasında İngilizlerin suda çözünen boyaların ve indigonun Almanya'ya girmesine engel olması üzerine gallosiyanın sentezinde gallik asit kullanılmıştır. Boya endüstrisinin yanı sıra tıpta bazı deri hastalıklarının tedavisindeki ilaçların hazırlanmasında GA'dan yararlanılmaktadır.

GA fotoğrafçılıkta, fotoğraf geliştirici madde olarak kullanılan pirogallol üretiminde de başlangıç maddesi olarak önem taşımaktadır. Ayrıca pirogallol (1,2,3-trihidroksibenzen) endüstride yaygın olarak kullanılan bir polifenol olduğu bildirilmektedir. Kimyasal olarak pirogallol, gallik asidin prolizi ile sentezlenir. Mikrobiyal olarak, topraktan izole edilen *Citrobacter* türlerinin GA'yı dekarboksile ederek pirogallol oluşturduğu saptanmıştır.

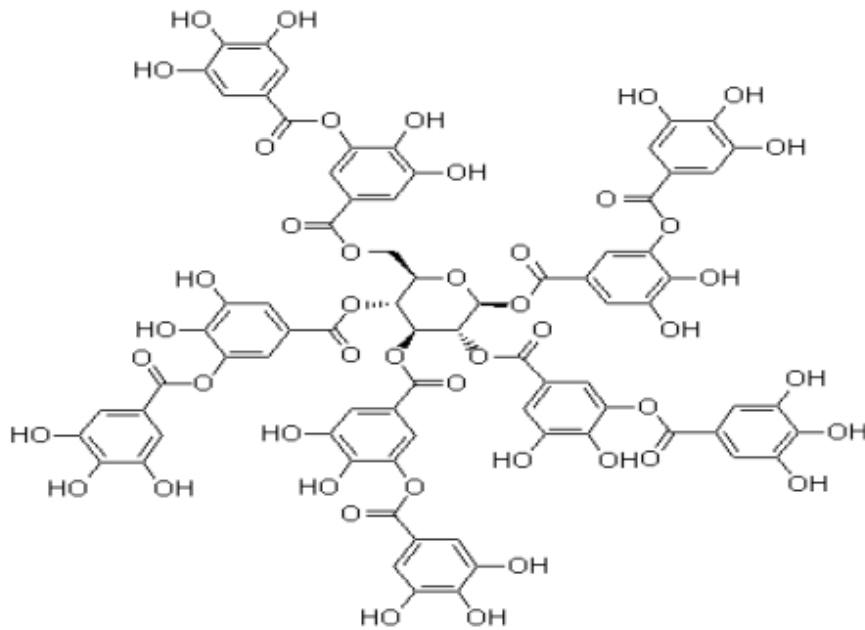
GA ayrıca deri tabakalamada, serbest mineral asitlerin, dihidroksiaseton ve alkoloidlerin tayininde kullanılır. Bu asitin sülfirik asit ile kondenzasyonu sonucu hekza – hidroksiantrakinon meydana gelir. Farmosotik ve gıda ürünlerinin imalinde çok sık kullanıldığına ait çalışmalar vardır.

Böylece, GA tıp ve eczacılıktan, boya, kimya ve besin endüstrisine kadar çok geniş bir alanda çeşitli amaçlarla kullanılan bir organik asittir. Birçok maddenin sentezi için öncü madde olma özelliği taşımaktadır.

İlk defa Scheele, palamutların su efüzyonlarında gelişen bir küf mantarını incelerken GA'yı bulmuştur. Daha sonra bir Fransız araştırmacı bu küf mantarını izole ederek bunun *Aspergillus niger* olduğunu ilk defa açıklamıştır [30].

2.4.2. Tannik asit ve kullanım alanları

Tabii bir fenolik bileşik olan TA'nın merkezi bir glukoz halkası ve 10 galloil grubundan oluşan yapısı Şekil 2.6.'da gösterilmiştir. TA çoğu bitkide bulunan bir üründür. Meşe, hemlock, kestane ve mangrov kabukları, sumak yaprakları ve pek çok bitki meyvesi TA içeren kaynaklardır. TA güçlü burucu tadı ile sarıdan açık kahverengiye dönük amorf bir toz olup yüksek moleküler ağırlıktadır. TA doğal kaynaklardan sıcak su ile ekstraksiyonla elde edilir.



Şekil 2.6. Tannik asitin (β-1,2,3,4,6-digalloil-O-D-glukoz) şematik gösterimi [27]

Ticari TA'nın yaklaşık ampirik formülü $C_{76}H_{52}O_{46}$ şeklindedir. Glukoz molekülünün beş hidroksil grubunun her biri bir digallik asit molekülü ile esterleşir ve TA yapısı oluşur.

TA'nın ayrışma noktası 210-215 °C aralığındadır. Su (1 g TA, 0,35 mL su içinde çözünür), alkol, aseton ve sıcak gliserinde çözünür fakat eter ve kloroformda çözünmez.

TA, kimya sanayii, gıda, ilaç ve deri gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. TA'nın kullanıldığı fabrikalardaki endüstriyel atık sularda bulunan TA, metaller ile etkileşime girerek TA-metal kompleksleri oluşturabilir. TA ayrıca sudaki ekosistemlerde toksik maddeler ile etkileşebilir ve toksisitesini değiştirebilir [27].

2.5. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler protein yapısında olup, hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonları katalizlerler. Enzimler katalizledikleri reaksiyonların hızlarını arttırmak için kullanılırlar. Aynı şartlar altında meydana gelen reaksiyonun hızı enzim varlığında enzim olmayan duruma göre birkaç milyon kata kadar daha yüksek olabilmektedir [31]. Enzimler biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların, canlılara zarar vermeden meydana gelmesini sağlayan “biyokatalizörler” şeklinde de tanımlanabilir [32].

Birçok endüstriyel proseste kullanılan enzimler çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni; mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin katalitik aktivitelerinin doğal enzimlere göre daha yüksek olmaları, katalizlenen reaksiyonda yan ürünler oluşturmamaları, daha kararlı ve ucuz olmaları, büyük miktarda üretilibilmeleridir [32].

Enzimler sentetik veya inorganik yapıli katalizörlerden çok daha fazla katalitik güce sahiptir, substratlarına karşı oldukça yüksek spesifikliğı sahiptir ve yavaş gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonları çok yüksek derecede hızlandırır ve reaksiyon sonunda yan ürün oluşturmazlar. Enzimler bu özelliğini reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek gerçekleştirirler ve reaksiyonun hızını diğer reaksiyonlara göre 10^8 – 10^{10} kat arttırır. Suda ekstrem olmayan pH ve sıcaklık aralıklarında işlev gösterirler. Çok az biyolojik olmayan katalizörler tüm bu özelliklere sahiptir [33].

Enzimler sentetik proseslerin tasarımları için çevresel durumlarda ve ürünlerin geniş bir oranını elde etmek için mükemmel özelliklere (aktivite, seçicilik, spesifik) sahiptirler. Enzimin biyokimyasal özellikleri onun moleküler ağırlığı, yüzey üzerinde

fonksiyonel grubu ve saflığı immobilizasyon için önemli bir faktördür. Enzimin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, örneğin enzim ve destek arasında ne türde etkileşimler meydana gelebileceği hakkında bilgi verir. Aynı zamanda safsızlıklar substratlara etki edebileceğinden enzimin saflığı önemlidir. İmmobilize enzimin parametrelerine karar veren, enzimin diğer özellikleri enzim tarafından katalizlenen reaksiyon kinetiği ve reaksiyon tipidir. Spesifik aktiviteler, aktivasyon ve inhibisyon için kinetik parametreler, pH, sıcaklık, çözücülere karşı kararlılık ve safsızlıklar aynı zamanda immobilize enzimlere etki etmektedir [31].

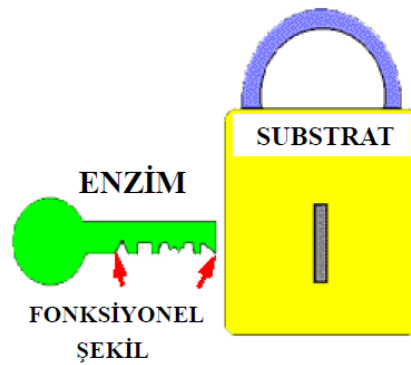
Hücrelerde çok önemli biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen enzimler günümüzde çok çeşitli uygulama alanlarında kendilerine yer bulmuşlardır, ancak enzimler avantajları yanında bazı dezavantajlara da sahiptirler. Enzimlerin bulundukları kaynaklardan izolasyonları ve saflaştırılmaları oldukça maliyetli işlemlerdir. Bitki ve hayvanlar gibi doğal kaynaklardan izole edilen enzimlerin kararlılığı oldukça düşüktür. Bunun yanında, bu enzimler proses koşullarında son derece hassastırlar. Enzimler katalizledikleri reaksiyonlarda değişime uğramadıkları için aynı enzim tekrar tekrar kullanılabilir, ancak enzimler çoğu endüstriyel, analitik ve klinik proseslerde substrat ile çözelti içerisinde karıştırılmaktadır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, enzimlerin geriye kalan substrat ve oluşan ürünlerle birlikte bulunduğu çözelti ortamından ayrılması zordur ve enzimler geri kazanılamazlar. Bu nedenle enzimler birçok uygulamada sadece bir kez kullanıldıkları ve pahalı oldukları için maliyetleri çok yüksek olmaktadır [31].

Optimum şartlarda bulundurulmuş enzimler özelliklerini bu ortamlarda da gösterebildiğinden in vitro ortamlarda oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Özellikle kimya sanayisinde, tarım ve ziraat alanında, tekstil endüstrisinde, gıda ve tıp alanında önemli bir yere sahiptir. Bununla birlikte serbest enzimin bu alanlarda kullanımında çeşitli sorunlarla karşılaşılır. Enzimin tekrar kullanılamaması, kullanılan enzimin ürünleri kirletmesi gibi sorunlar başlıca olarak sıralanabilir. Enzimler biyolojik kaynaklardan elde edilir ve bunun maliyeti oldukça yüksektir. Tüm bu konular göz önüne alındığında enzimlerin kullanıma uygun hale gelebilmesi için immobilize edilmeleri kaçınılmaz olmuştur [33].

2.5.1. Enzimatik reaksiyonlar üzerine etki eden faktörler

Enzim aktivitesi; belirli başlangıç şartlarında ve birim zamanda, belli bir miktarda enzimin etkisiyle reaksiyona giren substrat miktarının ölçülmesiyle elde edilen değerdir.

Herhangi bir enzimin aktivitesini belirlemek için ideal olan tek bir yol yoktur. Çünkü aktivite belirleme yöntemlerine çeşitli faktörler etki etmektedir. Bu faktörler; enzim saflığı, fizikokimyasal özellikleri, katalizlenen reaksiyonun türü, lokalize olduğu yer, mevcut analiz cihazlarının niteliği ve duyarlılığı, kullanılan yöntemin maliyeti şeklinde sıralanabilir. Enzimlerin substratlar ile etkileşimleri anahtar kilit modeli ile açıklanmaktadır (Şekil 2.7.). Enzimlerin, biyolojik ortamda bulunan miktarı çok az olduğundan tayin edilmeleri oldukça zordur, ancak aktiviteleri belirlenebilir. Enzimlerin aktivitelerini çeşitli şekillerde belirlemek mümkündür. Örneğin, 1 mg enzim tarafından birim zamanda meydana getirilen absorbans değişimi bir aktivite birimi olarak ifade edilebilir. Ancak genel olarak, bulunan sonuçların karşılaştırılabilir olması için daha standart olan bir birim tanımlaması geliştirilmiştir. Bu standart birim uluslararası ünite (IU) veya enzim ünitesi olarak ifade edilmekte ve 1 IU 1 dakikada 1 mikromol substratı katalizleyen enzim aktivitesi olarak tanımlanır [31].



Şekil 2.7. Enzimlerin anahtar-kilit modeli örneği [31]

Enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, pH (H^+ iyon konsantrasyonu), ısı, reaksiyondan meydana gelen ürünler, ışık ve diğer fiziksel özellikler ve zaman enzimatik reaksiyon hızı üzerine etki eden faktörlerdir.

Enzimatik reaksiyonun hızı kullanılan enzim miktarı ile doğru orantılıdır. Yani enzimin konsantrasyonu ne kadar fazla ise reaksiyon da o kadar hızlı olur. Mesela, enzim miktarı iki misline çıkarılır ise reaksiyon hızı da iki misli artar. Bu şu şekilde formüle edilebilir.

$$V = K \times E \quad (2.7)$$

Burada V: reaksiyonun hızı, K: orantı sabiti ve E: enzim konsantrasyonudur. Bu hal reaksiyonun başlangıcında her ne kadar böyle ise de reaksiyon devam ettikçe aynı nisbet dahilinde olmaz. Buna sebep enzimin tamamen saf olmamasıdır. Enzim konsantrasyonu lüzumundan fazla da arttırılrsa reaksiyon hızındaki artış yine aynı nisbette olmaz. Bu halde muhtemelen substratın maksimum faaliyete imkân sağlayacak miktarda olmamasına bağlıdır. Şekil 2.8. bu izah edilen hususlar ile birlikte enzim konsantrasyonunun reaksiyon hızı üzerine olan tesirini göstermektedir.



Şekil 2.8. Enzim konsantrasyonunun enzimatik reaksiyon hızına etkisi

Bu durumda eşitlik (2.7) şu şekilde de ifade edilebilir.

$$V = \frac{\text{Nihai ürünün miktarı}}{\text{Reaksiyonun süresi}} = K \times E \quad (2.8)$$

$$E = \frac{\text{Nihai ürün miktarı}}{K \times \text{Reaksiyon süresi}} \quad (2.9)$$

Eğer enzimatik reaksiyon çalışmalarında aynı reaksiyon süresi kullanılır ise bu iki sabit C olarak gösterilebilir.

$$E = \frac{\text{Nihai mahsülün miktarı}}{C} \quad (2.10)$$

O zaman enzim konsantrasyonunun teşekkül eden nihai mahsullerin miktarı ile orantılı olduğu görülür. Eğer bir deneyde 0,2 mg ve diğer deneyde de 0,6 mg nihai mahsul teşekkül eder ise bu ikincisinde gerekli enzim miktarı birincisine nazaran üç misli fazladır.

Enzim miktarı sabit kaldığı taktirde reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonu ile orantılı olarak artar. Bu başlangıçta linear bir şekilde ancak bir noktaya kadar vuku bulur. Bu huduttan sonra substrat konsantrasyonu artsa da reaksiyon hızı artmaz. Reaksiyon hızı hiperbolik bir hal alır. Bu anlatılanlar Şekil 2.9.'da gösterilmiştir.

