

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**DEMİR OKSİT MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİ ÜZERİNE SIĞIR KARBONİK
ANHİDRAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU: CO₂
GİDERİMİNDE POTANSİYEL UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

MUHAMMET FIRAT

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ŞÜKRÜ BEYDEMİR

BİLECİK, 2025

10732424

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**DEMİR OKSİT MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİ ÜZERİNE SIĞIR KARBONİK
ANHİDRAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU: CO₂
GİDERİMİNDE POTANSİYEL UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

MUHAMMET FIRAT

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ŞÜKRÜ BEYDEMİR

BİLECİK, 2025

10732424

BEYAN

“Demir Oksit Manyetik Nanopartikülleri Üzerine Sığır Karbonik Anhidraz Enziminin İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu: CO₂ Gideriminde Potansiyel Uygulanabilirliğinin Araştırılması” adlı doktora tezimin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın,			
Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR	X	DESTEK ALINMAMIŞTIR	
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum; TÜBİTAK			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- TÜBİTAK 1002-A		124Z108	
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:		 /.....	

Öğrenci Adı ve Soyadı

Muhammet FIRAT

Tarih

.....2025

İmza

ÖN SÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmada, demir oksit manyetik nanopartikülleri üzerine sığır karbonik anhidraz enziminin immobilizasyonu yapılarak CO₂ gideriminde potansiyel uygulanabilirliği araştırılmıştır. Çalışmanın deneysel işlemleri Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarım esnasında bana güvenen, bilgi ve tecrübesi ile her zaman yol gösteren, her türlü yardım ve desteği sağlayan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e şükranlarımı sunarım.

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Alev AKPINAR BORAZAN'a, Sayın Doç. Dr. Mesut IŞIK'a ve Sayın Doç. Dr. Rafiğ GURBANOV'a teşekkür ederim.

Hiçbir zaman fedakârlığını eksik etmeyen, arkadaşım Dr. Öğretim Görevlisi Fatih TOZOĞLU'na, destekleri ile yardımına koşan Öğretim Görevlisi Bilge ÇİFTÇİ'ye ve Çağla HANOĞLU'na, çalışmalarımız süresince birbirimize destek olduğumuz doktora öğrencisi arkadaşım, Öğretim Görevlisi Olgun ÇIRAK'a sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca gösterdikleri sabır ve anlayıştan dolayı eşime, anneme ve babama çok teşekkür ederim.

Son olarak bu çalışmayı gerçekleştirmem için gerekli maddi desteği "1002-A Hızlı Destek Modülü" kapsamında 124Z108 numaralı proje ile sağlayan TÜBİTAK'a özellikle teşekkür etmek isterim.

Muhammet FIRAT
2025

ÖZET

DEMİR OKSİT MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİ ÜZERİNE SIĞIR KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU: CO₂ GİDERİMİNDE POTANSİYEL UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi yöntemi ile CA enzimi % 35,98 verim ile saflaştırıldı. CA enzimi için saflaştırma kat sayısı 83,42 ve spesifik aktivite 1122,94 EÜ/mg olarak bulundu. Enzimin saflığını kontrol etmek ve molekül kütleini belirlemek için %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Molekül kütlei ise yaklaşık 29 kDa olarak belirlendi. Sonraki aşamada immobilizasyonu için iki farklı destek materyali sentezlendi. I. destek materyali (Fe₃O₄-NH₂)'nin sentezinde MNP, 3-aminopropil)trietoksisilan (APTES) kullanılarak amin grubu (NH₂) ilavesiyle fonksiyonel hale getirildi. Daha sonra glutaraldehit (GA) kullanılarak siğır karbonik anhidraz (BCA), kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edildi. II. destek materyali (Fe₃O₄@SiO₂-NH₂)'nin sentezinde ise MNP, tetraetil ortosilikat (TEOS) kullanılarak silisyum oksit ile kaplandı. Ardından APTES ile işlevselleştirilerek aynı yöntem ile immobilize edildi. İmmobilizasyondan önce ve sonra FT-IR, SEM-EDX ve VSM ile karakterizasyonları yapıldı. Aktivite, serbest ve immobilize enzimler için pH 5-9 aralığında belirlenmiş olup optimum pH 9 olarak gözlemlendi. Serbest BCA'nın Km ve Vmax değerleri sırasıyla 4,888 mM ve 3,081 EU mL⁻¹ iken, fonksiyonelleştirilmiş I. destek materyaline immobilize BCA'nın Km ve Vmax değerleri sırasıyla 9,369 mM ve 1,810 EU mL⁻¹ aynı şekilde ikincisi için ise Km ve Vmax değerleri sırasıyla 16,160 mM ve 2,195 EU mL⁻¹ olarak bulunmuştur. İmmobilize enzimlerin operasyonel kararlılığı için 20 defa yeniden kullanıldığında; I. destek materyaline immobilize BCA aktivitesinin % 73'ünü, ikincisi ise aktivitesinin % 86'sını korumuştur. Depolama stabilitesi çalışması için numuneler, 4 °C'de 60 gün süreyle inkübe edildi. 60 günün sonunda I. destek materyaline immobilize BCA aktivitesinin % 60'ını, ikincisi ise aktivitesinin % 49'unu korurken aynı şartlarda serbest BCA aktivitesinin yalnızca % 17'sini korumuştur. Son aşamada BCA'nın, CO₂ giderimindeki potansiyel uygulanabilirliği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Karbonik anhidraz, manyetik nanopartiküller, saflaştırma, immobilizasyon, CO₂ giderimi

ABSTRACT

IMMOBILISATION AND CHARACTERISATION OF BOVINE CARBONIC ANHYDRASE ENZYME ON IRON OXIDE MAGNETIC NANOPARTICLES: INVESTIGATION OF ITS POTENTIAL APPLICABILITY IN CO₂ REMOVAL

In this study, the CA enzyme was purified with 35.98% yield using the sepharose 4B-L-tyrosine sulfanilamide affinity chromatography method. The purification coefficient for CA enzyme was 83.42 and the specific activity was 1122.94 μ /mg. To check the purity of the enzyme and to determine its molecular mass, 3-8% batch sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed and a single band was observed. The molecular mass was determined to be approximately 29 kDa. In the next step, two different support materials were synthesized for immobilisation. In the synthesis of the first support material (Fe₃O₄-NH₂), the magnetic nanoparticle (MNP) was functionalised by the addition of amine group (NH₂) using 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). Then, bovine carbonic anhydrase (BCA) was immobilised by covalent binding method using glutaraldehyde (GA). In the synthesis of the second support material (Fe₃O₄@SiO₂-NH₂), MNP was coated with silicon oxide using tetraethyl orthosilicate (TEOS). It was then functionalized with APTES and immobilised by the same method. They were characterised by FT-IR, SEM-EDX and VSM before and after immobilisation. Activity was determined for free and immobilised enzymes in the pH range of 5–9, with an optimum pH of 9 observed. The K_m and V_{max} values of free BCA were 4.888 mM and 3.081 EU mL⁻¹, while the K_m and V_{max} values of immobilised BCA on functionalised I. support material were found to be 9.369 mM and 1.810 EU mL⁻¹, respectively, and for the second, the K_m and V_{max} values were found to be 16.160 mM and 2.195 EU mL⁻¹, respectively. When the immobilised enzymes were reused 20 times for operational stability, the BCA activity immobilised on the first support material retained 73% of its activity, while the second retained 86% of its activity. For the storage stability study, the samples were incubated at 4 °C for 60 days. At the end of 60 days, the first support material retained 60% of the immobilised BCA activity, while the second retained 49% of its activity. Under the same conditions, only 17% of the free BCA activity was retained. In the final stage, the potential applicability of BCA in CO₂ removal was determined.

Keywords: Carbonic anhydrase, magnetic nanoparticles, purification, immobilization, CO₂ removal

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ.....	i
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Karbonik Anhidraz Enzimi.....	5
2.1.1 Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı.....	7
2.1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Hidratasyon Mekanizması.....	10
2.2 Nanopartiküller.....	11
2.2.1 Manyetik Nanopartiküller	12
2.2.2 Demiroksitler.....	15
2.2.2.1 Hematit (α -Fe ₂ O ₃)	17
2.2.2.2 Maghemite (γ -Fe ₂ O ₃)	17
2.2.2.3 Manyetit (Fe ₃ O ₄)	17
2.2.3 Manyetik Nanopartiküllerin Kullanım Alanları.....	18
2.2.4 Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi.....	20
2.2.4.1 Ortak çöktürme (Birlikte çökeltme).....	22
2.2.5 Demir Oksitin (Fe ₃ O ₄) Yüzey Modifikasyonu.....	23
2.2.5.1 İnorganik metal oksitler	23
2.2.5.2 Organik küçük moleküller	24
2.3 Enzim İmmobilizasyonu	25
2.3.1 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Materyalleri.....	26
2.3.2 Enzim İmmobilizasyonu İçin Kullanılan Yöntemler.....	28

2.3.2.1 Taşıyıcı bağlama yöntemi.....	28
2.3.2.2. Çapraz bağlama yöntemi.....	32
2.3.2.3. Hapsetme yöntemi.....	34
2.3.3. CA'nın İmmobilizasyonunda Destek Materyalinin Seçimi.....	36
2.4 CA'nın İmmobilize Edilmesine Yönelik Daha Önceki Çalışmalar	37
2.5 Çalışmanın Amaçları.....	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1 Kimyasal Reaktifler	39
3.2 Sığır Karbonik Anhidraz (BCA)'ın Saflaştırılması.....	39
3.2.1 Kan numunelerinin alınması ve hemolizat eldesi.....	39
3.2.2 Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması	39
3.2.3 CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması	40
3.2.4 Sülfanilamit kenetlendirilmesi.....	40
3.2.5 Afinite kolonunun paketlenmesi.....	41
3.2.6 Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....	41
3.3 Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu	41
3.4 Manyetik Nanopartiküllerin Fonksiyonelleştirilmesi.....	42
3.4.1 Destek materyali I ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$).....	42
3.4.2 Destek materyali II ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$).....	42
3.5 Karbonik Anhidraz Enziminin İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu.....	43
3.5.1 Karbonik anhidraz enziminin immobilizasyonu.....	43
3.5.2 Karbonik anhidraz enziminin aktivite tayini.....	43
3.5.3 İmmobilize CA'nın karakterizasyonu.....	43
3.5.4 Enzim yükleme etkinliği.....	44
3.6 İmmobilize CA'nın pH, Termal Stabilitesi, Depolama Stabilitesi, Operasyonel Kararlılığı ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....	45
3.6.1 Optimum ve stabil pH'ın belirlenmesi.....	45
3.6.2 Termal stabilitenin ve optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	45
3.6.3 Kinetik parametrelerin belirlenmesi.....	45
3.6.4 Operasyonel kararlılık testi.....	46
3.6.5 Depolama stabilitesi.....	46

3.7 İmmobilize CA İle CO ₂ 'in Kalsiyum Karbonata Dönüşümü	46
3.7.1 Gaz halindeki CO ₂ 'i suda çözerek, çözünmüş CO ₂ oluşturma.....	46
3.7.2 İmmobilize CA'nın, CO ₂ giderim potansiyeli.....	46
4. BULGULAR.....	48
4.1 Sığır Karbonik Anhidraz (BCA)'ın Saflaştırılması.....	48
4.2 Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu	51
4.3 Manyetik Nanopartiküllerin Fonksiyonelleştirilmesi ve Karakterizasyonu.....	54
4.4 Karbonik Anhidraz Enziminin İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu.....	56
4.5 Enzim Yükleme Etkinliği	60
4.6 İmmobilize CA'nın pH, Termal Stabilitesi, Depolama Stabilitesi, Operasyonel Kararlılığı ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....	60
4.7 İmmobilize CA'nın, CO ₂ Giderim Potansiyeli	68
5. TARTIŞMA.....	71
6. SONUÇ.....	83
KAYNAKÇA.....	84

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1. Karbonik anhidrazın, karbondioksit hidratasyonu dışında, katalizlediği reaksiyon türleri.....	6
Tablo 2. 2. Karbonik anhidrazın altı temel sınıfının karakteristik özellikleri.....	7
Tablo 2. 3. α -CA'nın katalitik aktivite gösteren izoenzimleri ve hücre içi lokasyonları.....	8
Tablo 2. 4. Başlıca demir oksitler	16
Tablo 2. 5. Demir oksit nanopartiküllerinin (IONP) başlıca hazırlama yöntemlerinin karşılaştırılması.....	21
Tablo 2. 6. Enzim İmmobilizasyonda kullanılan destek materyalleri.....	27
Tablo 4. 1. Standart Test Tüpü ve Mikroplaka Protokolleri için Seyreltme Şeması (Çalışma Aralığı = 100–1500 μ g / mL).....	48
Tablo 4. 2. Homojenize edilmiş örnekdeki enzim ve afinite kolonundan saflaştırılan enzim için belirlenen saflaştırma sonuçları.....	50
Tablo 4. 3. Fe ₃ O ₄ MNP'lere ait EDX sonuçları.....	53
Tablo 4. 4. Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan serbest enzim ve immobilize enzimlerin esteraz aktivite ve spesifik aktivite sonuçları.....	56
Tablo 4. 5. İmmobilize MNP'lere ait EDX sonuçları (a: İmmobilize I. Destek Materyali (MNP-APTES-GA-BCA) b: İmmobilize II. Destek Materyali (MNP-TEOS-APTES-GA-BCA))....	57
Tablo 4. 6. Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan serbest ve immobilize BCA için Km ve Vmax değerleri.....	61
Tablo 4. 7. CO ₂ giderim potansiyeli olarak oluşan kalsiyum karbonat çökeltisi.....	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. Karbonik anhidraz II izoenzimi modeli, His-94, His-96, His-119 ve bir su molekülüne koordine olan Zn(II) iyonunu gösteren karbonik anhidrazın aktif bölgesi.....	9
Şekil 2. 2. CA tarafından katalizlenen CO ₂ -hidratasyon mekanizması.....	11
Şekil 2. 3. IONP'lerin tipik histerezis döngülerinin şematik sunumu (A).....	13
Şekil 2. 4. M manyetik momentinin H dış manyetik alanıyla etkileşiminin şematik gösterimi.....	14
Şekil 2. 5. Hematit, manyetit ve maghemitin kristal yapısı ve kristalografik verileri (siyah top Fe ²⁺ , yeşil top Fe ³⁺ ve kırmızı top O ²⁻).....	16
Şekil 2. 6. MNP'lerin çeşitli biyomedikal uygulamaları.....	20
Şekil 2. 7. Ortak Çöktürme yöntemi ile MIONP sentez sürecini gösteren şema.....	22
Şekil 2. 8. Başlıca enzim immobilizasyon yöntemleri.....	36
Şekil 4. 1. Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılan BCA enziminin elüsyonu sonucu yapılan absorbans-aktivite grafiği.....	48
Şekil 4. 2. Bradford yöntemiyle, BSA kullanılarak, protein miktarını belirlemek için hazırlanan standart grafik.....	49
Şekil 4. 3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan BCA enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı (a: standart b: Numune).....	50
Şekil 4. 4. Çalışmanın iş akışı.....	51
Şekil 4. 5. Kimyasal ortak çöktürme yöntemi ile demir oksit manyetik nanopartiküllerin (MNP) sentezlenmesi.....	52
Şekil 4. 6. Fe ₃ O ₄ MNP'lere ait SEM görüntüsü.....	53
Şekil 4. 7. Fe ₃ O ₄ MNP'lere ait EDX diyagramı.....	54
Şekil 4. 8. (a): I. Destek Materyali (MNP-APTES) ve (b): II. Destek Materyali (MNP- TEOS-APTES)'e ait FT-IR spektrumları.....	54
Şekil 4. 9. Çıplak MNP'lerin, immobilizasyon öncesi MNP-APTES'in ve MNP-TEOS-APTES'in manyetik histerezis döngüleri.....	55
Şekil 4. 10. Destek materyallerinin immobilizasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri.....	57

Şekil 4. 11. İmmobilize MNP'lere ait EDX diyagramı (a: İmmobilize I. Destek Materyali (MNP-APTES-GA-BCA) b: İmmobilize II. Destek Materyali (MNP-TEOS-APTES-GA-BCA)	58
Şekil 4. 12. (a) İmmobilizasyon sonrası I. Destek Materyali (MNP-APTES-GA-BCA) ve (b) İmmobilizasyon sonrası II. Destek Materyali (MNP-TEOS-APTES-GA-BCA)'e ait FT-IR spektrumları	59
Şekil 4. 13. Çıplak MNP'lerin, immobilizasyon sonrası MNP-APTES-GA-BCA 'in ve MNP-TEOS-APTES-GA-BCA 'in manyetik histerezis döngüleri	59
Şekil 4. 14. Çalışmanın şeması	60
Şekil 4. 15. Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan serbest ve immobilize BCA aktivitesine, substrat konsantrasyonunun etkisini gösteren Michaelis-Menten aktivite grafiği	61
Şekil 4. 16. Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan serbest ve immobilize BCA aktivitelerine, pH etkisi	62
Şekil 4. 17. Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan serbest BCA'nın, stabil olduğu pH	63
Şekil 4. 18. MNP-TEOS-APTES-GA-BCA'nın, stabil olduğu pH	63
Şekil 4. 19. MNP-APTES-GA-BCA'nın, stabil olduğu pH	64
Şekil 4. 20. Serbest BCA aktivitesinin stabil olduğu, sıcaklık	65
Şekil 4. 21. MNP-TEOS-APTES-GA- BCA aktivitesinin stabil olduğu, sıcaklık	65
Şekil 4. 22. MNP-APTES-GA- BCA aktivitesinin stabil olduğu, sıcaklık	66
Şekil 4. 23. Serbest ve immobilize BCA aktivitelerine, sıcaklığın etkisi	67
Şekil 4. 24. Serbest ve İmmobilize enzimlerin depolama stabilitesi	67
Şekil 4. 25. İmmobilize enzimlerin operasyonel kararlılığı	68
Şekil 4. 26. Serbest ve İmmobilize BCA'nın, CO ₂ giderim potansiyeli için 4 farklı reaksiyon karışımı	69
Şekil 4. 27. Serbest ve İmmobilize BCA ile CO ₂ 'in kalsiyum karbonata dönüşümü sonrası Whatman-42 filtre kâğıdında biriken kalsiyum karbonat (a: Kontrol, b: Serbest BCA, c: MNP-APTES-GA-BCA, d: MNP-TEOS-APTES-GA-BCA)	69

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

CA: karbonik anhidraz

BCA: Sığır karbonik anhidraz

hCA: İnsan karbonik anhidraz

α : Alfa

β : Beta

γ : Gama

δ : Delta

ζ : Zeta

η : Eta

θ : Teta

ι : İota

NP: Nanopartikül

SDS-PAGE: Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi

MNP: Manyetik nano partikül

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$: I. destek materyali

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$: II. destek materyali

APTES: 3-aminopropil)trietoksisilan

NH_2 : Amin grubu

GA: Glutaraldehit

FT-IR: Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

EDX: Enerji Dispersive X-Ray Spektroskopisi

VSM: Titreşimli numune manyetometresi

MNP-APTES-GA-BCA: I. destek materyaline bağlı immobilize ezim

MNP-TEOS-APTES-GA-BCA: II. destek materyaline bağı immobilize enzim

K_m: Michaelis-Menten sabiti

V_{max}: Maksimum reaksiyon hızı

E_Ü: Enzim ünitesi

IPCC: Hükûmetler Arası İklim Değişikliği Paneli

NOAA: Ulusal Okyanus ve Atmosfer Dairesi

Fe₃O₄: Demir oksit

SiO₂: Silika

TEOS: Tetraetilortosilikat

MIONP: Manyetik demir oksit nanopartikül

IONP: Demir oksit nanopartikül

kDa: Kilodaltons

RuBisCO: Ribuloz 1, 5-bisfosfat karboksilazın

PEPC: Fosfoenol piruvat karboksilaz

Ms: Doygunluk mıknatıslanma

Mr: Remanans

Mc: Koersivite

HC: Histerezis döngüsü

SPION: Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller

nm: Nanometre

MRI: Manyetik rezonans görüntüleme

α -Fe₂O₃: Hematit

Fe₃O₄: Manyetit

γ -Fe₂O₃: Maghemit

OA: Oleik asit

CLEC: Çapraz bağı enzim kristali

CLEA: Çapraz bağlı enzim agregatı

p-NPA: p-nitrofenil asetat

SA: Sulfanilamid (CA'nın inhibitörü)

ACD: Asit-sitraz dekstraz

BSA: Bovin Serum Albumin

cm: Santimetre

dk: Dakika

g : Gram

mg : Miligram

ml : Mililitre

μ : Mikro

μg : Mikrogram

μl : Mikrolitre

μM : Mikromolar

1. GİRİŞ

Atmosferdeki sera gazı emisyonundaki artış, küresel ısınmanın ve buna bağlı iklim değişikliğinin sebeplerinden birisidir. Hükûmetler arası İklim Değişikliği Paneli (IPCC), (2007, 2014); tüm sera gazları arasında, antropojenik aktivite kaynaklı karbon dioksit (CO₂) emisyonunun, iklim değişikliğinden sorumlu en etkili faktör olduğunu belirten kapsamlı bir rapor yayınlamıştır. Enerji ihtiyacı için fosil yakıtların yakılması, tüm antropojenik CO₂ emisyonlarının ~% 89'una yol açar. Atmosferdeki karbondioksit konsantrasyonu 1880 yılında miktar olarak ~291 ppm iken 2023 yılına gelindiğinde bu değer yüzde 45 artışla yaklaşık 421 ppm'ye ulaşmıştır (Ulusal Okyanus ve Atmosfer Dairesi (NOAA) verileri). Sera gazı emisyonundaki artış, dünyanın yüzey sıcaklığını sanayi öncesi zamanlara göre enaz 1°C artırmıştır (Ali vd., 2023). Şayet fosil yakıtların kullanımı böyle devam etmesi durumunda; CO₂ emisyonları nedeniyle, atmosferik CO₂ konsantrasyonunun 2100 yılında 450 ppm'den fazla artacağı tahmin edilmektedir (Vinoba vd., 2012). Bu nedenle, CO₂ yakalama ve ayırma için gelecek vaat eden teknolojilerin geliştirilmesi, 21. yüzyılın en çok araştırılan konuları arasında yer almaktadır (Sahoo vd., 2012). CO₂ emisyonlarıyla mücadele etmek için son yıllarda kimyasal, fiziksel ve biyolojik teknolojiler olmak üzere çeşitli CO₂ giderimi teknolojileri araştırılmıştır (Franca ve Azapagic, 2015). Biyolojik yöntemler arasında enzimler ön plana çıkmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) enziminin CO₂ gideriminde kullanıldığı bildirilmiştir (Bhattacharya vd., 2003; Dilmore vd., 2009; Effendi ve Ng, 2019; Sahoo vd., 2012; Savile ve Lalonde, 2011).

CA, doğada yaygın olarak bulunan ve yaşamsal faaliyetlerin devamı için önemli bir metaloenzimdir (Ali vd., 2023; Hirakawa vd., 2021). CA'lar, katalitik aktivitesi en yüksek olan enzimler arasındadır (Bong vd., 2001; Khalifah, 1991). CA enzim sınıfına ait α -CA'nın, izoenzimleri arasında en yüksek katalitik aktiviteye sahip CA II'nin olduğu bilinmektedir (Aktaş, 2004; Ores vd., 2012). Katalitik aktivitesi diğerlerine nispeten yüksek olan CA II'nin 25°C'de ve pH 9'da turnover sayısı 10^6 sn^{-1} 'dir (Steiner, 1975; Khalifah, 1991). CA enziminin iki ana izoenzimi olan (CA I ve CA II), eritrositlerin sitozolünde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır (Arslan vd., 2011; Ozensoy vd., 2006).

Yapılan literatür çalışmalarında mezbahada kesim işlemi sonrasındaki kan ve et atıklarının, karbonik anhidraz gibi yüksek katma değerli enzimlerin eldesi için potansiyel bir kaynak olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Ores vd., 2012; Bernardini vd., 2011). Çalışmamızda, mezbahadan temin ettiğimiz sığır kanı eritrositlerinden saflaştırarak elde

ettiğimiz BCA'nın kullanılması atıkların ekonomiye kazandırılması açısından önem arz etmektedir. Bu durum enzimin birçok alanda kullanımı göz önüne alındığında kaynağın erişilebilir ve ekonomik olması açısından çok önemlidir.

Endüstride kullanılan serbest enzimlerin çözünür olmaları ve kolaylıkla geri kazanılıp tekrar kullanılamamaları önemli dezavantajlara yol açar. Bu olumsuzlukları minimize etmede bir strateji olarak enzim immobilizasyonu düşünülmektedir. Enzim immobilizasyonunun ana nedenlerinden biri, immobilizasyonun ardından moleküllerin kısıtlı depolama ve operasyonel stabilitesinde beklenen artıştır.

Karbonik anhidraz (CA) enzimi ticari olarak temin edilebilir ancak çok pahalı olması ve reaksiyon ortamından geri kazanılıp yeniden kullanılamaması gibi birçok nedenden dolayı serbest formda kullanılması önerilmemektedir. Bu amaçla immobilizasyon, enzimin yeniden kullanılması ve sürecin ticarileştirilmesi için maliyet açısından da en iyi yaklaşımlardan biri olabilir.

CA'nın immobilize edilmesi için çeşitli destek materyalleri önerilmiştir (Vinoba vd., 2012, 2011). Bu taşıyıcılar arasında yüzeyi modifiye edilmiş demir oksit nanopartiküller kolay ve kimyasal olmayan ayırma yöntemleri ile ön plana çıkmaktadır. Gözeneksiz yapıda olmalarına rağmen geniş yüzey alanı nedeniyle yüksek miktarlarda enzim yüklemesine izin verirler (Betancor vd., 2005; Park vd., 2011) ve statik bir manyetik alanın uygulanması ile de bir reaksiyon ortamından kolayca geri kazanılırlar (Mukherjee vd., 2010; Vinoba vd., 2012).

Manyetik nanopartiküller (MNP), farklı fonksiyonel gruplar aracılığıyla yüzeylerinin kimyasal modifikasyonuna olanak sağlar (Yadav vd., 2012). MNP'lerin silanizasyonu, fonksiyonel gruplar eklemek için en yaygın kullanılan teknik olarak ortaya çıkmaktadır. Yüzey modifikasyonu pahalı ekipmanlara ihtiyaç duymadan, yüksek sıcaklık olmadan basit bir şekilde gerçekleştiği için, iç manyetik çekirdeği korumak adına ideal bir yöntemdir (Xu vd., 2014). MNP'lerde daha iyi performans elde etmek için, materyallerin yüzeylerinde amin, hidroksil, karboksil ve epoksi gibi bazı reaktif fonksiyonel gruplar sentezlenmektedir (Jing vd., 2015). Bunlar, CA'daki proteinin farklı nükleofilik gruplarıyla, örneğin amino, hidroksi veya tiyol gruplarıyla reaksiyona girerek son derece güçlü bağlar oluşturabilir (Mendes vd., 2013; Tural vd., 2014).

MNP'leri kararlı kılmak ve biyouyumlu hâle getirmek amacıyla silika ile de kaplanmaktadır (Çelik vd., 2023). Kararlı kimyasal özelliklere, biyouyumluluğa, düşük toksisiteye, asit direncine ve yüksek sıcaklık direncine sahip asidik bir oksit olan SiO₂ (Silika),

manyetik demir oksit nanopartikül (MIONP)'leri modifiye etmek için tercih edilen malzemelerden biridir (Ling vd., 2019). Tetraetilortosilikat (TEOS), OH grupları aracılığıyla demir oksit nanopartikül (IONP)'lerin yüzeyine kolayca bağlanan en yaygın kullanılan silanlardır (Wu vd., 2015). TEOS kullanılarak silisyum oksit nanopartikülleri sentezlenir ve bunlar MNP üzerinde Silanol grubunu oluşturur.

Ayrıca 3-aminopropil)trietoksisilan (APTES) yani silan birleştirme maddeleri, MNP'lerin yüzeyi üzerine doğrudan kaplanarak yüksek yoğunluktaki yüzey fonksiyonel grupları ve basit operasyon avantajı sağlar (Liu vd., 2004). APTES'in bir silan bağlama maddesi olan bir terminal amin grubu (NH_2) ile kullanılması proteinlerin desteğin yüzeyine kovalent bağlanması için faydalı olabilir (Chong ve Zhao, 2003). İmmobilizasyon esnasında, APTES'in -NH_2 grubu enzimle kimyasal bağlanmaya katılır ve enzimin statik adsorpsiyonla immobilize edildiği kaplanmamış MNP'lere kıyasla daha yüksek enzim immobilizasyonu ile sonuçlanmaktadır (Ming vd., 2003).

Sentezlenecek destek materyalinin maliyeti de enzim immobilizasyonu için önemli konulardan biridir. İmmobilizasyon için pahalı bir desteğin kullanılması, maliyet nedeniyle endüstriyel rekabeti engelleyebilir. Literatür araştırmasına göre, çok yüksek maliyetler gerektirmediği için, birçok çalışmada MNP destek materyali olarak immobilizasyonda kullanılmıştır (Al-Dhrub vd., 2017; Çelik vd., 2023; Faridi vd., 2017; Feng vd., 2016; Jing vd., 2015; Park vd., 2011; Vinoba vd., 2012; Xu vd., 2010; Yadav vd., 2021). Ayrıca, bu immobilize edilmiş biyo-katalizörlerin reaktörden verimli bir şekilde geri kazanılması, endüstriyel uygulama için başka bir gerekliliktir. Genel olarak, İmmobilize enzimleri geri kazanmak için pahalı süzme, santrifüjleme veya başka bir zaman alıcı işlem gerekir. Bu sınırlamalar, biyo-katalizörlerin ekonomisini ve sürdürülebilirliğini engellemektedir (Polshettiwar vd., 2011). Bu nedenle sentezlediğimiz MNP, manyetik olduğu için ürün oluştuktan sonra mıknatıs kullanılarak manyetik bir alan yardımı ile ortamdan kolaylıkla ayrılmakta ve herhangi bir aktivite kaybı olmadan defalarca kullanılabilir. Böylece üründen enzimin ayrılması için ilave işleme gerek olmaması maliyeti düşürmektedir.

Destek materyali üzerine, enzimin hangi yöntem kullanılarak immobilize edileceği de bir başka önemli konudur. Literatürde çeşitli yöntemlerle enzim immobilizasyonu konusunda çalışmalar yapılmıştır. Bu yöntemlerden en yaygın olarak kullanılanı destek materyali üzerine bağlı enzimin çözeltiye sızma göstermediği kovalent bağlanma yöntemidir. Bütün enzim moleküllerinin dış kısmında reaktif fonksiyonel gruplar bulunur. Bu fonksiyonel gruplar aracılığı ile enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması gerçekleştirilir (Aktaş, 2004).

İmmobilizasyon yöntemi olarak Kovalent bağlama yöntemi, enzim sızıntısını önlediğinden endüstriyel uygulamalar için uygun olduğu ifade edilmiştir (Zhang vd., 2021).

Enzim ve destek arasında kovalent bağlar oluşturmak için GA gibi bir çapraz bağlama maddesinin kullanılması; artan enzim immobilizasyon oranı, enzim sızıntısını azaltma ve biyokatalizörün yüksek stabilitesi dâhil olmak üzere birçok fayda sağlamaktadır (Weber vd., 2023). Ayrıca çapraz bağlama için nispeten daha iyi sonuçlar GA ile yapılan aktivasyon çalışmalarında elde edilmiştir (Petri vd., 2004; Uhlig, 1998). Çünkü GA, fonksiyonelleştirilmiş MNP yüzeyinde, reaktif aldehit grupları üretmek için bağlayıcı bir ara bileşen olup kovalent bağlar oluşturmak üzere BCA'nın amino grupları ile reaksiyona girmektedir (Vinoba vd., 2012). GA, taşıyıcı ile enzim arasında bir ara halka görevi yaparak kararlı bağlanmayı gerçekleştirir. GA ile kovalent bağlanma muhtemelen taşıyıcının bölgesel yüzey alanında artış sağlamakta ve neticede enzim molekülünün aktif bölgesi etrafındaki sterik engel düşmektedir.

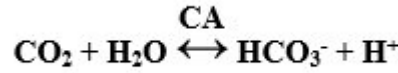
Bu tez çalışmasında, kovalent bağlanma yöntemi kullanılarak sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılarak elde edilen α -tipi BCA enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi. Destek materyalinin GA ile aktivasyonu yapılarak, enzimin destek materyaline bağlanma yüzdesi artırıldı. Bu kapsamda enzim yükleme oranı en iyi olan destek materyali seçilerek serbest enzim ile immobilize enzimin optimum sıcaklık, pH, kinetik parametreleri (K_m , V_{max}), stabilitelerinin (pH, termal ve depolama) belirlenmesi ve karakterize edilmesi amaçlandı. Ayrıca immobilize edilen enzimin, CO_2 giderimindeki potansiyel uygulanabilirliği belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Karbonik Anhidraz Enzimi

CA, yaşamsal faaliyetlerin devamı için gerekli olan ve aktif bölgesinde çinko iyonu bulunan bir metaloenzimidir. CO₂'in hidratasyonunu ve HCO₃⁻'in dehidratasyonunu tersinir olarak katalizler. Enzim Komisyonu'na (EC) göre EC 4.2.1.1 ile tanımlanır (Rasouli vd., 2022). Çoğunlukla CA, ortalama moleküler ağırlığı ~30 kDa olan monomerik bir proteindir (Keilin, 1997; Rasouli vd., 2022). Canlı sistemlerde keşfedilen ilk çinko metaloenzimidir (Bose ve Satyanarayana, 2017; Smith ve Ferry, 2000). Enzim ilk olarak kırmızı kan hücrelerinde keşfedilmiş ve daha sonra diğer organizmaların çoğunda tanımlanmıştır (Effendi ve Ng, 2019; Smith vd., 1999).

Karbonik anhidraz, karbondioksitin hidrasyonunu ve bikarbonatın dehidratasyonunu şu şekilde katalize eder:



CA'lar, katalitik aktivitesi en yüksek olan enzimler arasındadır (Bong vd., 2001; Khalifah, 1991). CA'lar, 10⁶ s⁻¹ mertebesinde kcat ve 108 M⁻¹s⁻¹ mertebesinde kcat/Km ile bilinen enzimler arasında en hızlı olanlardan biridir (Bose ve Satyanarayana, 2017). Bu da CA'yı CO₂ yakalama ve tutmada güçlü bir enzim haline getirir. Ayrıca, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve ılımlı koşullar altında çalışması CA'nın diğer avantajlarıdır (Hanna vd., 2013; Rasouli vd., 2022).

CA, insan ve diğer canlı organizmalarda biyolojik süreçleri düzenlemektedir (Rasouli vd., 2022). Organizmaların çoğunda CA'lar hızlı süreçler, özellikle de taşıma süreçleri için gereklidir. Örneğin, CO₂'nin akciğerlerden uzaklaştırılması ve göz salgılarının sentezi için gereklidir. CA'lar, birçok enzimatik reaksiyon için substrat olarak kullanıldıklarından vücutta optimum CO₂ ve HCO₃⁻ seviyesini korurlar. Kandaki asit-baz dengesini korur ve fizyolojik pH'nın korunmasına yardımcı olur ve ayrıca iyon taşınmasına ve solunuma aktif olarak katılır (Bose ve Satyanarayana, 2017).

CA'nın, karbondioksitin hidratasyonu dışında, katalizlediği reaksiyon türleri verilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2. 1. CA'nın, karbondioksit hidratasyonu dışında, katalizlediği reaksiyon türleri

Sıra	Katalizlenen Reaksiyonlar
1.	$O=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
2.	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
3.	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
4.	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
5.	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
6.	$ArOPO_3^{2-} + H_2O \rightleftharpoons HPO_3^{2-} + ArOH$
7.	$ArF + H_2C \rightleftharpoons HF + ArOH$ (Ar: 2,4dinitrofenil)
8.	$PHCH_2OCOC l + H_2O \rightleftharpoons PHCH_2OH + CO_2 + HCl$
9.	$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$ (R: Me; Ph)

Kaynak: (Supuran ve Scozzafava, 2001)

Bitkilerde, CA'lar ribuloz 1, 5-bisfosfat karboksilazın (RuBisCO) karboksilasyon oranını artırmak için CO_2 konsantrasyonunu yükselterek kloroplastlarda fotosentezde rol oynar (Bose ve Satyanarayana, 2017; Smith ve Ferry, 2000). Ayrıca bitkilerde metabolizma için gerekli olan bikarbonatı da sağlar (Monti vd., 2013). Yüksek organizmaların yanı sıra, CA'lar düşük organizmalarda da gereklidir (Bose ve Satyanarayana, 2017). Ökaryotik mikro ve makroalgler arasında yaygın olarak dağılmış, kloroplastlarında bulunan ve fotosentetik CO_2 fiksasyonunda hayati bir rol oynayan bir enzimdir. Üç mod mekanizmasını dönüştürme işlevine sahiptir: CO_2 'yi bikarbonata (C_4 bitkilerinde RuBisCO tarafından kullanılmak üzere), bikarbonatı fosfoenol piruvat karboksilaz (PEPC) ile CO_2 'ye ve ayrıca CO_2 ve HCO_3^- arasında hızlı dengeleme ile kolaylaştırılmış difüzyona yardımcı olur.

Dolayısıyla CA ve sınıfları tüm yaşam formlarının metabolik işlevlerinde önemli bir rol oynamaktadır. CA olmadan yaşam neredeyse söz konusu değildir. CA seviyeleri yaşlanma ile de ilişkilidir (Bose ve Satyanarayana, 2017; Cabiscol ve Levine, 1995). Parkinson hastalığı, diyabet, romatoid artrit ve alzheimer hastalığını içeren çeşitli hastalıklar bu tür oksidatif hasarla ilişkilendirilmiştir (Bose ve Satyanarayana, 2017).

