

**POLİSAKKARİTLERLE KAPLI MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN
ÜRETİMİ VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU İÇİN KULLANILMASI**

Nihal YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimyasal Teknolojiler Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Suzan BİRAN AY

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2022

DANIşMAN ONAYI

Danişmanlığını yürüttüğüm Yüksek Lisans ğrencisi Nihal YILMAZ, POLİSAKKARİTLERLE KAPLI MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU İÇİN KULLANILMASI başlıklı tez çalışmasını tamamlamıştır. Hazırlamış olduğu tez tarafımca incelenmiş ve öğrencinin tez savunma sınavına alınması bilimsel ve etik açıdan uygun görülmüştür.

Tez Danişmanı

Dr. Öğr. Üyesi Suzan BİRAN AY

ÖZET

POLİSAKKARİTLERLE KAPLI MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU İÇİN KULLANILMASI

Nihal YILMAZ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimyasal Teknolojiler Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2022

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Suzan BİRAN AY

Bu çalışmada, ikili çöktürme yöntemiyle oda sıcaklığında ve inert atmosferde sentezlenen manyetik nanopartiküller üzerine α -amilaz immobilizasyonu çalışılmıştır. Çıplak manyetik nanopartiküller yanısıra, simultane sentez-kaplama metoduyla, farklı konsantrasyonlarda (%0,5, %1 w/v) agar, pektin veya karboksimetil selüloz (CMC) içeren ortamlarda polisakkarit-kaplı manyetik nanopartiküller üretilmiştir. Sentezlenen nanopartiküller X-ışınları kırınımı (XRD), Fourier dönüşümlü infrared (kızılötesi) (FTIR) spektroskopisi, termogravimetrik analiz (TGA), titreşimli örnek manyetometresi (VSM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen çıplak, %0,5- ve %1- agar-kaplı manyetik nanopartiküller üzerine α -amilaz adsorpsiyon ve kovalent bağ ile immobilize edilmiştir. Adsorpsiyon yöntemi ile yapılan immobilizasyonda, sonikasyon, immobilizasyon süresi (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 saat), yüzey kaplama malzemesinin varlığı ve konsantrasyonu (%0,5 ve %1 w/v agar), immobilizasyon pH'ı (pH 3,4,5,6,7) gibi parametrelerin bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi incelenmiştir. Kovalent bağlama ile immobilizasyonda, glutaraldehit (GA) ile partiküllerin yüzey aktivasyonu yapılmış ardından enzim immobilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yüzey kaplama malzemesinin konsantrasyonu (%0,5 ve %1 w/v agar), immobilizasyon pH'ı (pH 4,5,6,7,8) ve glutaraldehit konsantrasyonu (%0,5; %1; %3; %5 v/v) gibi parametrelerin bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi incelenmiştir. İmmobilize edilen protein miktarları Bradford yöntemiyle hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi tayini için nişasta-iyodin metodu kullanılmıştır.

Çalışmalar sonucunda, serbest α -amilaza göre %666,6 spesifik aktivite artışı gösteren, pH 8’de, %3 GA ile aktive edilmiş %1 agar-kaplı manyetik nanopartiküller üzerine kovalent bağlama ile immobilize edilen enzimler seçilmiştir. 45°-60°C arasında yapılan sıcaklık stabilitesi deneyleri sonucunda immobilizasyon işleminin sıcaklık optimumunu değıştirmediği (55°C), ancak enzim aktivitesini 4 kat yükselttiği ortaya çıkmıştır. Saklama stabilitesi deneyleri +4°C’ de yapılmış ve 77 gün sonunda, serbest α -amilazın aktivitesi %88 düşerken, immobilize enzimin aktivitesinin %99’unun korunduğu görölmüştür. Çoklu kullanım çalışmalarında, immobilize α -amilaz, 6 kullanım sonunda spesifik aktivitesinin yaklaşık %55’ini korumuştur. Bu sonuç, α -amilazın manyetik nanopartikül üzerine kovalent bağ ile immobilizasyonunun, tekrarlı kullanım için uygun olduğu ve birçok endüstriyel uygulama için yüksek potansiyelinin olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Sözcükler: Manyetik nanopartikül, Polisakkaritler, Enzim immobilizasyonu, Alfa amilaz.

ABSTRACT

PRODUCTION OF MAGNETIC NANOPARTICLES COATED WITH POLYSACCHARIDES AND THEIR UTILIZATION IN ENZYME IMMOBILIZATION

Nihal YILMAZ

Department of Chemical Engineering

Programme in Chemical Technologies

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, January 2022

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Suzan BİRAN AY

In this study, α -amylase immobilization on magnetic nanoparticles synthesized by co-precipitation method at room temperature and under inert atmosphere was studied. In addition to bare magnetic nanoparticles, polysaccharide-coated magnetic nanoparticles were produced by the simultaneous synthesis-coating method in media containing agar, pectin, or carboxymethyl cellulose (CMC) at different concentrations (0.5%, 1% w/v). The synthesized nanoparticles were characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA), vibrating sample magnetometry (VSM) and scanning electron microscope (SEM). α -amylase was immobilized on the synthesized bare, 0.5%- and 1%- agar-coated magnetic nanoparticles by adsorption and covalent bonding. In the immobilization by adsorption method, the effects of parameters such as sonication, immobilization time (0.5; 1; 2; 4; 8; 16 h), presence and concentration of surface coating material (0.5% and 1% w/v agar), immobilization pH (pH 3,4,5,6,7) on the amount of bonded protein, enzyme activity and specific activity were investigated. In the immobilization by covalent bonding, the surface activation of the particles was made with glutaraldehyde (GA) and then enzyme immobilization processes was carried out. The effects of concentration of surface-coating material (0.5% and 1% w/v agar), immobilization pH (pH 4.5,6,7,8) and glutaraldehyde concentration (0.5%; 1%; 3%; 5% v/v) on the amount of bonded protein, enzyme activity and specific activity were investigated. The amount of immobilized protein was calculated by Bradford method. Enzyme activity was determined by starch-iodine method.