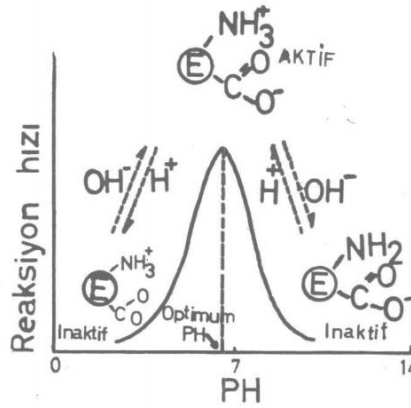


Şekil 2.9. Substrat konsantrasyonunun enzimatik reaksiyon hızına etkisi

Enzimin bulunduğu ortamın hidrojen iyon konsantrasyonu enzimatik aktivite üzerine belirli bir tesir yapar. Enzimler protein tabiatında olduklarından çok düşük ve çok yüksek pH'larda denatürasyona uğrayarak düşük aktivite gösterirler veya inaktivasyona uğrarlar. Enzimlerin aktivite değişiklikleri yalnız denatürasyon ile izah edilemez. Enzimlerin pH değişiklikleri karşısında gösterdikleri aktivite değişiklikleri Şekil 2.10.'da görüleceği gibi enzimlerin aktif yüzündeki fonksiyonel grupların iyonizasyon derecesi ile alakalıdır. Bilindiği gibi enzim-substrat kompleksinin teşekkülü için enzimde pozitif ve negatif yüklü grupların birlikte bulunması lâzımdır.

Eğer herhangi bir enzimde bu gruplardan herhangi birisi bulunmaz ise o zaman enzim inaktif durumdadır.

Ayrıca her enzim muayyen bir pH da en çok aktivite gösterir. Yani bu muayyen pH'da bu enzimin reaksiyon hızı en çoktur. Çünkü bu pH'da enzim molekülünün % büyük bir kısmı iyonik şekildedir. Yani pozitif ve negatif yüklüdür. İşte enzimin en çok aktif olduğu bu pH'ya optimum pH denir. Bu nokta enzimden enzime çok farklar gösterir. Çünkü her enzimin iyonize olan gruplarının tabiatı değişiktir. Optimum pH derecesinin iki tarafında enzimatik reaksiyon hızı zayıflamakta ve muayyen bir pH derecesine gelindiği taktirde de enzim harap olmakta ve aktivitesi kalmamaktadır. Enzimatik reaksiyonlarda hidrojen iyon konsantrasyonunu optimal halde muhafaza edebilmek için tampon çözeltileri kullanılır. Optimal pH, tampon çözeltisinin cinsi, substratın özelliği ve enzimin kaynağı gibi çeşitli şartlara tabidir. Şekil 2.10.'da enzimatik reaksiyon hızı üzerine tesir eden hidrojen iyon konsantrasyonu ve optimum pH'nın etkisi gösterilmiştir [34].



Şekil 2.10. pH'nın enzimatik reaksiyon hızına etkisi [34]

2.5.2. Enzim immobilizasyonu ve immobilizasyon yöntemleri

Bilindiği gibi enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel proseslerin çoğu sulu ortamlarda meydana geldiğinden bu uygulamalardaki reaksiyonları katalizlemek için kullanılan serbest enzimlerin aktivitelerini kaybetmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Ayrıca, serbest enzim reaksiyon ortamından istenildiği

zaman ayrılamadığından reaksiyonun kontrolü de zordur. Reaksiyonun istenildiği zaman sonlandırılması için inhibitör kullanılabilir. Ancak bu durumda da reaksiyon ortamında yeni bir kirlilik daha oluşacaktır. Ürünlerden bu kirliliklerin giderilmesi maliyetleri artırmaktadır. Bunun yanında serbest enzimlerin aktivitesini koruyarak geri kazanılması imkansız olduğundan tekrar kullanılmaları da mümkün değildir. Enzimler çok spesifik ve pahalı katalizörlerdir, geri kazanılamadıkları zaman üretim maliyetlerini önemli ölçüde arttırmaktadırlar. Bu yüzden serbest enzimler sürekli üretim proseslerinde kullanılamazlar. Bu sorunların üstesinden gelmek ve enzimleri endüstride kullanabilmek için enzim immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır. Immobilizasyon, enzim moleküllerinin katalitik aktivitesini koruyarak kataliz işlemlerinde tekrar ve sürekli kullanmak için bir destek maddesine fiziksel veya kimyasal olarak tutturulması şeklinde tanımlanabilir [35].

Enzim immobilizasyonu, aynı zamanda enzim özelliklerini geliştirmek için önemli bir araçtır. Immobilize enzimler genellikle daha iyi pH ve sıcaklık kararlılığı gösterir, ayırmak için daha kolaydır, tekrar kullanılabilir ve pratik uygulamalar için daha uygundur. Sonuç olarak, immobilize biyokatalizler yüksek tonajlı proseslerde ve farmasotik sanayi biyoayırıcılar ya da biyosensörler olarak birçok pratik ve ticari uygulamalarda kullanılmaktadır.

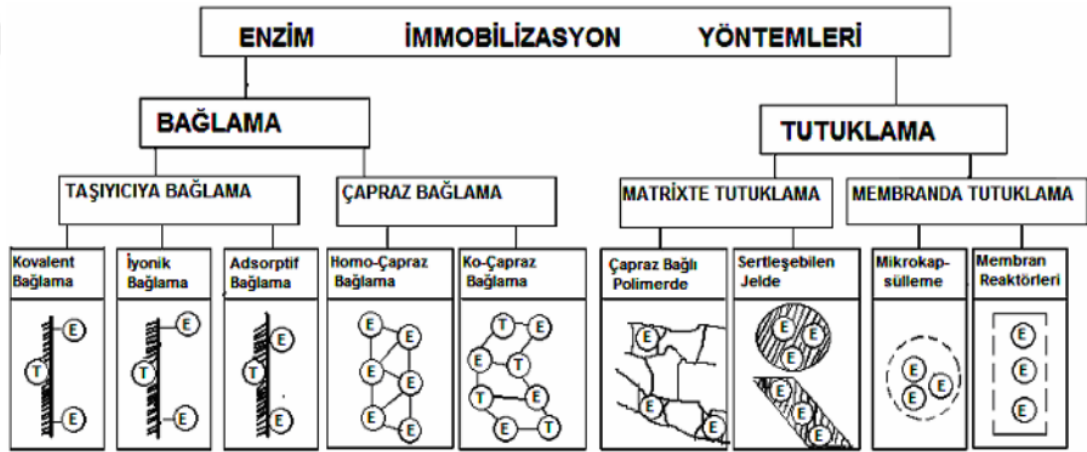
Enzimlerin immobilizasyonunun sağladığı avantajlar şöyle sıralanabilir.

- Tekrar kullanılabilirler, böylece üretim maliyetini azaltmaktadırlar.
- Katalizörün üründen olağan ayrılma problemi pratik olarak giderilmiştir.
- Immobilize enzimlerin reaksiyonları daha az yer gerektirir.
- Reaksiyonun daha iyi kontrolü mümkündür.
- Sürekli akış sistemlerine uygulanabilirler.
- Immobilize enzimlerin bazı durumlarda çözünür proteinlerden daha kararlı olduğu gösterilmiştir (yüksek sıcaklık, daha yüksek basınç ve bazik ya da asidik pH). Ayrıca, tıbbi uygulamalarda, olumsuz immünolojik reaksiyonlar sadece enzimlerin enkapsülasyon veya tutuklanması ile önlenabilir [31].

Enzimlerin immobilizasyonunun neden olduğu bazı dezavantajlar da aşağıda özetlenmiştir.

- İmmobilizasyon sırasında enzim aktivitesi azalabilir veya kaybolabilir.
- İmmobilizasyon işlemleri çok basamaklı ise enzim kararlılığı sınırlı olur.
- İmmobilizasyon için destek maddelerinin maliyetinin yüksek olması.

Enzim immobilizasyonu için kullanılan çeşitli metodlar vardır. En yaygın kullanılan immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.11.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. En yaygın kullanılan immobilizasyon yöntemleri, E: Enzim molekülü ve T: Taşıyıcı [35]

2.5.2.1. Bağlama yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda organik veya inorganik esaslı doğal veya yapay materyaller kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir (Tablo 2.1.). Taşıyıcının aranılan niteliklere sahip olması gerekir. Bunlar:

- Enzimlerin tutunabilmesi için hidrofilik yüzey,
- Reaksiyon ortamında çözünmeme,
- Porlu yapı,
- Mekanik kararlılık ve uygun tanecik yapısı,
- Kimyasal ve termal kararlılık,

- Kovalent bağlamada kullanılan taşıyıcılar immobilizasyon şartlarında reaksiyona girebilen fonksiyonel gruplar taşımali,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Toksik olmama,
- Rejenere olabilme.

Taşıyıcıya bağlamak için bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanılır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel ve iyonik gruplar ile hidrofobik kısımlar bu bağlanmada rol alırlar.

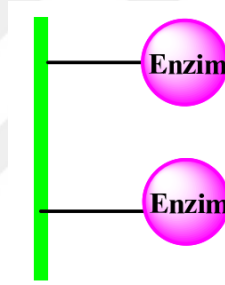
Tablo 2.1. Yaygın olarak kullanılan taşıyıcılar

Anorganik	Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Slikajel	Nişasta	Poliakrilamid
Bentonit	Dekstrin	Naylon
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve allil polimerler
Titanyum dioksit	Karragenan	Oksiranlar
Zirkonyum dioksit	Kollojen	Metakrilat türevleri
Nikel oksit	Kitin ve kitosan	İyon değiştirici reçineler

Enzim ile reaksiyon ortamında çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem immobilize olan enzimin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiye geçmesini engeller. Kovalent bağlama, genellikle enzimin yapısı ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda tercih edilir.

Kovalent bağ ile immobilize edilmiş enzimin aktivitesi doğal enziminkinden farklıdır. Bu farkın miktarı destek materyalinin biçim ve boyutuna, etkileşme metoduna, destek materyalinin bileşimine, enzim yapısına ve reaksiyon esnasındaki spesifik şartlara bağlıdır.

İmmobilizasyonda kovalent bağlama ile iki aşamada gerçekleştirilir. Birinci aşama destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikinci aşama enzimin kovalent bağlanmasıdır. Kovalent bağlamanın yapılabilmesi için destek maddesi; hidroksil, karboksil, amino, ve tiyol gibi polar fonksiyonel gruplar taşımalıdır. Aktifleştirilmiş destek materyallerine kovalent bağla bağlanan enzimlerin fonksiyonel grupları, polipeptit zincirlerin α -amino grupları, arjinin ve lisinin α -amino grupları, glutamat ve aspartatinin α -karboksil grupları ve zincirlerin α -karboksil grupları, serin ve treaninin hidroksil grupları, tirozinin aromatik zincirleri, histidinin imidazol halkası, triptofanın indol halkası ve sisteinin sülfidril grupları gibi gruplardır. İmmobilizasyon reaksiyonunda aktifleştiriciler enzimlerin bu fonksiyonel grupları ile ve taşıyıcıların içerdiği diazonyum tuzu, asit azid, izosiyanat, imin, imido-ester ve halojenürler gibi reaktif gruplar ile kovalent bağ oluştururlar (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Kovalent bağlama [22]

İmmobilizasyonda iyonik bağlanma, iyon değiştirme yeteneğine sahip reaksiyon ortamında çözünmeyen desteklere enzimin iyonik olarak bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlanma ile birlikte fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır.

İyonik bağlanma çok ılıman şartlarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile destek arasındaki bağ, kovalent bağ kadar güçlü olmadığından kataliz esnasında enzim kayıpları söz konusudur.

Adsorpsiyon metodu en eski ve basit bir immobilizasyon metodudur. Suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin immobilizasyonda çok

kullanıldığı görülmektedir. Yöntem; yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkayarak ortamdan uzaklaştırılmasına dayanır. Enzim taşıyıcıya van der Waals kuvvetleri ile bağlanır. Bir enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıya adsorpsiyonu pH, çözücü, iyon şiddeti, enzim/adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır.

Yaygın kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, nişasta, anyon ve katyon değiştirici reçineler, sentetik polimerler, silikajel, farklı killer, alumina, gözenekli camlar ve seramiklerdir. Taşıyıcıya bağlanmanın yarar ve sakıncaları Tablo 2.2’de verimiştir.

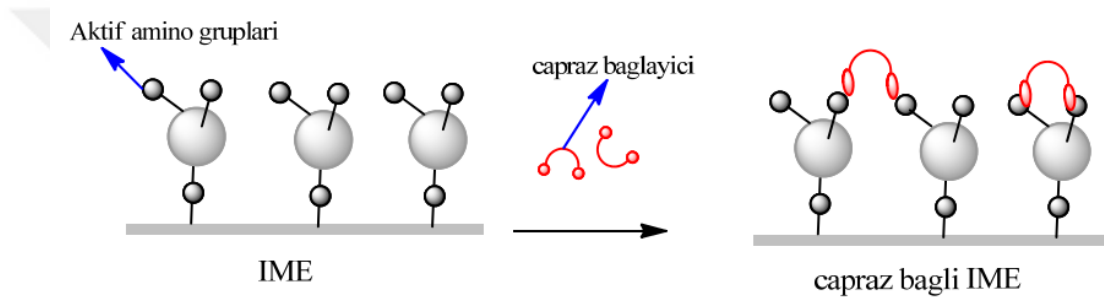
Tablo 2.2 Taşıyıcıya bağlanmanın yarar ve sakıncaları

Yararları	Sakıncaları
Reaktif taşıyıcıya enzim kolay bağlanır ve bağlı olmayan enzim yıkayarak uzaklaştırılabilir.	Enzim immobilizasyon koşullarından etkilenebilir.
Katı taşıyıcıya bağlı katalizör kullanışlıdır (süzme ve santrifüjleme ile ayrılır)	Bağlama aktivite için zorunlu amino asit artıkları üzerinden gerçekleşebilir
Reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılabilir.	Enzimin desteğe bağlanması özel ve pahalı işlemleri gerektirebilir.
Ürünleri kirletmez.	
Taşıyıcının yapısına bağlı olarak yeni spesifiklikler kazanabilir.	
Sürekli sistemlerde kullanılabilir.	
Değişik fiziksel yapılarda (tabaka, partikül, fiber vb.) üretilebilirler.	

Enzim molekülleri harici bir destek maddesi olmadan da kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çarpaz bağlanarak immobilize olabilirler (Şekil 2.13.). Böyle bir immobilizasyon sonucu üç boyutlu çarpaz bağlanmış enzimler oluşmaktadır. Bu yöntem ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çarpaz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gerekli şartların seçimi ve kurulması oldukça zordur. Çarpaz bağlı enzimin aktivitesi reaksiyon süresi ve sıcaklığı, iyonik şiddet, pH, çarpaz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu metodun en önemli avantajı, tek bir basamakta enzimleri immobilize etmek için gluter aldehit gibi iki ya da çok sayıda fonksiyonel gruplar içeren maddelerin kullanılabilmesidir.

Bu metodun dezavantajı ise immobilize enzimin aktifliğini koruyabilmesi için moleküller arası çarpaz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesinin zor olmasıdır. Enzim immobilizasyonunda çarpaz bağlayıcı olarak diazobenzidin, 1,5-diflor-2,4-dinitro benzen, glutaraldehit, triklor-s-triazin, hekzametilendiizosiyanat, 2,4-diizotiyosiyano-tolüen gibi çok fonksiyonlu maddeler kullanılmaktadır.