2.1.1 Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı

Şimdiye kadar alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), zeta (ζ), eta (η), teta (θ) ve iota (ι) dahil olmak üzere sekiz CA ailesi olduğu bilinmektedir. Bu sınıflara ait CA'lar farklı amino asit dizilerine sahiptir (Ali vd., 2023). Bu sınıflardan ilk altısının karakteristik özellikleri Tablo 2.2'de kısaca açıklanmıştır.

Tablo 2. 2. Karbonik anhidrazın altı temel sınıfının karakteristik özellikleri

Özellikler	α CA	β CA	γ CA	δ CA	ζ CA	η CA
Bulunduğu alem	Ağırlıklı olarak hayvanlar aleminde bulunur, ayrıca protozoa, algler, yeşil bitkiler ve bazı arkea, bakteri ve mantarlarda da bulunur	Yaşamın her üç alanında da çoğunlukla algler, bakteriler ile tek ve iki kotiledon'lu bitkilerin kloroplastlarında	Arkebakterive siyanobakteri	deniz diyatomu	deniz diyatomu	Plasmodium falciparum (tek hücreli hayvanlarda)
Moleküler ağırlık	monomerik (Mw: 26-37kDa)	dimer, 45 ila 200 kDa arasında çeşitli oligomerik yapılar oluşturabilir	homotrimer 60 kDa (doğal)	monomer 27 kDa	69 kDa	-
Aktif bölge amino asitleri	His – 94, His – 96, His –119	Cys 38, His 96 and Cys 99	His 81, His 122 and His 117	-	-	His – 94, His –96, His –118
Fonksiyon	pH homeostazı, HCO ₃ ⁻ salgılanması, iyon değişimi	siyanat parçalanması (E.coli), CO ₂ fiksasyonu (siyanobakteriler), Bazı patojenlerin patogenezi sırasında aşırı eksprese edilir (Salmonella)	asetat metabolizması ve asetatin metana dönüşümü (metanojenler)	-	-	Patogenez sırasında aşırı ekspresyon
Diğer özellikler	esteraz aktivitesi, periplazmik lokalizasyon veya ekstraselüler sekresyon için N-terminal sinyal peptidi	Karbon Yoğunlaştırma Mekanizmasının (CCM) temel bileşeni	CA'nın en eski formu	-	-	-

Kaynak: (Bose ve Satyanarayana, 2017)

Karbonik anhidraz enzim aileleri, katalizleme işlemi sırasında aktif bölgede bulundukları metal iyonuna göre farklılık göstermektedirler (Supuran vd., 2015). Ancak çinko iyonu veya ilgili metal iyonları içeren bir aktif bölge kullanmaları bakımından benzerdirler (Effendi ve Ng, 2019; Smith vd., 1999). Hepsinde çinko iyonu (Zn²⁺) kullanılmasına rağmen, γ -karbonik anhidrazlar büyük olasılıkla demir (Fe²⁺) iyonu enzimidir

(bağlı çinko (II) iyonu veya kobalt (II) iyonu ile de aktif), ζ -karbonik anhidrazlar ise Cd(II) veya Zn(II) iyonunu fizyolojik katalizleme performansı için kullanırlar (Alterio vd., 2012; Smith vd., 1999; Supuran vd., 2015; Xu vd., 2008). Farklı CA sınıfları farklı protein dizilimlerine sahipken, katalitik aktiviteleri hidroksil grupları taşıyan çinko katyonlarının (Zn^{2+}) varlığına bağlıdır (Zhu vd., 2023).

CA sınıflar arasında, ilk bulunan ve üzerinde en fazla araştırma yapılan, α -sınıfındaki izoenzimlerdir. Yalnızca memelilerde, 16 α -CA izoenzimi bulunur. Bu 16 izoenzim birbirinden aktivite, hücre içi lokalizasyon, afinite ve inhibitör yönünden farklılıklar gösterebilir. Bunlardan beşi CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII izoenzimleri sitozolde bulunurken, beş izoenzim CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV zara bağlı, iki izoenzim CA VA ve CA VB mitokondride bulunurken, CA VI tükürük salgısında ve sütte salgılanan tek izozim olarak bulunmaktadır (Ali vd., 2023; Supuran, 2008). CA ile ilişkili proteinler olan ve CARP'ler olarak isimlendirilen üç katalitik izoenzim de mevcuttur. Bular: CARP VIII, CARP X ve CARP XI (Supuran vd., 2004). α -CA'nın 16 izoenzimi arasında katalitik aktivite düzeyi, hücre içi lokasyonu ve ilgili olduğu hastalıklara ait bilgiler verilmiştir (Tablo 2.3).

Tablo 2. 3. α -CA'nın katalitik aktivite gösteren izoenzimleri ve hücre içi lokasyonları

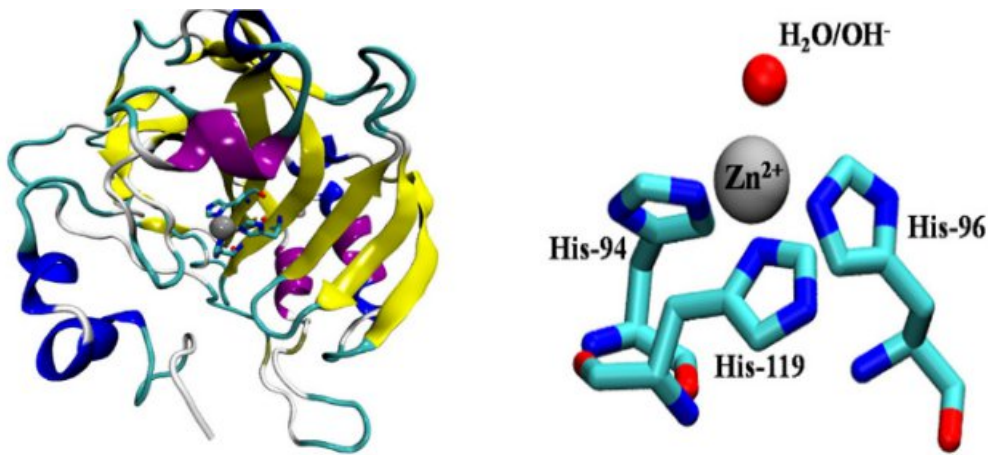
Enzim	Katalitik aktivite	Organ/doku dağılımı	İlişkili olduğu hastalık
CA I	Düşük	Eritrositler, sindirim sistemi, göz	Retina/beyin ödemi
CA II	Yüksek	Eritrositler, sindirim sistemi, göz, böbrek, akciğerler, kemik hücreleri, testis, beyin	Glokom, ödem, epilepsi, yükseklik hastalığı
CA III	Çok düşük	İskelet kaslarında, adipositlerde	Oksidatif stres
CA IV	Orta	Böbrek, pankreas, akciğer, beyin kapillerleri, kolon, kalp kası, göz	Glokom, inme, gece körlüğü
CA VA	Düşük	Karaciğer	Obezite
CA VB	Yüksek	Kalp ve iskelet kası, pankreas, böbrek, omurilik, sindirim sistemi	Obezite
CA VI	Düşük	Tükürük ve süt bezleri	Diş çürükleri
CA VII	Yüksek	Merkezi sinir sistemi	Epilepsi, oksidatif stres
CA IX	Yüksek	Tümörler ve sindirim mukozası	Kanser
CA XII	Düşük	Böbreğe ait, bağırsağa ait, üreme epitelleri, göz, tümörler	Kanser, glokom
CA XIII	Düşük	Böbrek, beyin, akciğer, üreme sistemi, bağırsak	Kısırlık
CA XIV	Düşük	Beyin, karaciğer, göz, iskelet kası	Epilepsi, iltihapsiz retina hastalığı

Kaynak: (Supuran vd., 2015)

Diğer izoenzimlere göre daha iyi aktivite gösteren CA II'nin, pH 9'da 25 °C'de CO₂ hidrasyonuna ait turnover sayısı 10⁶ sn⁻¹'dir (Steiner, 1975; Khalifah, 1991). CA'nın iki temel izoenzimi (CA I ve CA II), eritrositlerin sitozolünde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Arslan vd., 2011; Ozensoy vd., 2006). En aktif formun ise insan eritrositlerinde bulunan CA II olduğu bildirilmiştir (Phan vd., 2015). Bu enzim ya hücre içinde sitoplazmada bulunur ya da periplazma ile ilişkili olarak dışarı salgılanır (hücre dışı) ve neredeyse tüm yaşam formlarının hayatta kalması için gereklidir (Bose ve Satyanarayana, 2017).

Sığır eritrositlerinde de CA I ve CA II olmak üzere farklı enzimatik aktivitelere sahip iki sitozolik CA izoenzimi bulunmaktadır. Bunlardan CA I, CA II'ye göre nispeten daha düşük aktiviteye sahiptir (Çelik vd., 2023; Occhipinti ve Boron, 2019). α-tipi sığır CA'sı, insan eritrositlerinde bulunan CA II'de gözlemlenene benzer bir C-terminal düğüm yapısına sahip ve aktif bölgede üç histidine koordine edilmiş bir çinko iyonu içermektedir (Saito vd., 2004). Yapılan bir çalışmada (Nishita vd., 2005) memeli eritrositlerindeki CA II oranı CA I'e göre oldukça fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu iki izoenzim konformasyon olarak birbirine benzemesine rağmen, aktivitelerinde farklılık bulunmaktadır. CA II izoenzimi aktivite yönünden, CA I'den yaklaşık 100 kat daha fazla aktiftir (Deutsch, 1987; Wistrand ve Knuuttila, 1980).

α-CA II'nin konformasyonel yapısı ve katalitik bölgesi Şekil 2.1'de sunulmuştur.



Şekil 2. 1. Karbonik anhidraz II izoenzimi modeli, His-94, His-96, His-119 ve bir su molekülüne koordine olan Zn(II) iyonunu gösteren karbonik anhidrazın aktif bölgesi

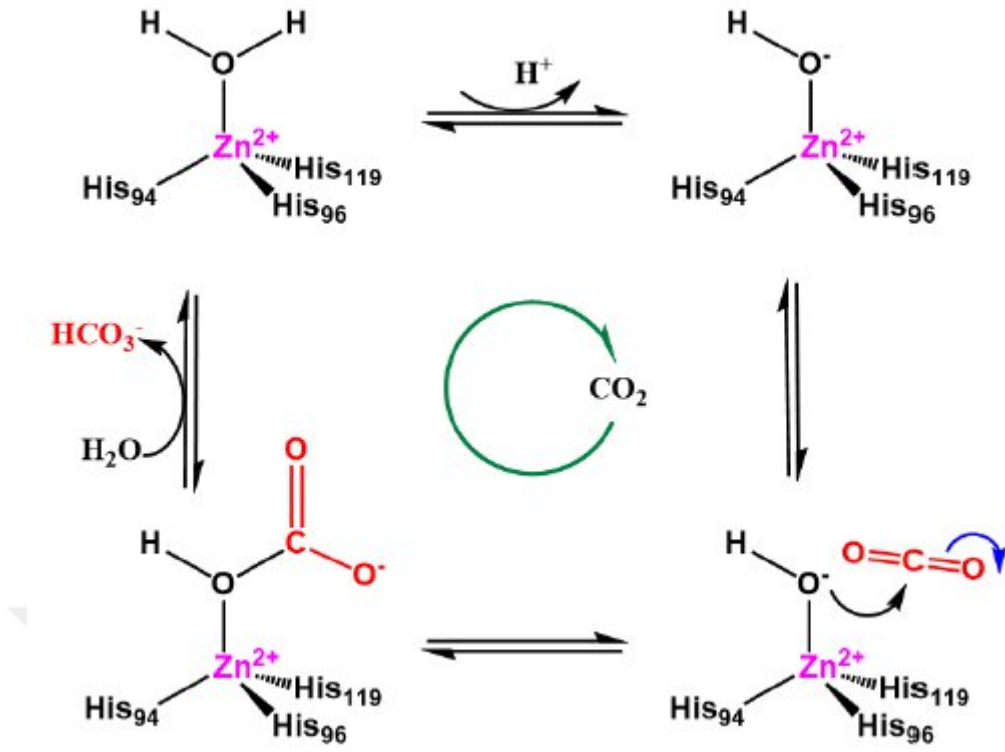
Kaynak: (Fisher vd., 2007; Rai vd., 2022)

CA II yapı olarak, üç histidin kalıntısı (His94, His96 ve His119) ve hidroksit iyonu (OH^-) tarafından koordine edilen Zn^{2+} aktif bölgesini taşır (Wu vd., 2020). α -CA'ların protein yapısına, CA'nın aktif bölgesinin yedi periferik α -helis ile çevrili on β -iplikten oluştuğu ve çinko (Zn^{2+}) iyonunu üç histidin kalıntısı (His94, His96 ve His119) ve bir su molekülü ile koordine eden merkezi bir β -sheet hâkimdir. Aktif bölge, neredeyse molekülün merkezine kadar ulaşan derin bir boşlukta yer alır (Effendi ve Ng, 2019).

Şekil 1'de Zn^{2+} , üç histidin kalıntısının (His94, His96 ve His119) imidazol nitrojen atomları ve CA'nın aktif merkezini oluşturan bir su molekülü ile çarpık bir tetrahedral yapı oluşturur. Bu tetrahedronun etrafında, CO_2 fiksasyonu için Val-121, Val-143, Leu-141, Trp-209 ve Leu-198 protein kalıntılarından oluşan ve aynı zamanda Thr-199 ve His-64'den oluşan bir proton transfer kanalı içeren hidrofobik bir cep vardır. Bu yapısal birimler, etkili katalitik CO_2 hidrasyonu elde etmek için birlikte çalışır (Zhu vd., 2023).

2.1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Hidratasyon Mekanizması

Yapısal farklılıklarına rağmen, CA'lar benzer etki mekanizmasına sahiptir. CO_2 'nin bikarbonat ve bir protona tersinir hidrasyon/dehidrasyonunu katalize eden iki aşamalı bir reaksiyonudur (Bose ve Satyanarayana, 2017; Silverman, 1982). Su molekülünün yakınında bulunan bir histidin kalıntısı, su molekülünden salınan bir protonu (H^+) kabul eder. Sadece çinko iyonuna bağlı hidroksit iyonu bırakır. Aktif bölge, hidroksit iyonuna bağlandığı CO_2 'yi bağlamak için özel ceplere sahiptir. Çinko iyon kompleksi karbondioksit hidrasyon aktivitesini kolaylaştırır. Ayrıca, çinkoya bağlı hidroksit tarafından karbonil grubuna nükleofilik saldırı gerçekleşir ve bu da HCO_3^- oluşumuyla sonuçlanır. Enzim daha sonra rejenere olur ve bikarbonat iyonu serbest kalır (Bose ve Satyanarayana, 2017; Silverman ve Lindskog, 1988). Yenilenen aktif bölgeler yeni CO_2 moleküllerinin hidrasyonunu katalize etmeye başlar (Wu vd., 2020). Katalizlenen CO_2 -hidratasyon mekanizması şekilde verilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. CA tarafından katalizlenen CO₂-hidratasyon mekanizması

Kaynak: (Wu vd., 2020).

2.2 Nanopartiküller

Nanopartiküller, boyutları 1 ile 100 nm arasında değişen çaplara sahip, inorganik veya organik malzemelerden yapılmış, yığın malzemelerle karşılaştırıldığında birçok yeni özelliğe sahip mikron altı parçacıklardır (Laconte vd., 2005; Wu vd., 2008).

Nanopartikül (NP) malzemelerin kullanımı, benzersiz boyutları ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle önemli avantajlar sunmaktadır (Akbarzadeh vd., 2012). Nano yapıları malzemeler, büyük yüzey/hacim oranı, mükemmel optik, elektriksel, manyetik ve katalitik özellikleri nedeniyle büyük ilgi çekmektedir (Majidi vd., 2016).

Nanopartiküller morfoloji, boyut ve şekil temelinde farklı türlere ayrılır.

1. Organik nanopartiküller
2. İnorganik nanopartiküller
 - Metal nanopartiküller
 - Metal oksit nanopartiküller

3. Seramik nanopartiküller

4. Biyolojik nanopartiküller veya biyonanopartiküller (Ijaz vd., 2020).

Nanoteknoloji uygulamaları, nano boyuttaki malzemelerin yığın halindeki benzerlerine kıyasla nano ölçekteki benzersiz özellikleri nedeniyle çeşitli alanlarda artan kullanımı ile ortaya çıkmıştır (Canaparo vd., 2021). Nanoteknolojinin diğer bilimlerle entegrasyonu, birçok endüstride teknolojiyi geliştirecek ve devrim yaratacak yeni araştırma alanlarının hızla gelişmesine neden olmuştur (Cheraghi vd., 2022). Bunlardan biride nanopartiküllerin enzim immobilizasyonunda kullanılmasıdır.

Parçacık boyutu daha küçük parçacıkların, daha büyük spesifik yüzey alanına sahip olması nedeniyle yüzeylerinde daha fazla enzimin immobilizasyonunu gerçekleştirerek substrat ve ürünün difüzyonu için daha az kısıtlama sağlamaktadır (Al-Dhrub vd., 2017). Bu durum da partiküllerin birim kütlesi başına daha fazla enzim yüklenmesi anlamına gelmektedir (Husain vd., 2011). Bunun dışında, nanoyapılı malzeme enzime çok noktalı bağlanma bölgeleri sunmaktadır. Böylece proteinin çözülmesini azaltarak immobilize enzimin kararlılığının çözünür formuna göre artırılır (Jia vd., 2003). Bu nedenle aktif bölgelere sahip biyokatalizörlerin yüksek oranda yüklenmesi sağlanır ve difüzyon artık enzimlerin kinetiğini sınırlamamaktadır (Sahoo vd., 2012). Nano malzemeler bu gibi özellikleri ile enzim immobilizasyonunda uygun taşıyıcı materyal olarak tercih edilmektedir (Yoon vd., 2000).

2.2.1 Manyetik Nanopartiküller

MNP'ler, birçok teknolojik uygulamada kullanım için kapsamlı bir şekilde araştırılan ilginç bir nanomalzeme sınıfıdır (Xu ve Lee, 2021). Makroskobik ölçekte benzerlerinden farklı özelliklere sahip olduğu iyi bilinmektedir. MNP'ler yalnızca süperparamanyetizma, yüksek duyarlılık vb. gibi özel manyetik özelliklere sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda benzersiz fiziksel özelliklere, biyouyumluluğa, kararlılığa ve diğer birçok ilgili özelliğe sahiptir (Liu vd., 2020; Khiabani vd., 2017).

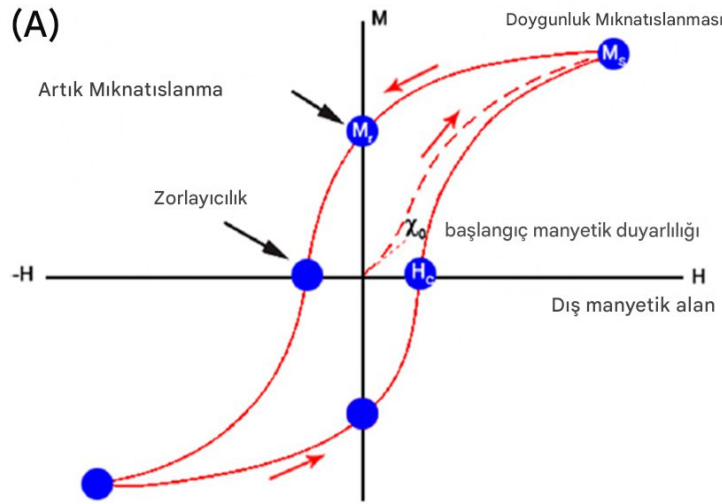
MNP'lerin sahip olduğu bu özellik dizisi, özellikle biyomedikal olmak üzere farklı alanlarda önemli ilerlemeler kaydedilmesini mümkün kılmıştır. Örneğin, hastalıkların tedavisi ve teşhisinde MNP'lerin rolü son yirmi yılda giderek daha önemli hale gelmiştir (Ortiz vd., 2022). Biyomedikal uygulamalarda, MNP'ler hipertermi tedavileri için ısıtmayı indüklemek, manyetik görüntüleme için kontrast etkileri sağlamak ve hedeflenen ilaç dağıtımının uzaktan kontrolü için kullanılmıştır (Xu ve Lee, 2021).

Manyetizma maddenin içsel bir özelliğidir. Bununla birlikte, bazı malzemeler diğerlerinden daha manyetiktir. Malzemelerin manyetik momentleri, elektronun yörünge ve spin hareketinden ve elektronların birbirleriyle olan etkileşimlerinden kaynaklanır. Tamamen dolu elektron kabuğuna sahip atom, hem yörünge hem de spin momentlerinin toplam iptalini yaşayacaktır. Bu nedenle, soy gazlar (He, Ne, Ar, vb.) gibi malzemeler kalıcı olarak mıknatıslanamaz (Sodipo ve Aziz, 2016).

Katılar, dış manyetik alana verilen tepkiye dayanarak üç ana grupta sınıflandırılabilir:

1. Diyamanyetizma
 2. Paramanyetizma
 3. Ferromanyetizma
- Antiferromanyetizma
 - Ferrimanyetizma

Antiferromanyetizma ve ferrimanyetizma, ferromanyetizmanın alt sınıflarıdır. Bununla birlikte, ferromanyetik ve ferrimanyetik malzemelerin nanoparçacıkları süperparamanyetik davranış sergiler (Sodipo ve Aziz, 2016).



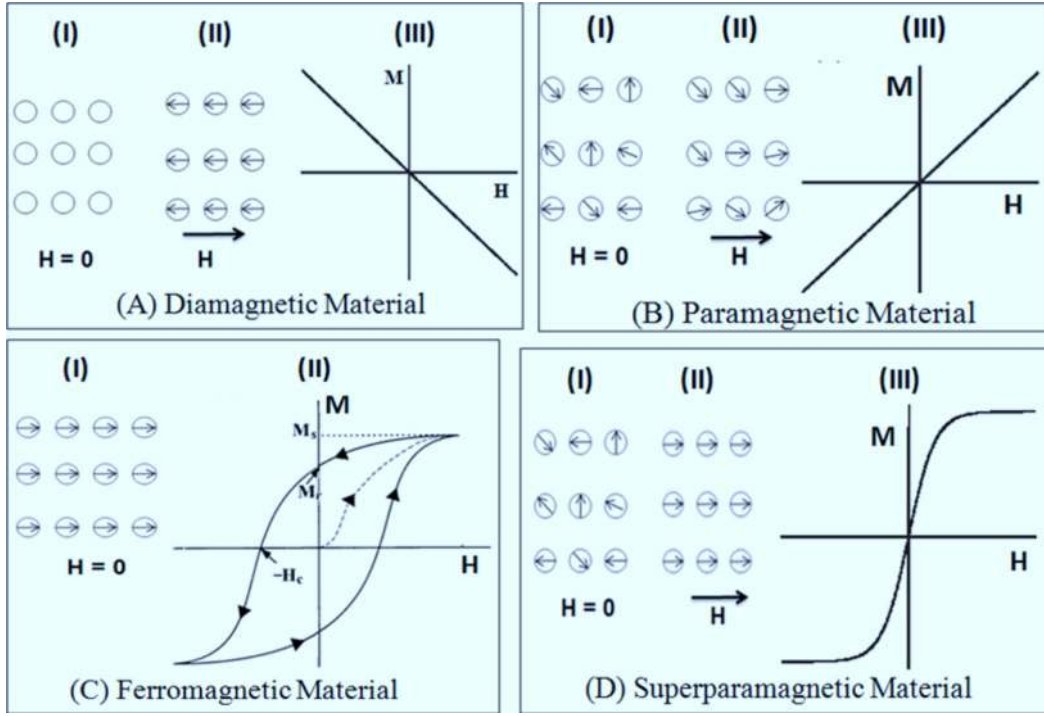
Şekil 2. 3. IONP'lerin tipik histerezis döngülerinin şematik sunumu (A)

Kaynak: (Wu vd., 2015)

En belirleyici özellikler, histerezis döngülerinden (M-H), eğrilerinden ölçülebilen manyetik alana tepki türü (ferromanyetik, paramanyetik, antiferromanyetik ve ferrimanyetik dahil) mıknatıslanmadır. Şekil 2.3(A)'da gösterildiği gibi, doygunluk mıknatıslanması (M_s),

remanans mıknatıslanması (M_r) ve koersivite (H_c) histerezis döngülerinden elde edilebilir. IONP'ler süperparamanyetik olduğunda, M-H eğrisi histerezis göstermemelidir ve ileri ve geri manyetizasyon eğrileri tamamen örtüşür ve neredeyse ihmal edilebilir (Wu vd., 2015).

Manyetizmanın çeşitli biçimleri Şekil 2.4'de H'ye karşı M grafiği ile özetlenebilir.



Şekil 2. 4. M manyetik momentinin H dış manyetik alanıyla etkileşiminin şematik gösterimi ((A): M manyetik momentinin uygulanan manyetik alana zıt yönde hareket ettiği ve H dış manyetik alanındaki artışla azaldığı diyamanyetik malzeme için M-H eğrisi. (B): M'nin kısmen alanın yönüyle aynı hizada olduğu ve H'deki artışla arttığı paramanyetik malzeme. (C): Manyetik alan yokluğunda M'nin paralel hizada olduğu ferromanyetik malzeme. Bu nedenle histerezis döngüsü remanans (M_r) ve koersivite (M_c) ile gözlenir. (D): Ferromanyetik madde ile benzer sigmoid şekli gösteren ancak histerezis döngüsü, remanans ve koersivitenin olmadığı süperparamanyetik malzeme)

Kaynak: (Sodipo ve Aziz, 2016)

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPION), 1 - 100 nm arasında boyutlara sahip ferromanyetik maddelerin inorganik nanomalzemeleridir. Nano boyutları sayesinde SPION süperparamanyetiktir (harici manyetik alan yokluğunda sıfır manyetizmaya sahip olma yeteneği). Bu, parçacıkların büyük manyetik duyarlılığa ve tek manyetik alana sahip olmasını sağlar. Süperparamanyetizma, ferromanyetik bir malzemenin boyutu, ortamdaki termal

enerjinin tüm kristalitin serbest dönüşünü indüklemeye yetecek kadar küçük olduğunda ortaya çıkar (Qiao vd., 2009). SPION ikiye ayrılabilir: Hidrodinamik boyutları 50 nm'den büyük olan SPION (kaplama dahil) ve ultra küçük süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (USPION) olarak adlandırılan 50 nm'den küçük boyutlara sahip olanlar (Sodipo ve Aziz, 2016).

SPION'lar söz konusu olduğunda, yalnızca herhangi bir manyetik alanın varlığında mıknatıs gibi davranırlar ve net dipol olmadan mıknatıslanmamış duruma geri dönerler. Bu nedenle, SPION'ların VSM grafiği, tutulma olmadığı anlamına gelen histerezis eğrisine sahip değildir. Bu durum süperparamanyetizma olarak adlandırılır ve biyolojik bir sistem içinde çalışmak için çok ideal bir özelliktir, çünkü her yerde güçlü manyetik alanlara tepki verebilir ve manyetik bir alana sokulduğunda ısı ürettiği için sistemlerle bile termo dedektörler tarafından tespit edilebilir (Samrot vd., 2021).

Farklı MNP türleri arasında, yüzey modifikasyonu, sentez kolaylığı ve düşük toksisitesi nedeniyle SPION'lar birçok alanda en popüler ve yaygın olarak kullanılanlardır (Zhu vd., 2018).

2.2.2 Demiroksitler

Manyetik malzemeler arasında, demir oksit NP'ler büyük biyoyumlulukları nedeniyle umut vadeden nanomalzemelerdir (Xu ve Lee, 2021). IONP'ler, çapları 1 ila 100 nm arasında değişen en yaygın inorganik kimyasal bileşiklerden biridir.

Demir oksitler, doğada yaygın olarak bulunan ve laboratuvarında kolayca sentezlenebilen bileşiklerdir. Son on yılda, manyetik IONP'lerin sentezi sadece temel bilimsel ilgisinden dolayı değil, aynı zamanda hedefli ilaç dağıtımı, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), manyetik hipertermi ve termoablasyon, biyoseparasyon ve biyoalgılama gibi birçok teknolojik uygulaması için de yoğun bir şekilde geliştirilmiştir (Wu vd., 2015). Özellikle, MNP'lere dayalı biyolojik uygulamalar büyük ilgi görmüştür çünkü MNP'ler diğer malzemelere göre benzersiz avantajlar sunmaktadır. Örneğin, manyetik IONP'lerin üretimi ucuzdur, fiziksel ve kimyasal olarak kararlıdır, biyolojik olarak uyumludur ve çevresel olarak güvenlidir (Lu vd., 2007; Wu vd., 2015).

MIONP'ler süperparamanyetik davranışa, iyi biyoyumluluğa ve düşük toksisiteye sahip bir tür MNP'dir (Ling vd., 2019). Hemoglobin şelatörü Fe(II) atomlarından oluştuğu için demir oksit insan sistemiyle bir dereceye kadar biyolojik olarak uyumludur (Samrot vd., 2021).

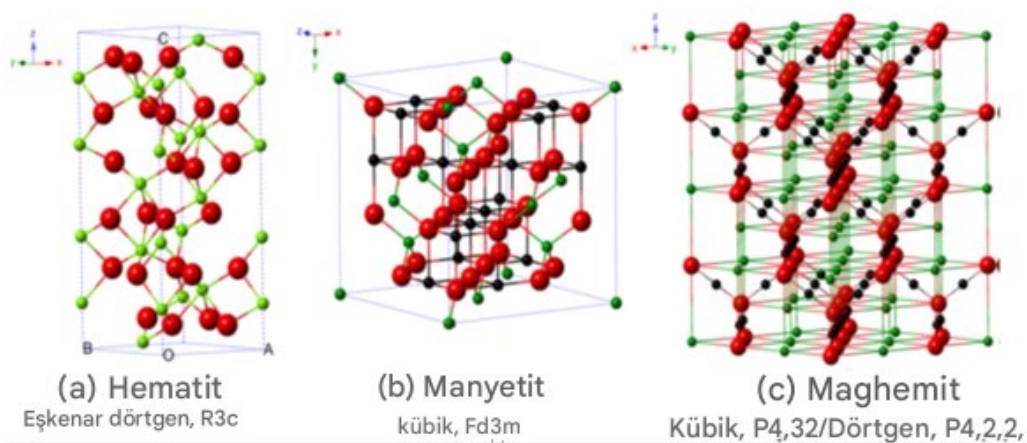
Doğada demir oksit, hidroksit ve oksihidroksit'in 16 çeşidi olduğu bilinmektedir. Bunlar içinde 8 çeşit demir oksit vardır. Bu demir oksitler Tablo 2.4'de verilmiştir (Cornell vd., 2003; Gossuin vd., 2009).

Tablo 2. 4. Başlıca demir oksitler

Mineral adı	Formül
Magnetit	Fe_3O_4
Maghemit	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Hematit	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Lepidocrocite	$\gamma\text{-FeOOH}$
Goethite	$\alpha\text{-FeOOH}$
Akaganeite	$\beta\text{-FeOOH}$
Ferroksit	$\delta\text{-FeOOH}$
Ferrihidrit	$\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Kaynak: (Cornell vd., 2003; Gossuin vd., 2009)

Her ne kadar çok sayıda demir oksit biliniyor olsa da, “demir oksitler” terimi genellikle üç türü ifade eder (Xu ve Lee, 2021). Bu demir oksitler arasında hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), manyetit (Fe_3O_4) ve maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), sıcaklık kaynaklı faz geçişini içeren polimorfizmleri nedeniyle çok umut verici popüler adaylardır. Bu üç demir oksidin her biri, belirli teknik ve biyomedikal uygulamalar için uygunluk sağlayan benzersiz biyokimyasal, manyetik, katalitik ve diğer özelliklere sahiptir (Wu vd., 2015).



Şekil 2. 5. Hematit, manyetit ve maghemitin kristal yapısı ve kristalografik verileri (siyah top Fe^{2+} , yeşil top Fe^{3+} ve kırmızı top O^{2-})

Kaynak: (Wu vd., 2015)

Demir oksitlerin kristal yapısı esasen oktahedral veya tetrahedral interstisyel bölgelerdeki oksijen anyonları ve demir katyonları açısından tanımlanabilir. Hematitte, oksijen iyonları hekzagonal yakın paketlenmiş bir düzende bulunurken, Fe (III) iyonları oktahedral bölgeleri işgal eder. Manyetit ve maghemitte, oksijen iyonları kübik yakın paketlenmiş bir yapı olarak düzenlenmiştir. Manyetit ve maghemit arasındaki yakın benzerlikler, XRD gibi tipik spektroskopik kullanılarak ayırt edilmelerini zorlaştırır (Kuhn vd., 2002). Hematit (α -Fe₂O₃) (012), (104), (110), (024) ve (116)'da ana kırınım desenine sahiptir (Rafi vd., 2015). Manyetit, oktahedral ve tetrahedral bölgeler arasında rastgele dağılmış Fe(III) iyonlarından oluşan ters spinel bir yapıya sahipken, Fe(II) iyonları oktahedral bölgelerde bulunur (Klotz vd., 2008). Kübik kristalin manyetit (220), (311), (400), (511) ve (440) şeklinde yansıma deseni gösterir (Singh vd., 2018). Maghemit için ekstra pikler genellikle (210) ve (211)'de gözlenir (Kim vd., 2012). Katyon alt kafesinin boşluklarında farklılıklar olan bir spinel yapı oluşturur. Burada, alanların üçte ikisi Fe(III) iyonları ile doludur ve düzenli bir şekilde iki dolu alanın ardından bir boş alan gelecek şekilde düzenlenmiştir (Samrot vd., 2021).

2.2.2.1 Hematit (α -Fe₂O₃)

Hematit, demir oksitlerin bilinen en eskisidir ve kayalarda ve toprakta yaygın olarak bulunur. Ferrik oksit, demir seskioksit, kırmızı aşı boyası, speküler demir cevheri, böbrek cevheri veya martit olarak da bilinir (Singh, 2024). Ortam koşulları altında en kararlı demir oksit ve n tipi yarı iletken olan hematit (α -Fe₂O₃), düşük maliyeti ve korozyona karşı yüksek direnci nedeniyle katalizörlerde, pigmentlerde ve gaz sensörlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, son birkaç on yılda hem temel bilimsel ilgi alanları hem de teknolojik uygulamalar için yoğun bir şekilde takip edilen manyetit (Fe₃O₄) ve maghemit (γ -Fe₂O₃) sentezi için bir başlangıç malzemesi olarak da kullanılabilir (Wu vd., 2015).

2.2.2.2 Maghemite (γ -Fe₂O₃)

Şekil 2.5(c)'de gösterildiği gibi, γ -Fe₂O₃'ün yapısı kübiktir; her bir maghemit birimi 32 O²⁻ iyonu, 21½ Fe³⁺ iyonu ve 2½ boşluk içerir. Oksijen anyonları kübik yakın paketlenmiş bir dizilime yol açarken, ferrik iyonlar tetrahedral bölgeler (birim hücre başına sekiz Fe iyonu) ve oktahedral bölgeler (kalan Fe iyonları ve boşluklar) üzerinde dağılmıştır. Bu nedenle, maghemit tamamen oksitlenmiş manyetit olarak düşünülebilir (Wu vd., 2015).

2.2.2.3 Manyetit (Fe₃O₄)

Şekil 2.5(b)'de gösterildiği gibi, Fe₃O₄, 32 O²⁻ iyonuna dayanan ve yakın istiflenmiş yüz merkezli kübik spinel yapıya sahiptir. Fe₃O₄, hem iki değerlikli hem de üç değerlikli demir

içermesi bakımından sayılan demir oksitlerin birçoğundan farklılık göstermektedir. Fe_3O_4 , tüm Fe^{2+} iyonlarının oktahedral bölgelerin yarısını işgal ettiği ve Fe^{3+} 'ün kalan oktahedral bölgeler ve tetrahedral bölgeler arasında eşit olarak bölündüğü kübik yakın paketlenmiş bir oksit iyonları dizisinden oluşan kübik bir ters spinel yapıya sahiptir. Stokiyometrik manyetitte $\text{FeII/FeIII} = 1/2$ 'dir ve iki değerli demirler, bazen tamamen bazen de kısmen başka iki değerli iyonlarla (Co, Mn, Zn, vb.) yer değiştirebilir. Böylece Fe_3O_4 hem n tipi yarı iletken, hem de p tipine sahip yarı iletken olabilmektedir (Wu vd., 2015).

Genel olarak, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oda sıcaklığında zayıf ferromanyetizmaya sahipken, doygunluk mıknatıslanması genellikle 1 emu g^{-1} 'den daha küçüktür. Bununla birlikte, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ve Fe_3O_4 oda sıcaklığında ferrimanyetizma sergiler ve doygunluk manyetizasyonu 92 emu g^{-1} 'e ulaşır (Wu vd., 2015). Ayrıca Fe_3O_4 manyetit, ferromanyetiktir, boyut 15 nm 'den küçük olduğunda süperparamanyetiktir, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematit, zayıf ferromanyetik veya antiferromanyetik), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit, ferrimanyetiktir) (Singh, 2024).

Tüm demir oksitler arasında, manyetit (Fe_3O_4) üstün manyetik özellikleri nedeniyle daha fazla ilgi çekmiştir. Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülleri, yumuşak ferromanyetizma, yarı metaliklik ve biyouyumluluk gibi değerli özellikleri nedeniyle malzeme bilimi, kimya ve fizik alanlarında çekici nanomalzemelerdir. Farklı boyut, geometri ve nano mimarilere sahip çeşitli Fe_3O_4 NP'leri yapıları sentezlenmiş ve ilgili özellikler biyomedikal cihazlar, elektronik cihazlar, çevre çözümleri ve enerji uygulamaları dahil olmak üzere birden fazla uygulama alanındaki hedeflerle incelenmiştir (Xu ve Lee, 2021).

Bu temel özelliklerinin yanı sıra doğada bol miktarda bulunması, ucuz olması ve çevre dostu olması da Fe_3O_4 bazlı NP'lerin geniş ölçekli uygulamalarına olanak veren ek avantajlardır.