As a result of the studies, enzymes that showed a specific activity increase of 666.6 % compared to the free enzyme and which were immobilized by covalent bonding on 1% agar-coated magnetic nanoparticles activated with 3% GA at pH 8 were selected. As a result of the temperature stability experiments carried out between 45°-60°C, it was revealed that the immobilization process did not change the temperature optimum (55°C), but increased the enzyme activity 4 times. Storage stability experiments were performed at +4°C and after 77 days, the activity of free α -amylase reduced to 88%, while 99% of the activity of the immobilized enzyme was preserved. In multiple use studies, immobilized α -amylase retained approximately 55% of its specific activity after 6 uses. This result revealed that covalent immobilization of α -amylase on magnetic nanoparticles is suitable for repeated use and has high potential for many industrial applications.

Keywords: Magnetic nanoparticles, Polysaccharides, Enzyme immobilization, Alpha amylase.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca tecrübelerinden yararlanma imkanı bulduğum, hiçbir zaman bilgisini desteğini esirgemeyen, fikirleri ile yol gösterici olan, beni her daim motive eden değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Suzan BİRAN AY'a,

Çalışmalarımız süresince her türlü imkanı ve desteği sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Feridun AY'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımını ve desteğini hiç esirgemeyen sevgili arkadaşım Merve KALAYCI'ya,

Hayatım boyunca attığım her adımda bana her türlü desteği veren, beni sevgiyle yetiştiren canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Nihal YILMAZ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Nihal YILMAZ

İÇİNDEKİLER

SAYFA

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
DANIŞMAN ONAYI	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR	viii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
GİRİŞ	1
1. ENZİMLER.....	4
1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	6
1.2. Enzim Aktivitesi ve Aktiviteyi Etkileyen Faktörler	7
1.2.1. Enzim konsantrasyonu	7
1.2.2. Substrat konsantrasyonu	8
1.2.3. İnhibitör ya da aktivatör varlığı	9
1.2.4. Sıcaklık	11
1.2.5. pH.....	12
1.3. Enzimlerin Avantajları ve Kısıtlamaları	13
1.4. Enzim İmmobilizasyonu	13
1.4.1. İmmobilizasyon yöntemleri	13
1.4.1.1. Taşıyıcıya bağlama	14
1.4.1.2. Tutuklama.....	17
1.4.1.3. Çapraz bağlama	20

1.4.2. Destek materyali seçimi	23
2. MANYETİK NANOPARTİKÜLLER.....	26
2.1. Manyetik Nanopartikül Sentezleme Yöntemleri.....	27
2.1.1. Fiziksel yöntemler	27
2.1.1.1. <i>Bilyeli öğütme yöntemi/mekanik yöntem</i>	27
2.1.2. Kimyasal yöntemler	27
2.1.2.1. <i>İkili çöktürme yöntemi</i>	27
2.1.2.2. <i>Termal ayrışma (termal bozunum) yöntemi</i>	28
2.1.2.3. <i>Hidrotermal sentez yöntemi</i>	29
2.1.2.4. <i>Mikroemülsiyon yöntemi</i>	29
2.1.2.5. <i>Sol-jel yöntemi</i>	30
2.1.3. Biyolojik yöntemlerle sentez.....	31
2.2. Farklı Sentez Yöntemlerinin Karşılaştırılması	31
2.3. Demiroksit (Fe_3O_4) Manyetik Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonları	32
2.4. Demiroksit (Fe_3O_4) Manyetik Nanopartiküllerin Yüzey Aktivasyonu	33
2.4.1. Gluteraldehit aktivasyonu	33
2.4.2. Karbodiimid aktivasyonu	34
2.5. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	34
3. AMİLAZLAR	37
3.1. Amilaz Tipleri.....	37
3.1.1. Endo-amilazlar	38
3.1.2. Ekzo-amilazlar	38
3.1.3. Dallanmayı kesen enzimler	38
3.2. Alfa Amilaz	38
3.2.1. Alfa amilaz kaynakları.....	39
3.2.1.1. <i>Bitkisel kaynaklı alfa amilazlar</i>	39
3.2.1.2. <i>Hayvansal kaynaklı alfa amilazlar</i>	39
3.2.1.3. <i>Mikroorganizma kaynaklı alfa amilazlar</i>	39
3.2.2. Alfa amilaz kullanım alanları.....	39
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	41