Çarpaz bağlanma sonucu immobilize enzimlerde büyük ölçüde aktivite kayıpları oluşabilir. Çarpaz bağlı enzimler mekanik olarak kararlı olmadıklarından şimdiye kadar yalnızca immunolojik testlerde kullanılmışlardır.



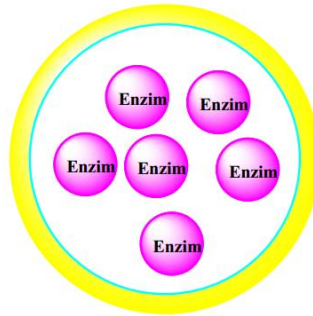
Şekil 2.13. Çarpaz bağlı immobilize enzimler [22]

2.5.2.2. Tutuklama ya da hapsetme yöntemleri

Bu metotta enzimler yarı geçirgen membran, moleküler elek veya polimerik matriks içerisinde hapsedilirler. Enzim önce sulu monomer veya polimer çözeltisi içerisinde çözülür, daha sonra polimer oluşumu veya polimerlerin çarpaz bağlanması ısı, gama radyasyonu veya UV ışınları ile başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilmiş olur. Oluşan polimerik matriks yapısı, substratın matriks içine ve oluşan ürünün dışarı difüzyonuna izin verecek, hacimli enzim molekülünün dışarı difüzyonunu engelleyecek şekilde olmalıdır.

Mikrokapsül ile tutuklama metodu, 1-100 mikron çaplı küçük yarı geçirgen membranlar içinde enzim moleküllerinin hapsedilmesini içerir (Şekil 2.14.). Yarı geçirgen membran, hacimli enzimlerin mikrokapsül dışına difüzyonunu engellerken, küçük moleüllü substrat ve ürünlerin kolayca difüzyonuna imkan sağlar. Enzimlerin

mikrokapsüllemesi için faz ayrımı ve ara yüzey polimerizasyonu olmak üzere basit iki metod vardır. Faz ayrımı metodunda, mikrokapsül ve enzim çözeltisi damlalar şeklinde çöktürücü üzerine eklenir. İkinci metodda ise sulu enzim çözeltisi, organik çözelti içerisinde emülsiyeye edilir. Enzim mikrodamlarının etrafında membran oluşturmak için ortama polimer çözeltisi ilave edilir. Bu şekilde oluşan polimerik membran enzimin etrafını sararak mikrokapsüllemiş olur. En çok kullanılan membranlar naylon, selüloz, polisülfon, poliakrilattır. Mikrokapsülleme ile hapsedme metodunda herhangi bir modifikasyon olmadığı için tutuklanan enzimin aktivitesi serbest enzimin aktivitesine çok yakın olmaktadır. Bu metod ile çok yüksek yüzey/hacim oranına ulaşılabilir [26]. Yüzey/hacim oranının yüksek olması, mikrokapsül içerisinde enzim ile sustrat arasındaki reaksiyonunun hızını önemli ölçüde arttırır. Bu metodun dezavantajları mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek enzim konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulması ve büyük molekül kütleli substrat ve ürünler için sınırlı olmasıdır.

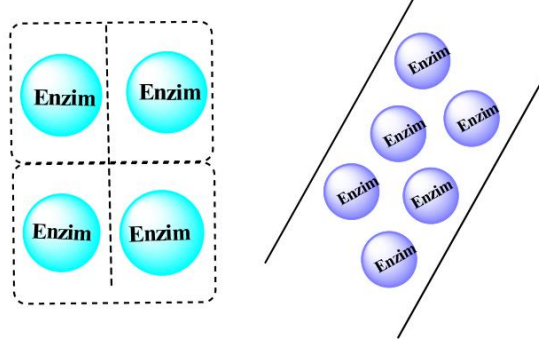


Şekil 2.14. Mikrokapsülleme [22]

Kafes tipi hapsedme metodunda, enzimler reaksiyon ortamında çözünmeyen çarpaz bağlı polimerlerin boşlukları içinde tutulurlar (Şekil 2.15.). Bu metotta da içerisine enzimler konulan monomer veya polimer çözeltilerine gama radyasyonu veya UV ışınları uygulayarak çarpaz bağlı polimer şebekeleri oluşturulur. Oluşan polimer kafes içerisine enzim molekülleri serbestçe girip çıkabilirler.

Bu metodda, enzimlerde kimyasal modifikasyon olmaz ve suda çözünmeyen farklı enzim türevlerinin hazırlanması mümkündür. Enzim türevlerinin jelatinimsi doğası, immobilize bir enzimin hem düzenli hem de düzensiz yüzeyler üzerinde kolayca

depolanmasını sağlar. En yaygın kullanılan polimerler matriksler Ca-aljinat, poliakrilamit, agar ve kollojendir. Molekül kütlesi 15.000'den fazla olan enzimler bu amaçla kullanılır. Substrat da büyük moleküllü olmamalıdır.



Şekil 2.15. Matrikste tutuklama [22]

Bu metodun sağladığı avantajlar şunlardır.

- Polimerlerin çarpaz bağlanmasında kullanılan gama radyasyonu veya UV ışınları enzim yapısını ve aktivitesini kimyasal prosesler kadar etkilemezler.
- Kullanılan çarpaz bağlayıcı ve monomer konsantrasyonları değiştirilerek farklı boyutlarda gözenekli polimerik kafesler üretilebilir.
- Polimerleşme genellikle kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilir.

Bu metodun dezavantajları ise çarpaz bağlı polimer kafeslerden enzimlerin çıkması, sadece küçük moleküllü substratların difüzyonu için uygun olması ve büyük moleküllü substratların difüzyonu zor olduğu için çok düşük aktivite göstermesidir. Farklı immobilizasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.3.'de ve immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması Tablo 2.4.'de verilmiştir.

2.6. Manyetik Partiküllere Enzim İmmobilizasyonu

Son yıllarda biyoteknolojide MNP kullanımı oldukça popülerdir. İmmobilize enzim desteği olarak MNP'i kullanmak bazı avantajlar sunmaktadır. Bunlar;

- Daha fazla miktarda enzimin bağlanmasına izin veren yüksek spesifik alan,
- Daha düşük kütle transfer direnci ve daha az kirlenme,

- Bir manyetik alan uygulayarak reaksiyon karışımından immobilize enzimin seçimli ayrılmasıdır.

Tablo 2.3. İmmobilizasyon metotlarının karşılaştırılması

Metot	Avantaj	Dezavantaj
Adsorpsiyon	Enzim hiçbir değişikliğe uğramaz. Taşıyıcının yenilenmesi mümkündür. Ucuz ve basit bir tekniktir.	İyonik şiddetin değişmesi desorpsiyona neden olur. Enzim microbial, proteolitik ataklara maruz kalır.
Tutuklama	Enzimde hiçbir değişiklik olmaz. Enzim mikrobiyal veya proteolitik etkilerden etkilenmez.	Difüzyon substrat dönüşümünü etkiler. Makromoleküler substratlar için etkili değildir. Sürekli enzim kaybedilmesinde gözenek büyüklüğünün etkisi vardır. Enzim genellikle inaktive olur.
Kovalent Bağlama	pH, zayıf kuvvetler tarafından ve substrat konsantrasyonundan etkilenmez.	Aktif bölge kolayca etkilenebilir ve maliyeti yüksektir.
Çarpaz Bağlama	Enzim sıkı bir şekilde bağlanır bu yüzden kaybolmaz.	Hazırlama esnasında enzim aktivite kaybeder. Makromoleküler substratlar için uygun değildir. Taşıyıcının yeniden kullanılabilirliği yoktur.

Tablo 2.4. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması [36]

Karakteristik Özellik	Karşı Bağlama	Fiziksel Adsorpsiyon	İyonik Bağlanma	Şelat veya Metal Bağlama	Kovalent Bağlanma	Tutuklama
Hazırlama	Orta	Kolay	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Bağlanma Gücü	Güçlü	Zayıf	Orta	Orta	Güçlü	Orta
Enzim Aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	İmkansız	Mümkün	Mümkün	Mümkün	Nadiren	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Orta	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet

Korunma	Mümkün	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet
---------	--------	-------	-------	-------	-------	------

Tablo 2.5.'de MNP'lere immobilize edilmiş çeşitli enzimler ve biyoteknolojideki uygulamalarına örnekler verilmiştir [38].

Tablo 2.5. Manyetik nanopartiküllere immobilize edilmiş enzimler ve biyoteknolojik uygulamaları [38]

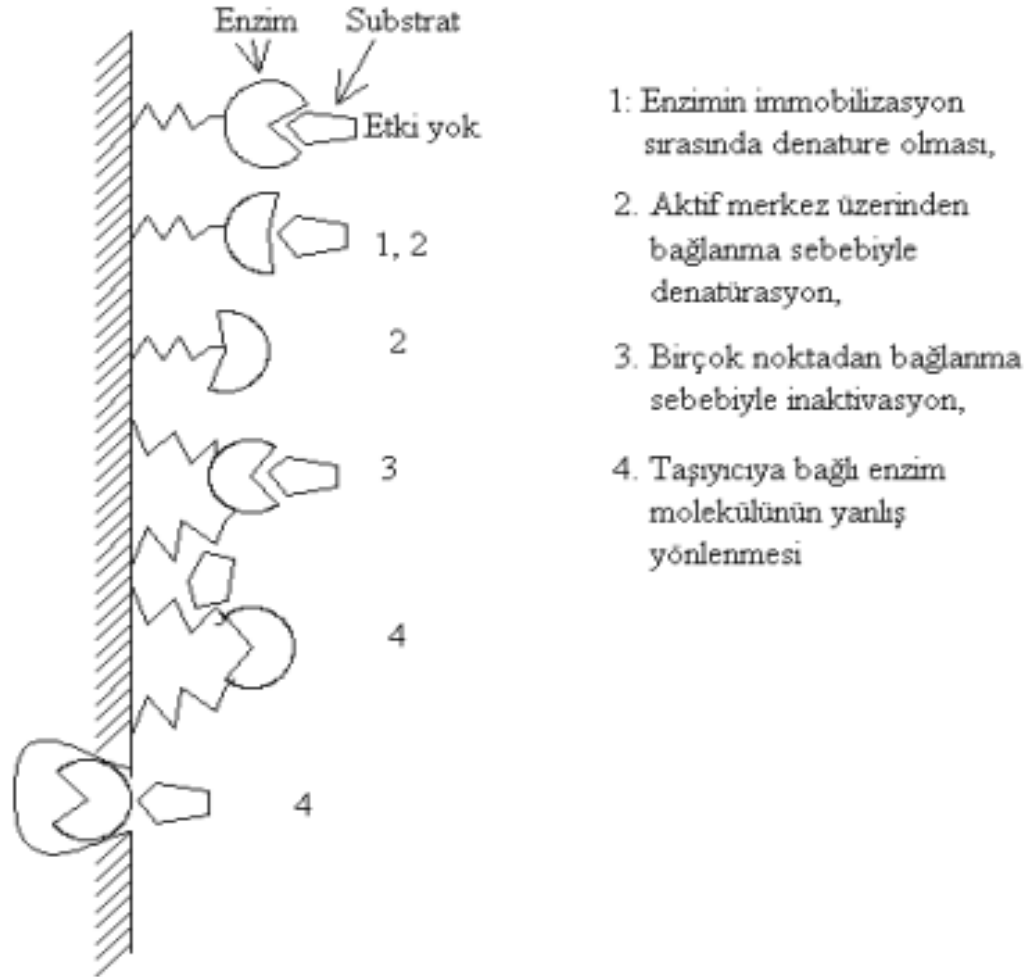
Enzim	Nanopartikül	Uygulamaları
Kolesterol osidaz	Fe ₃ O ₄ NP'leri	Serumdaki total kolesterol analizi
Haloalkan dehalogenaz	Silikon kaplı demir oksit NP'leri	Dehalogenaz sekanslarını içeren füzyon proteinlerinin üretimi
Lakkaz	Kitosan MNP'leri	Çevresel kirliliklerin biyosağaltımı
Keratinaz	Fe ₃ O ₄ NP'leri	Keratin sentezi
α -amilaz	Selüloz kaplı MNP'leri	Nişastanın parçalanması
β -Galaktosidaz	ConA kaplanmış ZnO NP'leri	Laktoz hidrolizi
Lipaz	Fe ₃ O ₄ NP'leri	pNPP hidrolizi

2.7. İmmobilizasyonun Enzim Aktivitesine ve Kararlılığına Etkisi

İmmobilizasyon işleminden sonra teorik olarak enzimin spesifik aktivitesinin düşmesi gerekir. Ancak, literatürde enzim aktivitesinin değişmediği veya arttığı örneklerle de karşılaşmaktadır. Enzim aktivitesinin düşmesindeki başlıca nedenler Şekil 2.16.'da gösterilmiştir.

Enzim immobilizasyonunun verimi immobilize enzimin aktivitesinin göstergesi değildir. İmmobilize enzimin aktivitesi ancak “aktif merkez tayini” ile bulunabilir. Endüstriyel üretimde kullanılacak immobilize enzim için en önemli kriterlerden biri de enzimin kararlılığıdır. İmmobilize enzimin kararlılığının göstergesi, çalışma şartlarında enzimin aktivitesinin uzun süre korunmasıdır. Çalışma süresince enzimin aktivite kaybı mikrobiyal yıkım, sıcaklığın etkisi, pH veya kimyasal etkiler gibi değişik sebeplere bağlıdır. Ayrıca destek materyalinin parçalanması veya enzimin

matriksten uzaklaşması da aktivite kayıplarına yol açar. Bunlardan başka substrat çözeltisinin içerdiği kirliliklerin matriks gözeneklerini tıkaması da immobilize enzimi etkisiz kılar [39].

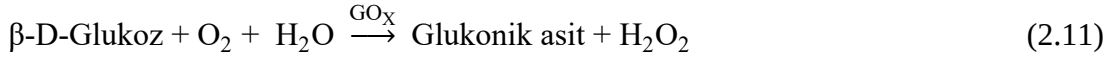


Şekil 2.16. İmmobilizasyonun enzim aktivitesine etkisi [38]

2.8. Glukoz Oksidaz ve İmmobilizasyonu

GOx (EC 1.1.3.4, β -D-glukoz: oksijen oksidoredüktaz) enzimi, böcek ve mantar gibi doğal organizmalarda bulunan dimerik flavoenzim katalizleyicisidir. GOx biyoteknolojik uygulamalar için *Aspergillus* ve *Penicilium* mantarlarından ekstrakte edilir. *Aspergillus niger* (GOx-an) göre *Penicilium amagasakiense* (GOx-pa) glukozu daha yüksek verimle katalizler. GOx-pa ve GOx-an her ikisi de kırılkan yapıya sahiptirler ve operasyonel yaşam ömürleri kısadır.