Fe_3O_4 NP'ler süperparamanyetizma gibi önemli manyetik özellikleri sayesinde geniş bir uygulama yelpazesi sağlamada önemli bir rol oynar. Bu olgu, ferromanyetik veya ferrimanyetik nanoparçacıkların yüksek manyetik duyarlılıkla birlikte sıfır manyetik remanansa sahip olacağını göstermektedir. Fe_3O_4 NP'ler, güçlü süperparamanyetik özellikleri ve kolay hazırlanma süreçleri nedeniyle öne çıkmaktadır ve bu nedenle araştırma alanında artan bir ilgi görmektedir (Al-Khamees, 2021).

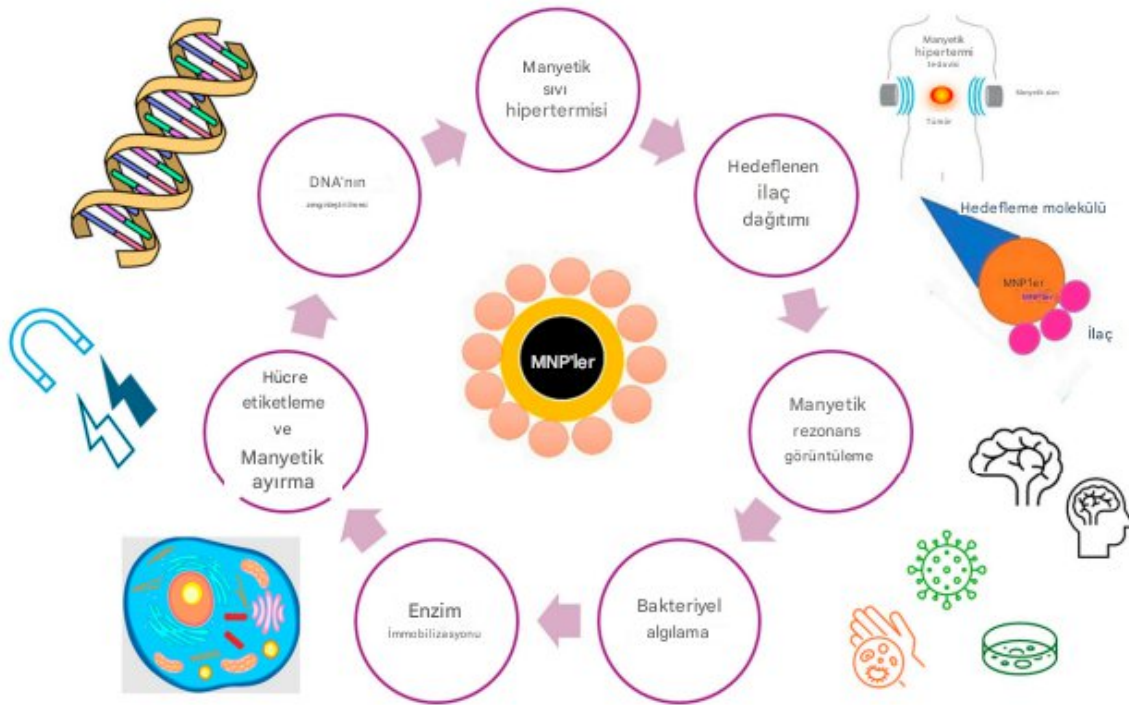
2.2.3 Manyetik Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Manyetik nanopartiküllerin kullanılması, araştırmacıların biyo-katalizörlerin pahalı ayrılması ve geri kazanılması gibi engellerin üstesinden gelmesine yardımcı olmuştur. Bu manyetik parçacıklar çözünmez ve harici bir mıknatıs kullanılarak biyo-katalizörün reaksiyon karışımından kolay ve verimli bir şekilde ayrılmasını sağlar; dolayısıyla işletme maliyetini azaltır (Sahoo vd., 2012). Bu nedenle MNP'ler DNA (deoksiribo nükleik asit), enzim ve antikorların immobilizasyonu sonrasında biyosensörler ile birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Simsek-Ege vd., 2002).

Manyetik nanoparçacıkların biyomedikal uygulamaları aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Liu vd., 2020).

- Enzim immobilizasyonu
- Saflaştırma
- Gen iletimi (magnetofeksiyon)
- Biyosensör
- Antibakteriyel aktivite
- Hücre ayırıştırma
- Manyetik Rezonans Görüntüleme
- Manyetik Hipertermi
- Hedefe yönelik ilaç dağıtımı
- In vitro biyoseparasyon
- Doku mühendisliği
- Radyoterapi
- Çevresel iyileştirme

Manyetik nanokompozitlerin gelişmesiyle birlikte, uygulama alanları da hızla genişlemektedir. Bu nedenle, hala net bir sınıflandırma bulunmamaktadır.



Şekil 2. 6. MNP'lerin çeşitli biyomedikal uygulamaları

Kaynak: (Vasić vd., 2024).

Uygun yüzey kimyasına sahip SPIONs, manyetik rezonans görüntüleme kontrast geliştirme, doku onarımı, immünoassay, biyolojik sıvıların detoksifikasyonu, hipertermi, ilaç dağıtımı ve hücre ayrıştırma gibi çok sayıda in vivo uygulama için deneysel olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Vasić vd., 2024). Manyetik nanopartiküller ilaçlara, proteinlere, enzimlere, antikorlara veya nükleotidlere bağlanabilir ve harici bir manyetik alan kullanılarak bir organa, dokuya veya tümöre yönlendirilebilir veya hipertermide kullanılmak üzere alternatif manyetik alanlarda ısıtılabilir (Bertoni vd., 2011).

2.2.4 Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi

MNP'lerin şekil, boyut ve morfolojilerinin özellikleri ve potansiyel uygulamaları üzerinde büyük etkisi olduğu iyi bilinmektedir. Bu bağlamda, yeni morfolojilere sahip nanoyapılı malzemelerin kontrollü sentezi çok önemlidir (Majidi vd., 2016). Bu nedenle, araştırmacılar ayarlanabilir ve istenen özelliklere sahip MNP'leri farklı yollardan sentezlenmeye odaklanmaktadır (Zhu vd., 2018). Nanoparçacıklarda istenen boyuta göre uygun bir hazırlama yöntemi seçilmelidir (Liu vd., 2020).

Şimdiye kadar, bir dizi sentez yolu, manyetik IONP'leri hazırlamak için bildirilmiştir (Zhu vd., 2018). Bunlar:

1. Ortak çöktürme (Birlikte çökeltme)
2. Hidrotermal
3. Termal ayrışma
4. Mikroemülsiyon
5. Elektrokimyasal biriktirme
6. Lazer pirolizi
7. Solvotermal yöntemler
8. Sonokimyasal yöntemler
9. Kimyasal buhar biriktirme
10. Mikrodalga destekli yöntem
11. Aerosol pirolizi
12. Sol-Jel

Bazı yöntemlerin dezavantajları ve avantajları listelenmiştir (Tablo 2.5).

Tablo 2. 5. Demir oksit nanopartiküllerinin (IONP) başlıca hazırlama yöntemlerinin karşılaştırılması

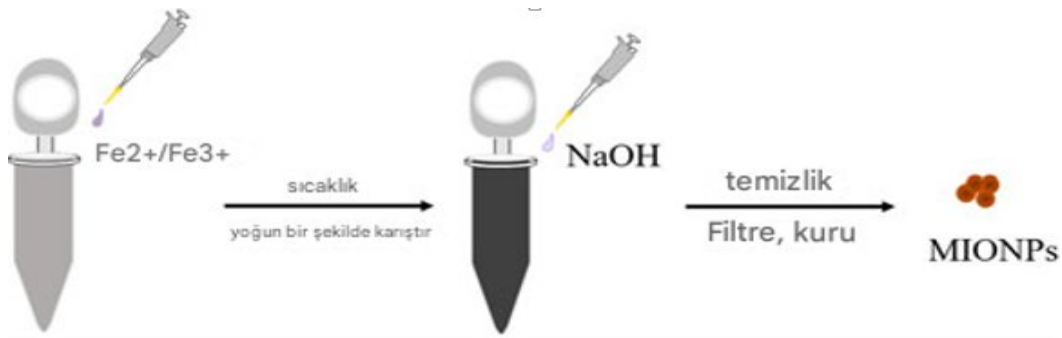
Yöntem	Avantajları	Dezavantajları
Ortak Çöktürme	Basit ve verimli	Boyut dağılımı, zayıf kristallik ve agregasyon
Hidrotermal	Partikül boyutunu ve şeklini kontrol etmek kolay	Uzun reaksiyon süresi, yüksek reaksiyon sıcaklığı, yüksek basınç
Termal Ayrışma	Boyut ve şekillerin iyi kontrolü, yüksek verim	Yüksek reaksiyon sıcaklığı
Mikroemülsiyon	Partikül boyutunun kontrolü, oldukça homojen	Düşük verim, büyük miktarda çözücü gerekli ve zaman alıcı
Sol-Jel	Boyut ve yapının hassas kontrolü	Nispeten pahalı, uzun reaksiyon süresi
Aerosol/Buhar fazı	Yüksek verim	Aşırı yüksek sıcaklıklar
Elektrokimyasal	Boyutun kolay kontrolü	Tekrarlanabilirlik

Kaynak: (Zhu vd., 2018)

Kullanılan sentez yöntemleri arasında, kimyasal Ortak Çöktürme (Birlikte Çökeltme), hem laboratuvar amaçlı hem de endüstriyel prosesler için daha büyük ölçekte oldukça avantajlı olması nedeniyle en yaygın yöntemdir. Proses, termal ayrıştırma ve hidrotermal gibi yöntemlere kıyasla kolay işleme, yüksek verimli ürün, düşük sıcaklık ve reaksiyon süresine sahiptir ve inorganik reaktanlar ve su gibi çevre dostu çözücüler kullanır (Al-Khamees, 2021).

2.2.4.1 Ortak çöktürme (Birlikte çökeltme)

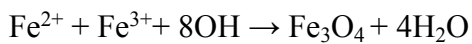
Ortak Çöktürme yöntemi, Şekil 2.7'de gösterildiği gibi Fe^{2+} tuzu, Fe^{3+} tuzu (genellikle klorür, nitrat veya sülfat) ve baz çöktürücü (örneğin, sodyum hidroksit veya amonyaklı su) içeren çok bileşenli katyonik yöntem olarak da adlandırılır (Ling vd., 2019; Suh vd., 2012).



Şekil 2. 7. Ortak Çöktürme yöntemi ile MIONP sentez sürecini gösteren şema

Kaynak: (Ling vd., 2019)

Bu yöntemde, demir öncülleri sodyum hidroksit, amonyak vb. gibi zayıf bir indirgeyici madde ile demir oksitlere indirgenir. Reaksiyon genellikle denklem ile verilir.



Oluşan demir oksit nanopartiküllerinin yapısı, kullanılan indirgeyici maddelerin pH gücüne, reaktan konsantrasyonuna, indirgeyici maddelere ve indirgeyici maddelerin eklenme hızına bağlı olarak oldukça farklılık göstermektedir. Parçacık boyutu ayrıca sıcaklık, pH, iyonik güç ile kontrol edilebilir ve değiştirilebilir (Samrot vd., 2021).

Ortak çöktürme yöntemiyle MIONP'lerin hazırlanması, kolay kullanım, düşük ekipman gereksinimi, düşük demir tuzu ve çöktürücü fiyatı, kısa süreç, nispeten yüksek verim ve endüstriyel üretime kolay yayılma gibi birçok avantaja sahiptir. Üretilen MIONP'ler, yüzeylerinde modifiye edilmeye elverişli olan küreye benzer. Bununla birlikte, bu yöntemde meydana gelen reaksiyon hızlı olduğu için şiddetli aglomerasyon, geniş bir partikül boyutu dağılımı (PSD) aralığı ve bu MIONP'lerin düzensiz şekli de gözlenmektedir bu nedenle tek dağılmış MNP elde etmek zordur (Ling vd., 2019).

2.2.5 Demir Oksitin (Fe_3O_4) Yüzey Modifikasyonu

MIONP'ler büyük bir yüzey/hacim oranına sahip oldukları için yüksek yüzey enerjileri sergilemektedirler, bu tür enerjiyi en aza indirmek için de Van der Waals çekim kuvvetleri ve nanopartiküller arasındaki dipol-dipol etkileşimleri artar ve bir araya gelerek aglomerasyon (topaklanma) oluştururlar (Singh, 2024). Ayrıca, çıplak MIONP'ler yüksek kimyasal aktiviteye sahiptir, bu da havada kolayca oksitlenmelerini sağlar. Bu iki durum hem dağılıbilirlik kaybı (kolloidal özellik) hem de manyetik özelliklerde bir düşüşe yol açar (Ling vd., 2019). Ne yazık ki, SPION'ların süperparamanyetik özellikleri aglomerasyon meydana geldiğinde bozulur. Nanopartiküllerin kolloidal stabilitesini korumak ve etkinliğini artırmak için nanopartikül yüzeyinin modifiye edilmesi gerekir (Samrot vd., 2021).

Kaplama yöntemi, organik veya inorganik malzemeleri IONP'lerin yüzeyine konjuge etmek için en yaygın yüzey modifikasyonu yaklaşımıdır. Bu yöntem yalnızca IONP'lerin oksidasyonunu ve aglomerasyonunu önlemekle kalmaz, aynı zamanda daha fazla işlevselleştirme olanağı da sağlar. Manyetik IONP'lerin işlevselleştirilmesi, fizikokimyasal özelliklerini iyileştirebilir ve bunları kataliz ve biyotıp alanı için ideal adaylar haline getirebilir (Zhu vd., 2018).

Bu nedenle, MIONP'lerin özelliklerini iyileştirmek ve uygulama alanlarını genişletecek çok işlevli MIONP'ler elde etmek için MIONP'lerin yüzey modifikasyonu için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Ling vd., 2019).

İnorganik metal oksitler (küçük moleküller) [SiO_2 ve soy metal gibi], organik küçük moleküller [Amino silane, sitrik asit ve oleik asit (OA) gibi] veya organik polimer [kitosan (CS), dekstran, polietilenimin (PEI) ve polietilenglikol (PEG) ve nişasta gibi] MIONP'leri modifiye etmek için kullanılmaktadır (Ling vd., 2019).

2.2.5.1 İnorganik metal oksitler

SiO_2 (TEOS): Kararlı kimyasal özelliklere, biyoyumluluğa, düşük toksisiteye, asit direncine ve yüksek sıcaklık direncine sahip asidik bir oksit olan SiO_2 , MIONP'leri modifiye etmek için tercih edilen malzemelerden biridir; MIONP'ler, MIONPs@ SiO_2 nanopartikülleri olarak da adlandırılan çekirdek-kabuk yapısı olan SiO_2 ile kaplanmaktadır (Ling vd., 2019). Dielektrik özelliği nedeniyle silika, dipol-dipol etkileşimlerini perdeleyebilir ve çekirdek SPION'un aglomerasyonunu önleyebilir. Silika, kompozit nanopartiküllerin suda veya polar çözücülerde dağılmasını sağlayan silanol (Si-OH) fonksiyonel grubuna sahiptir. Dahası, Si-

OH diğer fonksiyonel gruplarla modifiye edilebilir veya biyokonjugasyon için bağlanma bölgesi sağlayabilir (Sodipo ve Aziz, 2016).

SiO₂ sadece MIONP'lerin elektrostatik itmesini engellemekle kalmaz, aynı zamanda hidroksil grupları bakımından da zengindir. Bu hidroksil grupları MIONP'ler ile proteinler, antikorlar, DNA veya bir dizi biyoaktif molekül arasında kovalent köprülerin oluşumunda yer alır (Ling vd., 2019). Silika, çeşitli biyolojik ligandların IONP yüzeyine bağlanmasına yardımcı olur (Wu vd., 2015).

Son yıllarda, MIONPs@SiO₂ nanopartiküllerini sentezlemek için Stöber yöntemi ve sol-jel yöntemi olmak üzere geliştirilmiş yöntemler kullanılmıştır (Ling vd., 2019). Bu yöntemlerde, Tetraetilortosilikat (TEOS), OH grupları aracılığıyla IONP'lerin yüzeyine kolayca bağlanan en yaygın kullanılan silanlardır (Wu vd., 2015). Tetraetilortosilikat (TEOS) kullanılarak silisyum oksit nanopartikülleri sentezlenir ve bunlar MNP üzerinde Silanol grubunu oluşturur.

MNP'lerin silanizasyonu, MNP'lerin yüzeyine, fonksiyonel gruplar eklemek için en yaygın kullanılan teknik olarak ortaya çıkmaktadır. Buna ek olarak, yüzey modifikasyonu pahalı ekipmanlara ihtiyaç duymadan sulu veya organik ortamda orta sıcaklıklarda basit bir şekilde gerçekleştirilebilir, böylece iç manyetik çekirdeği korumak için ideal bir yöntemdir (Xu vd., 2014).

MNP'lerin yüzey modifikasyon mekanizması, nanopartiküller ve silan ligandı arasında Fe-O-Si bağının oluşumunu içerir. Silan molekülleri ilk olarak hidroliz yoluyla aktive edilir ve bunu silanolün Si-OH grupları ile demir MNP'lerin yüzeyinde bulunan OH grupları arasındaki polikondenzasyon reaksiyonları izleyerek MNP'lerin yüzeyinde kararlı bir bağ oluşmasını sağlar (Faridi vd., 2017).

2.2.5.2 Organik küçük moleküller

Amino silan (APTES): Bir amino silan bağlama maddesi olan 3-Aminopropiltrietoksilan (APTES), oda sıcaklığında iyi dağılılabilirlik, süperparamanyetik davranış ve güçlü mıknatıslanma gösteren fonksiyonel MIONP'ler üretmek için MIONP'lerin aminlenmesinde kullanılmaktadır (Ling vd., 2019). APTES, -NH₂'yi tutturmak için en yaygın silandır.

Küçük bir molekül olarak amino silan, genellikle metal iyonları, polimerler, biyomoleküller veya diğer biyolojik varlıklarla sonradan bağlantı kurmak için

işlevselleştirilmiş uç grupları doğrudan çıplak IONP'lerin yüzeyine modifiye etmek ve vermek için kullanılır. Silan modifiye manyetik IONP'ler, çıplak IONP'lerin doygunluk mıknatıslanma değerlerini de korumaktadır, burada azalan değer genellikle 5 emu g^{-1} 'den azdır. Bu durum, silan modifikasyonundan sonra manyetik ayırımın etkilenmediğini göstermektedir. Ek olarak, silan ligand-değişim reaksiyonu hidrofobik IONP'lerin suda dağılabilir NP'lere dönüşmesini sağlayabilir (Wu vd., 2015).

APTES yani silan birleştirme maddeleri, MNP'lerin yüzeyi üzerine doğrudan kaplanarak yüksek yoğunluktaki yüzey fonksiyonel grupları sağlar (Liu vd., 2004). APTES'in bir silan bağlama maddesi olan bir terminal amin grubu (NH_2) ile kullanılması proteinlerin desteğin yüzeyine kovalent bağlanması için faydalı olabilir (Chong ve Zhao, 2003).

2.3 Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu, enzim moleküllerinin substrat veya ürünlerden farklı olarak bir katı matrikse/desteğe hapsedilmesi olarak tanımlanabilir (Sirisha vd., 2016). “İmmobilize enzimler”, lokalize edilen ve sürekli olarak kullanılabilen enzimler olarak tanımlanmıştır (Brena vd., 2013). İmmobilizasyon, ana bileşenleri enzim, enzimin desteğe bağlandığı matris ve bağlanma şekli olan bir sistem oluşturur (Khan, 2021). Enzim immobilizasyonu, çözünür enzimlerin katalitik aktivitesini, kararlılığını ve yeniden kullanılabilirliğini artırmaktadır (Das ve Mishra, 2023; Mohidem vd., 2023). İmmobilize enzimler çözünmeyen bir formdur ve kolayca geri kazanılabilirler (Mohidem vd., 2023; Zhang vd., 2023).

Enzim immobilizasyonu, enzimin reaksiyon karışımından daha kolay ayrılmasını sağlar ve böylece sonraki işlemleri basitleştirir. Bu teknoloji, enzimi zorlu reaksiyon koşulları nedeniyle bozulmaya veya inaktivasyona karşı koruyarak daha sağlam ve çeşitli uygulamalarda kullanılmaya uygun hale getirir (Mohidem vd., 2023). Ayrıca enzim immobilizasyonunun bir sonucu olarak, termal kararlılık ve depolama kararlılığı gibi bazı özellikler iyileşmektedir (Abdel-Hameed vd., 2022; Mohidem vd., 2023). İmmobilize enzimler çevresel değişikliklere karşı daha yüksek dirence sahiptir. İmmobilizasyonun birincil faydası, enzimleri zorlu çevre koşullarından (örn. yüksek sıcaklıklar, aşırı pH değerleri, vb.) korumaktır. İmmobilize enzimler, su arıtma tesislerinde kullanılmanın yanı sıra tıp, gıda, deterjan, tekstil ve ilaç endüstrileri gibi çeşitli büyük ölçekli endüstrilerde de kullanılabilir (Maghraby vd., 2023).

Enzim immobilizasyonunun yine de bazı sınırlamaları vardır, yani: taşıyıcıların ekonomik maliyeti, immobilizasyon metodolojilerinin ekonomik maliyeti ve karmaşıklığı artı aktivite tükendiğinde immobilize edilmiş biyokatalizörün atılmasının ekonomik maliyeti ve karmaşıklığı; kütle transferi sınırlamaları, immobilizasyon prosedürleri ve kirlenme nedeniyle enzim inaktivasyonu sonucu serbest enzimlerle karşılaştırıldığında aktivite azalmasıdır (Bié vd., 2022; Fernández ve Paradisi, 2020). Ayrıca birçok durumda, immobilizasyon bir dizi faktöre bağlı olarak belirgin bir aktivite azalmasına yol açar: enzim konformasyon değişikliği (muhtemelen enzim dönüşümünde azalma), taşıyıcıda substrat ve ürünlerin bölünmesi (Fernández ve Luis, 2021; Secundo, 2013).

İmmobilizasyon yapılırken dikkat edilmesi gereken hususlar; aktif merkezin bileşimindeki fonksiyonel gruplar, enzimin immobilizasyonu sürecinde yer almamalıdır. Aksi takdirde enzim aktivitesi inaktivasyon nedeniyle kaybolabilir. Ayrıca enzim proteininin üçüncül yapısı hidrofilik, hidrofobik ve iyonik gibi nispeten zayıf bağlayıcı kuvvetler tarafından korunduğundan, immobilizasyon reaksiyonunun hafif koşullar altında gerçekleştirilmesi zorunludur (Khan, 2021).

2.3.1 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Materyalleri

Kullanılan yönteminin yanı sıra, taşıyıcının kendisi de immobilizasyon başarısında kilit rol oynamaktadır. Taşıyıcı iyi bir stabiliteye sahip olmalı, önemli ölçüde gözenekli yapılar içermeli ve immobilizasyon verimliliğini en üst düzeye çıkarmak için geniş bir yüzey alanına sahip olmalıdır. Taşıyıcı malzeme ayrıca enzim immobilizasyonunu kolaylaştırmak için kolayca modifiye edilebilmelidir. Yani desteğin temel işlevi, enzimlerin yapılarını stabilize etmek ve buna bağlı olarak onları çevreleyen ortamlara karşı daha dirençli hale getirerek etkinliklerini büyük ölçüde korumaktır (Jesionowski vd., 2014; Maghraby vd., 2023). Ayrıca, düşük maliyetli, bol miktarda ve çevre dostu olmalıdır (Liu ve Dong, 2020; Maghraby vd., 2023).

Literatürde, enzim taşıyıcıları hakkında birçok rapor mevcuttur. Bu yeni teknoloji için matrisler veya destekler şu şekilde kategorize edilebilir: Organik ve inorganik bileşikler, nanomalzemeler, hibrit malzemeler (Mohidem vd., 2023). İnorganik desteğin organik muadillerine kıyasla avantajları kimyasal, mekanik ve termal direnç, gözeneklilik, daha fazla yeniden kullanılabilirlik ve yeni immobilize enzimin stabilitesini garanti eden sertliktir.

Organik bazlı destek malzemeleri pH ve basınca karşı daha hassastır ve bakteri ve mantar büyümesi için uygun değildir (Yuan vd., 2022).

Tablo 2. 6. Enzim İmmobilizasyonda kullanılan destek materyalleri

Organik Materyaller		İnorganik Materyaller	Nanomateryaller	Hibrit Nanomateryaller
Doğal	Sentetik	-hidroksiapatit -altın -demir oksit -zirkonya -titanya -silika -gümüş -çinko oksit -alümina -selit -kil	-Titanya nanopartikülleri -Nano gözenekli alümina -Slika nanopartikülleri -Metal oksit nanopartikülleri -Nano boyutlu zirkonyum -Kitosan nanopartikülleri -Nanoselüloz	-Selüloz nanokristal/altın -Poli (karboksibetain metakrilat)-greftlenmiş silika nanopartikül -Suda çözünen polimerlere sahip gümüş Nanopartiküller -Manyetik AuNP@Fe ₃ O ₄ -Selüloz kaplı manyetit(CCM) nanopartikül -Zirkonya kaplı silika -Kitosan-mezapor silika
-kitosan -aljinat -reçine -kolajen -jelatin -dekstran -nişasta -karragenan -agaroza -protein -selüloz -aktif karbon -agar -kitin	-polivinil alkol -poliüretan köpük -poliakrilonitril polietilen -polipropilen membran -poliakrilamid			

Kaynak: (Mohidem vd., 2023)

Sıralayacak olursak ideal taşıyıcı bir matris, şu özelliklere sahip olmalıdır:

- (i) ekonomik olmak
- (ii) inertlik
- (iii) stabilite
- (iv) fiziksel güç
- (v) enzim özgüllüğünü/aktivitesini artırma yeteneği
- (vi) yenilenebilirlik
- (vii) ürün inhibisyonunu azaltma yeteneği
- (viii) spesifik olmayan adsorpsiyonu
- (ix) bakteriyel kontaminasyonu önleme yeteneği

Matrislerin çoğu sadece bazı özelliklere sahiptir; bu nedenle, enzim immobilizasyonu için taşıyıcı matris seçimi, matrislerin özelliklerine ve sınırlamalarına göre seçilmelidir (Sirisha vd., 2016).

2.3.2 Enzim İmmobilizasyonu İçin Kullanılan Yöntemler

Uygun immobilizasyon tekniğinin ve desteğinin seçilmesi, enzim aktivitesini ve kararlılığını belirlemede önemli rol oynadıkları için immobilizasyon sürecinin çok önemli parçalarıdır. Her bir immobilizasyon yönteminin, kendine has hem zayıf hem de güçlü prosedürleri mevcuttur (Rasouli vd., 2022). Enzim immobilizasyonu için yöntemler, temel olarak üç kategoride sınıflandırılabilir. Bunlar: Taşıyıcı bağlama yöntemi, Çapraz bağlama yöntemi ve Hapsetme yöntemidir.

2.3.2.1 Taşıyıcı bağlama yöntemi

En eski enzim immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntemde immobilizasyon, enzimin uygun bir taşıyıcı ile fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasıyla gerçekleştirilir (Jesionowski vd., 2014). Taşıyıcıların seçiminde ve bağlama tekniğinin uygulanmasında çok dikkatli olunması gerekmektedir. Taşıyıcı seçimi, partikül boyutu, hidrofobik grupların yüzey alanı molar oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi parametreler açısından enzimin doğasına bağlıdır. Taşıyıcı bağlama yöntemleri üç türe ayrılabilir (Khan, 2021).

a) Fiziksel adsorpsiyon yöntemi: Fiziksel adsorpsiyon yöntemi, enzimlerin destek materyaline fiziksel olarak bağlandığı en yaygın immobilizasyon yöntemidir (Rasouli vd., 2022). Adsorpsiyon, bir enzimin moleküller arası etkileşimler nedeniyle katı bir desteğin yüzeyi üzerinde birikmesi süreci olarak tanımlanabilir (Mohidem vd., 2023). Enzim bir çözelti içinde çözülür ve daha sonra destek belirli bir süre ve uygun koşullar için çözeltiye konur. Bu yöntemde, enzimler hidrojen bağı kuvvetleri, Van der Waals kuvvetleri veya hidrofobik etkileşimler yoluyla desteğe adsorbe edilir (Rasouli vd., 2022).

Taşıyıcı olarak genellikle inorganik malzemeler kullanılır: Aktif karbon, gözenekli cam, asit kili, ağartma kili, alümina, silika jel, kalsiyum fosfat vb. Ayrıca nişasta ve glüten gibi doğal polimerler de kullanılmaktadır (Khan, 2021).

Çapraz bağlama ve kovalent bağlamada ki gibi yüzey modifikasyonuna veya bağlayıcılara gerek yoktur. Enzimlerle yüzey adsorpsiyon etkileşimi hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimleri içerir (Mohidem vd., 2023).

Adsorpsiyon yoluyla enzim immobilizasyonunun avantajları, minimum aktivasyon adımlarının gerekli olması, az sayıda reaktifin gerekli olması, ucuz bir yöntem olması ve kolayca uygulanmasıdır (Maghraby vd., 2023). Fiziksel adsorpsiyon, enzim molekülünde çok az konformasyonel değişikliğe neden olur veya hiç olmaz (Khan, 2021). Adsorbe edilen

enzimler, agregasyondan, proteolizden ve hidrofobik arayüzlerle etkileşimden korunur (Datta vd., 2013; Spahn ve Minter, 2008).

Enzimler doğrudan kullanıldığı için aktivasyon adımlarının sınırlı olduğu bilinmektedir. Adsorpsiyon yönteminde, genellikle maliyeti düşük ya da diğerlerine nispeten biraz daha uygun olan enzimler kullanıldığı için büyük hacimli proseslerde düzenli olarak kullanılmaktadır. Adsorpsiyonda, olabildiğince güçlü etkileşimler olduğu için enzimleri yapı yönünden güvende tutar (Thangaraj ve Solomon, 2019). Adsorpsiyon yoluyla immobilizasyon genellikle enzime zarar vermez ve böylece başlangıçtaki enzim katalitik aktivitesini mümkün olduğunca korur (Rasouli vd., 2022).

Bu yöntemin dezavantajı, enzim proteini ile fiziksel adsorbe edici taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetinin zayıf olması nedeniyle adsorbe edilen enzimin kullanım sırasında taşıyıcıdan dışarı sızabilmesidir (Khan, 2021).

b) İyonik bağlama yöntemi: İyonik bağlama yöntemi, enzim proteininin iyon değiştirici kalıntılar içeren suda çözünmeyen taşıyıcılara iyonik olarak bağlanmasına dayanır. Bu tür kovalent olmayan immobilizasyon, iyonik güç, polarite ve sıcaklık değiştirilerek tersine çevrilebilir (Sirisha vd., 2016). Bu immobilizasyon tekniğinde kullanılan destek malzemeleri genellikle yüklüdür, çünkü proteinlerin birbirine bağlanabilmesi için zıt yüklere sahip olmaları gerekir (Brena vd., 2013; Maghraby vd., 2023). Genellikle İyon değiştirme kalıntılarına sahip polisakkaritler ve sentetik polimerler gibi destek materyalleri taşıyıcı olarak başarıyla kullanılmıştır (Khan, 2021).

Bu yöntemin avantajı, enzimin taşıyıcıya bağlanmasının çok daha basit olması ve kullanılan koşulların kovalent bağlanmaya göre daha hafif olması gibi avantajları vardır (Sirisha vd., 2016). Ayrıca enzim proteininin aktif bölgesinin yapısında çok az veya hiç konformasyon değişikliğine neden olmaz ve böylece birçok durumda yüksek aktiviteye sahip immobilize enzimler elde edilir (Khan, 2021).

Yöntemin dezavantajı, iyonik kuvvetlerin zayıflaması nedeniyle ortamın pH'ının değişmesi üzerine yüksek iyonik kuvvete sahip substrat çözeltilerinde enzimin taşıyıcıdan sızmasının meydana gelebilmesidir (Khan, 2021). Reaksiyon boyunca optimum pH değerini korumak için, enzimi immobilize eden matris sürekli olarak yüklendiğinden, aşırı yüklenme enzim yapısını bozabilir ve bu da yüksek ürün verimi elde edilmesini engelleyebilir (Maghraby vd., 2023).

Sonuç olarak iyonik bağlanma yönteminde enzim ve taşıyıcı arasındaki bağ, fiziksel adsorpsiyondan çok fazla güçlü; fakat kovalent bağlanmadan daha zayıftır (Sirisha vd., 2016).

c) Kovalent bağlama yöntemi: Kovalent bağlama, enzimlerin destek materyallerine kovalent bağlar ile bağlanmasıyla gerçekleştirilen köklü bir enzim immobilizasyon tekniğidir (Maghraby vd., 2023). Kovalent bağ, destek ve enzim molekülü arasındaki kimyasal bir reaksiyondur ve geri dönüşümsüz bir yöntemdir (Rasouli vd., 2022). Enzim ve matris arasında kovalent bağ oluşumu histidin, arginin, aspartik asit gibi yan zincir amino asitler aracılığıyla gerçekleşir (Sirisha vd., 2016). Ancak reaktivite, enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında rol alan fonksiyonel grupların varlığına bağlıdır. Bu yöntemde destekler, aktive edilebilen veya yüzeye eklenebilen ve kovalent bağlanma yoluyla enzim üzerindeki fonksiyonel gruplarla reaksiyona girebilen fonksiyonel gruplara ihtiyaç duyar (Rasouli vd., 2022).

Bu fonksiyonel gruplar aşağıda verilmiştir.

- (i) α veya 3-amino grubu
- (ii) α , β veya γ karboksilik grup
- (iii) Sülfhidril grubu
- (iv) Hidroksil grubu
- (v) Fenolik grup
- (vi) İndol grubu
- (vii) Tiyoil grubu
- (viii) İmidazol grubu (Khan, 2021).

Bu fonksiyonel gruplar ile beraber karbodiimidler ve GA, aktive edici bir reaktif olarak yaygın şekilde kullanılır ve daha sonra enzimler kovalent bağ ile desteğe bağlanır (Nguyen ve Kim, 2017; Rasouli vd., 2022).

İmmobilize enzimlerin yapısal ve işlevsel özelliklerinin korunması çok önemlidir ve bu da bir çapraz bağlayıcı ajan tarafından gerçekleştirilebilir. GA, sulu çözücülerdeki çözünürlüğü nedeniyle bu tür bir çapraz bağlama maddesidir ve popüler olarak iki işlevli çapraz bağlayıcı olarak kullanılan kararlı alt birimler arası ve içi kovalent bağlar oluşturabilir (Sirisha vd., 2016). GA ile bağlama, GA molekülünün aldehit grubunun enzimin amino grubu ile reaksiyonu ve ayrıca GA molekülünün başka bir aldehit grubunun desteğin amino grubu ile reaksiyonu yoluyla gerçekleşmektedir (Rasouli vd., 2022).

Bağlanma yönü çok önemlidir; enzimin merkezindeki amino grupları bağlanmaya dahil edilmediğinde maksimum enzim aktivitesinin elde edilebileceği bildirilmiştir (Mohamad vd., 2015; Rasouli vd., 2022).

Reaktif gruplar aracılığıyla bir taşıyıcıya bağlanma, bir ara kol da içerebilir. Bir ara kol, etilendiamin veya polietilen glikol gibi, enzimi bağlı olduğu katı taşıyıcıdan uzağa yerleştiren ve sterik engeli azaltmayı amaçlayan reaktif gruplar arasında oluşan bir atom zinciridir (Bié vd., 2022; Mohamad vd., 2015).

Enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvveti güçlü olduğundan, enzim sızması gerçekleşmez. Bu yöntem uygulandığında, yüksek konsantrasyonlarda substratların varlığında veya genellikle birçok denatürasyon reaksiyonunu kolaylaştıran güçlü tampon çözeltilerle birlikte bile enzim sızıntısı olasılığı düşüktür (Maghraby vd., 2023). Bu nedenle, fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlama yöntemlerine göre daha avantajlıdır (Khan, 2021). Ayrıca kovalent bağlama, dayanıklı enzimler üretmek ve enzimlerin yeniden kullanılabilirlik kadar geri kazanımını sağlamak gibi birçok avantaja sahiptir (Fernández vd., 2001; Maghraby vd., 2023). Kovalent bağlama yöntemi ile immobilize edilmiş enzimin yüksek stabilitesi ve yeniden kullanılabilirliği nedeniyle, bu teknik literatürde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Rasouli vd., 2022).

Ne yazık ki, kovalent bağlamanın uygulanmasında bazı sınırlamalar da ortaya çıkmaktadır; örneğin, bu strateji, uygun immobilizasyonun gerçekleşmesi için nispeten karmaşık adımlar ve uzun inkübasyon süreleri gerektirmektedir (Maghraby vd., 2023; Marrazza, 2014). Öte yandan, kovalent bağlanma nispeten rastgele bir şekilde meydana gelirse immobilizasyon sırasında aktivite kaybı meydana gelebilir, örneğin taşıyıcının yüzeyindeki aktif gruplarla reaksiyona girmeye yatkın enzim kalıntıları, enzim molekülündeki pozisyonlarından bağımsız olarak dahil olur ve bu da sterik engele, doğal enzim yapısında değişikliklere veya denatüre aktif bölge kalıntılarına yol açabilir (Bié vd., 2022). Bu durum enzimin aktif bölgesinin denatürasyon nedeniyle daha düşük bir aktiviteye sahip olmasına neden olur (Rasouli vd., 2022). Bununla birlikte, bu immobilizasyon stratejisinin avantajları dezavantajlarından daha ağır basmaktadır, çünkü özellikle artırılmış bir enzim stabilitesi ve enzimlerin yeterli bir geri kazanımı / yeniden kullanımı elde edilmektedir (Liu ve Dong, 2020; Maghraby vd., 2023).

d) Afinite Bağlama: Afinite bağlanması, enzimin spesifik etkileşimlerle destek matrisine immobilizasyonudur. Afinite immobilizasyonu, çeşitli fizyolojik koşullar altında

enzimin desteğine olan özgülüğünü kullanır. Bu iki yöntem izlenerek elde edilebilir. İlk yöntem, matrisin hedef enzim için bir afinite ligandına önceden bağlanmasıdır. Diğer yöntem, enzimin matrise karşı afinite geliştiren başka bir moleküle modifiye edilmesi veya konjuge edilmesinden oluşur (Nisha vd., 2012; Sirisha vd., 2016). Afinite adsorbanları ayrıca enzimlerin eş zamanlı saflaştırılması için de kullanılmıştır (Datta vd., 2013).