4.1. Kullanılan Kimyasallar	41
4.2. Kullanılan Cihazlar.....	41
4.3. Manyetik Nanopartikül Sentezi.....	42
4.3.1. Çıplak manyetik nanopartiküllerin sentezi	42
4.3.2. Yüzey aktif madde ile kaplı manyetik nanopartiküllerin sentezi	43
4.3.2.1. <i>Agar kaplı manyetik nanopartikül sentezi</i>	44
4.3.2.2. <i>Pektin kaplı manyetik nanopartikül sentezi</i>	45
4.3.2.3. <i>Karboksimetil selüloz kaplı manyetik nanopartikül sentezi</i>	46
4.3.3. Gluteraldehit ile manyetik nanopartiküllerin fonksiyonelleştirilmesi (Gluteraldehit Aktivasyonu)	46
4.4. Sentezlenen Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	47
4.4.1. FT-IR	47
4.4.2. XRD	47
4.4.3. TGA	48
4.4.4. VSM	48
4.4.5. SEM	49
4.5. Sentezlenen Partiküller Üzerine Enzim İmmobilizasyonu.....	50
4.5.1. Enzim immobilizasyonu etkinliğinin belirlenmesi	50
4.5.2. Enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	51
4.5.3. İmmobilize ve serbest enzimin termal stabilitesi.....	54
4.5.4. İmmobilize ve serbest enzimin pH stabilitesi.....	54
4.5.5. İmmobilize enzimin işlemsel stabilitesi (tekrar kullanılabilirliği)	54
4.5.6. İmmobilize ve serbest enzimin saklama stabilitesi.....	54
5. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	55
5.1. Sentezlenen Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	55
5.1.1. FT-IR	55
5.1.2. XRD	58
5.1.3. TGA	61
5.1.4. VSM	64
5.1.5. SEM	68
5.2. Sentezlenen Partiküller Üzerine Alfa Amilaz İmmobilizasyonu Çalışmaları	69

5.2.1. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyon çalışmaları.....	69
5.2.1.1. <i>Sonikasyon işleminin immobilizasyon verimine etkisi</i>	69
5.2.1.2. <i>İmmobilizasyon pH'nın immobilizasyon verimine ve spesifik aktiviteye etkisi</i>	70
5.2.1.3. <i>İmmobilizasyon sürelerinin bağlanan protein miktarına ve spesifik aktiviteye etkisi</i>	72
5.2.2. Kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyon çalışmaları (gluteraldehit aktivasyonu).....	73
5.2.2.1. <i>İmmobilizasyon pH'nın immobilizasyon verimine ve spesifik aktiviteye etkisi</i>	73
5.2.2.2. <i>GA konsantrasyonunun immobilizasyon verimine ve spesifik aktiviteye etkisi</i>	75
5.2.2.3. <i>İmmobilizasyon pH'nın immobilizasyon verimine ve spesifik aktiviteye etkisi</i>	77
5.2.3. Serbest ve immobilize enzimin termal ve pH stabilitesi	79
5.2.4. Serbest enzimin işlemsel stabilitesi (çoklu kullanım).....	80
5.2.5. Serbest ve immobilize enzimin saklama stabilitesi.....	82
6. SONUÇLAR.....	84
KAYNAKÇA.....	88
EKLER	102
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları	13
Tablo 1.2. Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları	16
Tablo 1.3. Adsorbsiyon ile enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları	17
Tablo 1.4. İyonik bağlama ile enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları	17
Tablo 1.5. Tutuklama yöntemiyle enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları	18
Tablo 1.6. Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları	21
Tablo 1.7. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri.....	23
Tablo 2.1. Manyetik nanopartikül sentezi için kullanılan yöntemlerin avantajları ve dezavantajları	31
Tablo 4.1. Kullanılan kimyasallar	41
Tablo 4.2. Kullanılan cihazlar	41
Tablo 5.1. Sentezlenen partiküllerin tanecik boyutları (nm).....	60
Tablo 5.2. Sentezlenen partiküllerin manyetik doygunluk değerleri	66
Tablo 5.3. Sonikasyon işleminin enzim immobilizasyonu üzerine etkisi	69
Tablo 5.4. Değişen pH'ın bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi.....	71
Tablo 5.5. Bekleme sürelerinin bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi.....	72
Tablo 5.6. Değişen pH'ın GA aktivasyonu yapılan partiküllerde bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi	74
Tablo 5.7. GA konsantrasyonunun bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi	76
Tablo 5.8. %3GA konsantrasyonunda pH'ın bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi	78
Tablo 5.9. Mevcut çalışmadaki immobilize α -amilazın özelliklerinin önceki çalışmalar ile karşılaştırılması	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Bir reaksiyonun başlaması için gereken aktivasyon enerjisi üzerine enzim etkisi (a) katalizlenmemiş, (b) katalizlenmiş (Robinson, 2015)	5
Şekil 1.2. Enzimin aktif bölgesi	5
Şekil 1.3. Holoenzimin yapısı	6
Şekil 1.4. Enzim konsantrasyonu ile değişen reaksiyon hızı (Worthington, 2021).....	8
Şekil 1.5. Substrat konsantrasyonu ile değişen reaksiyon hızı (Worthington, 2021).....	9
Şekil 1.6. Anahtar-kilit teorisi – rekabetçi inhibisyon (Worthington, 2021).....	10
Şekil 1.7. Rekabetçi olmayan inhibitörler (Worthington, 2021)	11
Şekil 1.8. Substrat inhibisyonu (Worthington, 2021).....	11
Şekil 1.9. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi (Worthington, 2021).....	12
Şekil 1.10. pH'ın reaksiyon hızına etkisi (Worthington, 2021).....	12
Şekil 1.11. Enzim immobilizasyonu için kullanılan yöntemler.....	14
Şekil 3.1. Amiloz molekülünde tekrar eden glukoz birimleri	37
Şekil 3.2. Amilopektin molekülündeki dallanma bölgesi (A): α -1,4 glikozidik bağlantı, (B): α -1,6 glikozidik bağlantı.....	37
Şekil 4.1. Çıplak manyetik nanopartiküllerin sentez aşamaları.....	43
Şekil 4.2. Sentezlenen manyetik nanopartiküller saf su içerisinde (solda), kurutulup kazındıktan sonra (sağda).....	43
Şekil 4.3. Yüzey aktif madde ile kaplı manyetik nanopartiküllerin sentez aşamaları	44
Şekil 4.4. Sentezlenen %0,5 w/v agar kaplı manyetik nanopartiküllerin uygulanan manyetik kuvvet karşısında gösterdikleri manyetik özellik (sırasıyla 0, 15, 71 saniye).....	45
Şekil 4.5. Sentezlenen %0,5 w/v pektin kaplı manyetik nanopartiküllerin uygulanan manyetik kuvvet karşısında gösterdikleri manyetik özellik (sırasıyla 0, 30, 165 saniye)	45
Şekil 4.6. Sentezlenen %0,5 w/v CMC kaplı manyetik nanopartiküllerin uygulanan manyetik kuvvet karşısında gösterdikleri manyetik özellik (sırasıyla 0, 20, 105 saniye)	46