GOx, β -D-glukozun glukonik asite oksidasyon reaksiyonunu katalizler. Bu reaksiyon sırasında kofaktör flavin adenin dinükleotid (FAD) iki elektron alır ve bu esnada oksijen molekülünü hidrojen perokside indirger.



Bu dönüşüm, gıda maddelerindeki glukoz ile oksijeni glukonik asite çevirmede kullanılır. GOx, monomer başına kovalent bağlı olmayan sadece bir FAD ile birlikte küresel enzim dimeridir. Denatüre edici şartlarda enzimden ayrılabilir. GOx enzimi 40-50 °C optimum sıcaklık ve 4,5 – 6,0 optimum pH aralığında aktiftir.

Glukozun oksidasyonu sonucunda oluşan H_2O_2 bir diğer üründür. GOx, ekmek yapımında kullanılmakta ve oluşan hidrojen peroksit, hamurun görünüş özelliklerini iyileştirmekte, kolay işlenebilir hale getirmekte ve kararlılığını arttırmaktadır. Ayrıca balda bulunan yüksek orandaki GOx, balın yüzeyindeki O_2 gazını H_2O_2 'ye indirgeyerek balın yüzeyinde antimikrobiyal bir tabaka oluşturmaktadır. GOx, farklı meyve suları, gazlı içecekler, salata sosları ve mayonez içerisinde çözünmüş halde bulunan O_2 'yi kendisine bağlayarak bu ürünlerdeki mikrobiyal faaliyetleri engelleyerek tadlarının korunmasını sağlar. GOx, tıbbi ve endüstriyel uygulamalar için biyosensörlerin geliştirilmesinde de kullanılır, örneğin kan ve meyve sularındaki glukoz tayin edilir. Ayrıca biyoyakıt hücrelerinde anot olarak da kullanılmaktadır [40].

BÖLÜM 3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal ve Kimyasallar

Glukoz oksidaz (*Aspergillus niger*, GOx, E.C. 1.1.3.4, 173 U/mg) Sigma Aldrich'den alınmıştır. D(+)-glukoz mono-hidrat, 2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoik asit (98.0%), potasyum sodyum tartarat tetrahidrat (99.0–102.0%), sodyum sülfid (98.0%), demir (III) klorür, heksahidrat (99.0–102.0%), kobalt (II) klorür heksahidrat ve tannik asit (TA) Merck'den temin edilmiştir. Tüm reaktifler Milipore Milli-Qwater saflaştırma sisteminden elde edilen çift damıtılmış su (DDW) ile hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kobalt ferrit sentezi

CoFe_2O_4 MNP'leri (CFO MNP'leri) hidrotermal yöntem ile hazırlanmıştır. Bu yöntemle göre, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tuzları çözeltide Fe^{3+} 'nin Co^{2+} 'ye mol oranı 2:1 olacak şekilde DDW ile çözölmüştür. Sonra, 2,5 M KOH'ın 30 mL'si yavaş yavaş çözeltinin içine eklenirken karıştırılmış ve ekleme tamamlandıktan sonra karışma 30 dakika boyunca devam ettirilmiştir. Karışım sonra Teflon-astarlı otoklava aktarılmış ve reaksiyon 120 °C'de 8 saat sürdürölmüştür. Karışım ortam sıcaklığında soğutulduktan sonra, CFO MNP'ler manyetik olarak ortamdaki ayrılıp, DDW ile 5 kez ve bir kere de etanol ile yıkanmıştır. Sentezlenen MNP'ler vakumlu fırında 60 °C'de bir gece kurutulmuştur [20].

3.2.2. Kobalt ferritin tannik asit ile modifikasyonu

Bir gram CFO, monodispers çözelti elde etmek için 20 mL DDW'de ultrasonikatör ile 40 °C'de karıştırılmıştır. Karıştırma sırasında TA çözeltisi (0,5 g/20 mL DDW) eklenmiştir. Bağlanma reaksiyonu 40 °C'de 1 saat devam ettirilmiştir. Oluşan CFO-TA, bir neodyum-demir-bor mıknatıs ile toplanmıştır. CFO-TA 5 kez DDW ile durulanmış ve ardından bir kez mutlak etanol ile yıkanmış ve daha sonra gece boyunca bir vakum etüvünde 60 °C'de kurutulmuştur.

3.2.3. Tannik asit ile modifiye edilmiş kobalt ferrite glukoz oksidaz immobilizasyonu

Beş miligram liyofilize GOx, 2 mL fosfat tampon çözeltisi (FTÇ, 0,1 M, pH 6,5) içinde çözülmüştür. GOx çözeltisine 0,4 g CFO-TA eklenmiş ve karışım FTÇ ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. İmmobilizasyon reaksiyonu, 4 °C'de 3 saat boyunca 200 rpm'de çalkalanarak sürdürülmüştür. Daha sonra CFO-TA-GOx manyetik olarak ayrılmış ve bağlanmamış GOx'i uzaklaştırmak için üç kez FTÇ (0,1 M, pH 6,5) ile yıkanmıştır. CFO-TA-GOx elde edilmiş ve kalıntı çözeltisi, protein konsantrasyonunu belirlemek için bekletilmiştir [20].

3.3. Hazırlanan Malzemelerin Karakterizasyonu

Sentezlenmiş NP'lerin kimyasal bileşimi ve kristal yapısı 10-90° aralığında 0,013°'lik artış ile 2θ açısında ki CuK α radyasyonu ($\lambda = 0,154$ nm) ile PANalytical Empyrean X-ray diffraktometre (XRD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Ürünlerin yüzey morfolojisinin karakterizasyonu FEI Nova Nanosem 450 taramalı elektron mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir. UV-vis absorpsiyonu bir spektrofotometre (UV-2600, SHIMADZU) kullanılarak ölçülmüştür. Numunelerin manyetik özellikleri el yapımı bir titreşen örnek magnetometresi (VSM) ile ölçülmüştür. Partiküllerin kimyasal bileşimi Perkin Elmer FTIR Spektrofotometre (Spectrum Two) kullanılarak oda sıcaklığında 400–4000 cm⁻¹ aralığında incelenmiştir. Zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zeta Sizer (Nano-ZS) ile 30 °C de gerçekleştirilmiştir. Termogravimetrik

analiz (TGA) Setaram termogravimetrik analizör (Setsys Evolution, France) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz oda sıcaklığından 1000 °C'ye kadar olan sıcaklık aralığında 10°C/dakika ısıtma hızı ve 20 mL/dakika gaz besleme hızı ile argon atmosferi altında gerçekleştirilmiştir [20].

3.4. Serbest ve İmmobilize Enzim İçin Aktivite Çalışmaları

Serbest ve immobilize GOx'in aktivitesi DNSA yöntemine göre kromojenik substrat olarak 2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoik asit kullanılarak tayin edilmiştir. Aktivite glukozun konsantrasyon değişimine göre belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyondan sonra, DNSA GOx tarafından katalizlenmeden ortamda kalan glukoz ile indirgenmiştir. İndirgenmeden sonra oluşan sarı renkli 3-amino-5-nitrosalisilik asit bir spektrofotometre kullanılarak taranmıştır. 0,1 M FTÇ'nin 1400 µL'si glukoz çözeltisinin 300 µL'sine (0,02 M glukoz pH 6,5 de FTÇ) eklenmiştir. Sonra enzim çözeltisinin 300 µL'si (50 µg/1 mL pH 6,5 de FTÇ) karışıma eklenmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında karıştırılırken 10 dakikada gerçekleştirilmiştir. 100 °C'de 10 dakika ısıtmayı takiben renk geliştirmek için DNSA çözeltisinin 2 mL'si eklenmiştir. Bu adımdan sonra, karışım oda sıcaklığına soğutulmuş, 0,1 M FTÇ'nin 7 ml'si eklenmiş ve 546 nm'de absorbans ölçülmüştür [20].

3.4.1. pH etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH ın etkisi, 25 °C de 5'den 9'a kadar değişen farklı pH'larda tampon çözeltisinde serbest ve immobilize enzimin aktifliği ölçülerek değerlendirilmiştir. pH 5,5 için 0,1 M asetat tampon ve pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 için ise 0,1 M FTÇ kullanılmıştır [20].

3.4.2. Sıcaklık etkisi

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi, serbest ve immobilize enzimin 25 ila 55 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda optimum pH değerinde ölçülmesiyle belirlenirken,

glukoz konsantrasyonu her test için $10 K_M$ 'de sabit tutularak enzimatik reaksiyon, aktivite testi sırasında maksimum hızda gerçekleşmiştir [20].

3.4.3. Depolama kararlılığı

İmmobilize ve serbest GOx'in depolama kararlılığı 0,1 M FTÇ (pH 6,5) de 4°C de depolanan GOx örneklerinin kalan aktiviteleri ölçülerek belirlenmiştir. Örnekler 35 gün saklanmış ve aktivite ölçmek için 7 gün aralıklarla kullanılmıştır [20].

3.4.4. Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilize GOx'in tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için, immobilize GOx'in aktivitesi ardışık olarak ölçülmüştür. Tekrar kullanılabilirlik testi oda sıcaklığında 0,1 M FTÇ (pH 6,5) ile 8 kere tekrarlanan bir döngüyle gerçekleştirilmiştir. Her ardışık döngü için, CFO-TA-GOx reaksiyon ortamından manyetik ayrıştırıcı kullanılarak çıkarılmış ve tekrar test için 3-4 kere 0,1 M FTÇ ile durulanmıştır [20].

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

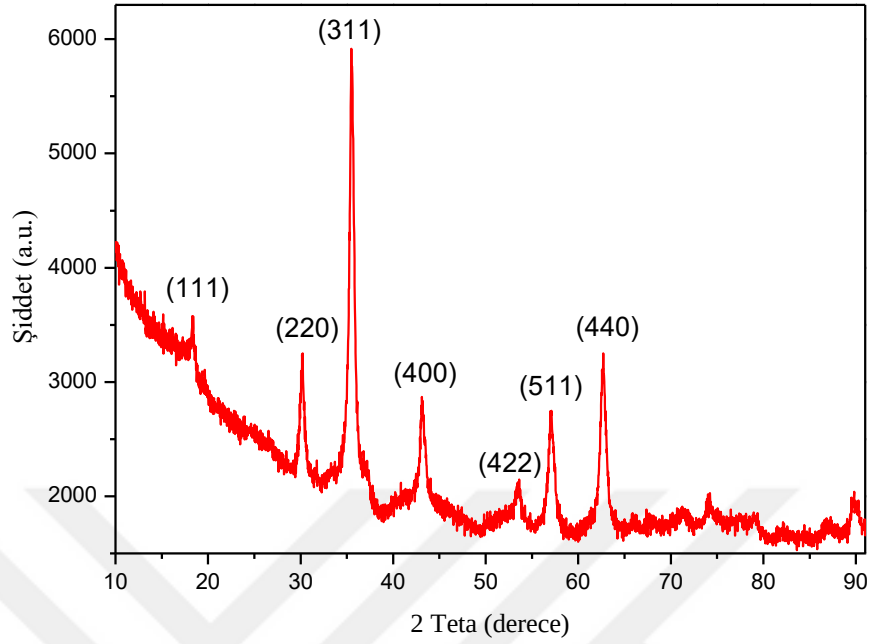
4.1. CFO'nun TA ile Yüzey Modifikasyonu ve CFO-TA Üzerine GOx İmmobilizasyonu

CFO, TA'nın fenolik hidroksil grupları ve CFO yüzeyindeki Fe^{3+} arasında oluşan koordinasyon bağları aracılığıyla modifiye edilmiştir [41]. Bağlanmayan tannik asit 4-5 kere DDW ile yıkanarak kolayca uzaklaştırılmıştır. Bradford protein analiz metodu kullanılarak, bağlanmayan enzim ölçülmüş ve 1 g CFO-TA başına 12,5 mg GOx yüklemesi elde edilmiş, yani GOx in %99,8'i CFO-TA üzerine bağlanmıştır. Bu sonucun tek makul açıklaması, fenolik hidroksil grupları üzerindeki hidrojen atomları ile peptid bağlarının karbonil oksijen atomları arasında meydana gelen H bağlarıdır [42,43].

4.2. CFO, CFO-TA ve CFO-TA-GOx'in Karakterizasyonu

4.2.1. X ışınlarının difraksiyon analizi

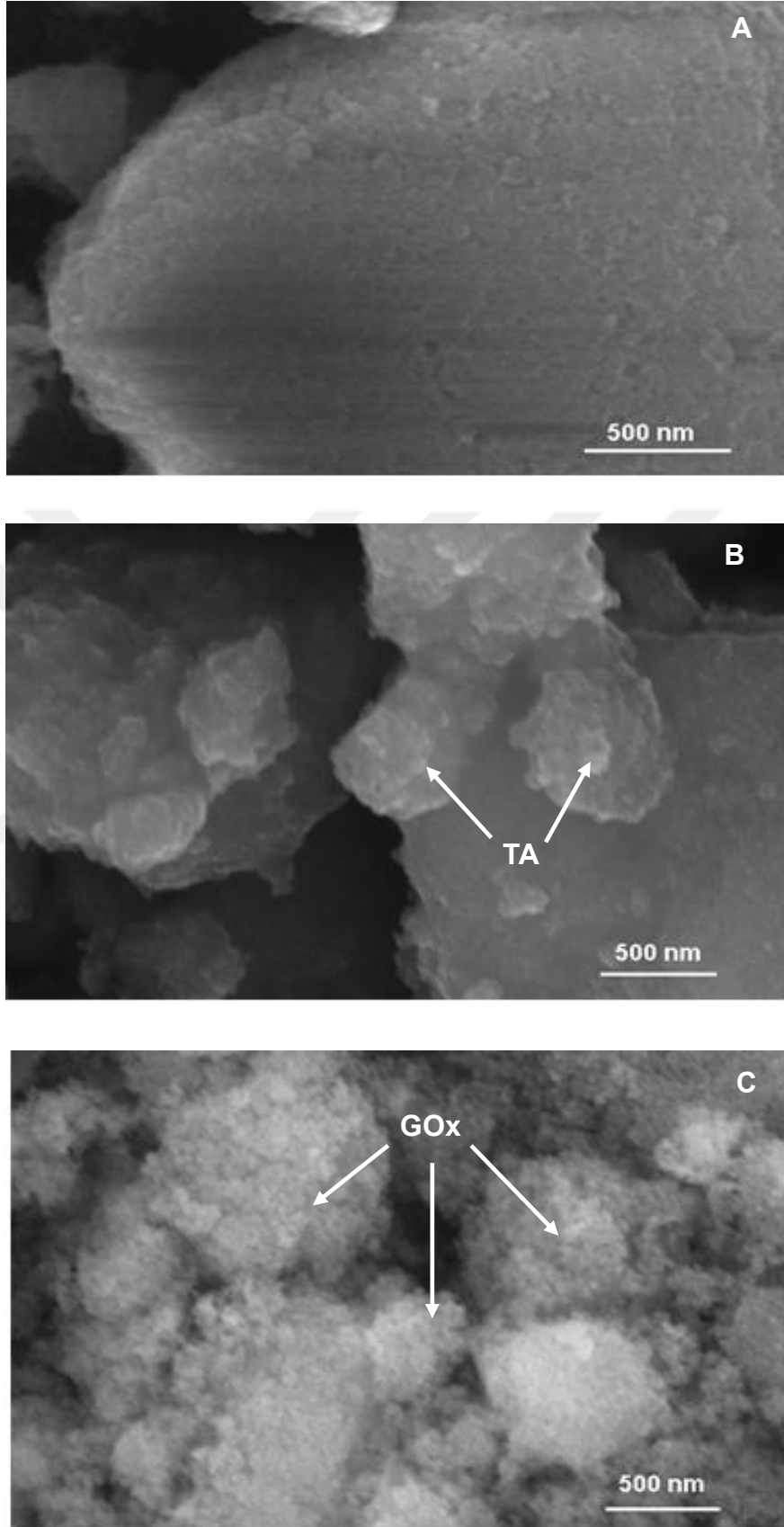
Numunelerin yapısal karakterizasyonu çalışılmış ve Şekil 4.1.'de gösterilen XRD paterni $Fd3m$ uzay grubuna ait $CoFe_2O_4$ 'ün yüzey merkezli kübik ters spinel yapısını doğrulamaktadır (ICDD No: 98-002-7899). Elde edilen XRD paterni Li ve ark. tarafından belgelenen patern ile iyi bir uyum içerisindedir [44]. $CoFe_2O_4$ 'ün $2\theta = 18,19^\circ, 30,11^\circ, 35,45^\circ, 43,10^\circ, 53,64^\circ, 56,96^\circ$ ve $62,57^\circ$ difraksiyon pikleri sırasıyla (1 1 1), (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1), ve (4 4 0) difraksiyon düzlemlerine karşılık gelmektedir [45]. $\alpha-Fe_2O_3$ ve $\mu-Fe_2O_3$ veya başka safsızlıklara ilişkin ilave bir pik gözlenmemiştir. Scherrer denklemi kullanılarak $CoFe_2O_4$ 'ün kristal boyutu hesaplanmış ve 11,64 nm bulunmuştur. XRD modelinde görülen yoğun pikler CFO'nun artan kristalleşmesinin bir göstergesidir [46].