Bu stratejide nispeten zayıf kuvvetler söz konusu olduğundan, immobilizasyon sırasında enzimin doğal yapısında neredeyse hiçbir değişiklik meydana gelmez, ancak bu immobilizasyon yöntemi, pH, sıcaklık veya iyonik güç gibi çevre koşullarındaki kaymalar nedeniyle enzim sızıntısına eğilimlidir. Sonunda, enzim sızıntısı, enzim aktivitesi tükendiğinde taşıyıcı rejenerasyonuna izin vermek için kontrollü koşullar altında bir avantaja dönüştürülebilir. Adsorpsiyon ve iyonik bağlanma oldukça basit ve düşük maliyetli yöntemlerdir, ancak spesifik değildirler. Afinite bağlama oldukça seçicidir, tek kapta saflaştırma ve immobilizasyona olanak tanır ve yönlendirilmiş enzim immobilizasyonuna izin verir, ancak maliyetlidir (Bié vd., 2022; Bolivar ve Nidetzky, 2012).

2.3.2.2. Çapraz bağlama yöntemi

Bu yöntem, enzimlerin taşıyıcı olmadan kovalent bağlama yoluyla birbirine bağlandığı bir stratejidir (Gao vd., 2010; Maghraby vd., 2023). Çok işlevli reaktifler aracılığıyla enzim molekülleri arasında kimyasal bağların ve moleküller arası çapraz bağların oluşturulması prensibine dayanır (Khan, 2021). Moleküller arası çapraz bağlama, iki komşu enzim molekülü arasında köprü olarak kullanılan bağlayıcı ajanların varlığıyla gerçekleştirilir (Gao vd., 2010; Maghraby vd., 2023). Enzimin çapraz bağlanması üç boyutlu bir yapı oluşturur ve geri dönüşümsüz bir yöntemdir (Thangaraj ve Solomon, 2019).

Çapraz bağlamada, GA; izosiyanat türevleri, bis-diazobenzelen. N,N-polietilen, N,N'-etilen, bis-malomid gibi iki veya çok işlevli çapraz bağlama reaktifleri uygulanmaktadır. Enzim proteininin reaksiyonlara katılan fonksiyonel grupları lizinin α amino grubu veya 3-amino grubu, tirozinin fenolik grubu, sistinin sülfhidril grubu ve histidinin amidazol grubudur. Enzimlerin çapraz bağlanması için ağır koşullar gereklidir. Bu da, enzimin aktif merkezinin konformasyonundaki değişiklik nedeniyle aktivite kaybına neden olur (Khan, 2021).

Uygun fiyatlı ve yaygın olarak erişilebilir olduğu için GA yaygın bir fonksiyonel reaktiftir (Hanefeld vd., 2009; Rasouli vd., 2022). Bu yöntemde GA kullanımı enzimin konformasyonel değişikliklerine neden olabileceğinden enzim aktivitesini düşürmesi mümkündür (Liu vd., 2018; Rasouli vd., 2022).

Çapraz bağlama düşük aktiviteye, zayıf tekrarlanabilirliğe, düşük mekanik stabiliteye ve kullanım zorluklarına neden olur. Bu sorunlar çapraz bağlı enzim kristalleri (CLECs) ve çapraz bağlı enzim agregatları (CLEAs) gibi yöntemler ile aşılmaktadır (Thangaraj ve Solomon, 2019).

a) Çapraz bağlı enzim kristali (CLEC): Enzimin sulu bir tampon çözeltisinden uygun bir pH aralığında kristalleştirilmesi ve GA ile muamele edilmesiyle oluşturulur (Sheldon ve Pelt, 2013; Thangaraj ve Solomon, 2019). CLEC yönteminde, kristalizasyondan sonra, enzim kristallerini çapraz bağlamak için GA kullanılır (Górecka ve Jastrzębska, 2011; Rasouli vd., 2022). Bu teknik, yüksek saflıkta bir enzim gerektirir. Doğal olarak pahalıdır, ancak metodoloji nispeten basittir. Protein moleküllerinin sulu bir çözeltisi, tuzların veya suyla karışabilen organik çözücülerin veya iyonik olmayan polimerlerin eklenmesiyle çökeltilir (Thangaraj ve Solomon, 2019). Kontrol edilebilir partikül boyutları (1-100 µm) üreten seçkin bir aktif immobilize enzim tekniğidir. Organik çözücülere ve yüksek sıcaklıklara karşı önemli bir dirence sahiptir. Yüksek stabilitesi, optimum katalitik aktivite ile geri dönüşümü ve hacimsel verimliliği onu endüstriyel biyotransformasyonlar için oldukça cazip kılmaktadır (Cao vd., 2003; Maghraby vd., 2023).

b) Çapraz bağlı enzim agregatı (CLEA): Protein partiküllerinden oluşan fiziksel agregatlar üreten sulu bir ortamda doğrudan enzim çökeltme yoluyla oluşturulur. Bu sistem, çapraz bağlı enzimlerin ikiden fazla enzim içeren agregatlarının eşzamanlı formülasyonuna izin verdiği için birçok enzim sınıfı için kullanışlıdır (Cao vd., 2003). Oluşan agregatlar, üçüncül yapılarını koruyarak kovalent olmayan bağlarla bağlanır. Daha sonra, agregatların çapraz bağları enzimleri sürekli olarak çözünmez hale getirir, organize yapılarını korur ve sonuç olarak katalitik etkinliklerini sürdürür. Çapraz bağlı enzimlerin agregatlarının oluşturulması, maliyet açısından verimli olan önemli bir stratejidir; ancak mekanik stabilitesi zayıftır (Maghraby vd., 2023).

En iyisi GA olmak üzere agregatlar, yapı ile uyumlu bir kimyasal kullanıldığında çapraz bağlanarak artık çözünmez bir şekil almaktadır. CLEA'lar tipik olarak 5 ila 50 µm arasında boyutlandırılır ve bu nedenle filtrasyon veya santrifüjleme ile geri kazanılabilir (Bié vd., 2022). CLEA'lar kalıcı olarak çözünmezler, iyi yapılara ve katalitik aktiviteye sahiptirler (Thangaraj ve Solomon, 2019).

CLEA'ları hazırlamak için enzim, bir çökeltme ajanı kullanılarak çökeltilir ve GA gibi bir çapraz bağlama ajanı ile inkübe edilir (Jun vd., 2020). Ardından, çökeltileri oluşturan enzim

konglomerası çapraz bağlanarak kovalent olarak birbirine bağlanmış 3 boyutlu bir enzim ağı oluşturur. Çöktürme, enzim saflaştırma maliyetini azaltan ham bir ekstraktan doğrudan gerçekleştirilebilir (Sheldon ve Pelt, 2013). Çapraz bağlama yoluyla elde edilen immobilize enzim, bir biyokatalizör olarak kararlı ve işlevseldir. Bununla birlikte, dezavantajlar arasında genellikle sınırlı aktivite tutma, zayıf yeniden kullanılabilirlik, düşük mekanik stabilite ve jel benzeri çapraz bağlı enzimlerin kullanımındaki zorluklar yer almaktadır (Li vd., 2020; Mohidem vd., 2023).

CLEA sulu çözeltilerde çalışma avantajına sahipken, CLEC kristal oluşumuna ihtiyaç duyar (Rasouli vd., 2022).

2.3.2.3. Hapsetme yöntemi

Bu yöntemde enzim, bir polimer matrisin jel kafesi içine hapsedilir veya enzimler kolajen, jelatin, selüloz triasetat, poliakril-amid ve j-karragenan vb. yarı geçirgen bir polimer membran içine alınır (Khan, 2021). Hapsetme yöntemi iki tiptir.

a) Kafes tipi yöntem (Entrapment): Basitçe, enzimlerin kovalent veya kovalent olmayan bağlar yoluyla bir lif ağı içinde kafeslenmesi ya da jel matrisi içinde hapsedilmesini içerir (Maghraby vd., 2023; Won vd., 2005). Enzimler polimerik bir ağ içinde bloke edilir ve desteğe bağlanmaz. Ağ sadece substrat ve ürünlerin geçişine izin verir ancak enzimi tutar. İlk olarak, enzim bir monomer çözeltisine karıştırılır ve ikinci olarak monomer çözeltisi polimerize edilir (Liu vd., 2018). Bu yöntemde, enzim aktivitesinin çoğunu koruyarak ağ ile kimyasal olarak etkileşime girmez. (Rasouli vd., 2022).

Bu yöntemde immobilizasyon için poliakrilamid, polivinil alkol gibi çeşitli sentetik polimerler ve nişasta ve konjak tozu gibi doğal polimerler kullanılmıştır (Khan, 2021).

Kafes tipi yöntem kullanılırken, substratlar veya ürünler gibi reaksiyon içeriklerinin serbest difüzyonuna izin veren, polimerik ağın gözenek boyutu kontrol edilerek enzim sızıntısı kolayca önlenir (Maghraby vd., 2023). Bu stratejide, enzimler polimerlerle reaksiyona girmez; sonuç olarak, denatürasyon genellikle önlenir. Kafes tekniği, enzimlerin yüksek yükleme kapasitesi, düşük üretim maliyetleri, tuzaklanmış enzimlerin gelişmiş mekanik stabilitesi ve daha düşük kütle transferi gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Costa vd., 2004). Bu teknik, ortamla doğrudan teması önleyerek enzimleri korur. Ayrıca enzimleri mekanik kesmeden ve hidrofobik çözücülerden korur, böylece gaz kabarcıklarının girişimini en aza indirir. Kütle transferi sınırlamaları ve düşük seviyeli enzim yüklemesi bu yöntemin dezavantajlarıdır (Thangaraj ve Solomon, 2019).

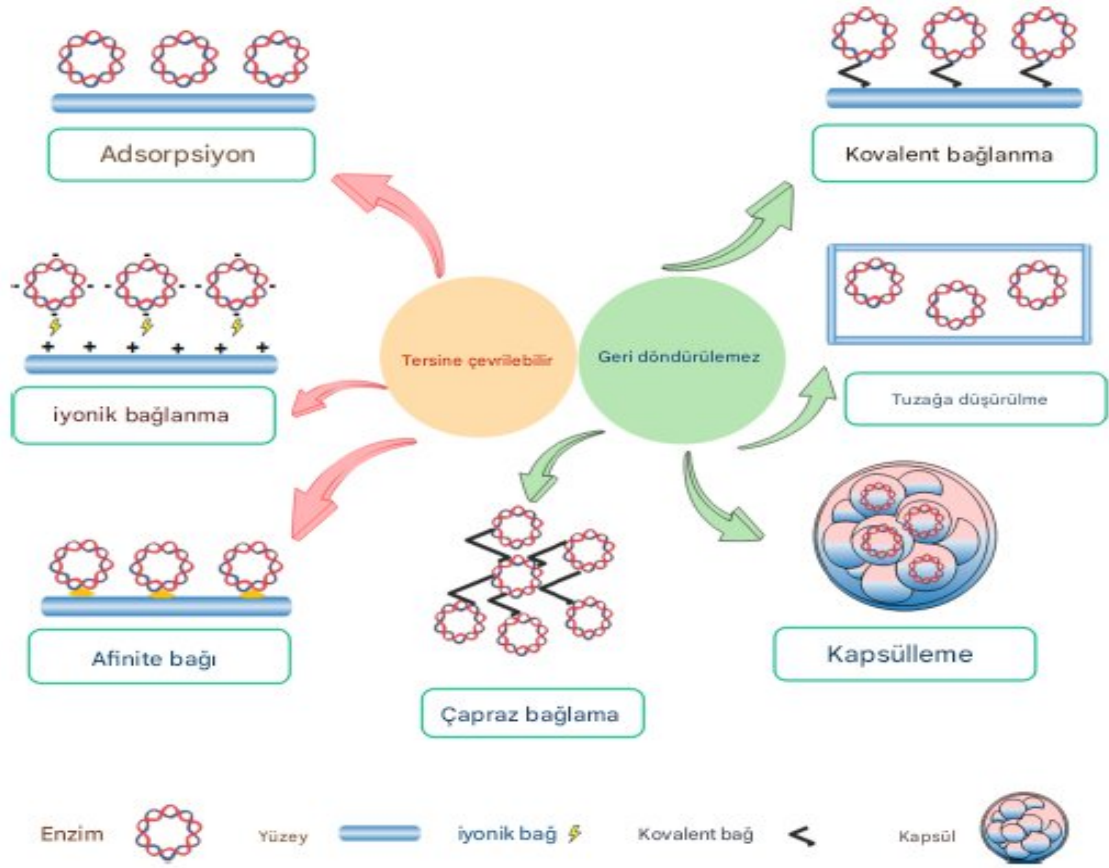
Kafes tipi yöntem için fotopolimerizasyon, sol-jel yöntemi ve elektropolimerizasyon gibi birçok prosedür uygulanmaktadır (Maghraby vd., 2023).

b) Kapsülleme tipi yöntem (Encapsulation): Enzimin yarı geçirgen polimer membran içine alınmasını içerir (Khan, 2021). Kapsülleme, hem enzimlerin hem de hücrelerin çözeltiye serbest ancak kontrollü bir alanda olması bakımından kafesleme yöntemine benzer. Büyük enzimler kapsüllerin dışına veya içine hareket edemez, ancak küçük substratlar/ürünler yarı geçirgen bir membran boyunca serbestçe hareket edebilir (Kurzbaum vd., 2020). Kapsülleme, biyolojik sistemleri ince bir film içinde tutar, böylece biyokatalizörlerin verimliliklerine zarar verebilecek çevre ile temasını önler. Bu nedenle kapsülleme, biyokatalizörlerin aktivitesinin uzun süre devam etmesini sağlar (Patil vd., 2010).

Enkapsülasyonda kullanılan farklı membranlar naylon, selüloz nitrat, selüloz asetat, epoksi reçineler, kolajen, polisülfonlar, poliakrilatlar ve polikarbonatlardır (Thangaraj ve Solomon, 2019).

Bununla birlikte, kapsülleme stratejileri, substratın ve ürünün polimer matrislerinin içine ve dışına difüze olabilmesini sağlamak için polimerizasyon matrislerinin kimyasal koşullarını, gözenek yapısını ve hacmini ve enzimlerin gözenek matrisleri ile uyumluluğunu dikkate almalıdır. Biyokataliz, biyosensör, enzim arıtımı, biyotıp ve biyoremediasyon gibi sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Mohidem vd., 2023; Zhang vd., 2023).

İki yöntem birbirine benzerse de aralarındaki fark; kafes tipi yöntemde enzim polimerik bir ağ içinde muhafaza edilirken, kapsülleme tipi yöntemde enzim yarı geçirgen olarak ifade edebileceğimiz bir engel tarafından tutulur. Her iki yöntemde de taşıyıcı, enzimi tutarken substratların ve ürünlerin geçmesini kolaylaştırır. İmmobilizasyon yöntemi hafiftir, çünkü enzim ve taşıyıcı arasında kimyasal etkileşimler yoktur, dolayısıyla doğal enzim yapısıyla oynama riski en aza indirilir ve taşıyıcı malzeme enzim için optimum bir ortam sağlayacak şekilde tasarlanabilir (Bié vd., 2022).



Şekil 2. 8. Başlıca enzim immobilizasyon yöntemleri

Kaynak: (Maghraby vd., 2023)

2.3.3. CA'nın İmmobilizasyonunda Destek Materyalinin Seçimi

CA'nın serbest formunun endüstriyel uygulamalarda kullanılması, kararsızlık ve yeniden kullanılamama nedeniyle rasyonel değildir. CA'nın immobilizasyonu, bu sorunları çözmek için umut verici bir yaklaşım olarak önemli bir ilgi görmüştür. Bu bağlamda, CA enziminin aktivitesini, kararlılığını ve yeniden kullanılabilirliğini iyileştirmek, maliyeti düşürmek ve büyük ölçekli uygulamalarda proses verimliliğini artırmak için farklı immobilizasyon stratejileri ve destekler geliştirilmiştir (Rasouli vd., 2022).

Destek malzemesinin seçimi, biyokatalitik sistemin performansı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu için dikkate alınması gereken önemli bir faktördür (Hou vd., 2015). Destek malzemesi seçiminde bulunabilirlik, düşük maliyet, fonksiyonel grup kullanılabilirliği, mekanik stabilite, sertlik, toksik olmama ve biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi bazı özellikler dikkate alınmalıdır (Zdarta vd., 2018). Son zamanlarda, CA'nın immobilizasyonu için taşıyıcı malzemeler olarak inorganik, organik ve hibrit bileşikler kullanılmaktadır. Bunlar:

- İnorganik oksit malzemeler
- Manyetik tabanlı malzemeler
- Karbon bazlı malzemeler
- Polimerik membranlar
- Sentetik polimerler
- Biyopolimerler
- MOF'lar (Metal Organik Çerçeveler) (Rasouli vd., 2022).

2.4 CA'nın İmmobilize Edilmesine Yönelik Daha Önceki Çalışmalar

Literatürde CA'yı çeşitli destekler üzerine immobilize eden çalışmalar aşağıda rapor edilmiştir:

-Al-Dhrub vd., hCA I enzimini, APTES ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacık üzerinde glutaraldehit ile kovalent olarak immobilize etmişlerdir. İmmobilize CA on üç tekrardan sonra başlangıç aktivitesinin %61'ini göstermiştir. İmmobilize enzim aktivitesi, pH 8.0 ve 25 °C'de optimum olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzimin Km değeri (1,02 mM), serbest hCA I'den (0,48 mM) daha yüksek olduğu gösterilmiştir. 4 °C ve 25 °C'de 40 günlük inkübasyondan sonra, immobilize hCA I, aktivitesinin sırasıyla %89 ve %85'ini oranında korunmuştur. Bu çalışmada MNP'ler, sırasıyla TEOS ile silika kaplama ve silika kaplı MNP'lerin, APTES kullanılarak amin fonksiyonizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu fonksiyonelleştirilmiş destek materyali, GA ile aktivasyonu yapıp, hCA I üzerine immobilize edilmiştir. (Al-Dhrub vd., 2017)

-Jing vd., kovalent bağlama yöntemiyle CA immobilizasyonu için yeni bir epoksi fonksiyonelleştirilmiş manyetik poli(glisidil metakrilat-divinil benzen, GMA-DVB) mikro küre sentezlenmiştir. Bu çalışmada, epoksi grubu ile işlevselleştirilmiş manyetik polimer mikroküreler hazırlanmış ve CA enzimi seçici kovalent bağlanma ile taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiştir. Araştırmaya göre; serbest CA ile karşılaştırıldığında, immobilize CA daha iyi bir enzim aktivitesine, daha yüksek bir termal stabiliteye ve depolama stabilitesine sahip olmuştur. Dahası, immobilize CA daha iyi bir yeniden kullanılabilirlik göstermiştir. Altı geri dönüşümden sonra başlangıçtaki aktivitesinin %47,6'sını korumuştur. Km ve Vmax değerleri serbest CA için 6,091 mM ve 0,091 µmol/(dk mL) iken, immobilize CA için sırasıyla 8,077 mM ve 0,027 µmol/(dk mL) olmuştur (Jing vd., 2015).

-Vinoba vd., BCA'yı $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanopartikülleri üzerine OAPS (okta(aminofenil) silseskioksan) ile işlevselleştirerek aralayıcı olarak GA kullanarak kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Kloropropil grupları, SiOH silika gruplarının CPTMS ile muamele edilmesiyle $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanopartiküllerinin yüzeylerine aşılanmıştır. OAPS daha sonra $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{CPTMS}$ 'nin kloropropil kısımları ile muamele edilerek $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{OAPS}$ destek materyali sentezlenmiştir. Ticari olarak satın alınan CA, destek materyali ile immobilize edildikten sonra Fe-CA olarak adlandırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; depolama stabilitesi çalışmaları Fe-CA'nın 30 gün sonra aktivitesinin yaklaşık %82'sini koruduğunu göstermiştir. CO_2 yakalama verimliliği, serbest enziminkinden 26 kat daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. (Vinoba vd., 2012)

-Faridi vd., bu araştırmada, poliektremofilik bakteri *Bacillus halodurans* TSLV1'in (rBhCA) rekombinant karbonik anhidrazı, yüzeyi modifiye edilmiş manyetik (silanlanmış) demir oksit nanopartiküller (Si-MNPs) üzerine immobilize etmiştir. Enzimin immobilizasyonu için rBhCA'nın karboksil grupları 3-(3 dimetilaminopropil) N'-ehtilkarbodiimid (EDC) ve N-hidroksisüksinimid (NHS) ile muamele edilmiştir. Immobilize rBhCA, serbest rBhCA'ya kıyasla alkalistabilitede iyileşme sergilemiş ve yüksek sıcaklıklarda önemli ölçüde yüksek aktiviteyi korumuştur. Ayrıca, Si-MNP'ler üzerinde immobilize edilen rBhCA, manyetik ayırma yoluyla reaksiyondan kolayca izole edilebilmiştir. Tekrarlanan 22 kullanımdan sonra, immobilize rBhCA ilk aktivitesinin %50'sini korumuş ve aktivitesinde herhangi bir kayıp olmadan 28 gün boyunca saklanabilmiştir (Faridi vd., 2017).

2.5 Çalışmanın Amaçları

Bu çalışmada, kovalent bağlanma yöntemi kullanılarak sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılarak elde edilen α -tipi BCA enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi. Destek materyalinin GA ile aktivasyonu yapılarak, enzimin destek materyaline bağlanma yüzdesi artırıldı. Bu kapsamda enzim yükleme oranı belirlenerek immobilize enzim ile serbest enzimin optimum sıcaklık, optimum pH, kinetik parametreleri (K_m , V_{max}) ve stabilitelerinin (pH, termal ve depolama) belirlenmesi ve karakterize edilmesi amaçlandı. Ayrıca destek materyali üzerine immobilize edilen enzimin CO_2 giderimindeki potansiyel uygulanabilirliği araştırıldı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kimyasal Reaktifler

(3-Aminopropil) trietoksisilan (APTES, %99), tetraetilortosilikat (TEOS), demir(II) klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, %99,0), demir (III) klorür hekzahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, %99,0), asit-sitraz dekstraz (ACD), L-Tirozin, sülfanilamid (SA), siyanojen bromürle aktive edilmiş Sepharose 4B, p-nitrofenil asetat (p-NPA) ve sulu amonyak çözeltisi ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, %25), monobazik sodyum fosfat, Glutaraldehit (%25), disodyum fosfat, trizma® hidroklorür, sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl, %35) ve kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. Kan örnekleri, Bilecik Belediyesi Ak Serhat Mezbahasından alınmıştır.

3.2 Sığır Karbonik Anhidraz (BCA)'ın Saflaştırılması

3.2.1 Kan numunelerinin alınması ve hemolizat eldesi

Sığır karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için sığır kanı Bilecik Belediyesi Ak Serhat Mezbahası'ndan alındı. Özellikle kanın pıhtılaşmasını önlemek için tam kesim esnasında, zaman kaybedilmeden, doğrudan damardan çıkan kandan 100 ml alındı, üzerine antikoagülant olarak kullanılan asit-sitraz dekstroza (ACD) çözeltisinden 15 ml ilave edildi. Böylelikle hem kanın pıhtılaşması önlendi hem de eritrositler için kullanılıncaya kadar bir beslenme ortamı oluşturuldu. Kan numuneleri alındıktan sonra 4°C korundu ve iki gün içinde hemolizat için kullanıldı. Sığır kanından hemolizat işlemi: Alınan kan santrifüj tüplerine konularak, 15 dk boyunca 2500xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden alınan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıkla dikkatli bir şekilde alındı. Tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0,154 M izotonik NaCl çözeltisi (2,25 g NaCl alınıp hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı) ile dikkatlice yıkandı. Yıkama sonrasında 2500xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 3 defa gerçekleştirildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin yaklaşık 4 katı kadar buzlu su ile buz banyosunda 45 dk hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4°C'de 20.000xg'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat damlalıkla dikkatli bir şekilde alındı. Sonra katı tris ile dikkatlice pH 8,7'ye ayarlandı. Böylece hemolizat kolona tatbik edilecek duruma geldi (Özdemir, 1992).

3.2.2 Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Kolon materyaline L-tirozinin kovalent olarak bağlanması ve daha sonraki aşamalarda sülfanilamitin diazollanarak tirozine kenetlenmesi sağlandı. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu,

sülfanilamit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamit, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısında bulunarak söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanılmaktadır (Söyüt, 2006).

3.2.3 CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

pH 8,8 olan ve 0,2 M'lık NaHCO_3 çözeltisi (sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlamak için kullanılan tampon çözelti): 16,8 g NaHCO_3 , 900 mL saf suda çözünerek, 1N'lik NaOH çözeltisi ile pH 8,8'e ayarlandıktan sonra, son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı. Daha sonra bu çözeltiden 1N'lik NaOH çözeltisi ile pH 10'a ayarlanarak, pH 10 olan ve 0,1 M'lık NaHCO_3 tamponu hazırlandı. 1,1 g CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B tartıldı ve 250 mL soğuk pH 10 olan ve 0,1 M'lık NaHCO_3 tamponunda çözüldü ve vakum filtrasyon süzme seti kullanılarak, nuche erlenine vakum pompası ile çekilerek yıkandı.

Bir sonraki işlem için 80 mg tirozin tartıldı. Daha önce hazırlanan pH 10 olan ve 0,1 M'lık NaHCO_3 tamponunda çözüldü. Tirozinin çözünmesi için 60 °C'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha önce yıkanarak hazırlanan jel, bu tirozin çözeltisine eklendi. Süspansiyon +4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda yavaş bir şekilde karıştırıldı ve akabinde 16 saat boyunca da +4 °C'de bekletildi. Bu işlemler sonucunda, yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye dek bol saf su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen tirozinin tamamen uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işlemi pH 8,8 olan ve 100 mL 0,2 M'lık NaHCO_3 tamponu ile 10 defa tekrarlandı. Son olarak tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL'si içine alınarak sonraki işlemler için bekletildi (Beydemir ve Gülçin, 2004).

3.2.4 Sülfanilamit kenetlendirilmesi

Sülfanilamit (CA'nın inhibitörü) kenetlenmesi için 0°C sıcaklığında 10 mL ve 1 M'lık HCl hazırlanarak üzerine (9 mL saf su ve 1mL % 37 HCl) 25 mg sülfanilamit eklenerek karıştırıldı. Daha sonra 0°C'deki 5 mL saf suya, 75 mg NaNO_2 eklenerek çözüldü ve sülfanilamid çözeltisine damla damla ilave edilerek diazonlandı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış olan sülfanilamit, 45 mL sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. 1 M NaOH ile pH 9,5'te sabit tutulmak suretiyle, 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırıldı. Akabinde 1 L saf su ve pH 7,4 olan 200 mL 0,05 M'lık Tris- SO_4 tamponuyla yıkandı. Son olarak üzerine bir miktar daha aynı tampondan ilave edilerek +4°C'de muhafaza edildi (Söyüt, 2006).

3.2.5 Afinite kolonunun paketlenmesi

Afinite kolonunun paketlenmesi için Tris-SO₄ tamponu hazırlanır. Bunun için 3,03 g Tris alınır 500 mL saf suda çözülerek pH 7,4 olan 0,05 M Tris-SO₄ elde edilir. Hazırlanan jel önce saf su ile yıkandı daha sonra hazırlanan bu Tris-SO₄ tamponu ile 5 defa yıkandı ve Tris-SO₄ tamponu ilave edilerek sonraki işlemler için +4'de saklandı. Kolaon kurulduktan sonra, destek materyali önce dengeleme tamponu (pH 8,7 olan ve 25 mM'lık Tris-HCl / 0,1 M'lık Na₂SO₄ çözeltisi) ile yıkandı sonra 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenmiştir. Jel çöktükten sonra peristaltik pompada kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı. Daha sonra kolondan dengeleme tamponu geçirilerek 2 gün dengelemeye bırakıldı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşılmaktadır (Söyüt, 2006).

3.2.6 Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Daha önce hazırlanan homojenattan 15 mL alınarak, bir pipet yardımı ile yavaş yavaş sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografi kolonunun çeperinden aşağıya bırakılarak yüklendi. Daha sonra kolon, yıkama tamponu ile 2 saat yıkandı (400 ml 25 mM Tris-HCl /22 mM Na₂SO₄ (pH: 8,7) çözeltisi). Bu şekilde CA enzimi kolona tutunması sağlanıp diğer safsızlıkların uzaklaştırılması sağlandı. Kolonun yıkanmış olduğunu anlamak için eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarına bakılır eşit ise bir sonraki adıma geçilir.

Daha sonra sığır CA elüsyonu için CA II elüsyon tamponu olan, 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH:5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip CA-II enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa yardımıyla elüatlar 3'er mL halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanları ölçüldü (Kolon çapı 1,3 cm, jel yüksekliği 40 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml). Absorbans değerlerinin yüksek olduğu tüpler toplanarak diyaliz torbası içinde yaklaşık 3-4 saat 0,05 M Tris-SO₄ (pH:7,4) tamponunun içinde bekletildi (Beydemir ve Gülçin, 2004) ve ardından enzim saflığının kontrolü için SDS-PAGE tekniği kullanıldı. Daha sonra BCA enzimi analiz için kullanıldı (Laemmli, 1970). Protein, standart olarak serum albümini kullanılarak Bradford yöntemiyle ölçüldü (Bradford, 1976).

3.3 Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Manyetik Fe₃O₄ nanopartikülleri ortak çöktürme yöntemi kullanılarak, açık hava ortamında sentezlendi. Çalışmada, 7,5 g FeCl₂.4H₂O ve 10,1 g FeCl₃.6H₂O 25 ml suda çözüldü. Çözeltinin üzerinde 25 ml NH₄OH (%25) eklenerek mekanik karıştırıcıda 700 rpm hızda 2 dakika karıştırıldı. Amonyum hidroksit eklendiğinde çözeltinin renginin siyaha döndüğü

gözlemlendi. Elde edilen siyah renkli çökeltiler, beherin altına güçlü nityum mıknatıslar konularak tutuldu. Üsteki sıvı kısım ise bir pipet yardımı ile dikkatli bir şekilde alınarak atıldı. Sonraki işlemde MNP'ler 3 kez 52 mL deiyonize su ile 2 kez de 51 mL etanol ile yıkandı ve süzülerek etüvde 60°C'de 2 saat boyunca kurutularak toz haline getirildi (Karaağaç, 2011; Özel, 2015).

MNP sentezinin doğrulanması için SEM ve VSM ile karakterizasyon çalışmaları yürütüldü. Karakterizasyon çalışmaları; SEM için Bilecik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden, VSM işlemi için ise TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü-UME'den hizmet alımı ile yapıldı.

3.4 Manyetik Nanopartiküllerin Fonksiyonelleştirilmesi

Manyetik nanopartiküllere farklı fonksiyonel gruplar bağlanarak 2 farklı destek materyali sentezlendi.

I. Destek Materyali: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$

II. Destek Materyali: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$

3.4.1 Destek materyali I ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$)

Bu destek materyali için MNP'lere 3-(aminopropil) trietoksisilan (APTES) (%99) kullanılarak amin grubu (NH_2) bağlanarak fonksiyonel hale getirildi. Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş MNP'lerden 300 g alınarak 100 mL etanol ve 4 mL distile su içerisine konularak 15 dk sonikasyon ile homojen bir şekilde dağılmaları sağlandı. Daha sonra 200 µl APTES bu karışıma ilave edildi. Karışımının sıcaklığı 70°C'ye çıkartıldı ve reaksiyon 18 saat boyunca sürdürüldü. 18 saatlik reaksiyon sonucunda, APTES bağlı MNP'ler öncelikle 9000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüjlenerek karışımdan ayrılacaktır. Santrifüjasyon sonrasında elde edilen MNP'ler manyetik ayırma ile ayrılıp, distile su ile 5 kez yıkandı ve kurutuldu (Cao vd., 2009).

3.4.2 Destek materyali II ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$)

Silisyum oksit kaplı MNP'lerin hazırlanması için 4 g MNP alınıp, 180 mL etanol ve 20 mL distile su ile karıştırıldı ve 30 dk sonikasyon yapıldı. Daha sonra üzerine 2 mL TEOS eklenerek 15 dk sonikasyonu sağlandı. 10 mL NH_4OH bu karışımın üzerine yavaş bir şekilde damla damla karıştırıcıda eklendi. 750 rpm'de 6 saat boyunca karıştırıldı. Elde edilen siyah renkli çökelti etanol ve distile su ile yıkanarak mıknatıs ile toplanarak 60°C'de 4 saat etüvde kurutuldu. Toz haline getirilen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 'den bir miktar alınarak karakterizasyon için ayrıldı. Geriye kalan $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 'den 0,5 g alındı ve üzerine etanol eklenip 30 dk sonikasyon

yapıldı. Daha sonra 300 µl APTES eklenerek sonikasyona devam edildi. Yayılan parçacıklar sonikasyondan alınıp shaker cihazına konuldu. Daha sonra mıknatıs ile ayrılması sağlandı. Distile su ve etanol ile yıkanarak kurutuldu (Al-Dhrub vd., 2017; Wang vd., 2011).

3.5 Karbonik Anhidraz Enziminin İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu

3.5.1 Karbonik anhidraz enziminin immobilizasyonu

Sentezlenen MNP-APTES-TEOS destek materyali alınıp üzerine % 20'lik GA (15 mL su ve 5mL GA) eklenerek hafifçe karıştırıldı ve 2 saat inkübe edildi. Daha sonra, GA ile aktifleştirilmiş destek materyali, harici bir manyetik alan kullanılarak çözeltiden toplandı ve fazla GA'yı çıkarmak için damıtılmış su ile 3 defa yıkandı ve kurutuldu. Toz haline getirilen bu destek materyalinden bir miktar alınarak karakterizasyon için ayrıldı. Daha sonra Tris-H₂SO₄ tamponu (50 mM, pH 8,0) hazırlandı ve 4mL alınarak serbest enzimin 4 mL ile karıştırıldı. Üzerine GA ile aktifleştirilmiş destek materyali eklenerek süspansiyon edildi ve bir süre hafifçe çalkalanarak 25°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra immobilize edilmiş BCA mıknatıs yardımı ile geri kazanıldı ve bağlanmamış BCA'nın çıkarılması için de Tris-H₂SO₄ tamponu (50 mM, pH 8,0) ile üç kez yıkandı ve yıkanan çözelti toplandı (Al-Dhrub vd., 2017).

3.5.2 Karbonik anhidraz enziminin aktivite tayini

Esteraz aktivitesi, Armstrong vd. (1966) tarafından modifiye edilen ve tanımlanan yöntemle göre bir substrat olarak p-nitrofenil asetat kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu yöntemle göre, CA enzimi varlığında 4-nitrofenil asetatın, 4-nitrofenilata dönüşümü 348 nm'de UV absorbanstaki değişime göre belirlenmektedir. 4-nitrofenilasetatın, 4-nitrofenilata hidrolizinde gözlenen maksimum dalga boyu 348 nm'dir. Bu nedenle, enzimatik reaksiyonun takibinde 348 nm'deki UV absorpsiyonu kullanıldı. Aktivite için toplam hacim 1 mL olacak şekilde ayarlandı. Bunun için 0,05 M Tris-SO₄ pH 7,4 tamponundan 400 µl, substrat olarak 360 µl 3 mM p-nitrofenil asetat, 190 µl saf su ve 50 µl enzim alındı. Köre karşı 348 nm'de absorbanstaki değişiklik, serbest ve immobilize enzim için 5 dakika boyunca ölçüldü. Enzim, immobilize edilen materyallerden deney karışımına aynı miktarlarda ilave edilerek her iki destek materyali için aktiviteye bakıldı. Bir birim enzim aktivitesi, oda sıcaklığında dakikada salınan 1 umol p-nitrofenol olarak ifade edildi.

3.5.3 İmmobilize CA'nın karakterizasyonu

İmmobilizasyonun doğrulanması için VSM, FTIR ve SEM ile yapılan karakterizasyon çalışması Bilecik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma

Merkezi'nden ve TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü-UME'den hizmet alımı ile gerçekleştirildi.

Elde edilen MNP destek materyalinin, immobilizasyon öncesi ve sonrası, kaplanmış ve kaplanmamış parçacıkların manyetik özellikleri, bir VSM Oxford 3001 titreşimli numune manyetometresi ile incelendi. Malzemelerin manyetik alan duyarlılığı, Ms histerezis döngüleri gibi temel manyetik parametreleri, bu cihazlar ile tespit edilmektedir. Demir parçacıklarının kaplanmasından önceki ve sonraki VSM verilerinin karşılaştırılması, oda sıcaklığında destekte güçlü ferromanyetizmanın varlığını göstermesi yönünden kanıt sunar (Hu vd., 2010).

Destek materyalinin yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupları belirlemek ve enzim immobilizasyon aşamalarının başarısını doğrulamak için, MNP, fonksiyonelleştirilmiş MNP, GA ile aktifleştirilmiş MNP ve enzim immobilize edildikten sonraki MNP, fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ölçümleriyle araştırıldı. FTIR, spektrumu 400 ile 4000 cm^{-1} arasındaki dalga sayılarını kapsayan Perkin Elmer/Spectrum 100 spektrometresi kullanılarak belirlendi.