Şekil 4.7. FTIR analizleri için kullanılan Shimadzu, IR-Tracer 100 cihazı	47
Şekil 4.8. XRD analizleri için kullanılan Rıgaku, MiniFlex 600	48
Şekil 4.9. TGA analizleri için kullanılan STA6000	48
Şekil 4.10. VSM analizleri için kullanılan Cryogenic Limited PPMS.....	49
Şekil 4.11. SEM analizleri için kullanılan HITACHI TM3030Plus Masaüstü Tip Taramalı Elektron Mikroskobu.....	49
Şekil 4.12. pH 8 tampon çözeltisi için BSA ile hazırlanan Bradford standart eğrisi	51
Şekil 4.13. Nişasta standart eğrisi (pH 4.50)	52
Şekil 4.14. Alfa amilaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan nişasta-iyodin yönteminde, zamanla nişasta konsantrasyon düşüşünün gözlemlenmesi	53
Şekil 5.1. Çıplak ve pektin kaplı manyetik partiküllerin FTIR spektrumları (a) çıplak, (b) %0,5 (w/v) pektin ile hazırlanmış, (c) %1 (w/v) pektin ile hazırlanmış manyetik partiküller ve (d) pektin.....	55
Şekil 5.2. Çıplak ve agar kaplı manyetik partiküllerin FTIR spektrumları (a) çıplak, (b) %0,5 (w/v) agar ile hazırlanmış, (c) %1 (w/v) agar ile hazırlanmış manyetik partiküller ve (d) agar	56
Şekil 5.3. Çıplak ve CMC kaplı manyetik partiküllerin FTIR spektrumları (a) çıplak, (b) %0,5 (w/v) CMC ile hazırlanmış, (c) %1 (w/v) CMC ile hazırlanmış manyetik partiküller ve (d) NaCMC	57
Şekil 5.4. Çıplak ve pektin kaplı manyetik partiküllerin XRD difraktogramları (a) %1 pektin kaplı, (b) %0,5 pektin kaplı, (c) çıplak manyetik partikül.....	58
Şekil 5.5. Çıplak ve agar kaplı manyetik partiküllerin XRD difraktogramları (a) %1 agar kaplı, (b) %0,5 agar kaplı, (c) çıplak manyetik partikül.....	59
Şekil 5.6. Çıplak ve NaCMC kaplı manyetik partiküllerin XRD difraktogramları (a) %1 NaCMC kaplı, (b) %0,5 NaCMC kaplı, (c) çıplak manyetik partikül	59
Şekil 5.7. Çıplak ve pektin kaplı manyetik partiküllerin termogramları, (a) çıplak, (b) %0,5 pektin kaplı, (c) %1 pektin kaplı manyetik partikül ve (d) pektin	61
Şekil 5.8. Çıplak ve agar kaplı manyetik partiküllerin termogramları, (a) çıplak, (b) %0,5 agar kaplı, (c) %1 agar kaplı manyetik partikül ve (d) agar	62