Şekil 4.1. CoFe_2O_4 'ün XRD paterni

4.2.2. Mikroyapısal analiz

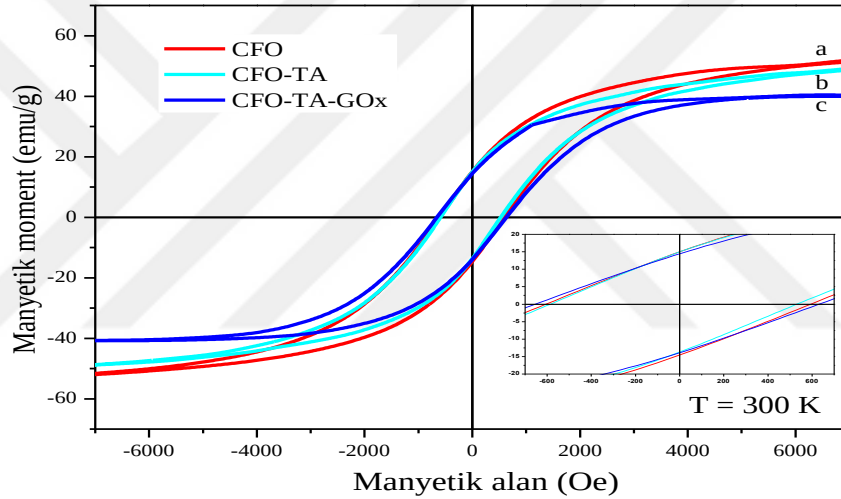
Örneklerin morfolojik yapısı FESEM ile incelenmiştir. CFO, CFO-TA ve CFO-TA-GO_x'ün FESEM görüntüleri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. CFO-TA, CFO ile kıyaslandığında, TA ile modifikasyondan kaynaklanan yüksek agregatlar içeren daha pürüzlü bir yüzeye sahiptir. Üzüm kümesine benzer partiküllerden oluşan CFO-TA-GO_x, GO_x'in immobilizasyonunu göstermektedir. FESEM görüntülerinin her birinde görünen aglomerasyonlar, NP'ler arasındaki manyetik etkileşimlerin bir sonucu olarak oluşurlar. NP'lerin yüzey bileşimleri enerji dağılımlı spektroskopisi (EDS) ile belirlenmiştir. EDS (spektrum verilmemiştir) sonuçları Co, Fe ve O'nun varlığını göstermiştir. CFO-TA'nın ve CFO-TA-GO_x'in C içerikleri sırasıyla %43,45 ve 47,39 olarak bulunmuştur. CFO'da C miktarı tespit edilemezken, CFO-TA ve CFO-TA-GO_x'in artan C miktarları TA ile modifikasyonu ve GO_x immobilizasyonunu doğrulamıştır [20].



Şekil 4.2. A) CFO, B) CFO-TA ve C) CFO-TA-GOx'un FESEM görüntüleri

4.2.3. Manyetik ölçümler

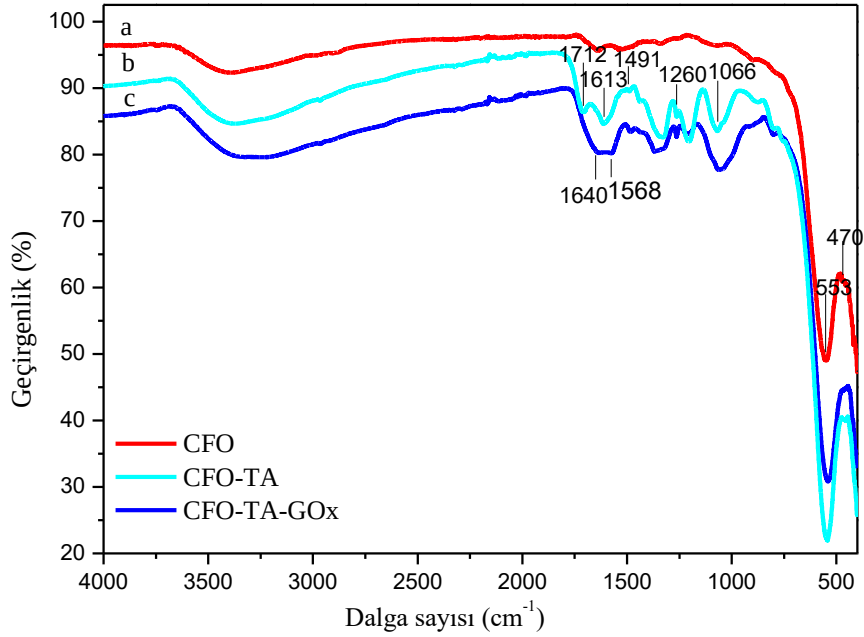
CFO, CFO-TA ve CFO-TA-GOx NP'lerinin manyetik özellikleri 300 K'da +8.000 ile -8.000 Oe aralığındaki dış manyetik alan uygulanarak belirlenmiştir. Şekil 4.3. NP'lerin histerezis eğrilerini göstermektedir. CFO, CFO-TA ve CFO-TA-GOx için doygunluk manyetizasyonu sırasıyla 51,47 emu/g, 47,67 emu/g ve 39,97 emu/g'dır. Bu fark, büyük miktarda TA ve GOx'in CFO MNP'lere bağlandığını göstermiştir. CFO, CFO-TA ve CFO-TA-GOx için koersivite değerleri sırasıyla 576,5 Oe, 532,4 Oe ve 617,2 Oe olarak bulunmuştur. Koersivite değerlerine göre MNP'ler ferromanyetik materyal özellikleri göstermiştir [20].



Şekil 4.3. (a) CFO, (b) CFO-TA ve (c) CFO-TA-GOx'in manyetizasyon eğrileri

4.2.4. FTIR spektroskopisi

MNP'lerin yüzeyinde TA'nın modifikasyon mekanizmasını ve CFO-TA üzerine GOx'in immobilizasyonunu anlamak için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Örneklerin 400–4000 cm^{-1} aralığında ölçülen FTIR spektrumları Şekil 4.4.'de gösterilmiştir. CFO spectrumunda 553 cm^{-1} 'deki pik spinel yapıda tetrahedral konumundaki ($\text{Fe}^{3+}-\text{O}^{2-}$) gerilme titreşimini gösterirken, 470 cm^{-1} 'deki bant spinel yapıdaki oktahedral bölgedeki ($\text{Co}^{2+}-\text{O}^{2-}$) gerilme titreşimine atfedilir ki bu da ters



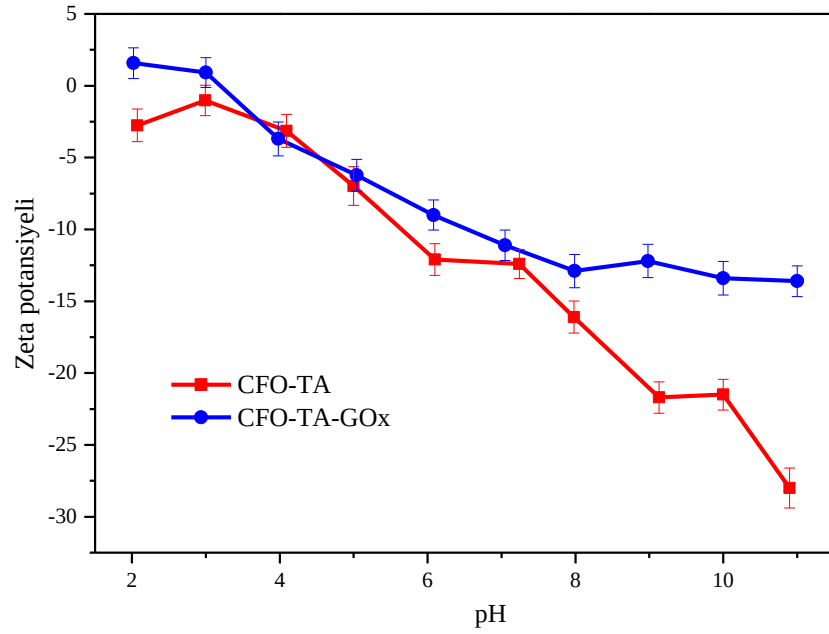
Şekil 4.4. (a) CFO, (b) CFO-TA ve (c) CFO-TA-GOx'in FTIR-ATR spektrumları

spinal kobalt ferrit yapılarının oluşumunun kanıtıdır [47, 48]. Üç örneğin her birinde 3600 cm^{-1} ve 3000 cm^{-1} aralığında görülen geniş pik büyük ölçüde fiziksel olarak adsorplanan su ile ilgilidir. Buna ek olarak, CFO-TA ve CFO-TA-GOx spektrumlarında polifenol hidroksil parçaları bu aralıktaki pike katkıda bulunurlar. CFO-TA'nın spektrumundaki 1712 cm^{-1} , 1613 cm^{-1} ve 1491 cm^{-1} 'deki absorpsiyon pikleri, sırasıyla, C = O gerilme, aromatik C - O gerilmesi ve aromatik C = C gerilme titreşimlerine karşılık gelir. 1330 cm^{-1} 'deki -OH eğilme düzleminden kaynaklanan, 1260 cm^{-1} 'deki Ph - O gerilmesine atfedilen ve 1066 cm^{-1} 'deki aromatik C - H deformasyon titreşimleriyle ilişkili diğer karakteristik pikler de gözlenmiştir [49]. Bu titreşim bantları göstermiştir ki, CFO TA ile başarılı bir şekilde modifiye edilmiştir. CFO-TA-GOx spektrumunda, 1640 cm^{-1} ve 1568 cm^{-1} de yer alan pikler, sırasıyla peptitin C = O gerdirme titreşimi ile ilişkili amid I bandına ve proteinin yapısındaki N - H eğilme ve C - N gerilmesinden kaynaklanan amid II bandına atfedilmiştir. Amid I bandı, GOx'in CFO-TA'ya immobilizasyonunu ve immobilizasyon işleminden sonra GOx'in ikincil yapısının ve biyoaktivitesinin korunmasını doğrulamıştır [50]. Amid I bandı ile üst üste binen C = O gerilme titreşiminin 1712 cm^{-1} 'deki önemli ölçüdeki kayması, açıkça, -C = O

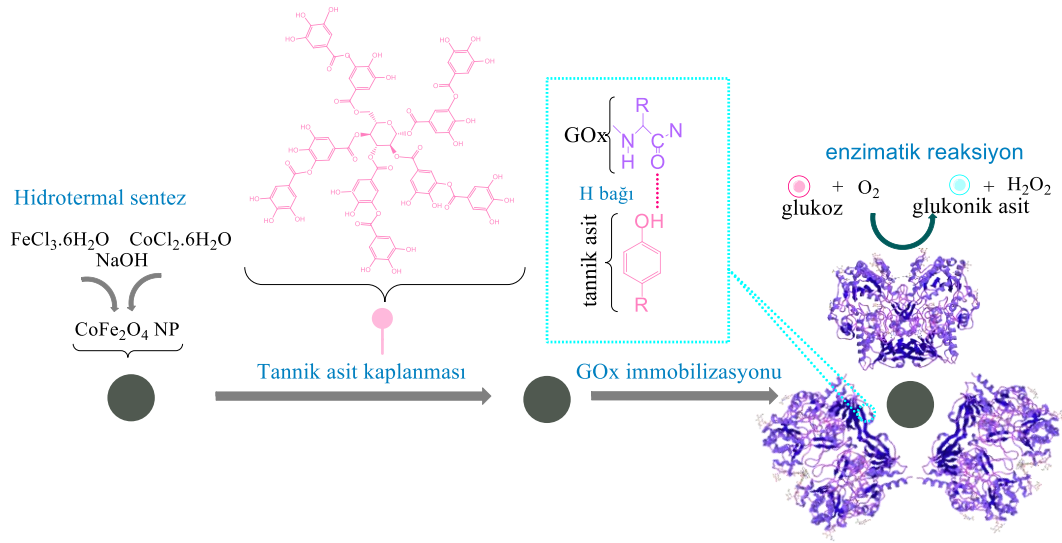
ve -OH fonksiyonel grupları arasındaki hidrojen bağlarının oluşmasından kaynaklanmaktadır [51].