Elementel özellikler EDX ile belirlenmiştir. SEM-EDX analizi, EDX aparatı ile donatılmış bir ZEISS/Supra 40 VP taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzim bağlı destek materyalinin, morfolojik yapısındaki değişime bağlı olarak enzimin yüzeye bağlanıp bağlanmadığı tespit edildi. Ayrıca EDX elementel analiz ile kükürt varlığının tespit edilmesi de destek materyalinin yüzeyinde CA enziminin varlığını ispatlamaktadır.

3.5.4 Enzim yükleme etkinliği

Serbest CA ve immobiliz CA'daki protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi (Bradford, 1976). Bu yöntem, Coomassie brilliant blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanarak kısa sürede renk değiştirmesi esasına dayanır. Coomassie brilliant blue G-250 negatif yüklü olduğu için proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlanabilen bir boyadır. Kırmızı rengi mavi renge dönüşür. Boya, çözeltide kırmızı renkte bulunurken, proteine bağlandığı zaman mavi renge dönüşür. Reaksiyonda renk dönüşümü iki dakika içinde gerçekleşir. Bir saate kadar da renk değişimi sabit kalabilir. Oluşan kompleksin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu 595 nm'dir. Bu yöntem 1-100 μg arasında duyarlılık gösterir. Numune hazırlandıktan sonra G-250 çözeltisi ilave edildi ve köre karşı 595 nm'de absorbans değeri okundu.

İmmobilizasyon yüzdesi, immobilizasyondan önce ve sonra solüsyondaki enzim aktivitesindeki değişimden yola çıkılarak belirlendi.

$$\text{İmmobilizasyon verimi (\%)} = X / ((A-B)) \times 100$$

A = eklenen enzim, B = serbest enzim ve X = immobilize enzim

3.6 İmmobilize CA'nın pH, Termal Stabilitesi, Depolama Stabilitesi, Operasyonel Kararlılığı ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

3.6.1 Optimum ve stabil pH'ın belirlenmesi

Enzim aktivitesine etki eden optimum pH'ın belirlenmesi için immobilize CA ve serbest CA enzim derişimleri eşit olacak şekilde alındı. pH'sı 7,0-9,0 aralığında 1M Tris-SO₄ ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 1M potasyum fosfat (KH₂PO₄) tampon çözeltilerinde esteraz aktivitesi belirleme yöntemiyle enzim aktiviteleri incelendi. Sonuçlar çizelgelerle ve aktivite-pH grafikleri halinde gösterildi. Serbest ve immobilize CA'nın en yüksek aktivite gösterdiği değer, optimum pH olarak belirlendi. Stabil pH belirlenirken de, immobilize CA ve serbest CA enzimi, yine pH'sı 7,0-9,0 aralığında 1M Tris-SO₄ ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 1M potasyum fosfat (KH₂PO₄) tampon çözeltilerinde 4°C'de muhafaza edildi. Daha sonra 1 hafta arayla yapılan esteraz aktivite ölçümünde, enzimin stabil olduğu pH belirlendi. İnkübasyon süresine karşılık, aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi. Bu analizlerden elde edilen optimum pH değeri, diğer deneylerde kullanıldı (Yadav vd., 2012).

3.6.2 Termal stabilitenin ve optimum sıcaklığın belirlenmesi

Serbest CA ve immobilize CA'nın termal stabiliteleri için aktiviteleri, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C ve 70°C arasında değişen sıcaklıklarda pH 8, 1M Tris-SO₄ tamponunda 20 dk aralıklarla toplamda 80 dk'lık bir inkübasyondan sonra esteraz aktivite ölçüm yöntemi ile ölçüldü. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için de, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C ve 70 °C arasında 5'er derece sıcaklık farkı oluşturularak daha önce belirlenen enzimin optimum pH'sında su banyosu kullanılarak esteraz aktivite ölçüm yöntemi ile belirlendi. Bu analizlerden elde edilen optimum sıcaklık değeri, diğer deneylerde de kullanıldı (Sahoo vd., 2012).

3.6.3 Kinetik parametrelerin belirlenmesi

Substrat başlangıç derişiminin, enzim aktivitesine etkisini incelemek için farklı derişimlerde (1,2,3,4,5 ve 6 mM) 4-nitrofenilasetat hazırlandı. Optimum pH'da ve optimum sıcaklıkta her bir substrat derişimi için hem immobilize CA hem de serbest CA enziminin

aktivitesi belirlendi. Elde edilen verilerle enzimatik reaksiyon için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) değerleri belirlendi (Ünlüer, 2015).

3.6.4 Operasyonel kararlılık testi

İmmobilize CA, p-NPA tahlili için test edildi. 0,05 M Tris- SO_4 pH 7,4 tamponundan 400 μ l, substrat olarak 360 μ l 3 mM p-nitrofenil asetat, 190 μ l saf su 5 mg enzim in üzerine ilave edildi. Çalkalanan süspansiyon çözeltisi süzüldü ve absorbans, her 5 dakikalık aralıklarla UV spektrofotometrede 348 nm'de ölçüldü. İmmobilizasyondan sonra, destek materyali üzerindeki gevşek bağlı CA'yı çıkarmak için her döngü arasında, immobilize enzim bir mıknatıs yardımı ile manyetik olarak ayrıldı ve fosfat tamponu ile yıkandı. Bu prosedür, immobilize CA'nın p-NPA hidrolizi için 20 kez tekrarlandı (Yadav vd., 2012).

3.6.5 Depolama stabilitesi

Depolama stabilitesi çalışması için numuneler, 4,8 ml fosfat tamponu (0,1 M, pH 7,0) içerisine yüklenen 50 μ l serbest enzim ve 5'er mg immobilize enzim ile 4°C 60 gün süreyle inkübe edildi. Serbest CA ve immobilize CA için depolama stabilitesi belirlendi. Katalizörlerin p-NPA'nın hidrolizi için aktiviteleri, 10 gün aralıklarla 4°C'de 60 gün boyunca analiz edildi (Sahoo vd., 2012). İmmobilizasyon sonrası ilk aktivite % 100 kabul edilerek yüzde stabilite belirlendi.

3.7 İmmobilize CA İle CO_2 'in Kalsiyum Karbonata Dönüşümü

3.7.1 Gaz halindeki CO_2 'i suda çözerek, çözünmüş CO_2 oluşturma

Gaz haldeki CO_2 'den, suda çözünmüş CO_2 karışımı oluşturuldu. Bunun için ise; deiyonize su, gaz haldeki CO_2 ile 0°C'de köpürtülerek suda çözünmüş karbondioksit çözeltisi hazırlandı. Daha sonra deneylerin başında bu çözeltiden 60 ml, enzim ve tampon karışımına eklendi. Tampon olarak fosfat tamponu kullanıldı. Reaksiyonun ilerleyişi, karışımın pH'ı ölçülerek izlendi. Çünkü CO_2 hidrasyonu sırasında bikarbonat iyonları ve protonların oluşumu nedeniyle pH düşüşü olmaktadır. pH değerinde başka bir değişiklik olmadığında deney sonlandırıldı (Mirjafari vd., 2007).

3.7.2 İmmobilize CA'nın, CO_2 giderim potansiyeli

Serbest ve İmmobilize CA enziminin, CO_2 'i tutarak kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) formundaki kireç taşına dönüştürmesi için; 0,9 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ve tampon çözeltisi içeren bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Tampon solüsyonu, 2,52 g Tris tamponunun (tris (hidroksimetil) aminometan) 20 ml deiyonize su içinde çözülerek hazırlandı. Daha sonra 50 μ l serbest enzim

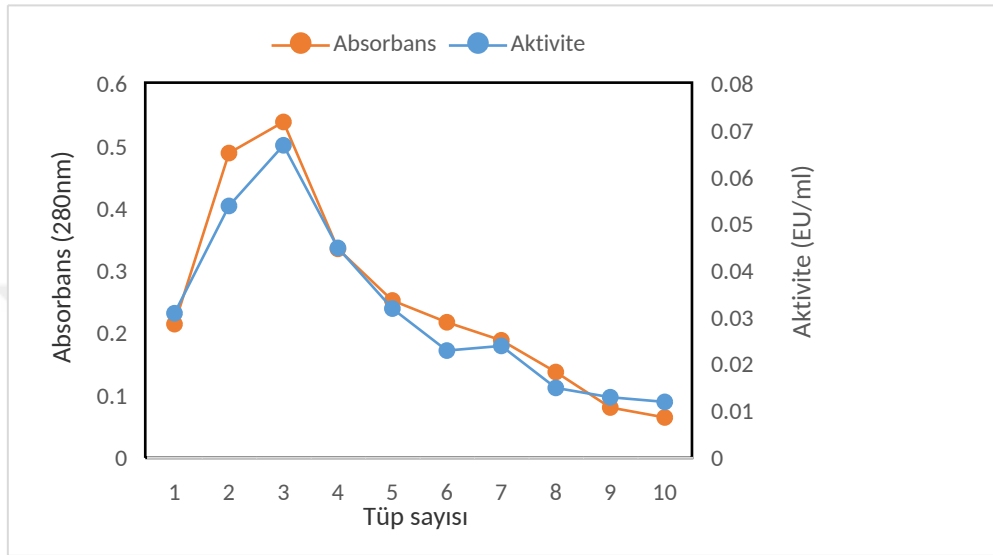
ve 5'er mg immobilize enzim hazırlandı ve biri kontrol olmak üzere 4 farklı erlene ayrıldı. Reaksiyonu başlatmak için bu erlendeki karışıma 60 ml çözünmüş CO₂ gazı eklenerek reaksiyonun ilerlenmesi sağlandı. Reaksiyon, yaklaşık 0°C'de tutuldu. CO₂ çözeltisi şişeye eklendiğinde hemen sızdırmaz bir filmi ile kapatıldı. Deneyde, CO₂ gazı karışıma eklendikten sonra, karışım 2 saat bekletmeye bırakıldı ve ardından çökelti Whatmann-42 filtre kâğıdı kullanılarak filtre edildi. Çökelen CaCO₃'ün ağırlığını ölçmek için kurutuldu (Mirjafari vd., 2007). Böylelikle serbest ve immobilize CA arasında kalsiyum karbonat çökmesinin karşılaştırmalı tespiti yapıldı.



4. BULGULAR

4.1 Sığır Karbonik Anhidraz (BCA)'ın Saflaştırılması

Afinite kolon kromatografisi kullanılarak sığır kanından hazırlanan hemolizattan Bölüm 3.2’de anlatıldığı gibi BCA saflaştırılmıştır. Absorbans değerleri ve CA esterez aktivite her bir elüsyonda belirlendi ve sonuçlar Şekil 4.1’de gösterildi.

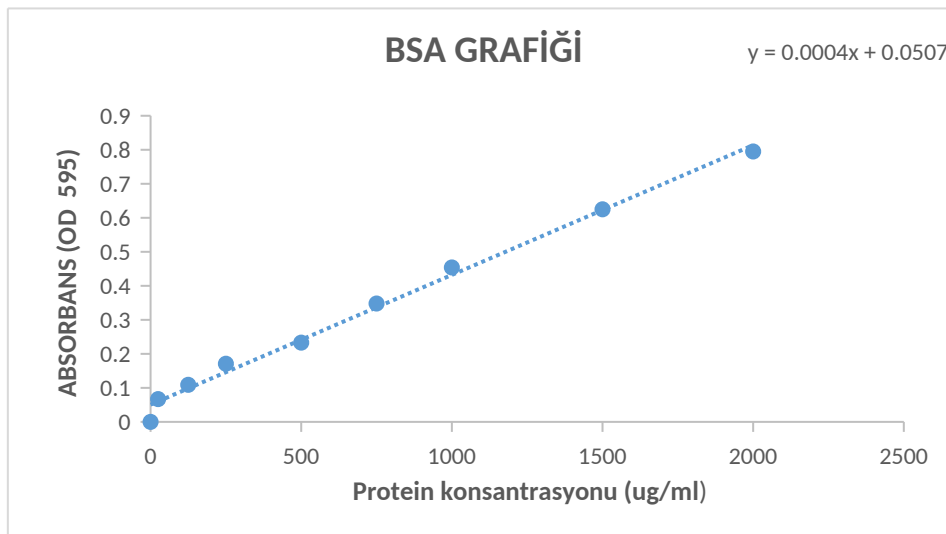


Şekil 4. 1. Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılan BCA enziminin elüsyonu sonucu yapılan absorbans-aktivite grafiği

Sığır kanı eritrositlerinden elde edilen homojenizasyon örneğinden ve saflaştırılan enzimden numune alınarak enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Protein miktarı, Bradford yöntemi (Bradford 1976) kullanılarak belirlendi. Proteinlerin miktar tayini için Bradford ajanı (Comassie Plus Protein Assay Reagent, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Bunun için öncelikli olarak BSA (Bovin Serum Albumin)’nın bilinen konsantrasyonları ile bir standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğrinin oluşturulmasında üretici firmanın talimatları takip edilmiştir. Kullanılan BSA dilüsyonları Tablo 4.1’de verilmiştir. 30 µL standart üzerine 1,5 mL Coomassie Reaktifi eklenerek iyice karıştırılmıştır. 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon sonunda absorbanslar 595 nm de spektrofotometre cihazında belirlenmiş, standart eğrinin formülü bu ölçümlere göre oluşturulmuştur. Daha sonra bir standart eğri oluşturulmuştur. (Şekil 4.2). Elde edilen homojenat ve saflaştırılan enzimde ki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi.

Tablo 4. 1. Standart Test Tüpü ve Mikroplaka Protokolleri için Seyreltme Şeması (Çalışma Aralığı = 100–1500µg / mL)

Ependorf etiketi	Dilüsyon miktarı	BSA(2mg/mL) kaynağı ve hacmi	Final BSA konsantrasyonu
A	0	300 µL stok BSA	2000 µg/mL
B	125 µL	375 µL stok BSA	1500 µg/ mL
C	325 µL	325 µL stok BSA	1000 µg/ mL
D	175 µL	175 µL B dilüsyonu	750 µg/ mL
E	325 µL	325 µL C dilüsyonu	500 µg/ mL
F	325 µL	325 µL E dilüsyonu	250 µg/ mL
G	325 µL	325 µL F dilüsyonu	125 µg/ mL
H	400 µL	100 µL G dilüsyonu	25 µg/ mL
I	400 µL	0	0 µg/ mL =Blank



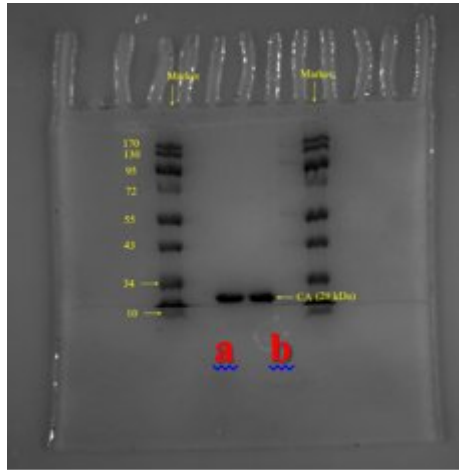
Şekil 4. 2. Bradford yöntemiyle, BSA kullanılarak, protein miktarını belirlemek için hazırlanan standart grafik

Homojenatın Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamit afinite kolonuna uygulanması sonucu elde edilen saflaştırma verileri Tablo 4.2’de gösterildi.

Tablo 4. 2. Homojenize edilmiş örnekdeki enzim ve afinite kolonundan saflaştırılan enzim için belirlenen saflaştırma sonuçları

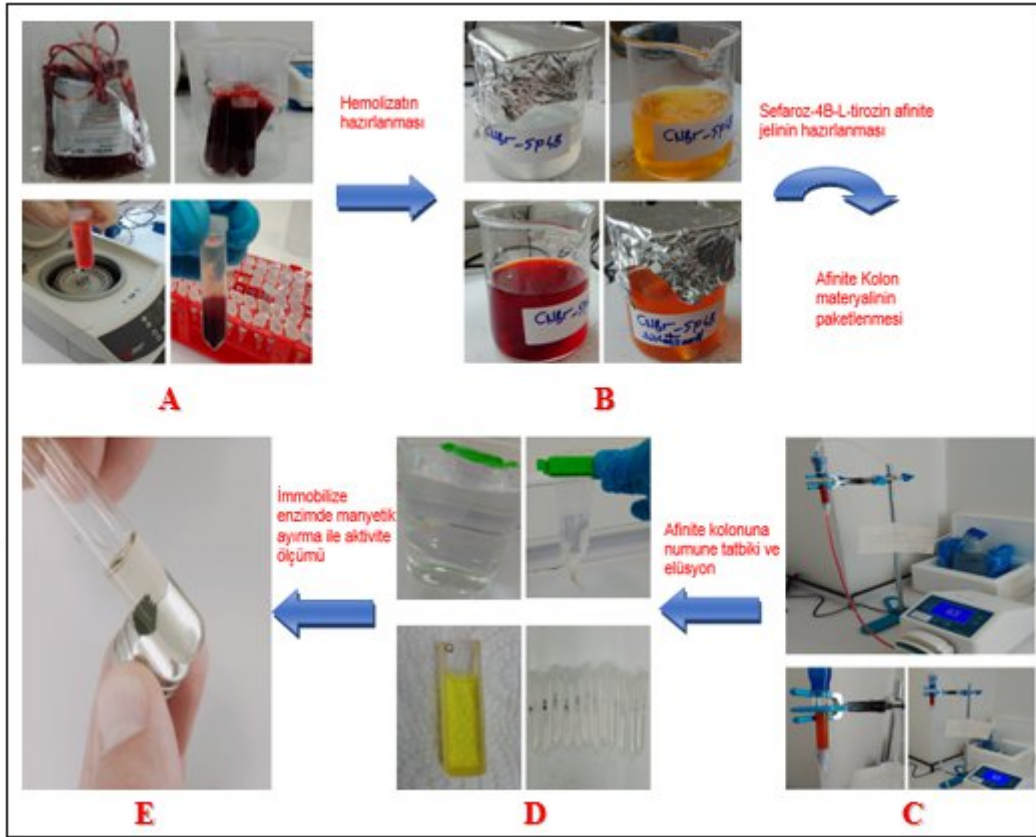
Numune Türü	Aktivite (EU/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Toplam aktivite	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	157,217	25	11,6787	291,967	13,461	3930,42	100	1,00
Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit afinite kolon kromatografisi	88,362	16	0,0787	1,259	1122,94	1413,79	35,98	83,42

Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin hem saflığını kontrol etmek için hem de molekül kütesini belirlemek için %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jelelektroforez (SDS-PAGE) yapıldı. SDS-PAGE’de BCA ile birlikte molekül kütesi bilinen standart protein numuneleri aynı zamanda yürütüldü ve sığır eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin molekül kütesi yaklaşık 29 kDa bulundu (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan BCA enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı (a: standart b: Numune)

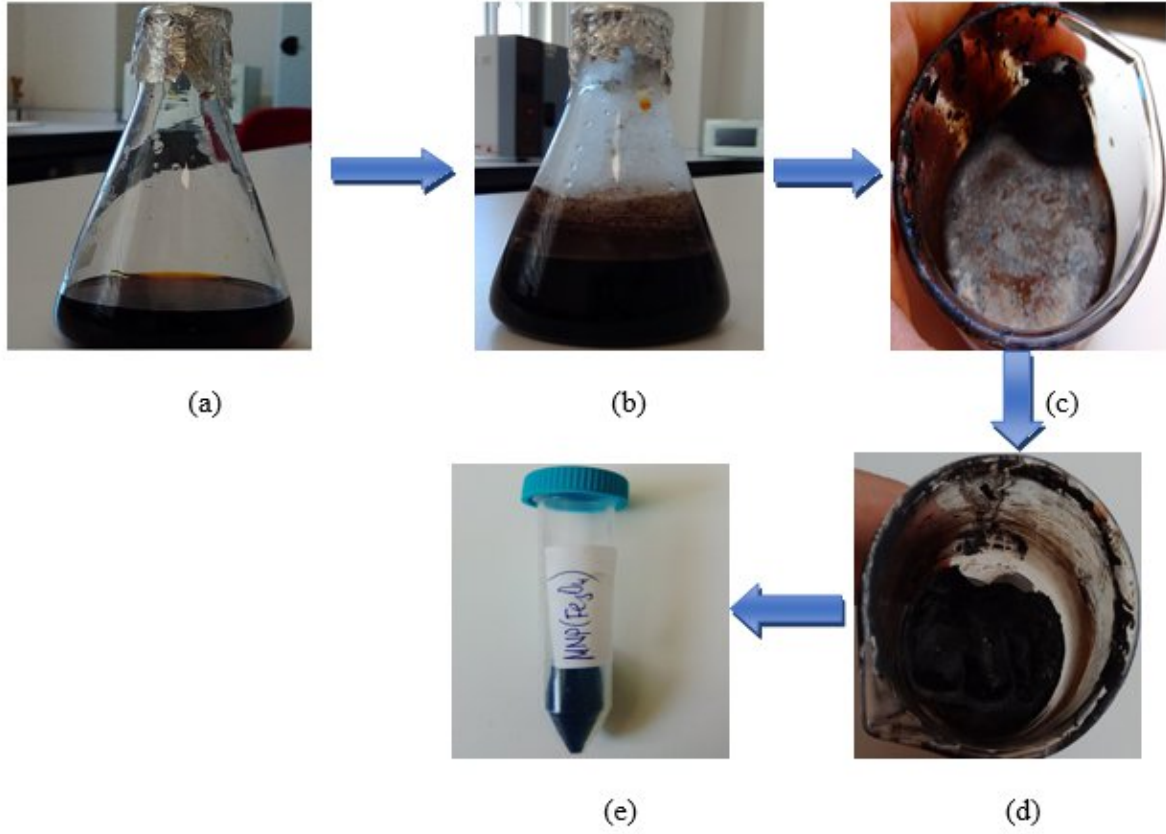
Çalışmanın iş akışı Şekil 4.4’de sunulmuştur.



Şekil 4. 4. Çalışmanın iş akışı (A: Sığır kan numunelerinin alınması ve hemolizatin hazırlanması, B: Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması, CNBr ile aktive edilmiş sepharose-4B’ye tirozin takılması ve Sülfanilamit kenetlendirilmesi, C: Afinite kolon materyalinin paketlenmesi, Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu, D: Absorbans değerinin yüksek olduğu tüplerin diyaliz edilmesi, enzim saflığının kontrolü için SDS-PAGE yapılması ve serum albümini kullanılarak Bradford yöntemiyle protein tayini, E: İmmobilize enzimde manyetik ayırma ile aktivite ölçümü)

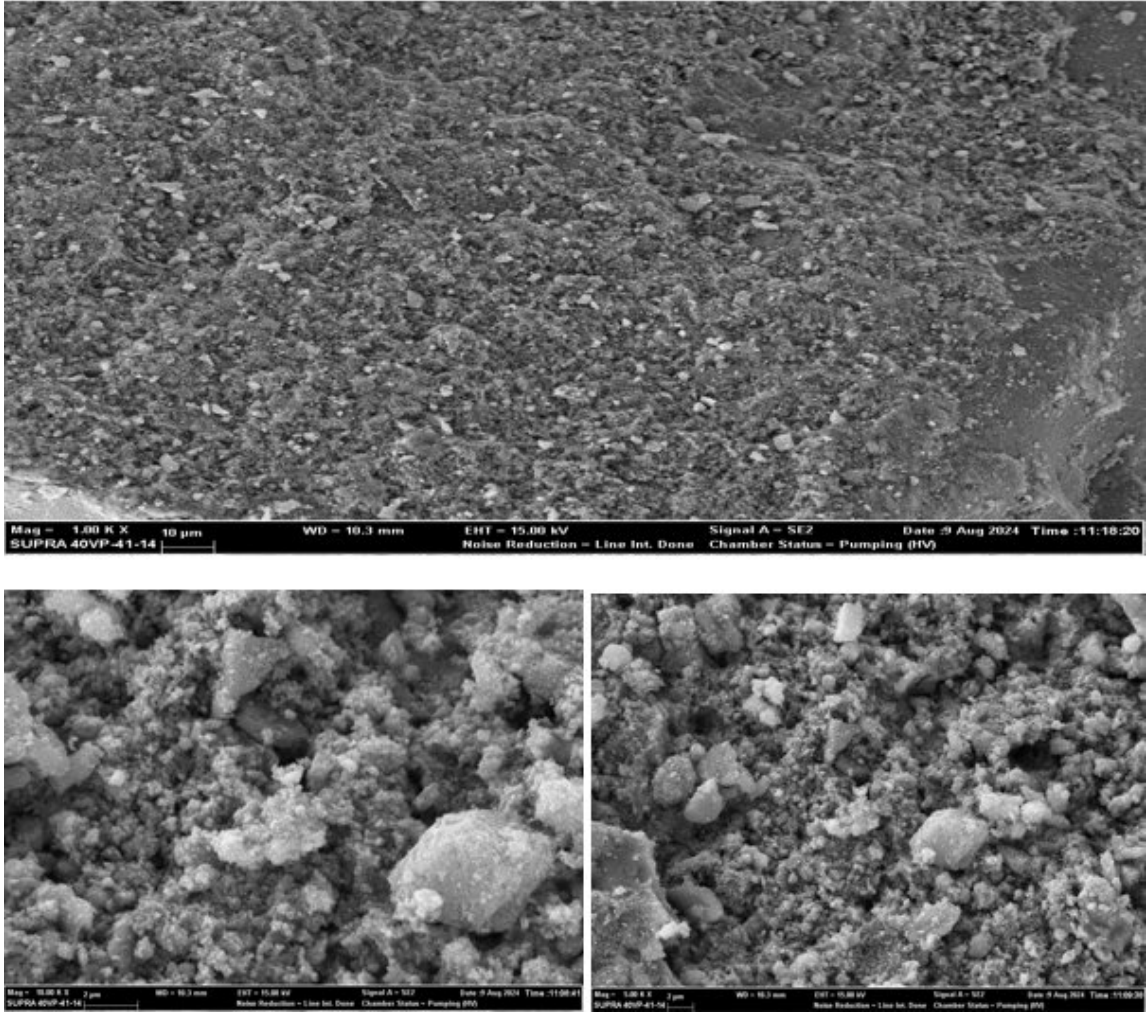
4.2 Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Fe_3O_4 Manyetik nanopartikülleri ortak çöktürme yöntemi kullanılarak, açık hava ortamında sentezlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. Kimyasal ortak çöktürme yöntemi ile demir oksit manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesi (a: Demir çözeltisi, b: NH_4OH katkısı ile siyah renk alan çözelti, c: Nano partiküllerin oluşumu, d: Nano partiküllerin etanol ile yıkanmış hali, e: Kurutulan MNP'ler)

MNP sentezinin doğrulanması için SEM-EDX analizi ve VSM ile karakterizasyon çalışmaları yapıldı. SEM-EDX analizi ile MNP 'nin morfolojik özellikleri ve element bileşimi belirlendi. MNP'lerin yüzey özellikleri, 15 kV'da taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak gözlenmiştir. Sentezlenen MNP'lerin farklı büyütme oranlı SEM görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir.

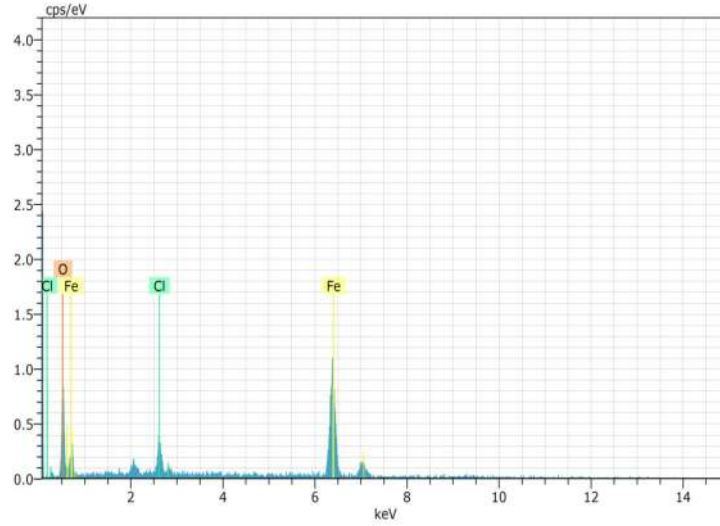


Şekil 4. 6. Fe_3O_4 MNP'lere ait SEM görüntüsü

SEM görüntüleri ile yapılan Enerji Dispersive X-Ray Spektroskopisi (EDX), element bileşimi hakkında bilgi vermiştir. Tablo 4.3'de ve Şekil 4.7'de EDX sonuçları verilmiştir.

Tablo 4. 3. Fe_3O_4 MNP'lere ait EDX sonuçları

Element	Wt%	Atomic %
Fe	82,47	60,53
O	13,67	35,01
Cl	3,86	4,46
Total	100	100

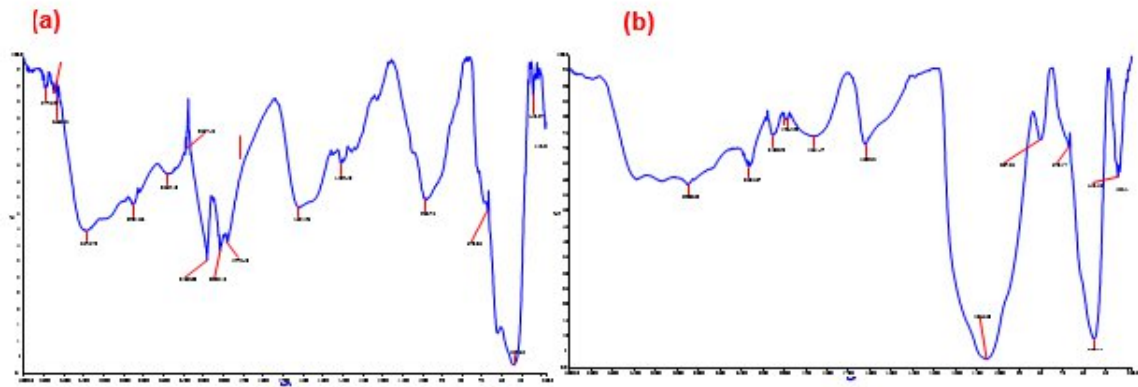


Şekil 4. 7. Fe₃O₄ MNP'lere ait EDX diyagramı

4.3 Manyetik Nanopartiküllerin Fonksiyonelleştirilmesi ve Karakterizasyonu

MNP'ler Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi iki farklı fonksiyonel grup bağlanarak işlevsel hale getirildi.

Destek materyalinin yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupları belirlemek için fonksiyonelleştirilmiş MNP'lerin, FT-IR ölçümleri yapıldı. İletim spektrumları 400 ila 4000 cm⁻¹ arasında elde edildi. Sentezlenen destek materyallerinin FT-IR sonuçları Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4. 8. (a): I. Destek Materyali (MNP-APTES) ve (b): II. Destek Materyali (MNP- TEOS-APTES)'e ait FT-IR spektrumları

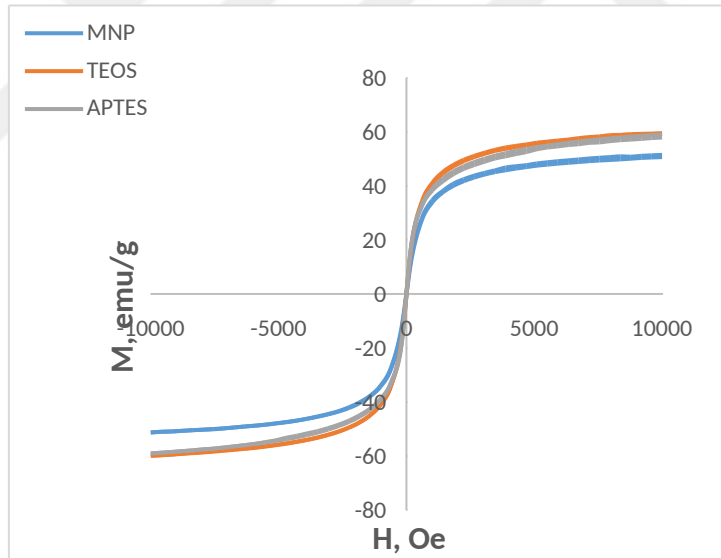
FT-IR spektrumlarına göre;

I. Destek Materyali (MNP-APTES): 539,68 cm^{-1} , 443,87 cm^{-1} ve 418,89 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler, Fe-O bağının karakteristik absorpsiyon bantlarını göstermektedir. 3376,79 cm^{-1} ve 3662,21 cm^{-1} 'deki pikler, APTES'in varlığını gösteren N-H gerilmesine karşılık gelebilir.

II. Destek Materyali (MNP-TEOS-APTES): 556,19 cm^{-1} , 443,48 cm^{-1} ve 435,14 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler, Fe-O bağının karakteristik absorpsiyon bantlarını göstermektedir.

1056,30 cm^{-1} (Si-O-Si gerilmesi) ve 2900,29 cm^{-1} (C-H gerilmesi) pikleri, TEOS'un varlığını gösterir. 807,38 cm^{-1} 'deki pik, APTES'ten Si-C gerilmesi ile ilişkili olabilir.

Elde edilen MNP destek materyalinin, immobilizasyon öncesi kaplanmış ve kaplanmamış parçacıkların manyetik özellikleri, oda sıcaklığında (298 K) titreşimli örnek manyetometre (VSM) ile analiz edilmiştir. Sentezlenen destek materyallerinin, manyetik histerezis döngüleri Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4. 9. Çıplak MNP'lerin, immobilizasyon öncesi MNP-APTES'in ve MNP-TEOS-APTES'in manyetik histerezis döngüleri.

Çıplak MNP'lerin, MNP-APTES'in ve MNP-TEOS-APTES'in doygunluk manyetizasyonları (M_s) sırasıyla; 51,375 emu/g, 59,040 emu/g ve 59,680 emu/g olarak ölçülmüştür.

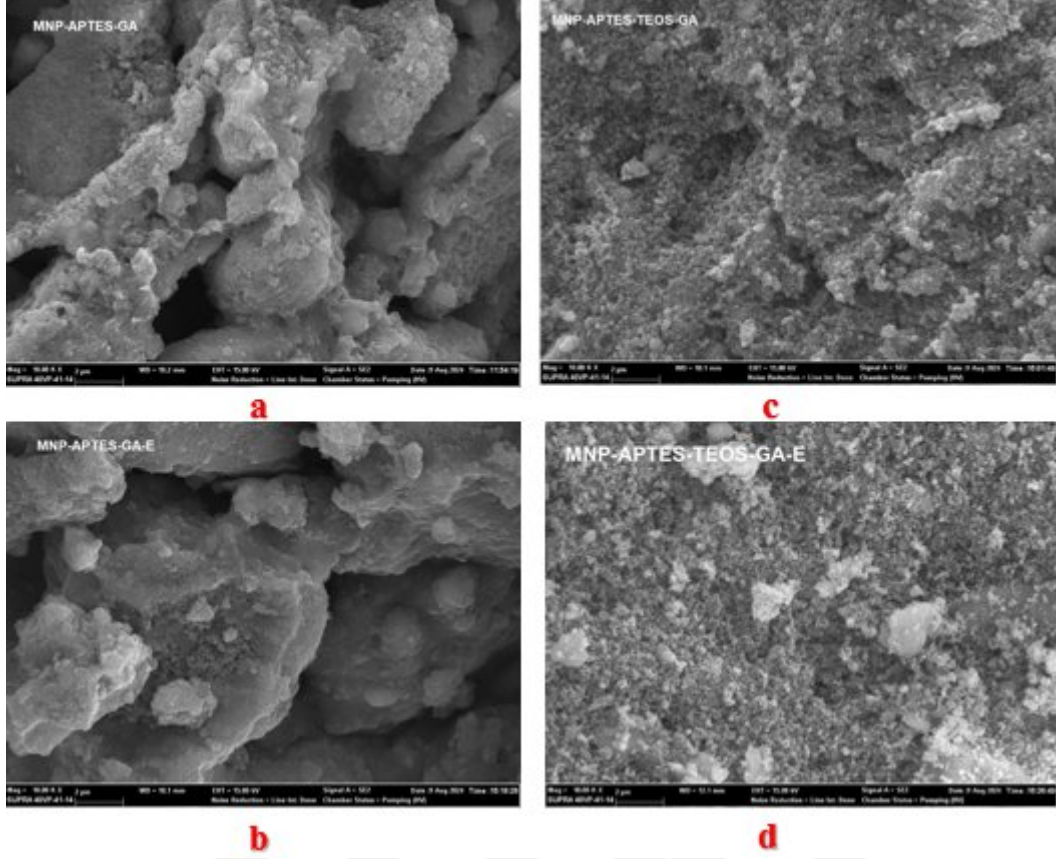
4.4 Karbonik Anhidraz Enziminin İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu

Sentezlenen destek materyallerinin immobilizasyonu Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. İmmobilizasyondan sonra serbest enzimin, MNP-APTES-GA-BCA ve MNP-TEOS-APTES-GA-BCA’nın esteraz aktivitesi ve Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı. Aktivite verileri Tablo 4.4’de gösterildi.

Tablo 4. 4. Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan serbest enzim ve immobilize enzimlerin esteraz aktivite ve spesifik aktivite sonuçları

Numune Türü	Aktivite (EU/ml)	Toplam hacim	Protein (mg/ml)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)
Serbest BCA	92,00	1	0,07875	1168,25
MNP-APTES-GA-BCA	71,00	1	0,00375	18933,33
MNP-TEOS-APTES-GA-BCA	156,00	1	0,11625	1341,93

CA enziminin immobilizasyondan önce ve sonra SEM-EDX analizi, immobilize enzimlerin morfoloji ve element bileşimindeki farklılıkları ispatlamak için kullanıldı. MNP'lerin yüzey özellikleri, 15 kV'da taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak gözlenmiştir. Herbir çalışmanın 10.00KX büyütme görüntüleri gelişmelerin takip edilebilmesi için Şekil 4.10’da sunulmuştur.