Şekil 5.9. Çıplak ve CMC kaplı manyetik partiküllerin termogramları, (a) çıplak, (b) %0,5 CMC kaplı, (c) %1 CMC kaplı manyetik partikül ve (d) NaCMC	63
Şekil 5.10. Çıplak ve pektin kaplı manyetik partiküllerin VSM sonuçları (a) çıplak, (b) %0,5 Pektin kaplı, (c) %1 Pektin kaplı manyetik partikül	64
Şekil 5.11. Çıplak ve CMC kaplı manyetik partiküllerin VSM sonuçları (a) çıplak, (b) %0,5 CMC kaplı, (c) %1 CMC kaplı manyetik partikül.....	65
Şekil 5.12. Çıplak ve agar kaplı manyetik partiküllerin VSM sonuçları (a) çıplak, (b) %0,5 agar kaplı, (c) %1 agar kaplı manyetik partikül.....	65
Şekil 5.13. (a) çıplak, (b) %0,5 Agar kaplı, (c) %0,5 NaCMC kaplı, (d) %0,5 Pektin kaplı manyetik partiküllerin VSM sonuçları	67
Şekil 5.14. Çıplak (a), %0,5 w/v agar kaplı (b) ve %1 w/v agar kaplı (c) partiküllerin 400X (solda) ve 4.0kX (sağda) büyütme SEM görüntüleri.....	68
Şekil 5.15. Sonikasyon işlemi uygulanmayan (sağdaki) ve uygulanan (soldaki eppendorflar) a) çıplak ve b) %0,5 w/v agar solüsyonunda kaplanan partiküller.....	70
Şekil 5.16. Immobilizasyon zamanının adsorpsiyon ile bağlanan protein miktarına ve bağıl enzim aktivitesine etkisi, a) pH 4 ortamında, b) pH 5 ortamında	75
Şekil 5.17. %0,5 v/v GA ile aktive edilen ve pH 4'te immobilizasyon yapılan (soldan sağa) çıplak, %0,5 agar-kaplı ve %1 agar-kaplı partiküllerin yıkama solüsyonları	75
Şekil 5.18. GA konsantrasyonunun bağlanan protein miktarına ve bağıl enzim aktivitesine etkisi	79
Şekil 5.19. Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı(pH 4,50).....	79
Şekil 5.20. Serbest ve immobilize enzimin pH kararlılığı (55°C).....	80
Şekil 5.21. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği (55°C,pH 4,50)	81
Şekil 5.22. Farklı serbest enzim çözeltilerinin zamana karşı nişasta derişimde meydana gelen değişimi; a) 15-20 dk 55°C'ye maruz kalma, b) taze hazırlanmış, c) oda sıcaklığında bekletilmiş solüsyon.....	82
Şekil 5.23. Taze hazırlanmış ve 77 gün süreyle bekletilmiş serbest ve immobilize enzim çözeltilerinin spesifik aktivitesi	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alpha
β	: Beta
BSA	: Bovine Serum Albumin
CMC	: Karboksimetil selüloz
CLEA	: Çapraz Bağlı Enzim Kristalleri (Cross-Linked Enzyme Crystals)
CLEC	: Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (Cross-Linked Enzyme Aggregates)
ES	: Enzim-Substrat kompleksi
ϵ	: Epsilon
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Infrared
FWHM	: Pikin yarısındaki maksimum genişlik (Full Width at Half Max)
GA	: Gluteraldehit
IUBMB	: Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)
K_m	: Michaelis sabiti
MNP	: Manyetik Nanopartikül
NaCMC	: Karboksimetil selüloz sodyum
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	: Termogravimetrik Analiz
VSM	: Titreşimli Örnek Magnetometresi
XRD	: X-ışını Kırınımı

GİRİŞ

Son yıllarda demir, nikel, kobalt, gümüş gibi malzemelerin ileri teknoloji uygulamalarına entegre edilmesi, yüksek performansa sahip ve karmaşık işlemlerde kullanılabilecek ileri malzeme uygulamaları üzerine birçok çalışma yapılmakta ve bu konu büyük önem arz etmektedir. Bu malzemelerin üretim proseslerinin geliştirilmesi, malzemenin kullanım amacına göre modifiye edilmesi, karakterizasyon çalışmaları oldukça önemlidir. Nano boyutta malzemelerin işlevselliği, karakteristik özellikleri ve performansları göz önünde bulundurulduğunda nanoteknoloji alanındaki gelişmeler için ilk ve en önemli adımın bu nano boyuttaki malzemelerin sentezi olduğu söylenebilir. İkili çöktürme, hidrotermal sentez, sol-jel metodu, mikroemülsiyon gibi farklı yöntemler ve sentez parametrelerinin değiştirilmesiyle farklı karakteristik özelliklerde partiküller sentezlenebilir. Kullanım amacına ve istenilen özelliklere uygun spesifik modifikasyonlarla da farklı uygulamalar için kullanılabilir hale getirilebilirler. Yüzey modifikasyonları için polimer, inorganik veya organik kaplama malzemeleri kullanılabilir. Seçilen kaplama malzemesine bağlı olarak nanopartiküllerin sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özellikler farklılık gösterebilir. Spesifik uygulamalar için metalik veya manyetik partiküller uygun biyopolimerlerle kaplanarak biyoteknolojik süreçlerde kullanılabilmektedir (Akbarzadeh, Samiei, & Davaran, 2012).

Nanopartiküller, moleküller ve atomik düzeydeki yapılar arasında bir köprü görevi gördükleri için bilimsel çalışmalarda büyük ilgi görmektedirler. Nanobiyokatalizörler olarak bilinen nano boyutlu partiküllere immobilize edilmiş enzimler, hızla gelişen ve ilgi çeken bir alan olarak kabul edilirler. Enzimlerin nanoyapı ortamları, nanolifler, nanotüpler, nanogözenekli yapılar ve nanopartikülleri içeren nanoyapılarla sağlanır (Kim, Grate, & Wang, 2008).