4.2.5. Zeta potansiyeli

CFO-TA ve CFO-TA-GOx'un sulu dispersiyonlarının zeta potansiyelleri, Şekil 4.5.'de gösterildiği gibi 2,0 ila 11,0 arasında değişik pH değerlerinde ölçülmüştür. Bir enzimin bir NP üzerine immobilizasyonu partikülün yüzey yüküne bağlı olduğundan, enzim ve MNP'lerin izoelektrik noktasının (IEN) belirlenmesi, hem immobilizasyon koşullarının belirlenmesi hem de immobilizasyon mekanizmasının aydınlatılması açısından çok önemlidir. CFO-TA'nın zeta potansiyel değerleri, fenolik -OH kısımlarının iyonlaşması nedeniyle tüm ölçüm aralığında negatif değerler olarak bulunmuştur [52]. CFO-TA-GOx durumunda, partiküllerin zeta potansiyeli, GOx'in pI'sının (pI: 4,2) altındaki pH değerlerinde pozitif değerlere artmıştır; bu, GOx'in negatif yüklü CFO-TA'yı nötralize ettiğini göstermektedir. pH 4.0-7.0 aralığında, zeta potansiyeli hafifçe artmış ve CFO-TA'ya kıyasla daha pozitif yük kazanarak pH 7'nin üzerinde dalgalanmıştır. Zira bu pH aralığında TA'nın fenolik hidroksil gruplarının hidrojen atomları iyonizasyon yerine hidrojen bağlarına katılmıştır. Ayrıca, CFO-TA'nın TA ile karşılaştırıldığında daha az negatif yüklü GOx ile kaplanması zeta potansiyelindeki artışa katkıda bulunabilir. Bu nedenle, CFO-TA-GOx, CFO-TA'dan daha az negatif olarak yüklenmiştir. İmmobilizasyon ortamında (pH 6,5, 0,1 M FTÇ), CFO-TA'nın yüzeyi negatif olarak yüklenir ve benzer şekilde, aynı pH'da, GOx, pH pI'nin üzerinde olduğu için negatif olarak yüklenir. Aynı yüklü yüzeyler arasındaki elektrostatik itme, enzim immobilizasyonu üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Bu nedenle, GOx'in immobilizasyonu elektrostatik etkileşimlerle açıklanamaz. Bunun makul nedeni, [42] Şekil 4.6.'da gösterildiği gibi GOx immobilizasyonu sırasında GOx'in peptit bağının karbonik oksijeni ile CFO-TA'nın hidrojen atomları arasında hidrojen bağlarının oluşmasıdır. TA ayrışması nedeniyle, CFO-TA hem hidrojen bağ vericisi hem de negatif yüklü partikül olabilir. Ayrıca zayıf van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler de bağlanmayı güçlendirebilir [53].



Şekil 4.5. CFO-TA ve CFO-TA-GOx'in zeta potansiyel eğrileri

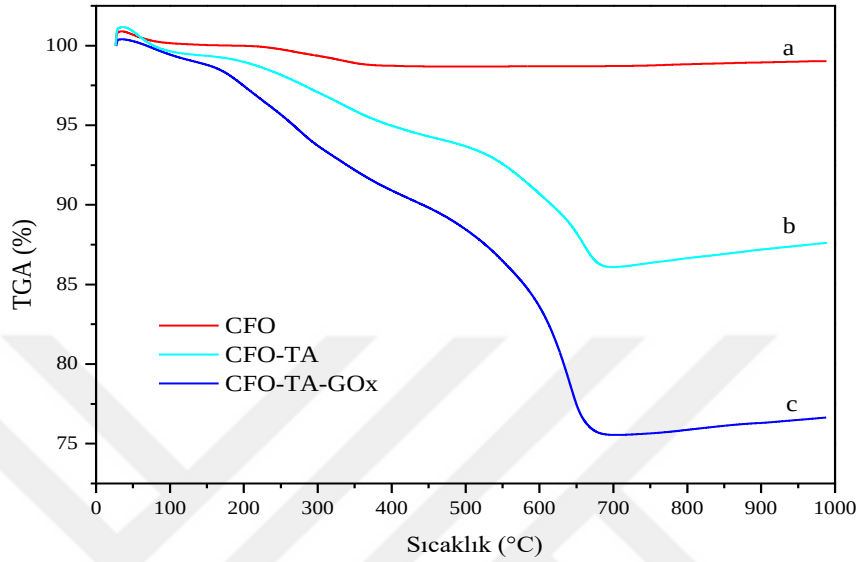


Şekil 4.6. CFO üzerine GOx immobilizasyonu ve GOx'un enzimatik aktivitesinin şematik açıklaması.

4.2.6. TGA analizleri

CFO, CFO-TA ve CFO-TA-GOx MNP'lerin termal stabiliteleri TGA kullanılarak araştırılmıştır. Şekil 4.7.'de gösterildiği gibi, CFO'nun kütle kaybı yaklaşık %1,3'dür,

bu da sabit bir kütleye ulaşana kadar adsorbe edilen suyun buharlaşmasıyla ilişkilidir. CFO'nun TGA eğrisinde fiziksel olarak adsorplanmış suya ve koordinasyon suyuna karşılık gelen belli-belirsiz iki kütle kaybı aşaması vardır. CFO-TA ve CFO-TA-GOx



Şekil 4.7. 25-1000 ° C sıcaklık aralığında (a) CFO, (b) CFO-TA ve (c) CFO-TA-GOx'un TGA eğrileri.

durumunda, her iki numunenin TGA eğrisinde de 3 kütle kaybı aşaması gözlenmiştir. İlk aşamada, oda sıcaklığından 180°C'ye kadar çıkan bölgede meydana gelen kütle kaybı CFO-TA ve CFO-TA-GOx için sırasıyla %0,7 ve %1,3'dür. Bu sıcaklık aralığında gözlenen kütle kaybı, büyük ölçüde hem fiziksel olarak adsorbe edilen suyun, hem de partikül boşluklarında ve hidrofilik tannik asit ve GOx'un hidrofilik bölgelerine bağlanan suyun serbest kalmasından kaynaklanmaktadır. Su salıverme aşamasında, modifikasyon ve immobilizasyon ile elde edilen örneklerin her ikisinin de artan hidrofilisitesi, daha fazla su adsorpsiyonuna yol açmakta, dolayısıyla daha fazla kütle kaybı gözlenmiştir [54]. 180–480 °C geniş bir sıcaklık aralığında (ikinci aşama), CFO-TA ve CFO-TA-GOx'in önemli ölçüde ağırlık kaybı meydana gelmiş ve yaklaşık olarak sırasıyla %5,4 ve %9,7 olarak bulunmuştur. Bu durum TA ve GOx'in kısmi bozulması ile açıklanabilir. Bu aşamada, gallik asit birimlerinden oluşan tannik asitin dış tabakası, pyrogallol (1,2,3-benzen triol) ve karbon dioksit bırakarak bozulmaya uğrar. Termal bozunmanın üçüncü aşamasında (480-680 °C), kalan iç tabakanın ve tannik asitin çekirdek glukoz halkasının 1,2-benzen diol ve

karbon dioksit gibi aromatik bileşiklere ayrışmasından dolayı önemli miktarda kütle kaybı gözlenmiştir [55]. Ayrıca GOx bileşimi bu aşamanın ağırlık kaybına katkıda bulunmuştur. Üçüncü aşama sonunda, CFO-TA ve CFO-TA-GOx için geri kalan kütlelerin yüzdeleri sırasıyla %86,1 ve %75,6'dır. CFO-TA ve CFO-TA-GOx'in tamamen bozunma sıcaklıklarında, kütle kaybı yüzdeleri, TA modifikasyonu ve GOx immobilizasyonunun önemli ölçüde gerçekleştirildiğini göstermiştir. CFO-TA ve CFO-TA-GOx örneklerinde azalan CFO içeriği manyetik özellikleri etkilemektedir. TGA sonuçları VSM eğrileri ile iyi korelasyon göstermiştir.

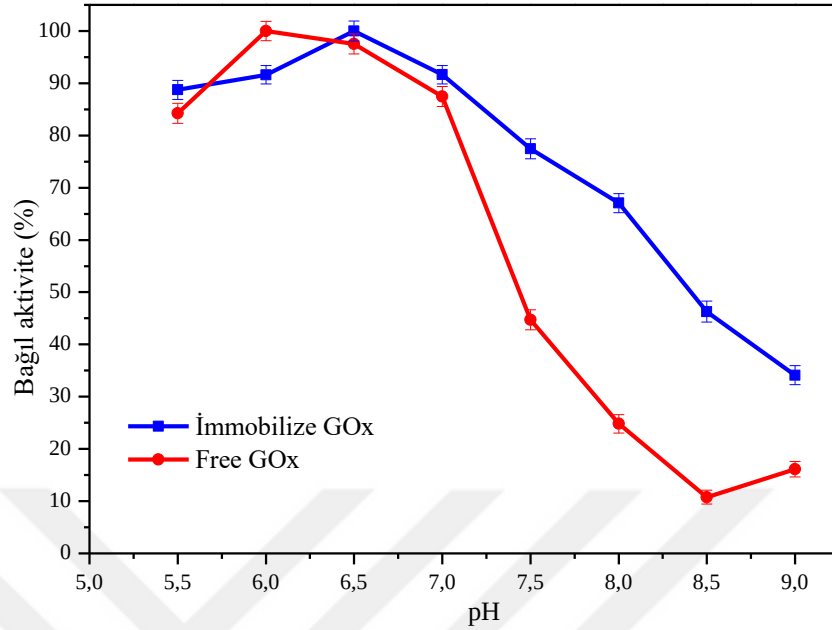
4.3. Serbest ve İmmobilize GOx Çalışmaları

Bu kısımda farklı parametrelerin serbest ve immobilize GOx'un aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

4.3.1. pH'ın katalitik aktivite üzerine etkileri

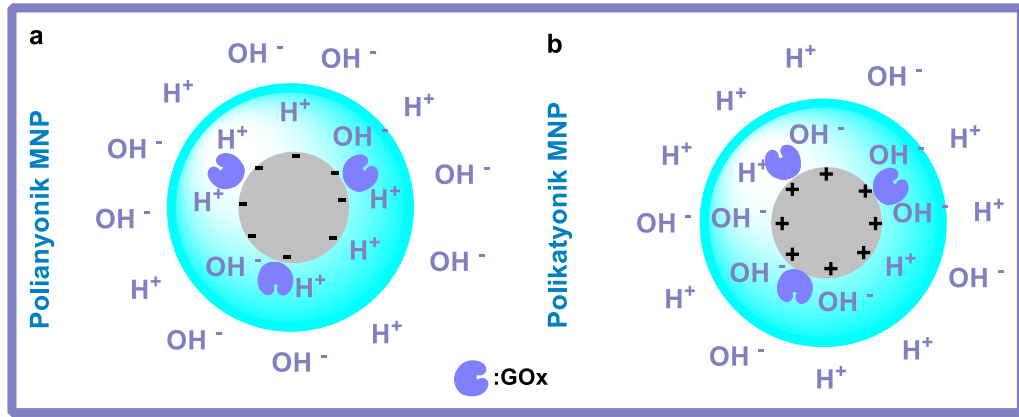
Enzim immobilizasyon çalışmalarında pH önemli bir faktördür. Optimal koşullardaki bir değişiklik genellikle immobilize enzim için gözlenir ve hedef uygulamada bir avantaj olabilir. Tampon pH'ın serbest ve immobilize edilmiş GOx üzerindeki etkileri Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.

İmmobilize edilmiş GOx'in pH 7,0-9,0 aralığında daha iyi bir enzim aktivitesi verdiği saptanmıştır. Serbest ve immobilize edilmiş GOx aktivitesi, pH 5,5'te hafifçe azalmıştır. Bu, esas olarak, GOx'in izoelektrik noktası (pI) olan pH 4,2'ye [3] yaklaşmanın, aktivitede bir azalmaya neden olmasından kaynaklanmaktadır [56]. Serbest ve immobilize enzimin optimum pH değerleri sırasıyla 6,0 ve 6,5 olarak bulunmuştur. İmmobilize GOx'in optimum pH değeri, serbest GOx ile karşılaştırıldığında, 0,5 pH birimi alkali bölgeye doğru kaymıştır. Bu, Şekil 4.9.'da gösterilen hidrojen iyonlarının ayrılmasından kaynaklanabilir [57]. Genel olarak, immobilize enzimin optimum pH değeri, desteğin anyonik veya katyonik yapısına bağlı olarak, serbest enzim ile karşılaştırıldığında 2 pH birimine kadar kayabilir.



Şekil 4.8. Serbest ve immobilize GOx aktiviteleri üzerine pH etkisi

CFO-TA-GOx gibi negatif yüklü enzim immobilize destekleri, enzimin etrafındaki hidrojen iyonlarını toplama eğilimindedir ve böylece enzimin etrafını saran ortamının pH'ını düşürür. Bu nedenle, GOx mikro ortamının pH'ı, pH ölçümünün yapıldığı geniş ortamından daha düşüktür. Sonuç olarak, immobilize enzimin optimum pH'ı serbest enziminkine yaklaşıırken, geniş ortamın pH'ı 6,5 bulunmuştur [58]. Böylece, immobilize edilmiş enzimin optimum pH'ı, FTC'de 6,5 olarak gözlenmiştir. Aksine, pozitif yüklü destekler, serbest enzim ile karşılaştırıldığında immobilize enzimin optimum pH'ını düşürür [59]. Optimum pH değerindeki değişimin bir diğer nedeni, GOx ve CFO-TA arasındaki güçlü etkileşimlerin GOx konformasyonunu etkilemesi ve böylece GOx için optimum pH değerini değiştirmesidir. Ayrıca optimum pH kayması, ürünlerin yükünden dolayı enzimatik reaksiyonun tipine bağlıdır. Ürünler, optimum pH değerini değiştirecek şekilde ortam pH'ını değiştirebilir [60]. Benzer şekilde, TA modifiye edilmiş Fe_3O_4 MNP üzerine immobilize edilmiş tripsin enzimi için pH kayması gözlenmiştir [61].

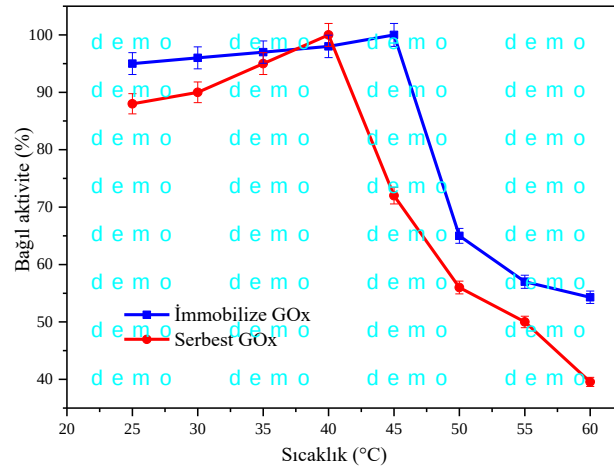


Şekil 4.9. Proton ayrışmasının (a) polianyonik destek veya (b) polikasyonik destek durumunda immobilize enzim mikroçevresine etkisinin gösterilmesi

Literatürden optimum pH değerinin değiştiğini gösteren örnekler Tablo 4.1.'de verilmiştir. Çoğu durumda, immobilize edilmiş enzimler, pH'nın optimum değerinin alkali taraflarındaki serbest enzimlere göre daha iyi bir aktivite gösterirler. İmmobilize edilmiş GOx, Şekil 4.8.'de gösterildiği gibi, serbest GOx'ten pH 6,5-9,0 aralığında daha aktif olmuştur. Literatürde benzer pH aralıkları, CoFe₂O₄/SiO₂-GA üzerine immobilize edilmiş GOx için 6,0-8,0 ve akrilonitril-glisidilmetakrilat kopolimeri üzerine immobilize edilmiş GOx için 7,0-8,5 olarak bulunmuştur [13,62]. Ek olarak, polianiline aşılınmış poliakrilonitril üzerine immobilize edilmiş GOx'un gelişmiş pH aralığı pH 6,5 ile 8 arasında belirlenmiştir [63].