Şekil 4. 10. Destek materyallerinin immobilizasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri (a: İmmobilizasyon öncesi I. Destek Materyali (MNP-APTES-GA), b: İmmobilizasyon sonrası I. Destek Materyali (MNP-APTES-GA-BCA), c: İmmobilizasyon öncesi II. Destek Materyali (MNP-TEOS-APTES-GA), d: İmmobilizasyon sonrası II. Destek Materyali (MNP-TEOS-APTES-GA-BCA))

SEM görüntüleri ile yapılan Enerji Dispersive X-Ray Spektroskopisi (EDX), element bileşimi hakkında bilgi vererek enzimin desteğe bağlanıp bağlanmadığını yani immobilizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği hakkında bilgi vermiştir (Tablo 4.5 ve Şekil 4.11).

Tablo 4. 5. İmmobilize MNP'lere ait EDX sonuçları (a: İmmobilize I. Destek Materyali (MNP-APTES-GA-BCA) b: İmmobilize II. Destek Materyali (MNP-TEOS-APTES-GA-BCA))

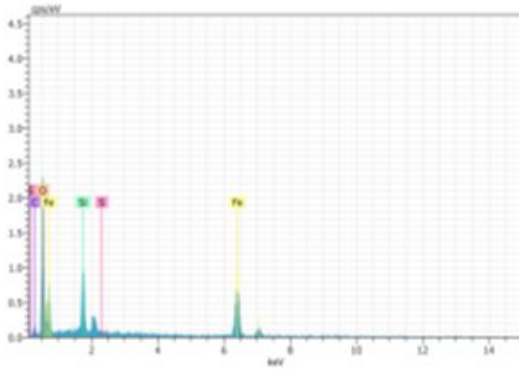
(a)

Element	Wt%	Atomic %
Fe	65.36	34.05
O	27.81	50.58
C	6.00	14.53
Si	0.58	0.60
S	0.25	0.23
Total	100	100

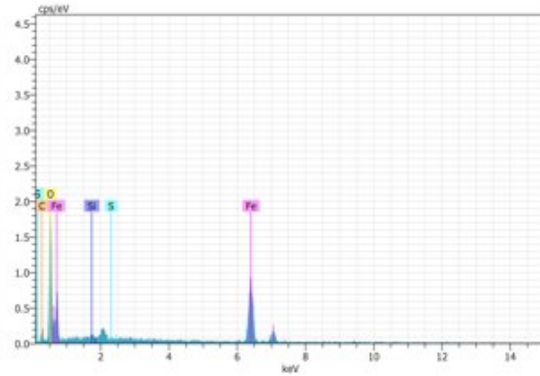
(b)

Element	Wt%	Atomic %
Fe	49.17	22.25
O	36.61	57.82
C	5.94	12.50
Si	8.11	7.30
S	0.16	0.13
Total	100	100

(a)



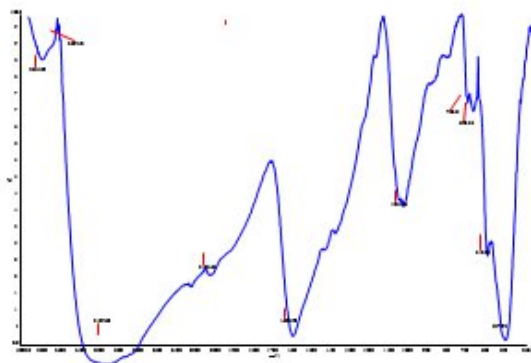
(b)



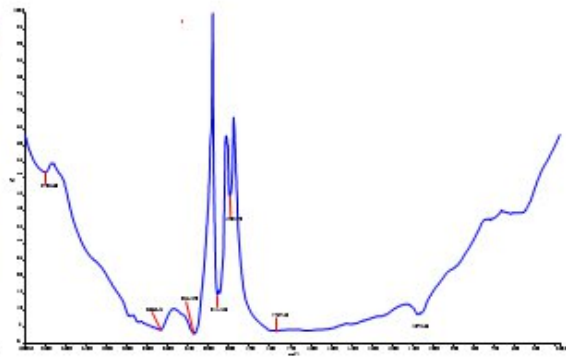
Şekil 4. 11. İmmobilize MNP'lere ait EDX diyagramı (a: İmmobilize I. Destek Materyali (MNP-APTES-GA-BCA) b: İmmobilize II. Destek Materyali (MNP-TEOS-APTES-GA-BCA))

İmmobilizasyon sonrası destek materyalinin yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupları belirlemek için FT-IR ölçümleri yapıldı (Şekil 4.12).

(a)



(b)



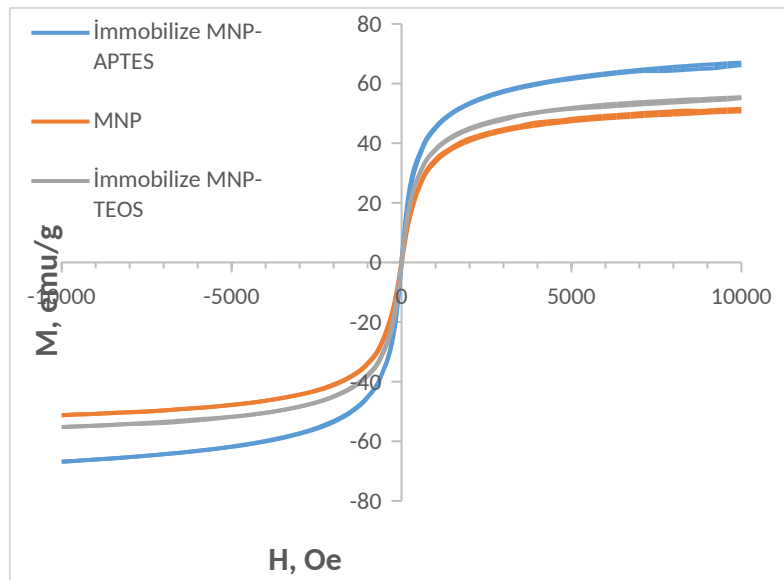
Şekil 4. 12. (a) İmmobilizasyon sonrası I. Destek Materyali (MNP-APTES-GA-BCA) ve (b) İmmobilizasyon sonrası II. Destek Materyali (MNP-TEOS-APTES-GA-BCA)'e ait FT-IR spektrumları

FT-IR spektrumlarına göre;

İmmobilizasyon sonrası I. Destek Materyali (MNP-APTES-GA-BCA): $3189,06\text{ cm}^{-1}$ (N-H gerilmesi) ve $2103,65\text{ cm}^{-1}$ (C=O gerilmesi) pikleri, APTES ve GA'nın varlığını önerir. $1626,92\text{ cm}^{-1}$ ve $2103,65\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler, amin ve karbonil gruplarının varlığını gösterir ve ayrıca APTES ve GA'yı önerir. Bu durum enzim -NH_2 gruplarının, GA'nın -C=O grubu sayesinde, yüzeye bağlandığının ispatıdır.

İmmobilizasyon sonrası II. Destek Materyali (MNP-TEOS-APTES-GA-BCA): $1075,66\text{ cm}^{-1}$ ve $2114,85\text{ cm}^{-1}$ 'deki piklerin varlığı, TEOS, APTES ve GA'nın varlığını doğrulayan Si-O-Si, C=O ve amin gruplarını önerir. $1056,30\text{ cm}^{-1}$, $1075,66\text{ cm}^{-1}$, $1767,53\text{ cm}^{-1}$ ve $3189,06\text{ cm}^{-1}$ 'deki piklerin kombinasyonu, TEOS, APTES ve GA'nın varlığını gösterir. Yine bu durum da enzim -NH_2 gruplarının, GA'nın -C=O grubu sayesinde, yüzeye bağlandığının kanıtıdır

MNP ve immobilizasyon sonrası destek materyallerinin manyetik özellikleri oda sıcaklığında (298 K) VSM ile analiz edilmiştir. Çıplak MNP'lerin, immobilizasyon sonrası MNP-APTES-GA-BCA'nın ve MNP-TEOS-APTES-GA-BCA'nın manyetik histerezis döngüleri Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4. 13. Çıplak MNP'lerin, immobilizasyon sonrası MNP-APTES-GA-BCA 'in ve MNP-TEOS-APTES-GA-BCA 'in manyetik histerezis döngüleri

Çıplak MNP'lerin, MNP-APTES-GA-BCA'nın ve MNP-TEOS-APTES-GA-BCA'nın doygunluk manyetizasyonları (Ms) sırasıyla; 51,375 emu/g, 66,932 emu/g ve 55,332 emu/g olarak ölçülmüştür.

4.5 Enzim Yükleme Etkinliği

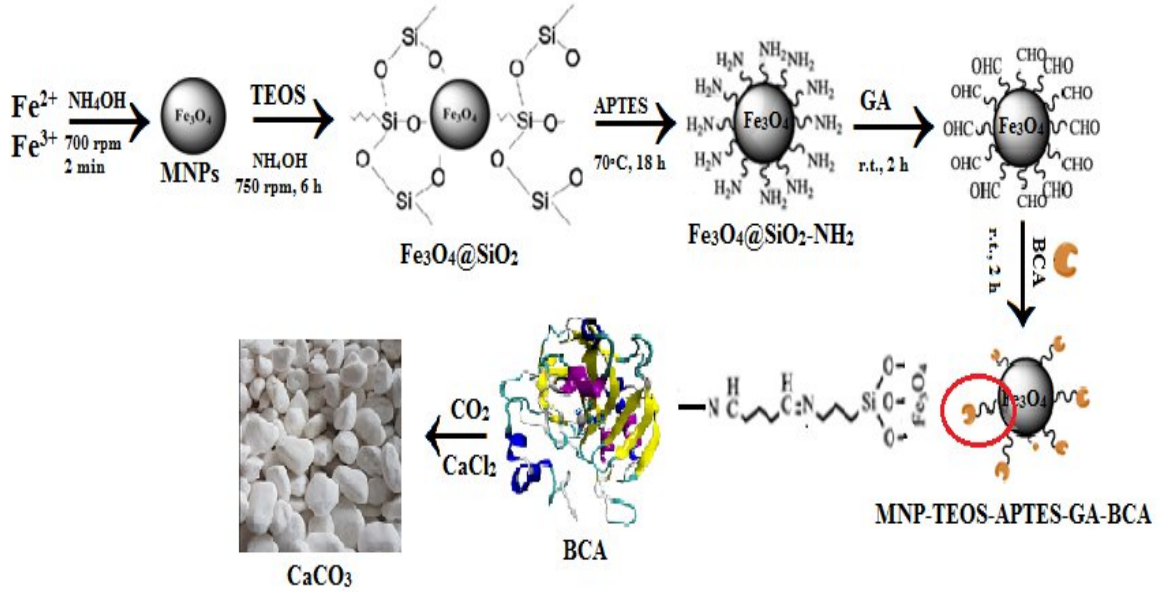
Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan BCA enzimi destek materyali üzerine bağlandıktan sonra % immobilizasyon verimi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{İmmobilizasyon verimi (\%)} = X / ((A-B)) \times 100$$

A = eklenen enzim, B = serbest enzim ve X = immobilize enzim.

MNP-APTES-GA-BCA'nın immobilizasyon verimi %72, MNP-TEOS-APTES-GA-BCA'nın immobilizasyon verimi ise % 78 bulunmuştur.

MNP'lerin sentezlenmesi, fonksiyonelleştirilmesi ve BCA'nın immobilizasyonu ve CO₂ giderimi ile ilgili çalışma şeması Şekil 4.14'de sunulmuştur.

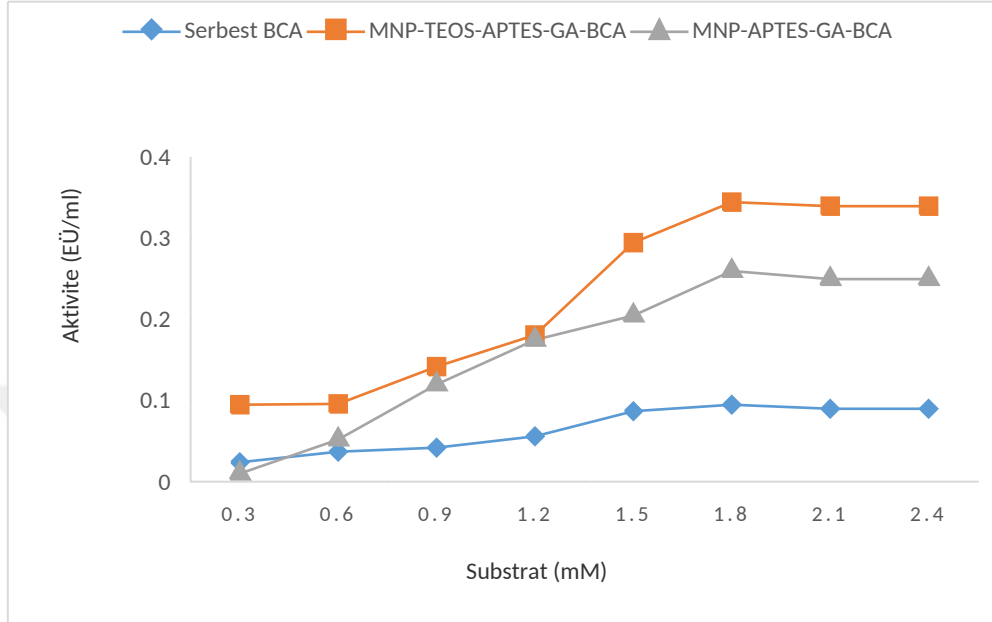


Şekil 4. 14. Çalışmanın şeması

4.6 İmmobilize CA'nın pH, Termal Stabilitesi, Depolama Stabilitesi, Operasyonel Kararlılığı ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılarak elde edilen serbest BCA ve immobilize BCA'ların farklı substrat konsantrasyonundaki (0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5, 1,8, 2,1 ve 2,4 mM)

aktivite değerleri ölçölmüştür. Bu değerlerden serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesine, substrat derişiminin etkisini gösteren Michaelis-Menten aktivite grafiği çizilmiştir (Şekil 4.15). Grafikten faydalanarak K_m ve V_{max} değerleri her üç enzim için hesaplanmıştır (Tablo 4.6).

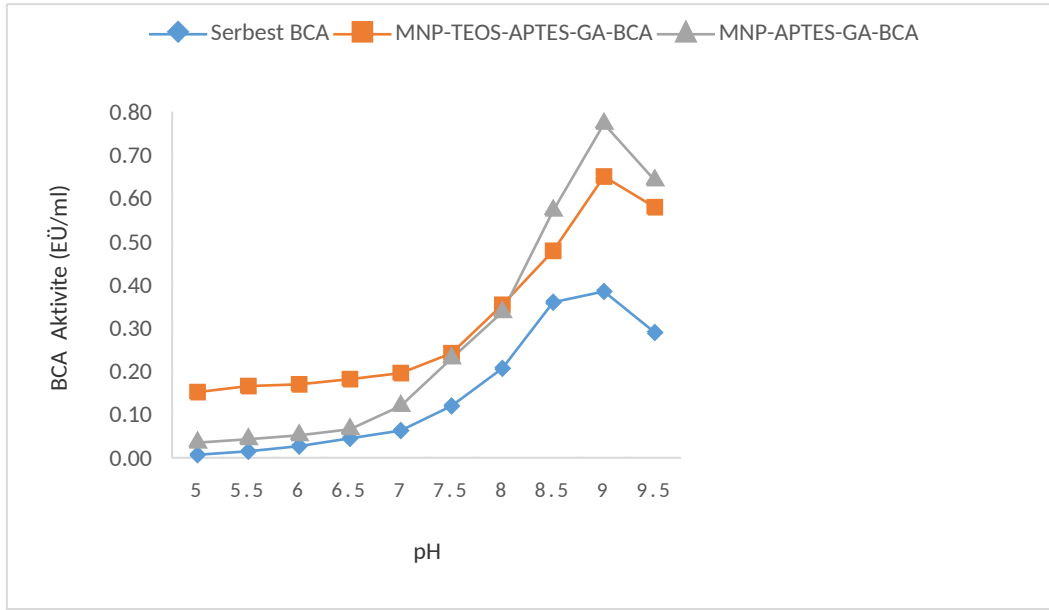


Şekil 4. 15. Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan serbest ve immobilize BCA aktivitesine, substrat konsantrasyonunun etkisini gösteren Michaelis-Menten aktivite grafiği

Tablo 4. 6. Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan serbest ve immobilize BCA için K_m ve V_{max} değerleri

Enzim	K_m (mM)	V_{max} (EU/mL)
Serbest BCA	4,888	3,081
MNP-TEOS-APTES-GA-BCA	9,369	1,810
MNP-APTES-GA-BCA	16,160	2,195

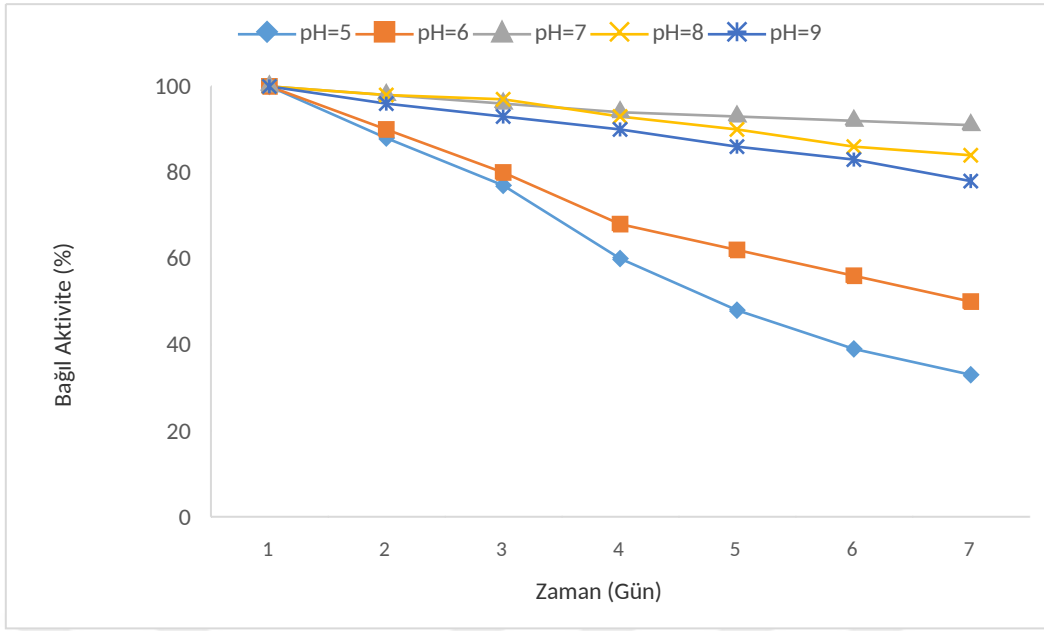
Enzim aktivitesine etki eden optimum pH'ın belirlenmesi için immobilize CA ve serbest CA pH'sı 7,0-9,0 aralığında 1M Tris-SO₄ ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 1M potasyum fosfat (KH₂PO₄) tampon çözeltilerinde esteraz aktivitesi belirleme yöntemiyle enzim aktiviteleri incelendi. Sonuçlar aktivite-pH grafikleri halinde gösterildi (Şekil 4.16). Serbest ve immobilize CA'nın en yüksek aktivite gösterdiği değer, optimum pH olarak belirlendi.



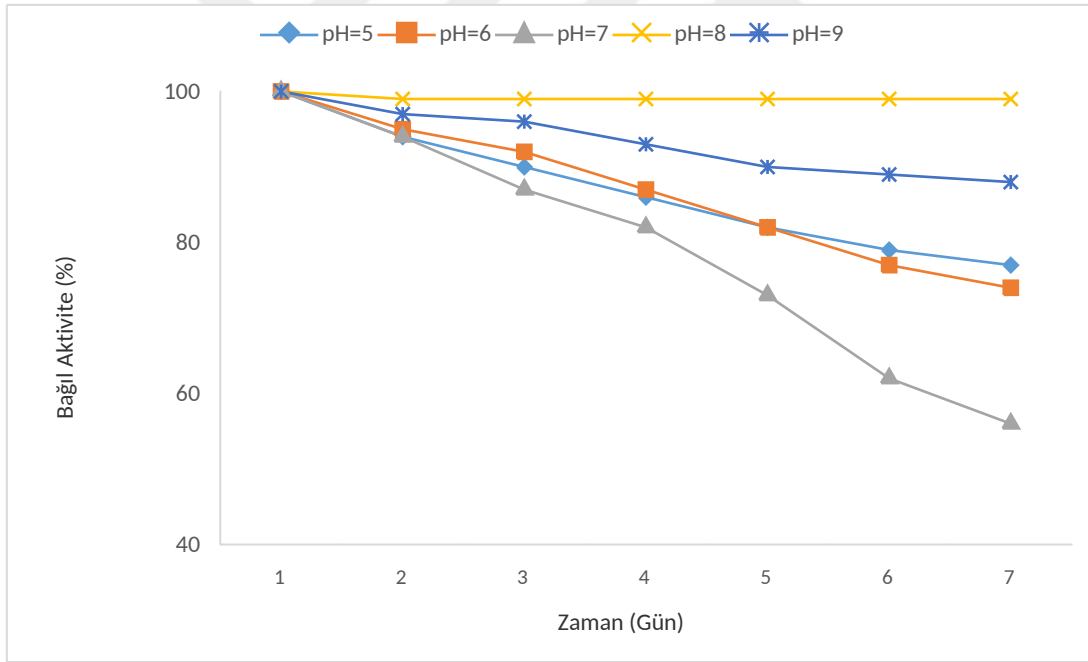
Şekil 4. 16. Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan serbest ve immobilize BCA aktivitelere, pH etkisi

Serbest BCA için optimum pH: 9, MNP-TEOS-APTES-GA-BCA için optimum pH: 9 ve MNP-APTES-GA-BCA için optimum pH: 9 olarak belirlendi.

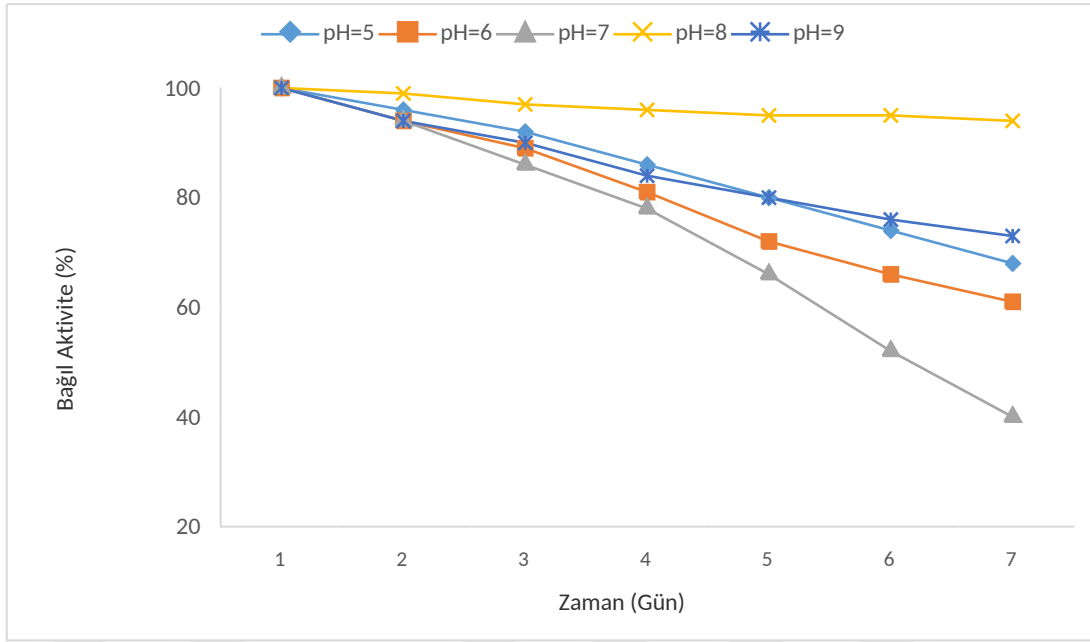
Stabil pH belirlenirken de, immobilize CA ve serbest CA enzimi, yine pH'sı 7,0-9,0 aralığında 1M Tris-SO₄ ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 1M potasyum fosfat (KH₂PO₄) tampon çözeltilerinde 4°C'de muhafaza edildi. Daha sonra birer gün arayla, 1 hafta boyunca yapılan esteraz aktivite ölçümünde, enzimin stabil olduğu pH belirlendi. İnkübasyon süresine karşılık, yüzde bağıl aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi (Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).



Şekil 4. 17. Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan serbest BCA'nın, stabil olduğu pH



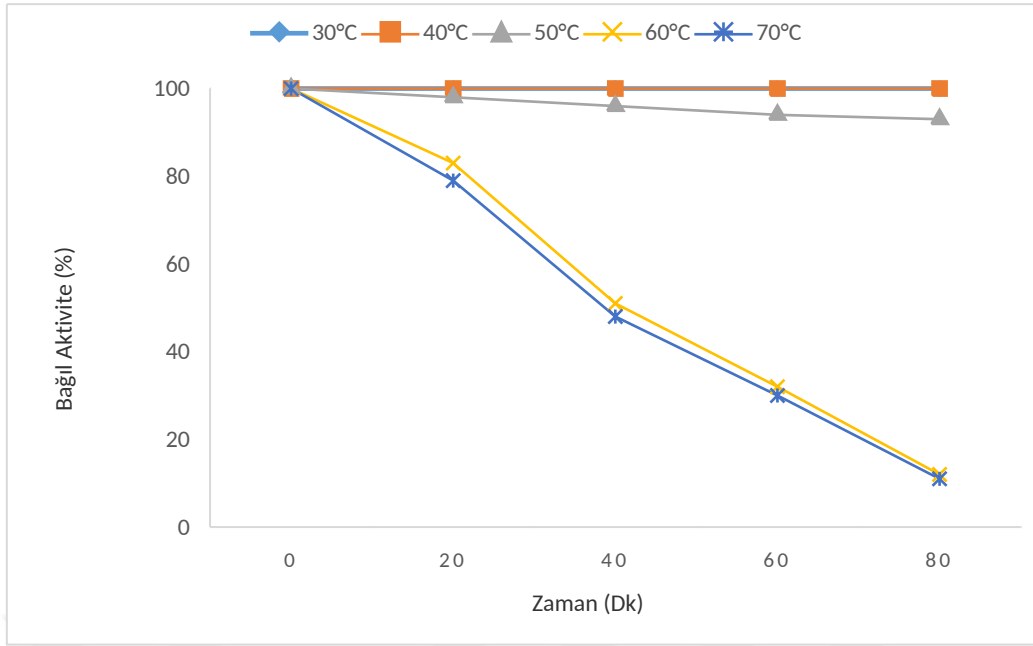
Şekil 4. 18. MNP-TEOS-APTES-GA-BCA'nın, stabil olduğu pH



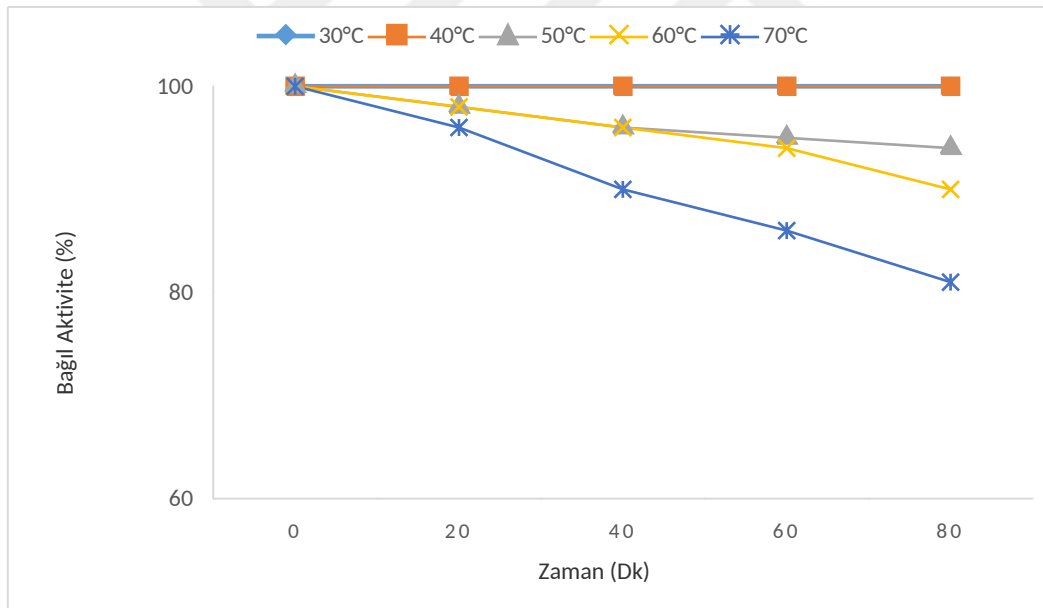
Şekil 4. 19. MNP-APTES-GA-BCA'nın, stabil olduğu pH

Grafikler incelendiğinde serbest ve immobilize enzimler pH 8-9 aralığında daha kararlıdır. Ancak serbest BCA, pH 9'da (1,0 M Tris-SO₄ tamponunda) kalan aktivitesini %78 oranında, MNP-TEOS-APTES-GA-BCA % 88 oranında ve MNP-APTES-GA-BCA ise %84 oranında korumuştur.

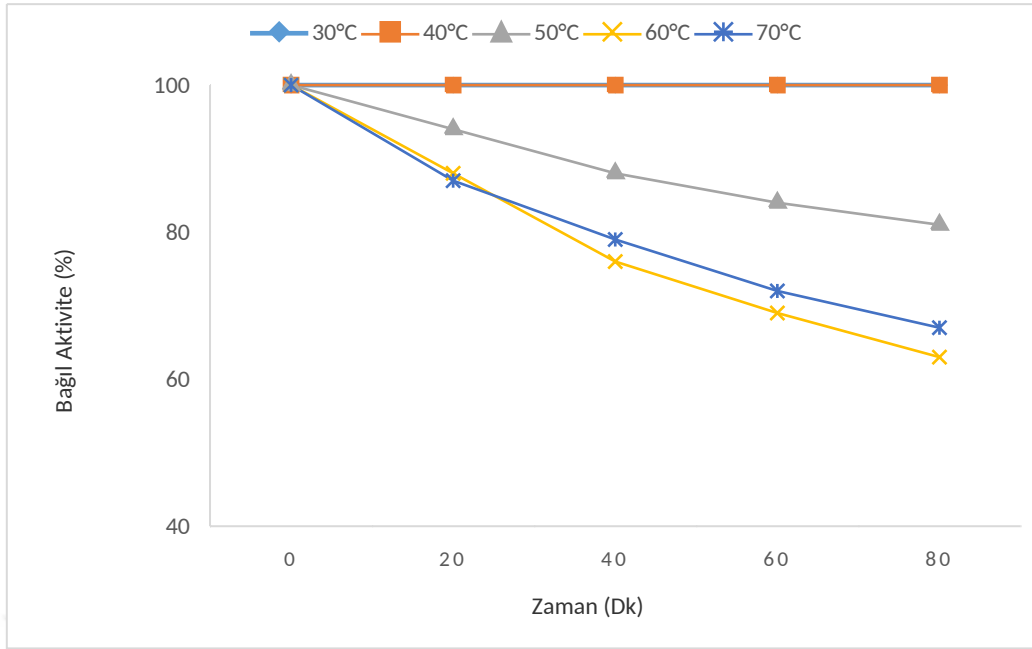
Serbest BCA, ve immobilize BCA'nın termal stabiliteleri için aktiviteleri, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C ve 70°C arasında değişen sıcaklıklarda, optimum pH'da, 1M Tris-SO₄ tamponunda 20 dk aralıklarla toplamda 80 dk'lık bir inkübasyondan sonra esteraz aktivite ölçüm yöntemi ile ölçüldü. Sonuçlar yüzde bağıl aktivite-zaman grafikleri ile gösterildi (Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).



Şekil 4. 20. Serbest BCA aktivitesinin stabil olduğu, sıcaklık



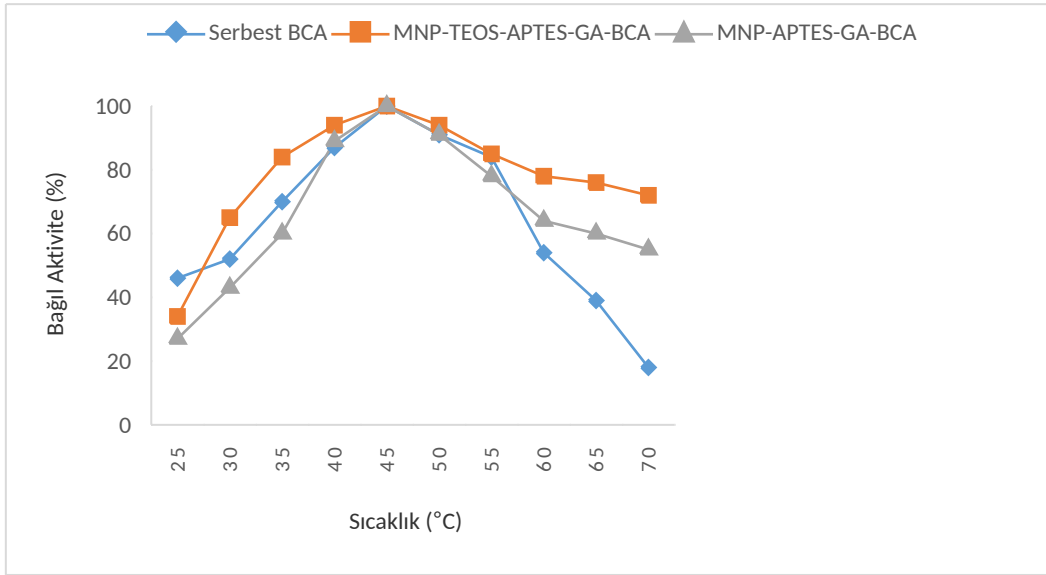
Şekil 4. 21. MNP-TEOS-APTES-GA- BCA aktivitesinin stabil olduğu, sıcaklık



Şekil 4. 22. MNP-APTES-GA- BCA aktivitesinin stabil olduğu, sıcaklık

Serbest BCA için kalan aktivite 30°C’de %100, 40°C’de %100, 50°C’de %93, 60°C’de %12 ve 70°C’de %11 iken; MNP-TEOS-APTES-GA-BCA için kalan aktivite 30°C’de %100, 40°C’de %100, 50°C’de %94, 60°C’de %90 ve 70°C’de %81 ve MNP-APTES-GA-BCA için kalan aktivite 30°C’de %100, 40°C’de %100, 50°C’de %81, 60°C’de %63 ve 70°C’de %67 olarak belirlendi. Serbest BCA’da aktivite 60 ve 70°C’de %11’e kadar düşmesine karşın immobilize BCA’da kalan aktivite %81’e kadar korunmuştur.

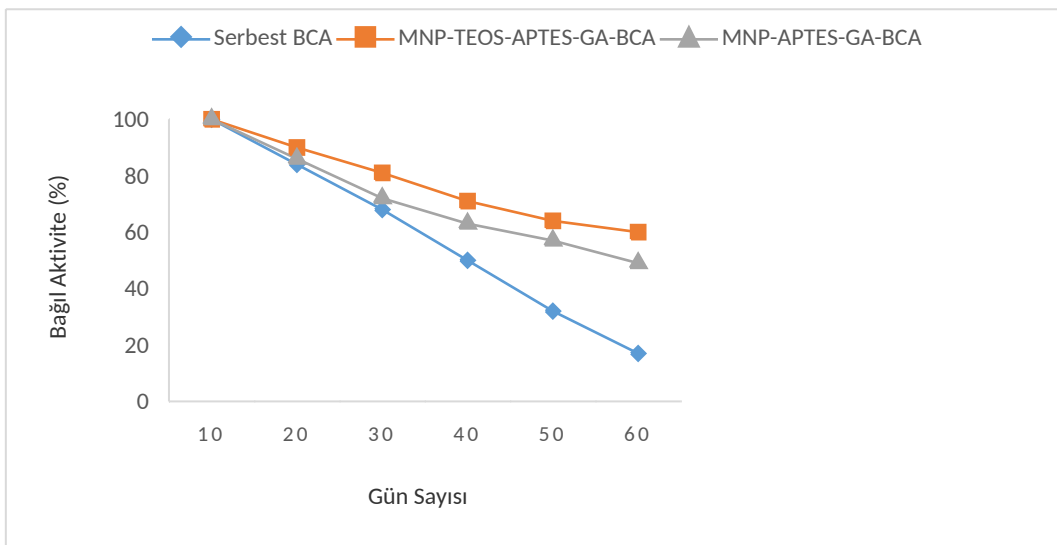
Optimum sıcaklığın belirlenmesi için de, 25-70°C arasında 5’er derece sıcaklık farkı oluşturularak daha önce belirlenen enzimin optimum pH’sında su banyosu kullanılarak esteraz aktivite ölçüm yöntemi yapıldı. Sonuçlar aktivite-sıcaklık grafikleri ile gösterildi (Şekil 4.23).



Şekil 4. 23. Serbest ve immobilize BCA aktivitelerine, sıcaklığın etkisi

Serbest BCA için optimum sıcaklık: 45°C, MNP-TEOS-APTES-GA-BCA için optimum sıcaklık: 45°C ve MNP-APTES-GA-BCA için optimum sıcaklık 45°C olarak belirlendi.