Enzimler gıda, deterjan, kağıt, tekstil gibi çeşitli endüstriyel ve biyolojik proseslerde yaygın olarak kullanılan katalizörlerdir. Ancak kısa ömürleri, kararsız yapıları ve saflaştırma tekniklerinin maliyeti nedeniyle uygulamaları sınırlıdır. Bu nedenle, enzim stabilitesinin iyileştirilmesiyle bu sorunlar çözülebilir ve uygulamaları artırılabilir (Bickerstaff, 1997; Jafarizadeh-Malmiri, Ghaz-Jahanian, & Berenjian, 2012). Enzimlerin immobilizasyonu, enzim özelliklerini geliştirmek için en başarılı yöntem

olarak kabul edilir (Velde, Lourenco, Pinheiro, & Bakker, 2002; Bullock, 1995). Çözünmeyen organik veya inorganik taşıyıcılar üzerine enzim immobilizasyonu, enzim teknolojisinde çok önemli bir yere gelmiştir (Bickerstaff, 1997). İmmobilize enzimler, fiziksel olarak sınırlandırılmış ve verimli bir şekilde geri dönüştürülebilen enzimlerdir. İmmobilize enzimlerin en önemli özelliği, büyük ölçekli uygulamalar için işlemin maliyetini azaltmasıdır. İmmobilize enzimin maliyeti, enzimin tekrar tekrar kullanılabilir hale gelmesiyle büyük ölçüde azaltılabilir. Bununla birlikte immobilize edilen enzimler, serbest enzimlere kıyasla daha stabildirler ve reaksiyon sonunda çözelti içerisinden kolaylıkla ayrılabilirler.

İmmobilize enzimlerin üretimi için fiziksel yöntemler (destek ve enzim arasında zayıf etkileşimler vardır) ve kimyasal yöntemler (enzim ile kovalent bağlar oluşur) gibi çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. İmmobilizasyon için en çok kullanılan teknikler kovalent bağlama, tuzaklama, adsorpsiyon ve çapraz bağlamadır (D'Souza, 1999).

Geleneksel immobilizasyon yöntemleriyle hazırlanan biyokatalizörlerle karşılaştırıldığında manyetik nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş enzimler, dışarıdan uygulanan bir manyetik alan yardımıyla kolayca çözelti içerisinden ayrılabilmesi sayesinde uygulamalarda daha avantajlıdır (Ansari & Husain, 2012).

Bu çalışmada, ikili çöktürme yöntemiyle manyetik nanopartiküllerin sentezlenmiştir. Manyetik nanopartiküller sentez aşamasında simultane bir şekilde farklı konsantrasyonlarda ve agar, karboksimetilselüloz, pektin gibi farklı yüzey aktif maddelerle kaplanmıştır. Ardından sentezlenen partiküller Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), X-ışını kırınımı (XRD), Termogravimetrik analiz (TGA), titreşimli örnek magnetometresi (VSM) gibi yöntemlerle karakterize edilmiştir. Kaplama malzemelerinin özellikleri ve konsantrasyon değişiminin karakteristik özellikler üzerine etkisi incelenmiştir.

Tezin ikinci aşamasında, sentezlenen bu partiküllerden farklı konsantrasyonlarda agar polimeri ile kaplanan partiküller üzerine alfa amilaz enzimi immobilizasyonu çalışılmıştır. İmmobilizasyon çalışmalarında adsorpsiyon ve kovalent bağlama yöntemleri incelenmiştir. Kovalent bağlama yöntemi için kullanılacak partiküllere farklı konsantrasyonlarda glutraldehit ile yüzey aktivasyonu işlemi uygulanmıştır. İmmobilizasyon çalışmalarında immobilizasyon yöntemi, immobilizasyon süresi,

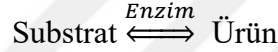
kaplama malzemesinin konsantrasyonu, immobilizasyon pH'ı, gluteraldehit konsantrasyonu gibi parametreler incelenmiştir. İmmobilize enzim için yapılan enzim aktivitesi ve spesifik aktivite tayinlerinin ardından optimum koşullar seçilmiş ve ardından serbest ve immobilize enzimlerin pH kararlılığı, sıcaklık kararlılığı, işlemsel kararlılıkları ve saklama stabiliteleri çalışılmıştır.



1. ENZİMLER

Spesifik biyokatalizör olarak da bilinen enzimler canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran protein molekülleridir. Canlı organizmalarda meydana gelen birçok tepkime enzimler yardımıyla katalizlenir. Enzimler, uygun koşullar sağlandığı takdirde etkilerini gösterebiliyor olduklarından, doğal ortamları dışında pek çok alanda yaralanabilme imkanı sunarlar. Bu sebeple farklı bilim dalları ve çeşitli endüstriyel alanlar için büyük önem taşımaktadırlar (Robinson, 2015).