4.3.2. Sıcaklığın katalitik aktivite üzerine etkileri

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi, optimum çalışma koşullarını belirlemek için pH'nin etkisi ile birlikte çok önemlidir. Bu nedenle, immobilize edilmiş ve serbest GOx'in 25 ila 60 °C arasındaki sıcaklık aralığındaki bağıl aktiviteleri, enzim stabilizasyonunu araştırmak için belirlenmiştir. Enzim katalizli reaksiyonlarda, optimum değer üzerindeki sıcaklıklarda enzim aktivitesi, enzim proteininin denatürasyonu nedeniyle azalmaktadır. Şekil 4.10.'daki sonuçlar, serbest GOx için optimum sıcaklığın yaklaşık 40 °C olduğunu ve immobilize edilmiş GOx için 45 °C'ye kaydığını göstermiştir.



Şekil 4.10. Serbest ve immobilize GOx aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi

Enzim aktivitesi, serbest GOx için 25-40°C aralığında ve immobilize GOx için 25-45°C aralığında hafif bir şekilde sıcaklığa bağlı bulunmuştur. Bu sonucun makul bir nedeni, GOx'teki sıcaklıktan kaynaklanan konformasyonel değişikliklere karşı düşük duyarlılıkta olmasıdır [7]. Bu sıcaklıkların üzerinde, enzim aktiviteleri, enzim denatürasyonu nedeniyle büyük ölçüde azalmıştır. Sonuçlar önceki çalışmalar ile uyumludur [13,62]. Optimum sıcaklık değerlerinin diğer çalışmalarla karşılaştırılması Tablo 4.1.'de verilmiştir.

4.3.3. Serbest ve immobilize GOx ile kinetik çalışmalar

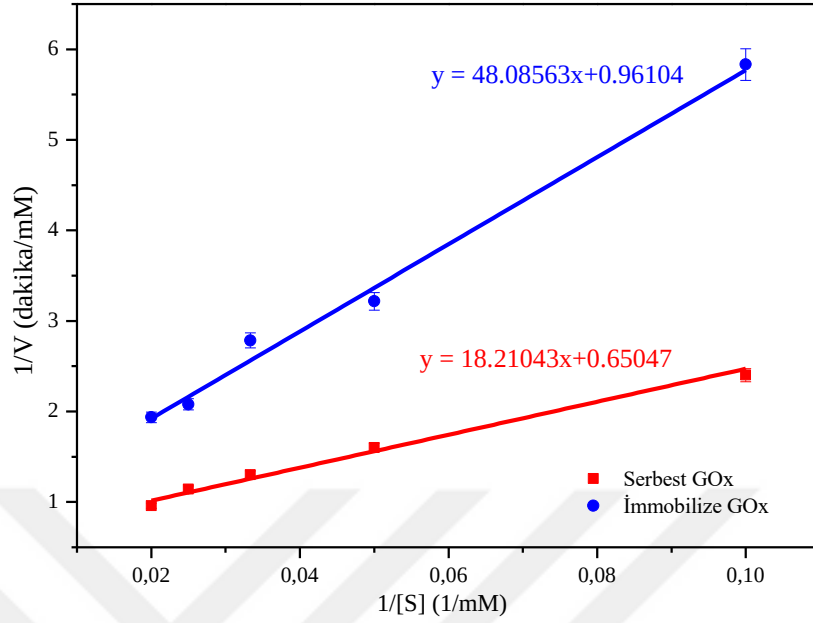
Glukoz konsantrasyonunun serbest ve immobilize GOx ile katalizlenen glukozun oksidasyon hızı üzerine etkisi, Michaelis – Menten denklemi ve Lineweaver – Burk grafikleri [64] kullanılarak, pH 6,5 FTÇ'de 10-50 mM aralığında farklı glukoz konsantrasyonları kullanılarak araştırılmıştır. Serbest ve immobilize enzimler için K_M ve V_{max} değerleri, Şekil 4.11.'de gösterilen Lineweaver – Burk grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Serbest GOx'in K_M değeri 28,00 mM iken, immobilize GOx'in K_M değeri 50,05 mM olarak bulunmuştur, bu da serbest GOx'inkinden çok daha yüksektir. Bu durum immobilize edilmiş GOx'in glukoz için serbest GOx'inkinden daha düşük bir biyolojik affiniteye sahip olduğunu gösterir. Bu sonuç, glukoz moleküllerinin immobilize enzimin aktif bölgelerine sınırlı

erişiminden ve enzim konformasyonunun değişmesinden dolayı genellikle enzim immobilizasyonlarında gözlenmiştir [64]. Çözeltideki glukoz moleküllerinin negatif yükünden dolayı, glukoz ve negatif yüklü CFO-TA desteği arasında elektrostatik bir itme meydana gelir. Bu itme kuvveti, glukozun konsantrasyonunu GOx aktif bölgesi civarında azaltır ve böylece K_M değerini artırır. İmmobilize ve serbest GOx için V_{max} değerleri sırasıyla 1,04 dk mM^{-1} ve 1,54 dk mM^{-1} olarak bulunmuştur. İmmobilizasyon işlemi sırasında GOx'in aktif bölgelerinin bir kısmının bloke olması nedeniyle immobilizasyon sonrası V_{max} 'ta bir azalma gözlenmiştir [56].

Tablo 4.1. Bu çalışma ve diğer çalışmalarda GOx immobilizasyon özelliklerinin karşılaştırılması

İmmobilizasyon tipi	Destek malzemeleri	Aktivite için optimum pH		Aktivite için optimum sıcaklık (°C)		Michaelis – Menten sabiti (K_M) (mM)		Yeniden kullanım sayısı (kalan bağlı aktivite)	Kaynak
		S	İ	S	İ	S	İ		
Adsorpsiyon-bağlanma	CoFe ₂ O ₄ -TA MNP'ler	6.0	6.5	40	45	28.00	50.05	8 (61%)	Bu çalışma
Çarpaz bağlama	CoFe ₂ O ₄ /SiO ₂	5.5	6.5	35	40	27.1	14.6	7 (57%)	[43]
Kovalent bağlanma	Akrilik asit aşı-kopolimerize polivinil florür)	5.8	4.8	30	35	4.91	10.49		[46]
Tuzak	Fe ₂ O ₃ -CaO-SiO ₂ -P ₂ O ₅	6.0	6.0	40	50	—	—	7 (50%)	[48]
Kovalent bağlanma	Akrilonitrilin kopolimeri glisidilmetakrilat	5.8	7.0	28	35	28	30–35		[44]
Çevrilebilir	Polianilin, poliakrilonitril	5.5	6.5	35	35	5.4	7.8	20	[45]

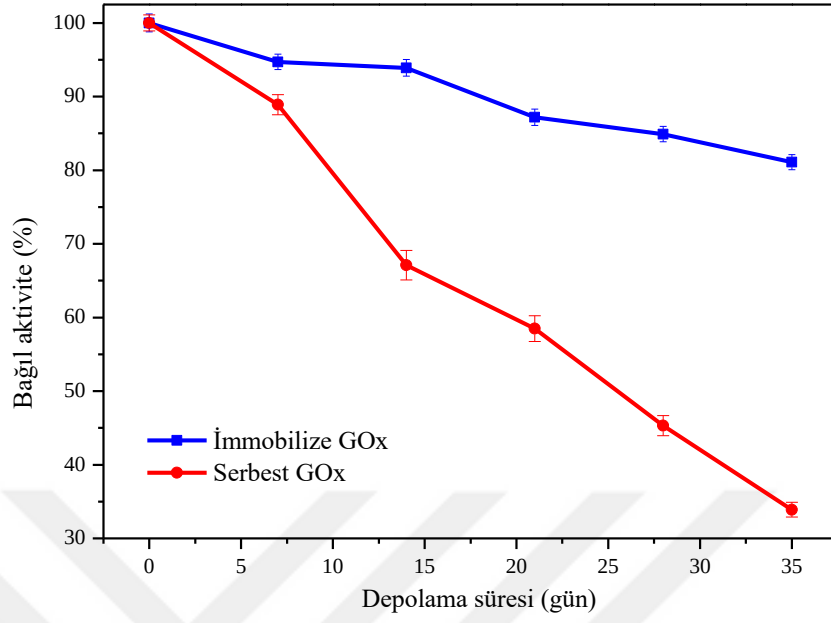
S:serbest, İ:İmmobilize



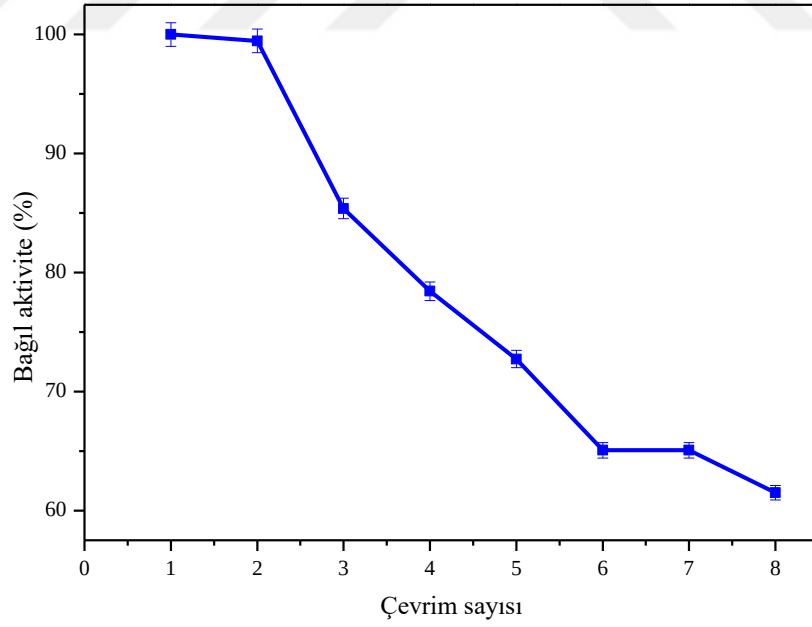
Şekil 4.11. Serbest ve immobilize GOx için Lineweaver – Burk grafiği (hata çubukları n = 3 için $\pm$ SS'yı gösterir).

4.3.4. GOx'in depolama ve operasyonel kararlılığı

Enzimler, kararsız yapılar olsa da, ticari olarak yararlıdırlar. Bu istenmeyen özellik, enzim immobilizasyonu ile aşılabılır. İmmobilizasyon yöntemini değerlendirirken, depolama stabilitesi ve immobilize enzimin çoklu kullanımı büyük önem taşımaktadır. İmmobilize ve serbest GOx'in depolama kararlılıkları 4 °C'de 35 gün için araştırılmış ve Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. Serbest enzim 35 gün içinde ilk aktivitesinin %65'ini kaybederken, immobilize GOx aynı zaman aralığında ilk aktivitesinin %20'sini kaybetmiştir. İmmobilizasyonun GOx'in kararlılığını artırdığı ve aktivitesinin daha uzun süre kalmasına neden olduğu gösterilmiştir. İmmobilize GOx'in operasyonel kararlılığı, immobilize GOx'in ardışık kullanımını belirlemek için incelenmiştir. Şekil 4.13.'deki sonuçlar, immobilize GOx'in 8 tekrarlı kullanımından sonra ilk aktivitesinin yaklaşık olarak %60'ının korunmuş olduğunu göstermiştir. GOx'in immobilizasyonu, stabilizeyi sürdürmüş ve Tablo 4.1.'de listelenen diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında enzimin yeniden kullanılabilirliğini geliştirmiştir [20].



Şekil 4.12. Serbest ve immobilize GOx'in depolama kararlılığı



Şekil 4.13. İmmobilize GOx'in çalışma kararlılığı

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Yüksek saflıkta CFO, hidrotermal yöntemle başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve XRD ile doğrulanmıştır. CFO'nun TA ile modifikasyonu ve immobilizasyon işlemi sırasında GOx'in TA'ya hidrojen bağları ile yüksek bağlanma affinitesi TGA, VSM ve FTIR ile doğrulanmıştır. Bradford protein tayini kullanılarak ölçüm yapıldığında 1 g CFO-TA başına 12,5 mg GOx elde edilmiş, yani GOx'in %99,8'i CFO-TA immobilize olmuştur. Bu sonucun sebebi peptit bağlarının karbonil oksijen atomu ve fenolik hidroksil gruplarının hidrojen atomları arasında oluşan H bağlarından kaynaklanmaktadır.

İmmobilize GOx pH 7,0-9,0 arasında iken daha iyi bir enzim aktivitesi göstermiştir. Serbest ve immobilize GOx'in aktivitesi pH 5,5'da hafifçe azalmıştır. Bunun sebebi GOx'in pI'sı olan pH 4,2'ye yaklaşmasının, aktivitede bir azalmaya neden olmasından kaynaklanmaktadır. Serbet enzimin optimum pH değeri 6,0 iken, immobilize enzimin optimum pH değeri 6,5 olarak bulunmaktadır. İmmobilize GOx, serbest GOx'den pH 6,5 ile 9,0 arasında daha aktif olmaktadır. Serbest GOx'in optimum sıcaklık değeri 40 °C iken, immobilize GOx'in optimum sıcaklık değeri 45 °C olmuştur. Enzim aktivitesi, serbest GOx için 25-40 °C arasında ve immobilize GOx için 25-45 °C arasında hafifçe sıcaklığa bağlı bulunmuştur. Nedeni GOx'in sıcaklıkla konformasyonel değişikliklere karşı düşük duyarlılıkta olmasından kaynaklanmaktadır. Bu sıcaklıkların üzerinde enzim aktiviteleri, enzim proteininin denatürasyonu nedeniyle büyük ölçüde azalmaktadır.

Serbest GOx'in K_M değeri 28,00 mM iken, immobilize GOx'in K_M değeri 50,05 mM olarak bulunmuştur. Nedeni, glukoz moleküllerinin enzimin aktif bölgesine sınırlı

erişiminden ve enzim konformasyonunun değişmesi nedeniyle immobilize enzimlerle yapılan çalışmalarda gözlenmektedir. Çözelti içindeki glukoz moleküllerinin negatif yüklenmesi nedeniyle, glukoz ve negatif yüklü CFO-TA desteği arasında elektrostatik bir itme meydana gelmektedir. Bu itme kuvveti, glukozun konsantrasyonunu GOx aktif bölgesi civarında azaltmakta ve böylece K_M değerini arttırmaktadır. İmmobilize ve serbest GOx için V_{max} değerleri sırasıyla 1,04 dk mM^{-1} ve 1,54 dk mM^{-1} olarak bulunmuştur. İmmobilizasyon işlemi sırasında GOx'in aktif bölgelerinin bir kısmının bloke olması nedeniyle immobilizasyon sonrası V_{max} 'da bir azalma gözlenmektedir.