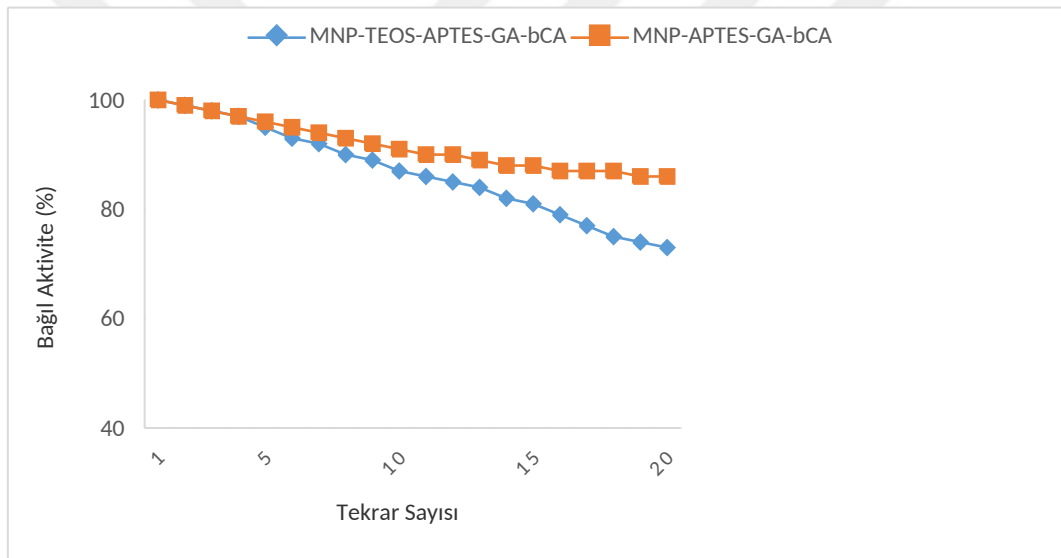
Depolama stabilitesi çalışması için numuneler, 4,8 ml fosfat tamponu (0,1 M, pH 7,0) içerisine yüklenen 50 µl serbest enzim ve 5'er mg immobilize enzim ile 4°C 60 gün süreyle inkübe edildi. 10 gün aralıklarla 4°C'de 60 gün boyunca aktivitelerine bakıldı. Elde edilen sonuçlar % bağıl aktivite grafiği ile gösterilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4. 24. Serbest ve immobilize enzimlerin depolama stabilitesi

İmmobilizasyon sonrası ilk aktivite % 100 kabul edilerek 60 günün sonunda kalan yüzde bağıl aktivite belirlendi. Grafikte de görüldüğü gibi 60 gün sonunda MNP-TEOS-APTES-GA-BCA aktivitesinin % 60'ını, İmmobilize MNP-APTES-GA-BCA aktivitesinin % 49'unu korurken aynı şartlarda serbest BCA aktivitesinin yalnızca % 17'sini korumuştur.

İmmobilize enzimlerin operasyonel kararlılığı için yani yeniden kullanılabilirlikleri için p-NPA tahlili yapıldı. 0,05 M Tris-SO₄ pH 7,4 tamponundan 400 µl, substrat olarak 360 µl 3 mM p-nitrofenil asetat, 190 µl saf su 5 mg enzimin üzerine ilave edildi. Çalkalanan süspansiyon çözeltisinde MNP'ler bir mıknatıs yardımı ile manyetik olarak ayrıldı ve absorbans, her 5 dakikalık aralıklarla UV spektrofotometrede 348 nm'de ölçüldü. 20 tekrara kadar bakılan sonuçlar % aktivite grafiği ile gösterildi (Şekil 4.25).



Şekil 4. 25. İmmobilize enzimlerin operasyonel kararlılığı

İmmobilize enzimler 20 defa yeniden kullanıldığında; MNP-TEOS-APTES-GA-BCA aktivitesinin % 73'ünü, MNP-APTES-GA-BCA ise aktivitesinin % 86'sını koruduğu belirlendi.

4.7 İmmobilize CA'nın, CO₂ Giderim Potansiyeli

Serbest ve İmmobilize CA enziminin, CO₂'i tutarak CaCO₃ formunda kireç taşına dönüştürmesi için bölüm 3.7'de anlatıldığı gibi, biri kontrol olmak üzere, 4 farklı reaksiyon karışımı hazırlandı (Şekil 4.26). Erlendeki reaksiyon karışımında 0,3 g CaCl₂-2H₂O, Tampon solüsyonu (2,52 g Tris tamponu 20 ml deiyonize su içinde çözülerek hazırlandı), 50 µl serbest

enzim ya da 5'er mg immobilize enzim ve 20 ml çözünmüş CO₂ gazı bulunmaktadır. Reaksiyon, 0°C'de tutulmuştur.



Şekil 4. 26. Serbest ve İmmobilize BCA'nın, CO₂ giderim potansiyeli için 4 farklı reaksiyon karışımı

Deneyde CO₂ gazı karışıma eklendikten sonra, hemen sızdırmaz bir filmi ile erlenler kapatıldı ve karışım 2 saat bekletmeye bırakıldı. Ardından çökelti Whatman-42 filtre kâğıdı kullanılarak filtre edildi. Çökelen CaCO₃'ün ağırlığını ölçmek için filtre kâğıtları kurutuldu (Şekil 4.27).



Şekil 4. 27. Serbest ve İmmobilize BCA ile CO₂'in kalsiyum karbonata dönüşümü sonrası Whatman-42 filtre kâğıdında biriken kalsiyum karbonat (a: Kontrol, b: Serbest BCA, c: MNP-APTES-GA-BCA, d: MNP-TEOS-APTES-GA-BCA)

Kullanmadan önceki filtre kağıtlarının kütlesi ve kurutulduktan sonraki filtre kağıtlarının kütlesi arasındaki fark alınarak, serbest ve immobilize BCA'nın oluşturduğu kalsiyum karbonat miktarı belirlendi. Bu sonuçlara göre:

Boş filtre kağıdı: 867,5 mg

Kontrol grubu filtre kağıdı: 867,7 mg

Serbest BCA filtre kağıdı: 880,5 mg

MNP-TEOS-APTES-GA-BCA filtre kâğıdı: 879,2 mg

MNP-APTES-GA-BCA filtre kağıdı: 889,5 mg

Kontrol grubunun (Enzim olmadan) oluşturduğu CaCO_3 miktarı: 0,2 mg, serbest BCA enziminin oluşturduğu CaCO_3 miktarı: 13 mg, immobilize MNP-TEOS-APTES-GA-BCA enziminin oluşturduğu CaCO_3 miktarı: 11,3 mg ve MNP-APTES-GA-BCA enziminin oluşturduğu CaCO_3 miktarı: 22 mg olarak bulunmuştur. CO_2 giderim potansiyeli olarak çöken CaCO_3 miktarları Tablo 4. 7’de sunulmuştur.

Tablo 4. 7. CO_2 giderim potansiyeli olarak oluşan kalsiyum karbonat çökeltisi

Reaksiyon Karışımları	Sıcaklık (°C)	Enzim Konsan-trasyonu	Tampon	Çöken CaCO_3 Miktarı (mg)
Kontrol	0	Enzim Yok	Var	0,2
Serbest BCA	0	50 μL	Var	13
MNP-TEOS-APTES-GA-BCA	0	5 mg	Var	11,3
MNP-APTES-GA-BCA	0	5 mg	Var	22

5. TARTIŞMA

CO₂ emisyonlarıyla mücadele etmek için son yıllarda kimyasal, fiziksel ve biyolojik teknolojiler olmak üzere çeşitli CO₂ giderimi teknolojileri araştırılmıştır (Franca ve Azapagic, 2015). Biyolojik yöntemler arasında enzimler ön plana çıkmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin CO₂ gideriminde yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Bhattacharya vd., 2003; Dilmore vd., 2009; Effendi ve Ng, 2019; Sahoo vd., 2012; Savile ve Lalonde, 2011).

CA, doğada yaygın olarak bulunan ve yaşamsal faaliyetlerin devamı için önemli bir metaloenzimidir (Ali vd., 2023; Hirakawa vd., 2021). İki ana CA izoenzimi (CA I ve CA II), eritrositlerin sitozolünde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Arslan vd., 2011; Ozensoy vd., 2006). Çalışmamızda, atık sığır kanı eritrositlerinden saflaştırarak elde ettiğimiz BCA'nın kullanılması atıkların ekonomiye kazandırılması açısından önem arz etmektedir. Bu durum enzimin birçok alanda kullanımı göz önüne alındığında kaynağın erişilebilir ve ekonomik olması açısından önemlidir.

Endüstride kullanılan serbest enzimler çözünür olması ve kolaylıkla geri kazanılıp tekrar kullanılamaması, önemli dezavantajlara yol açar. Bu olumsuzlukları minimize etmede bir strateji olarak enzim immobilizasyonu düşünülmektedir. Enzim immobilizasyonunun ana nedenlerinden biri, immobilizasyonun ardından moleküllerin kısıtlı depolama ve operasyonel stabilitesinde beklenen artıştır.

Sığır karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için sığır kanı Bilecik Belediyesi Ak Serhat Mezbahası'ndan alındı. Özellikle kanın pıhtılaşmasını önlemek için tam kesim esnasında, zaman kaybedilmeden, doğrudan damardan çıkan kandan 100 ml alındı, üzerine antikoagülant olarak kullanılan ACD çözeltisinden 15 ml ilave edildi. Böylelikle hem kanın pıhtılaşması önlendi hem de eritrositler için kullanılıncaya kadar bir beslenme ortamı oluşturuldu. Kan numuneleri alındıktan sonra 4°C'de korundu ve iki gün içinde hemolizat için kullanıldı. Afinite kolon materyali kullanılarak, hazırlanan hemolizattan CA saflaştırılmıştır. BCA enzimi, aktivite tayini için fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 3'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanları ölçüldü (Kolon çapı 1 cm, jel yüksekliği 40 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml). Toplanan eluatlarda, 10 tüpün herbirisinde hem

absorbans hem de BCA aktivitesine rastlanmıştır. Absorbans değerleri ile BCA aktivitesi arasında paralel bir artış olduğu görülmüştür.

Homojenizasyon örneğinden ve saflaştırılan enzimden numune alınarak enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Protein miktarı, Bradford yöntemi (Bradford 1976) kullanılarak belirlendi. Bunun için öncelikli olarak BSA'nın bilinen konsantrasyonları ile bir standart eğri oluşturulmuştur. Elde edilen homojenat ve saflaştırılan enzimde ki protein miktarı bu eğriye göre belirlenmiştir. Yapılan aktivite ve protein tayini sonuçlarına göre; BCA % 35,98 verim ve 83,42 saflaştırma katsayısı ile saflaştırıldı. Spesifik aktivite ise 1122,94 EÜ/mg bulundu. Literatürde yapılan çalışmalarda da CA enzimi aynı yöntemle, Sepharose-4B afinite kolonunun kullanılmasıyla, saflaştırılmıştır. Örneğin; insan kanı hCA I ve II izoenzimleri için sırasıyla %57,86 verimle 76 kat ve %67 verimle 509,29 kat (Topal ve Gülçin, 2014), koyun böbreği CA II ve IV izoenzimleri için sırasıyla %60,75 verimle 227,61 kat ve %30,83 verimle 139,45 kat (Demirdağ, 2012), taze insan kanının saflaştırılması ile hCA I için spesifik aktivite değeri 4571,62 EU/mg olup %49,54 verim ile saflaştırılmıştır. hCA II izoenzimi için ise spesifik aktivite değeri 15555,56 EU/mg olup %50,11 verim ile saflaştırılmıştır (Polat, 2016). Koyun midesi CA I ve II izoenzimleri için sırasıyla %51,09 verimle 529,4 kat ve %78 verimle 615,2 kat saflaştırılmıştır (Kılınç, 2011).

BCA enziminin saflığını kontrol etmek ve alt birim molekül kütesini tespit etmek için SDS-PAGE yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Tek bantın gözlemlenmesi enzimin saflığı hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir. BCA enziminin molekül kütesi ise yaklaşık 29 kDa olarak belirlendi. Literatürde mevcut çalışmalarda da bazı canlılarda saflaştırılan CA enzimi için SDS-PAGE ile molekül kütesi hesaplanmıştır. Örneği; insan eritrositlerinden saflaştırılan CA II izoenzimi için 30 kDa (Beydemir vd., 2002), keçi karaciğer dokusu için 27,70 kDa ve böbrek dokusu için 28,00 kDa (Çağlayan, 2017), koyun mide dokusundan saflaştırılan CA I ve II izoenzimleri için 26,7 kDa (Kılınç, 2011) ve insan kanından saflaştırılan hCA I ve II izoenzimleri için yaklaşık 30 kDa olarak hesaplanmıştır (Polat, 2016).

Manyetik Fe₃O₄ nanopartikülleri ortak çöktürme yöntemi kullanılarak, açık hava ortamında sentezlendi. MNP sentezinin doğrulanması için SEM ve VSM ile karakterizasyon çalışmaları yürütüldü.

SEM-EDX analizi ile MNP 'nin morfolojik özellikleri ve element bileşimi belirlendi. MNP'lerin yüzey özellikleri, 15 kV'da SEM kullanılarak gözlemlenmiştir. Sentezlenen MNP'lerin farklı büyütme oranlı SEM görüntülerinde MNP'lerde şekil ve parçacık boyutunda çok fazla

homojenlik ve düzenlilik oluşmadığı izlenmektedir. Görüntülerde parçacıkların, manyetik dipol momenti nedeniyle kümелendiğı belirlenmiştir.

SEM görüntüleri ile yapılan EDX, element bileşimi hakkında bilgi vermiştir. MNP'lerin EDX spektrumlarında, Fe ve O ile ilişkili pikler elde edilmiştir. Bu durum MNP'lerdeki temel bileşenin, demir ve oksijen ile oluşan demir oksit olduğunu ispatlamıştır.

MNP'lere farklı fonksiyonel gruplar bağlanarak 2 farklı destek materyali sentezlendi. I. destek materyali ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$)'nin MNP, APTES kullanılarak amin grubu (NH_2) ilavesiyle fonksiyonel hale getirildi. II. destek materyali ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$)'nin sentezinde ise MNP, TEOS kullanılarak silisyum oksit ile kaplandı. Ardından APTES ile işlevselleştirildi.

Destek materyalinin yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupları belirlemek için fonksiyonelleştirilmiş MNP'lerin, FT-IR ölçümleri yapıldı. İletim spektrumları 400 ila 4000 cm^{-1} arasında elde edildi.

İmmobilizasyon öncesi FT-IR spektrumlarına göre;

MNP-APTES: 539,68 cm^{-1} , 443,87 cm^{-1} ve 418,89 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler, Fe-O bağının karakteristik absorpsiyon bantlarını göstermektedir. 3376,79 cm^{-1} ve 3662,21 cm^{-1} 'deki pikler, APTES'in varlığını gösteren N-H gerilmesine karşılık gelebilir.

MNP-TEOS-APTES: 556,19 cm^{-1} , 443,48 cm^{-1} ve 435,14 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler, Fe-O bağının karakteristik absorpsiyon bantlarını göstermektedir. 1056,30 cm^{-1} (Si-O-Si gerilmesi) ve 2900,29 cm^{-1} (C-H gerilmesi) pikleri, TEOS'un varlığını gösterir. 807,38 cm^{-1} 'deki pik, APTES'ten Si-C gerilmesi ile ilişkili olabilir

Elde edilen MNP destek materyalinin, immobilizasyon öncesi kaplanmış ve kaplanmamış parçacıkların manyetik özellikleri, oda sıcaklığında (298 K) VSM ile analiz edilmiştir. Sentezlenen destek materyallerinin, manyetik histerezis döngüleri verilmiştir.

Çıplak MNP'lerin, MNP-APTES'in ve MNP-TEOS-APTES'in doygunluk manyetizasyonları (M_s) sırasıyla; 51,375 emu/g, 59,040 emu/g ve 59,680 emu/g olarak ölçülmüştür.

Sonuçlara göre; çıplak MNP'lere kıyasla, APTES ile fonksiyonel hale getirilen ve TEOS ile kaplanan MNP'lerde doyum mıknatıslanma (M_s) değerlerinde artış görülmektedir. Bu durum, destek materyallerinin manyetik özelliklerinde kaplanma yapılmasına rağmen herhangi bir azalma olmadığını, göstermektedir. Süperparamanyetik davranışın karakteristiğı olan histerezis döngüleri MNP, MNP-APTES ve MNP-TEOS-APTES için açıkça

gözlemlenebilir. Bu üç MNP'nin tümü, süperparamanyetik malzemelerin tipik özelliği olan ihmal edilebilir koersivite (H_c) ve remanans göstermiştir. Histerezis ve kalıntı mıknatıslanmanın olmaması, bu parçacıkların doğada süperpara-manyetik olduğunu gösterir (Kulkarni vd., 2014). Bu durum da destek materyallerinin süperparamanyetik olduğunun kanıtıdır. Süperparamanyetizm, ferromanyetik nanoparçacıkların genellikle muzdarip olduğu şiddetli agregasyon oluşmadan çözeltideki manyetik nanoparçacıkların yeniden dağılması anlamına gelir (Cao vd., 2009). Bu özellik, nispeten düşük harici manyetik alan altında bile MNP'lerin, yüksek verimli bir şekilde ayrılmasına izin verir. Nanopartiküllerin çekirdeğindeki manyetik malzeme (Fe_3O_4) nedeniyle immobilize katalizörler harici bir mıknatısla saniyeler içinde reaksiyon ortamından tamamen geri kazanılabilir (Sahoo vd., 2012).

Bulunan değerler literatür ile uyumludur. Örneğin; Aliahmad ve arkadaşı, manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerinin termal ayrışması ile maghemit ($\gamma-Fe_2O_3$) nanopartiküllerinin sentezi için manyetik özellikleri oda sıcaklığında VSM ile ölçülmüştür. Fe_3O_4 ve $\gamma-Fe_2O_3$ 'ün doygunluk mıknatıslanma (M_s) değerlerini sırasıyla 45 ve 31 emu/g olarak bulmuşlardır. Histerezis döngüleri $\gamma-Fe_2O_3$ ve Fe_3O_4 nanoparçacıklarının süper-paramanyetik olduğunu göstermiştir (Aliahmad ve Moghaddam, 2013). Başka bir çalışmada Karakelle, fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküllerin sentezinde doyum mıknatıslanma değerlerini, Fe_3O_4 , $Fe_3O_4@SiO_2$ ve $Fe_3O_4@SiO_2@NH_2$ nanopartikülleri için sırasıyla 36,4 - 21,6 ve 13,2 emu/g şeklinde bulmuştur. Üç nanopartikülün kapalı bir histerezis döngüsüne sahip olmaları, kalıcı mıknatıslanma ve koersivite sergilememeleri süperparamanyetikliğin göstergeleridir (Karakelle, 2019).

Genelde MNP'ler kaplandığı zaman M_s değeri düşer. Fakat sentezlediğimiz destek materyallerinde kaplamadan sonra çıplak MNP'lere nispeten M_s değerinin artmasının nedeni; kaplama malzemesinde bağ yapmamış serbest elektronların varlığı manyetizmayı artırıyor olabilir. Ayrıca bileşimin basitliği ve stabilize edici bileşiklerin yokluğu nedeniyle, elde edilen malzemelerin manyetik momentlerinin çok yüksek olması olabilir.

Literatürde MNP üzerine kaplama yapıldıktan sonra M_s değerinde artış olduğuna yönelik çalışmalar da mevcuttur. Örneğin; Özel, hidrotermal işlem sırasında kaplama yaptığında, yüzey aktif madde olarak tartarik asit kullanıldığında büyük M_s değeri elde

edilmiştir. Ayrıca yüzey kaplaması manyetik nanoparçacıkların daha kolay doyuma gitmesini sağlamıştır (Özel, 2015).

İmmobilizasyondan sonra serbest enzimin, MNP-APTES-GA-E ve MNP-TEOS-APTES-GA-E'in esteraz aktivitesi ve Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı. Esteraz aktivitesi, Armstrong vd. (1966) tarafından modifiye edilen ve tanımlanan yöntemle göre bir substrat olarak p-nitrofenil asetat kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü (Armstrong vd., 1966). Bu yöntemle göre, CA enzimi varlığında 4-nitrofenil asetatın, 4-nitrofenilata dönüşümü 348 nm'de UV absorpsiyonundaki değişime göre belirlenmektedir. 4-nitrofenilasetatın, 4-nitrofenilata hidrolizinde gözlenen maksimum dalga boyu 348 nm'dir. Bu nedenle, enzimatik reaksiyonun takibinde 348 nm'deki UV absorpsiyonu kullanıldı.

Sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılan serbest enzim ve immobilize enzimlerin spesifik aktiviteleri; serbest BCA: 1168,25 EÜ/mg, MNP-APTES-GA-BCA: 18933,33 EÜ/mg ve MNP-TEOS-APTES-GA-BCA: 1341,93 EÜ/mg olarak bulunmuştur.

CA enziminin immobilizasyondan sonra SEM-EDX analizi, immobilize enzimlerin morfoloji ve element bileşimindeki farklılıkları ispatlamak için kullanıldı. MNP'lerin yüzey özellikleri, 15 kV'da SEM kullanılarak gözlenmiştir.

SEM görüntülerinde MNP temelli numunelerde şekil ve parçacık boyutunda çok fazla homojenlik ve düzenlilik oluşmadığı izlenmektedir. Görüntülerde parçacıkların manyetik dipol momenti nedeniyle kümелendiği ve parçacıkların yüzeyinin, MNP nanopartikülleri üzerindeki silika kaplamaya bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Yüzey, özellikle TEOS bulunan numunelerde kristaller arasında yüksek agregasyon ile oldukça pürüzlü yapıdadır. Nitekim literatür verileri SiO₂'nin amorf yapıda olduğunu ve küresel bir yapıda olmadığını göstermektedir. Bu durumun partiküller arasındaki Van der Waals kuvvetinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüzey modifikasyonundan sonra kümeleşmelerin azaldığı görülmektedir.

İmmobilizasyondan sonra EDX spektrumlarında S (kükürt) ile ilişkili pikler görülmüştür. S ile ilişkili piklerin BCA'nın içeriğindeki metiyonin ve sistein amino asitlerinden kaynaklandığı söylenebilir. Bu bulgu, BCA'nın fonksiyonelleştirilmiş MNP'lerin yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini kanıtlamaktadır.

İmmobilizasyon sonrası destek materyalinin yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupları belirlemek için FT-IR ölçümleri yapıldı.

İmmobilizasyon sonrası FT-IR spektrumlarına göre;

MNP-APTES-GA-BCA: 3189,06 cm^{-1} (N-H gerilmesi) ve 2103,65 cm^{-1} (C=O gerilmesi) pikleri, APTES ve GA'nın varlığını önerir. 1626,92 cm^{-1} ve 2103,65 cm^{-1} 'deki pikler, amin ve karbonil gruplarının varlığını gösterir. Ayrıca APTES ve GA'yı önerir. Bu durum enzim -NH₂ gruplarının, GA'nın -C=O grubu sayesinde, yüzeye bağlandığının ispatıdır.

MNP-TEOS-APTES-GA-BCA: 1075,66 cm^{-1} ve 2114,85 cm^{-1} 'deki piklerin varlığı, TEOS, APTES ve GA'nın varlığını doğrulayan Si-O-Si, C=O ve amin gruplarını önerir. 1056,30 cm^{-1} , 1075,66 cm^{-1} , 1767,53 cm^{-1} ve 3189,06 cm^{-1} 'deki piklerin kombinasyonu, TEOS, APTES ve GA'nın varlığını gösterir. Yine bu durum da enzim -NH₂ gruplarının, GA'nın -C=O grubu sayesinde, yüzeye bağlandığının kanıtıdır.

MNP ve immobilizasyon sonrası destek materyallerinin manyetik özellikleri oda sıcaklığında (298 K) VSM ile analiz edilmiştir.

Çıplak MNP'lerin, MNP-APTES-GA-BCA'nın ve MNP-TEOS-APTES-GA-BCA için Ms sırasıyla; 51,375 emu/g, 66,932 emu/g ve 55,332 emu/g olarak ölçülmüştür. Sonuçlara göre destek materyalleri immobilize edildikten sonra doyum mıknatıslanma değerlerinde artış görülmektedir. Bu üç MNP'nin tümü, süperparamanyetik malzemelerin tipik özelliği olan ihmal edilebilir koersivite (H_c) ve remanans göstermiştir. Histerezis ve kalıntı mıknatıslanmanın olmaması, bu parçacıkların doğada süperpara-manyetik olduğunu gösterir (Kulkarni vd., 2014; Xu vd., 2013). Ayrıca süperparamanyetik davranışın karakteristiği olan histerezis döngüleri MNP, MNP-APTES-GA-BCA ve MNP-TEOS-APTES-GA-BCA için açıkça gözlemlenebilir. Elde edilen 3 histerezis döngüsü çok benzerdi ve manyetik partiküllerin immobilize enzimden önce ve sonra iyi süperparamanyetik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum da destek materyallerinin süperparamanyetik olduğunun kanıtıdır ve immobilizasyon süreci boyunca süperparamanyetik özelliğini korumaktadır.

Mıknatıslanma değerleri, immobilize enzimlerin harici bir manyetik alan varlığında reaksiyon ortamından kolayca ayrılabilmesini ve manyetik alan kaldırıldığında hafif bir çalkalama ile katalizörlerin yeniden dağılmasının hızla gerçekleşebileceğini göstermiştir. Dolayısıyla, bu özellik yeniden kullanım sırasında immobilize manyetik nanopartiküllerin reaksiyon ortamından uzaklaştırılmasında kullanılabilmiştir. Bu sonuçlar manyetik ayırmanın

etkinliğini göstermektedir. Bulunan değerler literatür ile uyumludur (Al-Dhrub vd., 2017; Drozdov vd., 2016; Jing vd., 2015; Miao vd., 2018; Vinoba vd., 2012; Xu vd., 2013).

Serbest CA ve immobiliz CA'daki protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi (Bradford, 1976). Bu yöntem, Coomassie brilliant blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanarak kısa sürede renk değiştirmesi esasına dayanır. Coomassie brilliant blue G-250 negatif yüklü olduğu için proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlanabilen bir boyadır. Kırmızı rengi mavi renge dönüşür. Boya, çözeltide kırmızı renkte bulunurken, proteine bağlandığı zaman mavi renge dönüşür. Reaksiyonda renk dönüşümü iki dakika içinde gerçekleşir. Bir saate kadar da renk değişimi sabit kalabilir. Oluşan kompleksin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu 595 nm'dir. Bu yöntem 1-100 µg arasında duyarlılık gösterir.

İmmobilizasyon yüzdesi, immobilizasyondan önce ve sonra solüsyondaki enzim aktivitesindeki değişimden yola çıkılarak belirlendi. BCA enzimi destek materyali üzerine bağlandıktan sonra MNP-APTES-GA-BCA'nın immobilizasyon verimi %72, MNP-TEOS-APTES-GA-BCA'nın immobilizasyon verimi ise % 78 bulundu. İmmobilizasyon sonrasında destek materyali süzüntülerinde spektroskopik analiz sonucu protein bulunmaması ve immobilize enzimlerin aktivitelerinde herhangi bir azalma olmaması, immobilizasyonun kovalent bağlanma ile gerçekleştiğini desteklemektedir.

Substrat başlangıç derişiminin, enzim aktivitesine etkisini incelemek için farklı derişimlerde (1,2,3,4,5 ve 6 mM) 4-nitrofenilasetat hazırlandı. Optimum pH'da ve optimum sıcaklıkta her bir substrat derişimi için hem immobilize CA hem de serbest CA enziminin aktivitesi belirlendi. Elde edilen verilerle enzimatik reaksiyon için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) değerleri belirlendi.

Serbest BCA'nın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 4,888 mM ve 3,081 EU mL⁻¹ iken, MNP-TEOS-APTES-GA-BCA'nın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 9,369 mM ve 1,810 EU mL⁻¹, MNP-APTES-GA-BCA'nın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 16,160 mM ve 2,195 EU mL⁻¹ bulunmuştur. Serbest enzimle kıyaslandığında, immobilize enzimlerin, K_m değerinde yükseliş ve V_{max} değerinde ise azalış görülmektedir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; immobilize enzimin K_m değerinde artış, V_{max} değerinde de azalış görülmektedir. Örneğin; Yadav ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada serbest enzim için K_m ve V_{max} sırasıyla 1,594 mM ve 1,307 µmol dk⁻¹ mL⁻¹, İmmobilize CA için ise K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,727 mM ve 1,189 µmol dk⁻¹ mL⁻¹ olarak bulunmuştur

(Yadav vd., 2012). Jing ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, serbest CA'nın K_m ve V_{max} değeri sırasıyla 6,091 mM ve 0,091 $\mu\text{mol dk}^{-1} \text{ml}^{-1}$ iken, immobilize CA'nın K_m ve V_{max} değeri sırasıyla 8,077 mM ve 0,027 $\mu\text{mol dk}^{-1} \text{ml}^{-1}$ bulunmuştur (Jing vd., 2015). Immobilize enzimlerdeki K_m değerinin yükselmesi ve V_{max} değerinin düşmesinin sebebi; immobilizasyon aşamasında enzim ile destek materyali arasında oluşan güçlü kovalent bağlanmanın, kısmi bir şekilde, enzimin aktif bölgesindeki konformasyonel yapıyı bozması sonucu, enzim ile substrat arasındaki afinitenin azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Enzim aktivitesine etki eden optimum pH'ın belirlenmesi için immobilize CA ve serbest CA enzim derişimleri eşit olacak şekilde alındı. pH'sı 7,0-9,0 aralığında 1M Tris- SO_4 ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 1M potasyum fosfat (KH_2PO_4) tampon çözeltilerinde esteraz aktivitesi belirleme yöntemiyle enzim aktiviteleri incelendi. Serbest ve immobilize CA'nın en yüksek aktivite gösterdiği değer, optimum pH olarak belirlendi. Hem serbest hem de immobilize enzimler için optimum pH 9 olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH değeri aynı olduğu için yapılan immobilizasyon işleminden BCA'nın aktivitesinin etkilenmediği söylenebilir. Immobilizasyon işleminde enzimin hangi pH değerinde yüksek aktivite göstereceği, matriksin kimyasal yapısına ve immobilizasyon yöntemine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin; Jing ve arkadaşları manyetik poli(GMA-DVB) mikroküreler üzerinde immobilize edilen CA'nın optimum pH değerini 8 olarak bulmuşlardır (Jing vd., 2015).

Stabil pH belirlenirken de, immobilize CA ve serbest CA enzimi, yine pH'sı 7,0-9,0 aralığında 1M Tris- SO_4 ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 1M potasyum fosfat (KH_2PO_4) tampon çözeltilerinde 4°C'de muhafaza edildi. Daha sonra 1 hafta arayla yapılan esteraz aktivite ölçümünde, enzimin stabil olduğu pH belirlendi. Serbest ve immobilize enzimler pH 8-9 aralığında daha kararlı aktivite göstermiştir. Ancak serbest BCA, pH 9'da (1,0 M Tris- SO_4 tamponunda) kalan aktivitesini %78 oranında, MNP-TEOS-APTES-GA-BCA % 88 oranında ve MNP-APTES-GA-BCA ise %84 oranında korumuştur. Immobilize BCA enzimleri aynı tampon ve aynı koşullar altında serbest BCA enzimine nispeten alkali aralıkta, daha yüksek bir yüzde bağlı aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Stabilizedeki bu farklılığın üç boyutlu konformasyonel yapıdaki pH'a bağlı değişimden ve immobilizasyondan kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir. Immobilize BCA'nın alkali pH'daki kararlılığının artması CO_2 'in

tutulması için önemli bir parametredir. Sonuç olarak, BCA'nın MNP'ler üzerine immobilize edilmesiyle enzim stabilitesini artırmıştır. Literatürde rapor edilen çalışmalarda (Faridi vd., 2017; Jing vd., 2015) CA kaynağına, destek materyaline ve immobilizasyon yöntemine bağlı olarak stabil pH'nın 8-10 aralığında değişiyor olması bu bulguları desteklemektedir.

Serbest BCA, ve immobilize BCA'nın termal stabiliteleri için aktiviteleri, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C ve 70°C arasında değişen sıcaklıklarda, optimum pH'da, 1M Tris-SO₄ tamponunda 20 dk aralıklarla toplamda 80 dk'lık bir inkübasyondan sonra esteraz aktivite ölçüm yöntemi ile ölçüldü.

Serbest BCA için kalan yüzde aktivite 30°C'de %100, 40°C'de %100, 50°C'de %93, 60°C'de %12 ve 70°C'de %11 iken; MNP-TEOS-APTES-GA-BCA için kalan aktivite 30°C'de %100, 40°C'de %100, 50°C'de %94, 60°C'de %90 ve 70°C'de %81 ve MNP-APTES-GA-BCA için kalan aktivite 30°C'de %100, 40°C'de %100, 50°C'de %81, 60°C'de %63 ve 70°C'de %67 olarak belirlendi. Serbest BCA'da aktivite 60 ve 70°C'de %11'e kadar düşmesine karşın immobilize BCA'da kalan aktivite %81'e kadar korunmuştur. Bu sonuçlar immobilize BCA'ların özellikle 60 ve 70°C'de serbest BCA'dan çok daha iyi termal bir stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir.

Yöntem olarak kovalent bağlanmanın tercih edilmesi, enzim moleküllerinin konformasyonel esnekliğini azaltmış ve bu da immobilize enzimlerin 70°C'de dahi aktivitelerini büyük bir oranda korumuştur. Bu sonuçlar enzimin aktif merkezinin, sıcaklık değişimlerinden, immobilizasyon prosedürü ile korunabileceğini göstermektedir. Bu durum özellikle endüstriyel uygulamalar için büyük önem arz etmektedir. Çünkü CA için 40-70°C'de ki termal kararlılık baca gazındaki CO₂'in, herhangi bir ek soğutma işlemi gerektirmeden, giderimi için önem arz etmektedir.

Mevcut çalışmadaki sonuçlar, literatürdeki diğer çalışmalardan üstünlük göstermektedir. Örneğin; Al-Dhrub ve arkadaşları hCA I'nin amin fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküller üzerinde immobilizasyonunda, serbest ve immobilize hCA I'nin termal stabilitesini 30, 40 ve 50 °C'de incelenmiştir. 80 dakikalık inkübasyondan sonra, serbest enzimin kalıntı aktiviteleri 30 °C'de %79, 40 °C'de %56 ve 50 °C'de %24 iken, immobilize enzimin kalıntı aktiviteleri sırasıyla 30 °C'de %89, 40 °C'de %93 ve 50 °C'de %35 bulmuştur (Al-Dhrub vd., 2017). Bu sonuçlara göre 50 °C'de kalan aktivite %35 iken, bu çalışmada 50°C'de kalan aktivite %94 bulunmuştur. Başka bir çalışmada Sahoo ve arkadaşları, biyomimetik karbondioksit sekestrasyonu için karbonik anhidraz ve yapay bir Zn(II)

kompleksinin manyetik bir destek üzerinde immobilizasyonu çalışmasında, termal kararlılığı, 30°C ile 70°C arasında değişen çeşitli sıcaklıklarda 4 saatlik bir inkübasyondan sonra ölçülmüştür. Artan sıcaklıkla birlikte, 70°C'de, immobilize CA aktivitesinin %30'unu korurken, serbest CA orijinal aktivitesinin %91'ini kaybetmiştir (Sahoo vd., 2012).

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için de, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C ve 70 °C arasında 5'er derece sıcaklık farkı oluşturularak daha önce belirlenen enzimin optimum pH'sında su banyosu kullanılarak esteraz aktivite ölçüm yöntemi ile belirlendi.

Serbest ve immobilize BCA için optimum sıcaklık: 45°C olarak belirlendi. Her ikisi de 45°C'de en yüksek aktivite göstermiş ve diğer sıcaklık değerlerinde ise aktivitelerini önemli ölçüde kaybetmiştir. Ancak, sıcaklığın serbest CA'nın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi immobilize CA'ninkinden daha belirgin olmuştur. Sonuçlar, immobilize enzimin konformasyonel yapısını sıcaklıkta daha kolay koruduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca uygulamalarda da bu durumun göz ardı edilmemesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Optimum sıcaklık değeri literatürdeki çalışmalara uygunluk göstermektedir. Örneğin; Yadav ve arkadaşları, CA'nın karbonatlaşma reaksiyonu için kitosan stabilize demir nanopartiküller üzerine immobilizasyonunda, immobilize CA'nın optimum sıcaklığını 45 °C olarak bulmuştur (Yadav vd., 2012). Başka bir çalışmada Jing ve arkadaşları, manyetik poli(GMA-DVB) mikroküreler üzerine immobilize edilen CA'nın ve serbest CA'nın bağlı aktivitesinin ilk olarak sıcaklık arttıkça arttığını ve her ikisinin de 45 °C'de maksimuma ulaştığını rapor etmişlerdir (Jing vd., 2015).

Depolama stabilitesi çalışması için numuneler, 4,8 ml fosfat tamponu (0,1 M, pH 7,0) içerisine yüklenen 50 µl serbest enzim ve 5'er mg immobilize enzim ile 4°C 60 gün süreyle inkübe edildi. 10 gün aralıklarla 4°C'de 60 gün boyunca aktivitelerine bakıldı.

İmmobilizasyon sonrası ilk aktivite % 100 kabul edilerek 60 günün sonunda kalan yüzde bağlı aktivite belirlendi. 60 gün sonunda MNP-TEOS-APTES-GA-BCA aktivitesinin % 60'ını, İmmobilize MNP-APTES-GA-BCA aktivitesinin % 49'unu korurken aynı şartlarda serbest BCA aktivitesinin yalnızca % 17'sini korumuştur. Sonuçlara bakıldığında 60 günlük depolama sonunda, serbest ve immobilize enzimler arasında, kalan aktivitede önemli derecede fark görülmektedir. Bu durum BCA'nın kovalent bağlanma ile manyetik nanopartiküller üzerine immobilizasyonu, enzimin depolama stabilitesini dikkate değer bir şekilde artırdığını göstermektedir. İmmobilize enzimler olan MNP-TEOS-APTES-

GA-BCA ve MNP-APTES-GA-BCA, CO₂ yakalamada ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda geniş bir potansiyel taşıdığı için bu alanlarda kullanılabileceği önerilebilir.