Katalizör olarak enzimler çok düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında bile etkilidirler ve reaksiyon esnasında kendilerini tüketmeden reaksiyonları hızlandırırlar. Genel olarak enzimler, substrat moleküllerinin ürün moleküllerine dönüşümünü katalize etme yeteneğine sahip olan biyokatalizörler olarak tanımlanabilir:



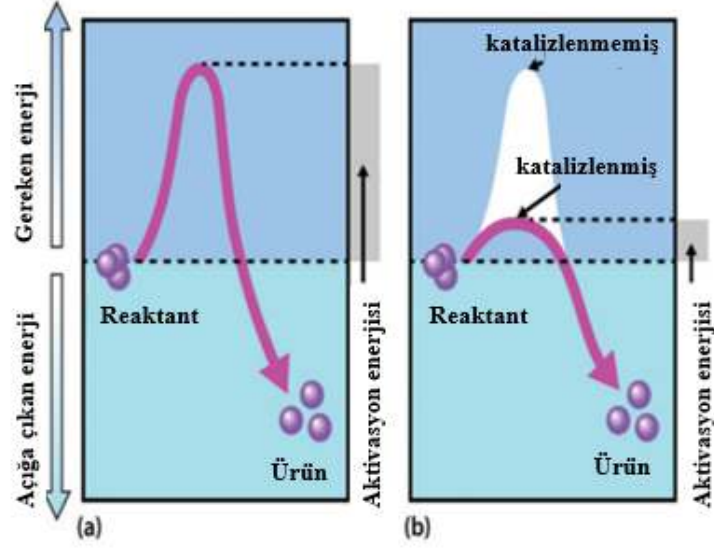
Enzimler dört temel açıdan çok güçlü katalizörlerdir:

- Enzimler sıradan kimyasal katalizörlere göre tepkimeleri yaklaşık 1000 kat daha hızlı gerçekleştirebilmektedirler. Bu hıza ulaşabilmeleri için yüksek sıcaklık, basınç, pH gibi reaksiyon koşullarına ihtiyaç duymazlar. Bu nedenle enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar fazla enerji gerektirmezler.
- Kimyasal katalizörlere göre çok daha farklı kimyasal reaksiyonlar enzimler tarafından katalizlenebilir.
- Enzimler substrata ve reaksiyon türüne oldukça spesifiktirler. Bu sebeple gerçekleşen reaksiyon yüksek verimle gerçekleşir ve az sayıda yan ürün meydana gelir.
- Enzimler farklı doğal kontrol mekanizmalarına sahiptirler. Enzimlerin aktivitesi, bulundukları şartlara göre düzenlenebilir.

Enzimlerin çalışma mekanizması iki farklı açıdan ele alınabilir:

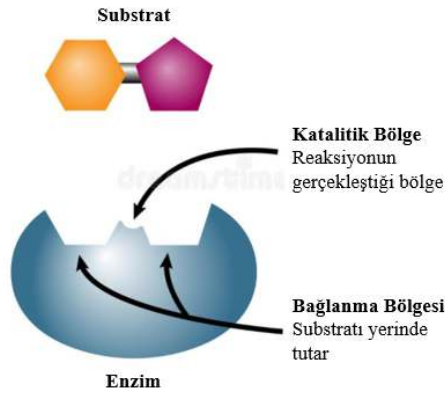
- Reaksiyon süresince meydana gelen enerji değişiklikleri incelenebilir. Bütün kimyasal reaksiyonlarda aktivasyon enerjisi olarak adlandırılan enerji engelinin aşılması gerekmektedir. Aktivasyon enerjisi ne kadar yüksek olursa, aşılması gereken enerji engeli o kadar büyük olacak ve birim zamanda bu engeli aşabilen moleküllerin sayısı da o kadar az olacaktır.

Reaksiyon hızını artırabilmek için sisteme katalizör eklenebilir. Katalizör olarak enzimler seçildiğinde enzim substrat ile kompleks yaparak aktivasyon enerjisini düşürebilir (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Bir reaksiyonun başlaması için gereken aktivasyon enerjisi üzerine enzimin etkisi (a) katalizlenmemiş, (b) katalizlenmiş (Robinson, 2015)

- Kataliz sırasında enzimin aktif bölgesinde gerçekleşen yapısal değişiklikler incelenebilir. Enzimlerde aktif merkez, enzimin substrata bağlandığı bölge ve kataliz olayının gerçekleştirildiği bölge olmak üzere iki bölgeden oluşur. Substrata bağlanan bölge dışında protein molekülünün geri kalanı aktif bölgeyi stabilize eder ve bölgenin substrat molekülü ile etkileşimi için uygun bir ortam sağlar. Bu sebeple aktif bölge, katalitik aktivite kaybı olmadan proteinin geri kalanından ayrılamaz (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Enzimin aktif bölgesi

Çoğu enzim yalnızca protein yapısından oluşurken bazıları da protein yanında enzimlerin katalitik aktivite göstermeleri için gerekli olan protein olmayan bileşenler içerirler. Enzimin protein kısmına “Apoenzim” denir. Protein yapısında olmayan yan gruplar, genellikle demir, kobalt, bakır, manganez veya çinko gibi metal iyonlarından meydana gelmiş ise “Kofaktör”, organik moleküllerden meydana gelmişse ise “Koenzim” olarak adlandırılır. Enzim yüzeyine kovalent olarak bağlı olan koenzim veya kofaktöre “prostetik grup” adı verilir. Enzimin protein bileşini olan apoenzim, koenzim ya da kofaktörü ile katalitik olarak aktif olduğu durum ise “Holoenzim” olarak adlandırılır (Şekil 1.3.). Eğer koenzim veya kofaktör enzimden ayrılacak olursa, enzimin geri kalan apoenzim kısmı tek başına katalitik olarak inaktiftir. Enzimin aktivitesi sadece koenzim ya da kofaktör apoenzim ile bir arada olduğunda gözlenir (Fennema, 1985).