İmmobilize ve serbest GOx'in depolama kararlılıkları 4 °C'de 35 gün süreyle araştırılmıştır. Serbest enzim 35 gün içinde ilk aktivitesinin sadece %35'ini korurken, immobilize GOx aynı zaman aralığında ilk aktivitesinin %80'ini korumuştur. İmmobilizasyonunun GOx'in kararlılığını arttırdığı ve aktivitesini daha uzun süre koruduğunu göstermektedir. İmmobilize GOx'in 8 tekrarlı kullanımından sonra ilk aktivitesinin yaklaşık olarak %60'ının korunduğu görülmüştür. İmmobilizasyon işlemi, GOx'in stabilitesini sürdürmesini sağlamakta ve Tablo 4.1.'de listelenen diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında enzimin yeniden kullanılabilirliğini geliştirmektedir.

5.2. Öneriler

Bu çalışmanın gelecek çalışmalara ışık tutması için öneriler şu şekilde özetlenebilir:

CoFe₂O₄ MNP'leri bu çalışmada hidrotermal yöntemle sentezlenmiştir. Solvo termal, mikro dalga hidrotermal ve birlikte çöktürme yöntemi gibi farklı yöntemler ile sentezlenebilir. Sentez esnasında etkili olan sıcaklık, süre ve pH gibi parametreler değiştirilebilir. Böylece üretilecek CoFe₂O₄ MNP'lerinin farklılıkları ve manyetik özelliklerinin kullanıldığı ortamdan ayrılabilirliği incelenebilir.

NiFe_2O_4 , CuFe_2O_4 , MnFe_2O_4 , ZnFe_2O_4 , ve Fe_3O_4 gibi farklı MNP'ler sentezlenebilir, sentezlenen bu MNP'lere enzimler immobilize edilerek farklı reaksiyon ortamlarında kullanılabilirler.

MNP'leri modifiye etmek için bu çalışmada TA kullanılmıştır. MNP'leri galik asit ve tanin gibi farklı moleküllerle modifiye ederek enzim immobilizasyonuna etkisi araştırılabilir.

Bu çalışmada enzim olarak GOx kullanılmıştır. Başka enzimler immobilize edilerek farklı uygulamalarda kullanılabilir.

MNP'lere farklı enzimler immobilize edilerek, enzim biyosensörleri hazırlanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger Principles of Biochemistry, W.H. Freeman and Company, New York, 2005.
- [2] Vallon, O., New sequence motifs in flavoproteins: Evidence for common ancestry and tools to predict structure. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 38 95, 2000.
- [3] Wilson, R., Turner, A.P.F., Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosens. Bioelectron.* 7 165, 1992.
- [4] Bornscheuer, U.T., Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 3336, 2003.
- [5] Jung, D., Streb, C., Hartmann, M., Oxidation of indole using chloroperoxidase and glucose oxidase immobilized on SBA-15 as tandem biocatalyst. *Microporous Mesoporous Mater.* 113 523-529, 2008.
- [6] Wang, X., Zhu, K.-X., Zhou, H.-M., Immobilization of glucose oxidase in alginate-chitosan microcapsules. *Int. J. Mol. Sci.* 12 3042, 2011.
- [7] Ying, L., Kang, E.T., Neoh, K.G., Covalent immobilization of glucose oxidase on microporous membranes prepared from poly(vinylidene fluoride) with grafted poly(acrylic acid) side chains. *J. Membr. Sci.* 208, 2002.
- [8] Direct immobilization of glucose oxidase in magnetic mesoporous bioactive glasses. Min, D., Zhang, X., He, W., Zhang, Y., Li, P., Zhang, M., *Mater. J., Chem. B* 1 3295, 2013.
- [9] Li, Y., Zhang, X., Deng, C., Functionalized magnetic nanoparticles for sample preparation in proteomics and peptidomics analysis. *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 8517.
- [10] Xiangfeng, C., Dongli, J., Yu, G., Chenmou, Z., Ethanol gas sensor based on CoFe_2O_4 nano-crystallines prepared by hydrothermal method. *Sens. Actuators B* 120 (2006) 177.

- [11] Liu, Q., Sun, J., Long, H., Sun, X., Zhong, X., Xu, Z., Hydrothermal synthesis of CoFe₂O₄ nanoplatelets and nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.* 108 (2008) 269.
- [12] Tang, D., Yuan, R., Chai, Y., An, H., Magnetic-Core/Porous-Shell CoFe₂O₄/SiO₂ Composite Nanoparticles as Immobilized Affinity Supports for Clinical Immunoassays. *Adv. Funct. Mater.* 17 (2007) 976.
- [13] Wang, H., Huang, J., Wang, C., Li, D., Ding, L., Han, Y., Immobilization of glucose oxidase using CoFe₂O₄/SiO₂ nanoparticles as carrier. *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 5739.
- [14] Klostergaard, J., Seeney, C.E., Magnetic nanovectors for drug delivery. *Nanomed. Nanotechnol.* 8 (2012) S37.
- [15] Hayrapetyan, S.S., Khachatryan, H.G., Porosity appearance in cobalt ferrite and changes under the thermal treatment of co-precipitated iron(II) and cobalt(II) oxalates. *Microporous Mesoporous Mater.* 72 (2004) 105.
- [16] Özacar, M., Şengil, İ.A., Evaluation of tannin biopolymer as a coagulant aid for coagulation of colloidal particles. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 229 (2003) 85.
- [17] Özacar, M., Soykan, C., Şengil, İ.A., Studies on synthesis, characterization, and metal adsorption of mimosa and valonia tannin resins. *J. Appl. Polymer Sci.* 102 (2006) 786.
- [18] M. Özacar, M., Şengil, İ.A., Türkmenler, H., Equilibrium and kinetic data, and adsorption mechanism for adsorption of lead onto valonia tannin resin. *Chem. Eng. J.* 143 (2008) 32.
- [19] Haslam, E., Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J. Nat. Prod.* 59 (1996) 205.
- [20] Altun, S., Çakıroğlu, B., Özacar, M., Özacar, M., A facile and effective immobilization of glucose oxidase on tannic acid modified CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136 (2015) 963–970, 2015
- [21] Sakallıoğlu, H., Manyetik nanopartiküller üzerine desteklenmiş schiff bazı türevi metal komplekslerinin sentezleri ve katalitik etkinliklerinin incelenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2013.

- [22] Etcı, K., Sol- jel tekniğine göre manyetik nanopartiküllere lipaz immobilizasyonu ve bazı enantiyoseçimli tepkimelerde kullanılması. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2011.
- [23] Beyaz, S., Süperparamanyetik nano-manyetit içeren lateks eldesi ve karakterizasyonu. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2009.
- [24] Çavdarlı, M., Bazı kobalt ferrit nano sistemlerin elektriksel özelliklerinin dielektrik spektroskopi yöntemi ile incelenmesi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Fizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2009.
- [25] Kaynar, M.B., Ferrit tabanlı nanokompozit malzemelerde mikrodalga soğurma özelliklerinin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2014.
- [26] Bilir, B., Süperparamanyetik Kobalt Ferrit Nanoparçacıkların Sentezi ve Karakterizasyonu. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2014.
- [27] Erdem, P., Synthesis, characterization and applications of polyphenol-Fe(III) complexes and tannic acid resin. Dokuz Eylül University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Chemistry Program, 2013.
- [28] Turhanlar, E., Gallik asitin apoptotik etkisinin belirlenmesi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2014.
- [29] Yılmaz, K., Bazı Polifenollerin Nanoboyutta Hazırlanması ve Antioksidatif Kapasitelerinin Belirlenmesi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
- [30] Mutlu, N., Türk Meşe Mazısından Kimyasal ve Biyoteknolojik Yöntemlerle Gallik Asit Elde Edilmesi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2004.
- [31] Atacan, K., Polifenollerle fonksiyonelleştirilmiş Fe_3O_4 nanopartiküllerine tripsin immobilizasyonu ve sindirim uygulaması. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2016.
- [32] İçli, N., İmmobilize glukoz oksidaz enziminin özellikleri ve enzim aktivliğinin artırılması. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2008.

- [33] Çakıroğlu, B., Asetilkolinesteraz (ache) enziminin poliakrilik asit esaslı nanofiber membran üzerine kovalent immobilizasyonu. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı, Yüksek Lisans tezi, 2015.
- [34] Atasagungal, M., Enzimler. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınlarından, Sayı 8, 1965.
- [35] Kara, F., Üreazın aljinat/kitosan polielektrolit ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/κ-karragenan interpolimer komplekslerine immobilizasyonu. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2006.
- [36] Özyılmaz, G., Glukoz oksidaz ve katalazın ayrı ayrı ve birlikte immobilizasyonu ve karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2005.
- [37] Malkoç, A., Polimer modifiyeli silika nanopartiküllerin enzim immobilizasyonunda kullanımı. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2011.
- [38] Alpay, P., Manyetik nanopartiküllere papain enziminin immobilizasyonu ve proteinlerin enzimatik hidrolizinde kullanımı. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2014.
- [39] Yüksekdağ, H., Biyomimetik kaplama ile hazırlanan manyetik nanotanecikler üzerine enzim immobilizasyonu. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2014.
- [40] Güleç, M., Polistiren destekli schiff bazı ve metal kompleksi üzerine enzim immobilizasyonu. Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2016.
- [41] South, P.K., Miller, D.D., Iron binding by tannic acid: Effects of selected ligands. Food Chem. 63 (1998) 167.
- [42] J.A. Field, G. Lettinga, N. Slabbert, Toxicity of tannic compounds to microorganisms, in: R.W. Hemingway, P.E. Laks, S.J. Branham (Eds.), Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance, Plenum Press, New York, 1992, pp. 673–692.
- [43] Osawa, R., Walsh, T.P., Agric. J., Effects of acidic and alkaline treatments on tannic acid and its binding property to protein. Food Chem. 41 (1993) 704.

- [44] Li, Z.H., Zhao, T.P., Zhan, X.Y., Gao, D.S., Xiao, Q.Z., Lei, G.T., High capacity three-dimensional ordered macroporous CoFe_2O_4 as anode material for lithium ion batteries. *Electrochim. Acta* 55 (2010) 4594.
- [45] Lavela, P., Tirado, J.L., CoFe_2O_4 and NiFe_2O_4 synthesized by sol–gel procedures for their use as anode materials for Li ion batteries. *J. Power Sources* 172 (2007) 379.
- [46] Reddy, M.P., Mohamed, A.M.A., One-pot solvothermal synthesis and performance of mesoporous magnetic ferrite MFe_2O_4 nanospheres. *Microporous Mesoporous Mater.* 215 (2015) 37.
- [47] Ji, G., Lin, X., Sun, Y., Trimizi, S.A.A., Sub, H., Du, Y., Molten salt growth and magnetic properties of octahedral CoFe_2O_4 crystals: effects of synthesis conditions. *CrystEngComm* 13 (2011) 6451.
- [48] Adeela, N., Maaz, K., Khan, U., Karim, S., Nisar, A., Ahmad, M., Ali, G., Han, X.F., Duan, J.L., Liu, J., Influence of manganese substitution on structural and magnetic properties of CoFe_2O_4 nanoparticles. *J. Alloys Compd.* 639 (2015) 533.
- [49] Araujo, P.Z., Morando, P.J., Blesa, M.A., Interaction of catechol and gallic acid with titanium dioxide in aqueous suspensions. 1. Equilibrium studies. *Langmuir* 21 (2005) 3470.
- [50] Mei, Y., Miller, L., Gao, W., Gross, R.A., Imaging the Distribution and Secondary Structure of Immobilized Enzymes Using Infrared Microspectroscopy. *Biomacromolecules* 4 (2003) 70.
- [51] Jastrzebska, M., Zalewska-Rejda, J., Wrzalik, R., Kocot, A., Mroz, I., Barwinski, B., Turek, A., Cwalina, B., Tannic acid-stabilized pericardium tissue: IR spectroscopy, atomic force microscopy, and dielectric spectroscopy investigations. *J. Biomed. Mater. Res. A* 78 (2006) 148.
- [52] Sahiner, N., Sagbas, S., Aktas, N., Single step natural poly (tannic acid) particle preparation as multitasking biomaterial. *Mater. Sci. Eng. C* 49 (2015) 824.
- [53] Kumar, R., Singh, M., Agric. J., Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *Food Chem.* 32 (1984) 447.

- [54] Mohy Eldin, M.S., El Enshasy, H.A., Hassan, M.E., Haroun, B., Hassan, E.A., Covalent immobilization of penicillin G acylase onto amine-functionalized PVC membranes for 6-APA production from penicillin hydrolysis process. II. Enzyme immobilization and characterization. *J. Appl. Polym. Sci.* 125 (2012) 3820.
- [55] Xia, Z., Singh, A., Kiratitanavit, W., Mosurkal, R., Kumar, J., Nagarajan, R., Unraveling the mechanism of thermal and thermo-oxidative degradation of tannic acid. *Thermochim. Acta* 605 (2015) 77.
- [56] Zhou, Q.Z.K., Chen, X.D., Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Eng. J.* 9 (2001) 33.
- [57] Çil, M., Büyükbayram, A.E., Kıralp, S., Toppare, L., Yağcı, Y., Various applications of immobilized glucose oxidase and polyphenol oxidase in a conducting polymer matrix. *Int. J. Biol. Macromol.* 41 (2007) 49.
- [58] Yildiz, H.B., Kıralp, S., Toppare, L., Yağcı, Y., Immobilization of glucose oxidase in conducting graft copolymers and determination of glucose amount in orange juices with enzyme electrodes. *Int. J. Biol. Macromol.* 37 (2005) 174.
- [59] Yilmaz, E., Can, K., Sezgin, M., Yilmaz, M., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester. *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 499.
- [60] Kahraman, M., Bayramoğlu, G., Kayaman-Apohan, N., Güngör, A., α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chem.* 104 (2007) 1385.
- [61] Atacan, K., Özacar, M., Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 128 (2015) 227.
- [62] Godjevargova, T., Konsulov, V., Dimov, A., Preparation of an ultrafiltration membrane from the copolymer of acrylonitrile–glycidylmethacrylate utilized for immobilization of glucose oxidase. *J. Membr. Sci.* 152 (1999) 235.
- [63] Bayramoğlu, G., Metin, A.Ü., Altıntaş, B., Arica, M.Y., Reversible immobilization of glucose oxidase on polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite membrane. *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 6881.

- [64] Du, T., Liu, B., Hou, X., Zhang, B., Du, C., Covalent immobilization of glucose oxidase onto Poly (St-GMA-NaSS) monodisperse microspheres via BSA as spacer arm. *Appl. Surf. Sci.* 255 (2009) 7937.



ÖZGEÇMİŞ

Seher Altun Yılmaz, 30.07.1990'da İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. 2008 yılında başladığı Selçuk Üniversitesi Kimya Bölümünü 2012 yılında bitirdi. 2013 yılında Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Fizikokimya Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Aynı yıl özel sektörde çalışmaya başladı. Halen çalışmaktadır.