Depolama stabilitesi sonuçları, literatürde rapor edilen diğer çalışma sonuçlarına benzerdir. Örneğin; Al- Duhub ve arkadaşları; insan karbonik anhidraz I'in amin fonksiyonlu manyetik nanopartiküller üzerinde immobilizasyonu sonrasında depolama stabilitesini araştırmıştır. Aktivite 40 gün boyunca 5 günlük periyotta belirlenmiştir. 40 günlük depolama sonunda, serbest hCA I orijinal aktivitesinin %50'sini korurken, immobilize hCA I orijinal aktivitesini %89 oranında korumuştur (Al-Dhrub vd., 2017). Başka bir çalışmada Yadav ve arkadaşları, karbonik anhidraz enzimini karbonasyon reaksiyonu için kitosan stabilize demir nanopartiküller üzerine immobilize etmiş ve oda sıcaklığında depolama kararlılığını araştırmışlardır. 20. günün sonunda immobilize CA'nın %65 ve serbest enzimin %43 kalan aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Yadav vd., 2012).

İmmobilize enzimlerin operasyonel kararlılığı için yani yeniden kullanılabilirlikleri için p-NPA tahlili yapıldı. Süspansiyon çözeltisinde MNP'ler bir mıknatıs yardımı ile manyetik olarak ayrıldı ve absorbans, her 5 dakikalık aralıklarla UV spektrofotometrede 348 nm'de ölçüldü.

İmmobilize enzimler operasyonel kararlılık için 20 defa yeniden kullanıldığında; MNP-TEOS-APTES-GA-BCA aktivitesinin % 73'ünü, MNP-APTES-GA-BCA ise aktivitesinin % 86'sını koruduğu belirlendi. İmmobilizasyon işleminde, bir enzimin katalitik aktivitesini kaybetmeden, çok sayıda yeniden kullanılması enzimde sızıntı olmadığını ve immobilizasyon işleminin başarılı olduğunu gösterir. Serbest enzimlerin sadece bir defa kullanılabilir olması ve enzim üretiminin maliyetli olması gözönüne alındığında, biyoteknolojik uygulamalarda enzimin defalarca yeniden kullanılması ürün maliyetini düşürecektir. Her döngüden sonra aktivite kaybı, MNP'lerin kaybindan ve enzimin MNP'lerden süzülmesinden kaynaklanabilir (Faridi vd., 2017). Mevcut çalışma literatürdeki benzer çalışmalar ile operasyonel stabilite yönünden kıyaslandığında, 20 defa tekrar kullanılmasına rağmen, aktivitesini %86 oranında koruması ile ön plana çıkmaktadır. Örneğin; yapılan bir çalışmada; silanize MNP'ler üzerine rBhCA immobilize edilmiştir. İmmobilize rBhCA, 22 tekrar kullanımdan sonra aktivitesinin %50'sini korumuştur (Faridi vd., 2017). Başka bir çalışmada; CO₂ yakalama için karbonik anhidrazın epoksi-fonksiyonelleştirilmiş manyetik polimer mikroküreler üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirilmiştir. Enzimin yeniden kullanılabilirliği 6 döngüden sonra başlangıçtaki aktivitesinin yaklaşık %47,6'sı olarak kalmıştır (Jing vd., 2015).

Serbest ve İmmobilize CA enziminin, CO₂'i tutarak CaCO₃ formunda kireç taşına dönüştürmesi için biri kontrol olmak üzere, 4 farklı reaksiyon karışımı hazırlandı. CO₂ gazı karışıma eklendikten sonra, hemen sızdırmaz bir filmi ile kapatıldı ve karışım 2 saat bekletmeye bırakıldı. Ardından çökelti filtre edildi. Çökelen CaCO₃'ün ağırlığını ölçmek için filtre kâğıtları kurutuldu.

Kontrol grubunun (Enzim olmadan) oluşturduğu CaCO₃ miktarı: 0,2 mg, Serbest BCA enziminin oluşturduğu CaCO₃ miktarı: 13 mg, MNP-TEOS-APTES-GA-BCA enziminin oluşturduğu CaCO₃ miktarı: 11,3 mg ve MNP-APTES-GA-BCA enziminin oluşturduğu CaCO₃ miktarı: 22 mg olarak bulunmuştur.

Sonuçlar rapor edilen çalışmalar ile uyumludur. Yadav ve arkadaşları; Karbonik anhidrazın aljinat içinde immobilizasyonu ve CO₂'nin kalsite dönüşümü üzerindeki etkisini araştırırken, bağımsız reaksiyonlarda serbest ve immobilize CA kullanımı ile çöken karbonat miktarının neredeyse eşit olduğunu bulmuşlardır (Yadav vd., 2012). Sharma ve arkadaşları; kalsiyum karbonat çökmesini, kitosan-KOH immobilize P. fragi CA kullanarak elde etmiştir. Serbest enzime kıyasla immobilize sistem için sekestrasyon potansiyelinde 2 kattan fazla artış gözlemlendiğini bildirmişlerdir (Sharma vd., 2011).

Bu yöntemde, CO₂'nin hidrasyonunu ve ardından çökmesini artırmak için CA enzim kullanıldı. Tepkimede Ca²⁺ iyonlarının varlığında CaCO₃ oluşmaktadır. Çünkü çökme koşulları altında (pH 9,0-9,5) bikarbonat iyonları karbonat iyonları ile dengede bulunur ve kalsiyum iyonlarının varlığında kalsiyum karbonat çökmesine neden olur. Bu nedenle CA, kalsiyum karbonat oluşumuna karşılık gelen hidrasyon reaksiyonunda önemli bir rol oynamakta ve kalsit formu yoğun bir şekilde oluşmaktadır (Favre vd., 2009; Sharma vd., 2011).

Mevcut çalışmada, serbest enzime kıyasla, MNP-APTES-GA-BCA ile yaklaşık 2 kat CaCO₃ çökmesi olmuştur. Sonuç olarak immobilize CA'nın CO₂ giderim potansiyeli, bu sisteme ekonomik uygunluk ile birlikte büyük bir avantaj ve üstünlük sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışması, endüstriyel olarak kullanılabilecek immobilize CA'nın atık sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılarak elde edilmesi ve sürdürülebilir olması açısından önemlidir. Çalışma ile düşük maliyetli ve sürdürülebilir enzimlerin atık kandan saflaştırılması, immobilizasyonu ve stabilite problemlerinin iyileştirilmesine katkıda bulunmayı amaçladık.

Çalışmada, kovalent bağlanma yöntemi kullanılarak sığır kanı eritrositlerinden saflaştırılarak elde edilen α -tipi BCA enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi. Destek materyalinin GA ile aktivasyonu yapılarak, enzimin destek materyaline bağlanma yüzdesi artırıldı. Bu kapsamda serbest enzim ile immobilize enzimin karakterizasyonu yapılarak optimum pH, sıcaklık, kinetik parametreleri (K_m , V_{max}) ve stabiliteleri (pH, termal ve depolama) belirlendi. Ayrıca immobilize edilen enzimin CO_2 giderimindeki potansiyel uygulanabilirliği tespit edildi.

Çalışmada BCA enzimi, TEOS ve APTES ile fonksiyonel hale getirilen Fe_3O_4 MNP'ler üzerine immobilize edilmiştir. Yapılan bu immobilizasyon işlemi ile kinetik parametreler olumlu yönde etkilenmiş ve BCA enziminin pH stabilitesi, termal stabilitesi, depolama stabilitesi ve operasyonel kararlılığı önemli ölçüde geliştirilmiştir. Serbest BCA ile kıyaslandığında, immobilize BCA daha geniş bir pH aralığında yüksek aktivite göstermiş ve 60 gün sonunda MNP-TEOS-APTES-GA-BCA aktivitesinin % 60'ını, İmmobilize MNP-APTES-GA-BCA aktivitesinin % 49'unu korurken aynı şartlarda serbest BCA aktivitesinin yalnızca % 17'sini korumuştur. Ayrıca 20 defa tekrar kullanılmasına rağmen, MNP-TEOS-APTES-GA-BCA aktivitesinin % 73'ünü, MNP-APTES-GA-BCA ise aktivitesinin % 86'sını koruyarak yüksek operasyonel stabilite göstermiştir.

Bu sonuçlar, sentezlenen yeni destek materyali ile BCA'nın aktivite kaybının en aza indirilmesine ve dolayısıyla BCA'nın CO_2 giderim kapasitesine katkı sağlamaktadır. Ayrıca, atık kandan elde edilen BCA kullanarak CO_2 gideriminde biyolojik temelli potansiyel bir yaklaşım sunmaktadır. Çalışma kapsamında hedeflenen çıktılar ve sonuçlar ile sanayi tesislerindeki CO_2 emisyonunun azaltılması için gelecekteki çalışmalara fikir sunması öngörülmektedir.

KAYNAKÇA

Abdel-Hameed, S. A. M., Ahmed, S. A., Mostafa, F. A., Almasarawi, O. N., & Abdel Wahab, W. A. (2022). Preparation and characterization of sugilite glass from basalt for α -amylase immobilization, statistical optimization of the immobilization process and description of free and immobilized enzyme. *Heliyon*, 8(7), 1–12.

Akbarzadeh, A., Samiei, M., & Davaran, S. (2012). Magnetic nanoparticles: Preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*, 7, 1–13.

Aktaş, D. (2004). Sığır Karbonik Anhidraz Enziminin Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Al-Dhrub, A. H. A., Sahin, S., Ozmen, I., Tunca, E., & Bulbul, M. (2017). Immobilization and characterization of human carbonic anhydrase I on amine functionalized magnetic nanoparticles. *Process Biochemistry*, 57, 95–104.

Ali, J., Faridi, S., & Sardar, M. (2023). Carbonic anhydrase as a tool to mitigate global warming. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(35), 83093–83112.

Aliahmad, M., & Nasiri Moghaddam, N. (2013). Synthesis of maghemite (γ -Fe₂O₃) nanoparticles by thermal-decomposition of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles. *Materials Science-Poland*, 31(2), 264–268.

AlKhamees, S. S. A. and A. (2021). Synthesis, surface modification, and characterization of Fe₃O₄@SiO₂ core@shell nanostructure. *Green Processing and Synthesis*, 10(12), 384–391.

Alterio, V., Langella, E., Viparelli, F., Vullo, D., Ascione, G., Dathan, N. A., Monti, S. M. (2012). Structural and inhibition insights into carbonic anhydrase CDCA1 from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Biochimie*, 94(5), 1232–1241.

Arslan, M., Beyaztas, S., & Erzengin, M. (2011). In vitro effects of some antibiotics on enzyme activity of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(2 A), 439–445.

Avşar Karakelle, S. B. (2019). Fonk Siyonelleştirilmiş Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi ve Boyar Madde Adsorpsiyonunda Kullanılması. Yüksek lisans tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Bertoni, G., Torre, B., Falqui, A., Fragouli, D., Athanassiou, A., & Cingolani, R. (2011). Nanochains formation of superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 115(15), 7249–7254.

Betancor, L., Fuentes, M., Dellamora-Ortiz, G., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Fernández-Lafuente, R. (2005). Dextran aldehyde coating of glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles prevents its inactivation by gas bubbles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32(3), 97–101.

Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö. I., & Büyükokuroğlu, M. E. (2002). Effects of gentamicin sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in Vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(8), 966–969.

Beydemir, Ş., & Gülçin, I. (2004). Effects of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19(2), 193–197.

Bhattacharya, S., Schiavone, M., Chakrabarti, S., & Bhattacharya, S. K. (2003). CO₂ hydration by immobilized carbonic anhydrase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38(2), 111.

Bié, J., Sepodes, B., Fernandes, P. C. B., & Ribeiro, M. H. L. (2022). Enzyme Immobilization and Co-Immobilization: Main Framework, Advances and Some Applications. *Processes* (C. 10).

Bolivar, J. M., & Nidetzky, B. (2012). Positively charged mini-protein Z basic2 as a highly efficient silica binding module: Opportunities for enzyme immobilization on unmodified silica supports. *Langmuir*, 28(26), 10040–10049.

Bong, G. M., Stringer, J., Brandvold, D. K., Simsek, F. A., Medina, M. G., & Egeland, G. (2001). Development of integrated system for biomimetic CO₂ sequestration using the enzyme carbonic anhydrase. *Energy and Fuels*, 15(2), 309–316.

Bose, H., & Satyanarayana, T. (2017). Microbial carbonic anhydrases in biomimetic carbon sequestration for mitigating global warming: Prospects and perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), 1–20.

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*,

72, 248–254.

Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: A literature survey. *İçinde Methods in Molecular Biology* (C. 1051, ss. 15–31).

Cabiscol, E., & Levine, R. L. (1995). Carbonic anhydrase III: Oxidative modification in vivo and loss of phosphatase activity during aging. *Journal of Biological Chemistry*, 270(24), 14742–14747.

Çağlayan, C. (2017). Keçi Karaciğer Ve Böbrek Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Metal İyonlarının, Antibiyotoklerin ve Avermektinlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Canaparo, R., Foglietta, F., Limongi, T., & Serpe, L. (2021). Biomedical applications of reactive oxygen species generation by metal nanoparticles. *Materials*, 14(1), 1–14.

Cao, H., He, J., Deng, L., & Gao, X. (2009). Fabrication of cyclodextrin-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄/amino-silane core-shell nanoparticles via layer-by-layer method. *Applied Surface Science*, 255(18), 7974–7980.

Cao, L., van Langen, L., & Sheldon, R. A. (2003). Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 387–394.

Çelik, S. Y., Solak, K., & Mavi, A. (2023). Sulfanilamide Modified Magnetic Nanoparticles for Purification of Carbonic Anhydrase from Bovine Blood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(6), 3900–3913.

Cheraghi, M., Lorestani, B., Zandipak, R., & Sobhanardakani, S. (2022). GO@Fe₃O₄@ZnO@CS nanocomposite as a novel adsorbent for removal of doxorubicin hydrochloride from aqueous solutions. *Toxin Reviews*, 41(1), 82–91.

Claudiu Supuran ve Andrea Scozzafava. (2001). Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Curr. Med. Chem. – Imm., Endoc. & Metab*, 1, 61–97.

Claudiu T. Supuran, Scozzafava, A., & Conway, J. (2004). Carbonic anhydrase: Its inhibitors and activators. Boca Raton: FL.: CRC Press.

Cornell, R. M., Schwertmann, U. (2003). No Title. *İçinde The Iron Oxides* (Wiley-VCH).

Costa Ores, J. da, Sala, L., Cerveira, G. P., & Kalil, S. J. (2012). Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon

dioxide. *Chemosphere*, 88(2), 255–259.

Costa, S. A., Azevedo, H. S., & Reis, R. L. (2004). Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. *Çinde Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (ss. 301–324).

Cuéllar-Franca, R. M., & Azapagic, A. (2015). Carbon capture, storage and utilisation technologies: A critical analysis and comparison of their life cycle environmental impacts. *Journal of CO₂ Utilization*, 9, 82–102.

Das, J., & Mishra, H. N. (2023). Electrochemical biosensor for monitoring fish spoilage based on nanocellulose as enzyme immobilization matrix. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(4), 3827–3844.

Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9.

Demirdağ, R. (2012). Karbonik anhidraz II ve IV izoenzimlerinin koyun böbrek dokusundan saflaştırılması karakterizasyonu ve bazı kimyasalların etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Deutsch, H. F. (1987). Carbonic anhydrases. *International Journal of Biochemistry*, 19(2), 101–113.

Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296–1307.

Dilmore, R., Griffith, C., Liu, Z., Soong, Y., Hedges, S. W., Koepsel, R., & Atai, M. (2009). Carbonic anhydrase-facilitated CO₂ absorption with polyacrylamide buffering bead capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 3(4), 401–410.

Drozdov, A. S., Shapovalova, O. E., Ivanovski, V., Avnir, D., & Vinogradov, V. V. (2016). Entrapment of Enzymes within Sol-Gel-Derived Magnetite. *Chemistry of Materials*, 28(7), 2248–2253.

Effendi, S. S. W., & Ng, I. S. (2019). The prospective and potential of carbonic anhydrase for carbon dioxide sequestration: A critical review. *Process Biochemistry*, 87(July), 55–65.

Faridi, S., Bose, H., & Satyanarayana, T. (2017). Utility of Immobilized Recombinant Carbonic Anhydrase of *Bacillus halodurans* TSLV1 on the Surface of Modified Iron Magnetic

Nanoparticles in Carbon Sequestration. *Energy and Fuels*, 31(3), 3002–3009.

Favre, N., Christ, M. L., & Pierre, A. C. (2009). Biocatalytic capture of CO₂ with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60(3–4), 163–170.

Feng, J., Yu, S., Li, J., Mo, T., & Li, P. (2016). Enhancement of the catalytic activity and stability of immobilized aminoacylase using modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 286, 216–222.

Fernández-Lorente, G., Terreni, M., Mateo, C., Bastida, A., Fernández-Lafuente, R., Dalmases, P., Guisán, J. M. (2001). Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: Enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(4–5), 389–396.

Fisher, S. Z., Maupin, C. M., Budayova-Spano, M., Govindasamy, L., Tu, C., Agbandje-McKenna, M., McKenna, R. (2007). Atomic crystal and molecular dynamics simulation structures of human carbonic anhydrase II: Insights into the proton transfer mechanism. *Biochemistry*, 46(11), 2930–2937.

Gao, S., Wang, Y., Diao, X., Luo, G., & Dai, Y. (2010). Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15. *Bioresource Technology*, 101(11), 3830–3837.

Górecka, E., & Jastrzębska, M. (2011). Review article: Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science*, 75(1), 65–86.

Gossuin, Y., Gillis, P., Hocq, A., Vuong, Q. L., & Roch, A. (2009). Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(3), 299–310.

Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 453–468.

Hanna, J., Iliuta, I., Larachi, F., & Iliuta, M. C. (2013). Enzymatic CO₂ capture by immobilized hCA II in an intensified microreactor-Kinetic study of the catalytic hydration. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 15, 78–85.

Hikan Steiner, B.-H. J. and S. L. (1975). The catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.*, 59, 253–259.

Hou, J., Dong, G., Xiao, B., Malassigne, C., & Chen, V. (2015). Preparation of titania based biocatalytic nanoparticles and membranes for CO₂ conversion. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(7), 3332–3342.

Hu, H., Wang, Z., Pan, L., Zhao, S., & Zhu, S. (2010). Ag-Coated Fe₃O₄@SiO₂ three-ply composite microspheres: Synthesis, characterization, and application in detecting melamine with their surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(17), 7738–7742.

Husain, Q., Ansari, S. A., Alam, F., & Azam, A. (2011). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(1), 37–43.

Ijaz, I., Gilani, E., Nazir, A., & Bukhari, A. (2020). Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13(3), 59–81.

J. Mcd. Armstrong, Dirck V. Myers, Jacob A. Verpoorte, A. J. T. E. (1966). Purification Erythrocyte and Properties of Human Carbonic Anhydrases. *Journal of Biological Chemistry*, 241(21), 5137–5149.

Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*, 20(5–6), 801–821.

Jia, H., Zhu, G., & Wang, P. (2003). Catalytic Behaviors of Enzymes Attached to Nanoparticles: The Effect of Particle Mobility. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(4), 406–414.

Jing, G., Pan, F., Lv, B., & Zhou, Z. (2015). Immobilization of carbonic anhydrase on epoxy-functionalized magnetic polymer microspheres for CO₂ capture. *Process Biochemistry*, 50(12), 2234–2241.

Jun, S. H., Yang, J., Jeon, H., Kim, H. S., Pack, S. P., Jin, E., & Kim, J. (2020). Stabilized and Immobilized Carbonic Anhydrase on Electrospun Nanofibers for Enzymatic CO₂ Conversion and Utilization in Expedited Microalgal Growth. *Environmental Science and Technology*, 54(2), 1223–1231.

Karaağaç, Ö. (2011). Nanoparçacıkların Sentezi, Karakterizasyonu ve Enzim Optimum Doyum Manyetizasyonlu Süperparamanyetik İmmobilizasyon Uygulaması, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Keilin, D. (1997). Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharmacology and Therapeutics*, 74(1), 1–20.

Khalifah, D. N. S. (1991). The Carbonic Anhydrases. *İçinde Cellular Physiology and Molecular Genetics* (ss. 49–70).

Khan, M. R. (2021). Immobilized enzymes: a comprehensive review. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1).

Kim, W., Suh, C. Y., Cho, S. W., Roh, K. M., Kwon, H., Song, K., & Shon, I. J. (2012). A new method for the identification and quantification of magnetite-maghemite mixture using conventional X-ray diffraction technique. *Talanta*, 94, 348–352.

Kılınç, N. (2011). Karbonik anhidraz 1 ve 11 izoenzimlerinin koyun midesinden saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

Klotz, S., Steinle-Neumann, G., Strässle, T., Philippe, J., Hansen, T., & Wenzel, M. J. (2008). Magnetism and the Verwey transition in Fe_3O_4 under pressure. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, 77(1), 2–5.

Kurzbaum, E., Raizner, Y., Kuc, M. E., Kulikov, A., Hakimi, B., Kruh, L. I., & Menashe, O. (2020). Phenol biodegradation by bacterial cultures encapsulated in 3D microfiltration-membrane capsules. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 41(22), 2875–2883.

L Theil Kuhn, A Bojesen, L Timmermann, Mm. N. and, & Mørup, S. (2002). Structural and magnetic properties of core – shell iron – iron oxide nanoparticles. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 14, 13551.

Laconte, L., Nitin, N., & Bao, G. (2005). Magnetic nanoparticle probes. *Materials Today*, 8(5 SUPPL. 1), 32–38.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 228, 726–734.

Li, W., Huo, Z., Zhang, X., Zhao, H., Cui, Z., Fu, P., Pang, X. (2020). New sight for in-situ monitoring of silica growth process: The incorporation of Stöber process and aggregation-induced emission (AIE) technique. *Dyes and Pigments*, 182(December 2019), 108637.

Ling, W., Wang, M., Xiong, C., Xie, D., Chen, Q., Chu, X., Xiao, X. (2019). Synthesis, surface modification, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of*

Materials Research, 34(11), 1828–1844.

Liu, D. M., Chen, J., & Shi, Y. P. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 102, 332–342.

Liu, D. M., & Dong, C. (2020). Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. *Process Biochemistry*, 92(February), 464–475.

Liu, S., Yua, B., Wanga, S., Shena, Y., & Conga, H. (2020). Preparation, Surface Functionalization and Application of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Shixiang Liu. İçinde *Advances in Colloid and Interface Science* (C. 281).

Liu, X., Ma, Z., Xing, J., & Liu, H. (2004). Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 270(1–2), 1–6.

Lu, A. H., Salabas, E. L., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(8), 1222–1244.

Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega*, 8(6), 5184–5196.

Majidi, S., Sehrig, F. Z., Farkhani, S. M., Goloujeh, M. S., & Akbarzadeh, A. (2016). Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(2), 722–734.

Maria Chong, A. S., & Zhao, X. S. (2003). Functionalization of SBA-15 with APTES and Characterization of Functionalized Materials. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(46), 12650–12657.

Marrazza, G. (2014). Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: A review. *Biosensors*, 4(3), 301–317.

Mendes, A. A., De Castro, H. F., Andrade, G. S. S., Tardioli, P. W., & Giordano, R. D. L. C. (2013). Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. *Reactive and Functional Polymers*, 73(1), 160–167.

Miao, C., Yang, L., Wang, Z., Luo, W., Li, H., Lv, P., & Yuan, Z. (2018). Lipase immobilization on amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as

biocatalyst for biodiesel production. *Fuel*, 224 (November 2017), 774–782.

Ming Ma, Yu Zhang, Wei Yu, Hao-ying Shen, Hai-qian Zhang, N. G. (2003). Preparation and characterization of magnetite nanoparticles. *Colloids and Surfaces A*, 212, 219–226.

Mirjafari, P., Asghari, K., & Mahinpey, N. (2007). Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO₂ sequestration purposes. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46(3), 921–926.

Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(2), 205–220.

Mohidem, N. A., Mohamad, M., Rashid, M. U., Norizan, M. N., Hamzah, F., & Mat, H. (2023). Recent Advances in Enzyme Immobilisation Strategies: An Overview of Techniques and Composite Carriers. *Journal of Composites Science*, 7(12), 1–21.

Molina-Fernández, C., & Luis, P. (2021). Immobilization of carbonic anhydrase for CO₂ capture and its industrial implementation: A review. *Journal of CO₂ Utilization*, 47(December 2020).

Monti, S. M., De Simone, G., Dathan, N. A., Ludwig, M., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C. T. (2013). Kinetic and anion inhibition studies of a β -carbonic anhydrase (FbiCA 1) from the C4 plant *Flaveria bidentis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(6), 1626–1630.

Mukherjee, A. K., Kumar, T. S., Rai, S. K., & Roy, J. K. (2010). Statistical optimization of *Bacillus alcalophilus* α -amylase immobilization on iron-oxide magnetic nanoparticles. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(6), 984–992.

Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157–163.

Nisha, S., Arun Karthick, S., & Gobi, N. (2012). A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. *Che Sci Rev Lett*, 1(3), 148–155.

Nishita, T., Takahasi, M., Kasuya, T., Matsui, K., Ichihara, N., Murakami, M., & Asari, M. (2005). Measurement of erythrocyte carbonic anhydrase isozymes (CA-I and CA-II) in racehorses and riding horses. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(1), 63–67.

Occhipinti, R., & Boron, W. F. (2019). Role of carbonic anhydrases and inhibitors in

acid–base physiology: Insights from mathematical modeling. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15).

Özdemir, H. (1992). İnsan ve Sığır Eritrosit Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Bazı Aktif Katyonlarla İnhibisyon Kinetiği. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Özel, F. (2015). Süperparamanyetik Demir Oksit Nanoparçacıklar: Sentezi, Yüzey Modifikasyonu, Yapısal Ve Manyetik Karakterizasyonu İle Toksik Etkinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Ozensoy, O., Kockar, F., Arslan, O., Isik, S., Supuran, C. T., & Lyon, M. (2006). An evaluation of cytosolic erythrocyte carbonic anhydrase and catalase in carcinoma patients: An elevation of carbonic anhydrase activity. *Clinical Biochemistry*, 39(8), 804–809.

Park, H. J., McConnell, J. T., Boddohi, S., Kipper, M. J., & Johnson, P. A. (2011). Synthesis and characterization of enzyme-magnetic nanoparticle complexes: Effect of size on activity and recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(2), 198–203.

Patil, J. S., Kamalapur, M. V., Marapur, S. C., & Kadam, D. V. (2010). Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(1), 241–248.

Petri, A., Gambicorti, T., & Salvadori, P. (2004). Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27(2–3), 103–106.

Phan, D. T., Burns, R. C., Puxty, G., Williams, M., Haritos, V. S., & Maeder, M. (2015). A study of bovine and human carbonic anhydrases as a model enzyme system for CO₂ hydration in post combustion capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 37, 85–89.

Polat, L. (2016). Bazı Doğal Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi, Ache Ve Bche Enzimleri İle hCA I ve hCA II İzoenzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Polshettiwar, V., Luque, R., Fihri, A., Zhu, H., Bouhrara, M., & Basset, J. M. (2011). Magnetically recoverable nanocatalysts. *Chemical Reviews*, 111(5), 3036–3075.

Qiao, R., Yang, C., & Gao, M. (2009). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: From preparations to in vivo MRI applications. *Journal of Materials Chemistry*, 19(35), 6274–6293.

- Rafi, M. M., Ahmed, K. S. Z., Nazeer, K. P., Siva Kumar, D., & Thamilselvan, M.** (2015). Synthesis, characterization and magnetic properties of hematite (α -Fe₂O₃) nanoparticles on polysaccharide templates and their antibacterial activity. *Applied Nanoscience* (Switzerland), 5(4), 515–520.
- Rai, D., Khatua, S., & Taraphder, S.** (2022). Structure and Dynamics of the Isozymes II and IX of Human Carbonic Anhydrase. *ACS Omega*, 7(35), 31149–31166.
- Rasouli, H., Nguyen, K., & Iliuta, M. C.** (2022). Recent advancements in carbonic anhydrase immobilization and its implementation in CO₂ capture technologies: A review. *Separation and Purification Technology*, 296 (May), 121299.
- Romero-Fernández, M., & Paradisi, F.** (2020). Protein immobilization technology for flow biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 55, 1–8.
- Sachnin A. Kulkarni, P. S. Sawadh, and P. K. P.** (2014). Synthesis and Characterization of Superparamagnetic Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticles. *Journal of the Korean Chemical Society*, 58(1), 100–104.
- Sahoo, P. C., Jang, Y. N., & Lee, S. W.** (2012). Immobilization of carbonic anhydrase and an artificial Zn(II) complex on a magnetic support for biomimetic carbon dioxide sequestration. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 82, 37–45.
- Saito, R., Sato, T., Ikai, A., & Tanaka, N.** (2004). Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 Å resolution. *Biological Crystallography*, 60(4), 792–795.
- Samrot, A. V., Sahithya, C. S., Selvarani A, J., Purayil, S. K., & Ponnaiah, P.** (2021). A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4 (November 2020), 100042.
- Savile, C. K., & Lalonde, J. J.** (2011). Biotechnology for the acceleration of carbon dioxide capture and sequestration. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), 818–823.
- Secundo, F.** (2013). Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6250–6261.
- Shabestari Khiabani, S., Farshbaf, M., Akbarzadeh, A., & Davaran, S.** (2017). Magnetic nanoparticles: preparation methods, applications in cancer diagnosis and cancer therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(1), 6–17.

Sharma, A., Bhattacharya, A., & Shrivastava, A. (2011). Biomimetic CO₂ sequestration using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains immobilized on biopolymeric materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(4–5), 416–426.

Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235.

Silverman, D. N. (1982). Carbonic Anhydrase: Oxygen-18 Exchange Catalyzed by An Enzyme with Rate-Contributing Proton-Transfer Steps. *Methods in Enzymology*, 87(C), 732–752.

Silverman, D. N., & Lindskog, S. (1988). The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase: Implications of a Rate-Limiting Protolysis of Water. *Accounts of Chemical Research*, 21(1), 30–36.

Simsek-Ege, F. A., Bond, G. M., & Stringer, J. (2002). Matrix molecular weight cut-off for encapsulation of carbonic anhydrase in polyelectrolyte beads. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 13(11), 1175–1187.

Singh, H., Du, J., Singh, P., Mavlonov, G. T., & Yi, T. H. (2018). Development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles via direct conjugation with ginsenosides and its in-vitro study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 185(March), 100–110.

Singh, V. (2024). Corrosion Management Synthesis, Surface Modifications And Biomedical Applications Of Super Paramagnetic Iron Oxide Corrosion Management. 34(02), 141–162.

Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *İçinde Advances in Food and Nutrition Research* (C. 79, ss. 179–211).

Smith, K. S., & Ferry, J. G. (2000). Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 335–366.

Smith, K. S., Jakubzick, C., Whittam, T. S., & Ferry, J. G. (1999). Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15184–15189.

Sodipo, B. K., & Aziz, A. A. (2016). Recent advances in synthesis and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with silica. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 416, 275–291.

Söyüt, H. (2006). Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz

enziminin saflaştırılması karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Spahn, C., & Minter, S. (2008). Enzyme Immobilization in Biotechnology. Recent Patents on Engineering, 2(3), 195–200.

Suh, S. K., Yuet, K., Hwang, D. K., Bong, K. W., Doyle, P. S., & Hatton, T. A. (2012). Synthesis of nonspherical superparamagnetic particles: In situ coprecipitation of magnetic nanoparticles in microgels prepared by stop-flow lithography. Journal of the American Chemical Society, 134(17), 7337–7343.

Supuran, C. T., De Simone, G. (2015). Carbonic Anhydrases as Biocatalysts. Waltham: MA. Elsevier.

Supuran, C. (2008). Carbonic anhydrases - an overview. Curr Pharm Des, 14, 603–614.
Thangaraj, B., & Solomon, P. R. (2019). Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. ChemBioEng Reviews, 6(5), 157–166.

Topal, M., & Gülçin, I. (2014). Rosmarinic acid: A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. Turkish Journal of Chemistry, 38(5), 894–902.

Tural, B., Tarhan, T., & Tural, S. (2014). Covalent immobilization of benzoylformate decarboxylase from Pseudomonas putida on magnetic epoxy support and its carboligation reactivity. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 102(April), 188–194.

Uhlir, H. (1998). Industrial Enzymes and Their Applications. & ohn W. & Sons (Ed.), Enzymes, proteins and bioinformatics (ss. 3–21). USA.

Ünlüer, Ö. (2015). Karbondioksit Tutucu Ve Dönüştürücü Biyomimik Nanoenzim Sistemlerinin Geliştirilmesi Ve Uygulamaları. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Vargas-Ortiz, J. R., Gonzalez, C., & Esquivel, K. (2022). Magnetic Iron Nanoparticles: Synthesis, Surface Enhancements, and Biological Challenges. Processes, 10(11).

Vasić, K., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2024). Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles as Promising Magnetic Biomaterials in Drug Delivery: A Review. Journal of Functional Biomaterials, 15(8).

Vinoba, M., Bhagiyalakshmi, M., Jeong, S. K., Nam, S. C., & Yoon, Y. (2012). Carbonic anhydrase immobilized on encapsulated magnetic nanoparticles for CO₂ sequestration.

Chemistry - A European Journal, 18(38), 12028–12034.

Vinoba, M., Lim, K. S., Lee, S. K., Jeong, S. K., & Alagar, M. (2011). Immobilization of human carbonic anhydrase on gold nanoparticles assembled onto amine/thiol-functionalized mesoporous SBA-15 for biomimetic sequestration of CO₂. *Langmuir*, 27(10), 6227–6234.

Wang, J., Sugawara-Narutaki, A., Fukao, M., Yokoi, T., Shimojima, A., & Okubo, T. (2011). Two-phase synthesis of monodisperse silica nanospheres with amines or ammonia catalyst and their controlled self-assembly. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 3(5), 1538–1544.

Weber, A. C., da Silva, B. E., Cordeiro, S. G., Henn, G. S., Costa, B., dos Santos, J. S. H., Hoehne, L. (2023). Immobilization of commercial horseradish peroxidase in calcium alginate-starch hybrid support and its application in the biodegradation of phenol red dye. *International Journal of Biological Macromolecules*, 246(November).

Wistrand, P. J., & Knuuttila, K. G. (1980). Bovine lens carbonic anhydrases: Purification and properties. *Experimental Eye Research*, 30(3), 277–290.

Won, K., Kim, S., Kim, K. J., Park, H. W., & Moon, S. J. (2005). Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochemistry*, 40(6), 2149–2154.

Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3(11), 397–415.

Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., & Kim, W. S. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(2), 23501.

Wu, Z., Nan, Y., Zhao, Y., Wang, X., Huang, S., & Shi, J. (2020). Immobilization of carbonic anhydrase for facilitated CO₂ capture and separation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 28(11), 2817–2831.

Xu, J., Ju, C., Sheng, J., Wang, F., Zhang, Q., Sun, G., & Sun, M. (2013). Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles and its application in lipase immobilization. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34(8), 2408–2412.

Xu, J., Sun, J., Wang, Y., Sheng, J., Wang, F., & Sun, M. (2014). Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. *Molecules*, 19(8), 11465–11486.

Xu, S., & Lee, T. R. (2021). Fe₃O₄ Nanoparticles : Structures , Synthesis , Magnetic

Properties , Surface Functionalization , and. Appl. Sci., 11, 11301.

Xu, X., Dong, P., Feng, Y., Li, F., & Yu, H. (2010). A simple strategy for preparation of spherical silica-supported porous chitosan matrix based on sol-gel reaction and simple treatment with ammonia solution. *Analytical Methods*, 2(5), 546–551.

Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P. D., Shi, Y., & Morel, F. M. M. (2008). Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*, 452(7183), 56–61.

Yadav, D., Ranjan, B., Mchunu, N., Le Roes-Hill, M., & Kudanga, T. (2021). Enzymatic treatment of phenolic pollutants by a small laccase immobilized on APTES-functionalised magnetic nanoparticles. *3 Biotech*, 11(6), 1–12.

Yadav, R., Joshi, M., Wanjari, S., Prabhu, C., Kotwal, S., Satyanarayanan, T., & Rayalu, S. (2012). Immobilization of carbonic anhydrase on chitosan stabilized Iron nanoparticles for the carbonation reaction. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(8), 5345–5356.

Yoon, H. C., Hong, M. Y., & Kim, H. S. (2000). Functionalization of a poly(amidoamine) dendrimer with ferrocenyls and its application to the construction of a reagentless enzyme electrode. *Analytical Chemistry*, 72(18), 4420–4427.

Yoshihisa Hirakawa, M. S., Kodai, F., Hong Yang Yu, M. I., Masafumi, T., & Senda, K. K. and T. (2021). Characterization of a novel type of carbonic anhydrase that acts without metal cofactors. *BMC Biology*, 19(1), 1–15.

Yuan, Y., Wang, F., Li, H., Su, S., Gao, H., Han, X., & Ren, S. (2022). Potential application of the immobilization of carbonic anhydrase based on metal organic framework supports. *Process Biochemistry*, 122(P2), 214–223.

Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2).

Zhang, L., Wang, W., Yang, Y., Zhu, W., Li, P., Wang, S., & Liu, X. (2023). Site-specific, covalent immobilization of PNGase F on magnetic particles mediated by microbial transglutaminase. *Analytica Chimica Acta*, 1250(October 2022), 340972.

Zhang, S., Bilal, M., Zdarta, J., Cui, J., Kumar, A., Franco, M., Iqbal, H. M. N. (2021). Biopolymers and nanostructured materials to develop pectinases-based immobilized nanobiocatalytic systems for biotechnological applications. *Food Research International*, 140, 109979.

Zhang, X., Lin, Z., Cai, Y., Liu, X., Niu, L., & Liu, A. (2023). Selective and sensitive colorimetric sensing of iodine ions based on porous MoS₂ particles with excellent haloperoxidase-like activity. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 392(March), 134127.

Zhu, N., Ji, H., Yu, P., Niu, J., Farooq, M. U., Akram, M. W., Niu, X. (2018). Surface modification of magnetic iron oxide nanoparticles. *Nanomaterials*, 8(10), 1–27.

Zhu, X., Du, C., Gao, B., & He, B. (2023). Strategies to improve the mass transfer in the CO₂ capture process using immobilized carbonic anhydrase. *Journal of Environmental Management*, 332(October 2022), 117370.