Şekil 1.3. Holoenzimin yapısı

1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler etki ettikleri ve katalizledikleri reaksiyona bağlı olarak adlandırılmakta ve hidrolazlar, izomeraslar, ligazlar, liyazlar, oksidoredüktazlar ve transferazlar olarak altı temel grupta sınıflandırılmaktadırlar. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB)’ ne göre, her enzim katalize edilen reaksiyona dayalı olarak bir enzim sınıfına (EC 1 – 6) atanır (Moss & Webb, 2001).

- Oksidoredüktazlar (EC 1), elektron donörü olarak kabul edilen oksitlenmiş substrat ile indirgeme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Bu enzim sınıfı, etki ettiği kükürt, aldehit vb. gibi fonksiyon grubuna göre 22 alt sınıfa ayrılır.
- Transferazlar (EC 2), fonksiyonel grupların donör bir bileşikten alıcı bir bileşiğe transfer edilmesi reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Fonksiyonel grubun aktarıldığı gruba göre 9 alt sınıfa ayrılırlar.

- Hidrolazlar (EC 3), C – O, C – N ve C – C bağları dahil olmak üzere ester, glikoliz, eter, peptid, asit anhidrit gibi çeşitli bağların hidrolizini katalize eder. Hidrolize edilen bağa bağlı olarak 13 alt sınıfa ayrılırlar. Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin %80'ini oluştururlar. Çoğunlukla gıda işlemede kullanılırlar (Krishna, 2002).
- Liyazlar (EC 4), hidroliz ve oksidasyon dışındaki yollarla çeşitli bağların parçalanmasını katalize eder. Ayrıldıkları bağa göre 7 alt sınıfa ayrılırlar.
- İzomerazlar (EC 5), tek bir molekül içindeki değişiklikleri katalize eden enzimlerdir. Bu enzimlerden bazıları substratın fonksiyonel gruplarını moleküldeki bir pozisyondan diğerine transfer ederek yapısal olarak yeniden düzenlerken, diğerleri substratın moleküler geometrisini değiştirir.
- Ligazlar (EC 6), ATP difosfat bağlarının hidrolizi sonucu serbest kalan enerji ile yeni bağların oluşmasını katalize eder (Brown, 2013).

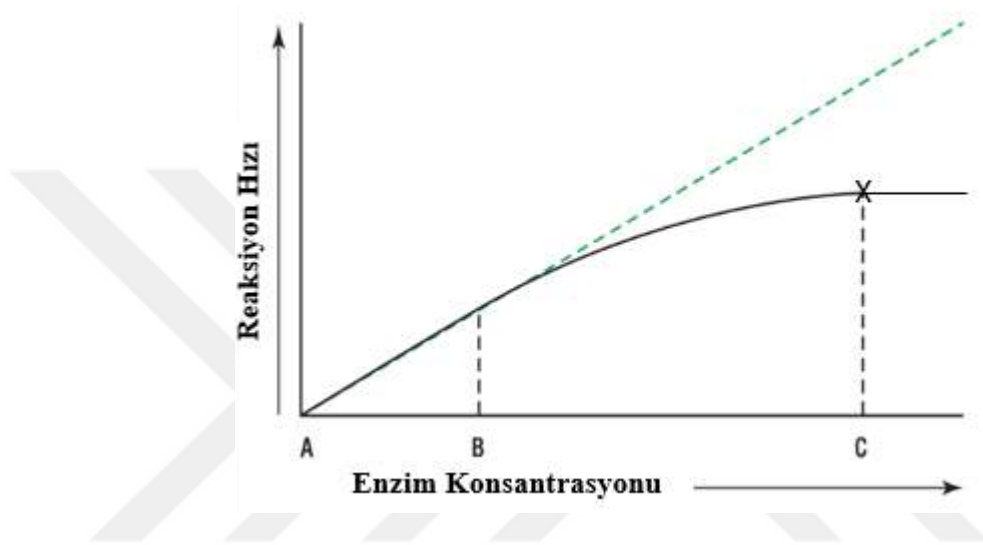
1.2. Enzim Aktivitesi ve Aktiviteyi Etkileyen Faktörler

Uluslararası Biyokimya Birliği kararı ile 1 birim enzim aktivitesi, optimum ölçüm koşullarında 25°C'de dakikada 1 mol substratın ürüne dönüşümüne neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Koolman & Roehm, 2005). Gıda endüstrisinde kullanılmakta olan enzimlerin çoğu için farklı tanımlar kullanılır. Çünkü bu endüstride kullanılan enzimler hammaddedir ve enzimatik olarak aktif protein miktarının ölçülmesi mümkün değildir. Bu sebeple derişik ham enzim solüsyonları için aktivite mL enzim başına enzim birimi (U/mL enzim çözeltisi) olarak veya solüsyonun içerdiği protein miktarı belirlenmişse mg toplam protein başına (U/mg protein) olarak tanımlanabilir (Fennema, 1985). Enzim aktivitesi terimi bir çözelti içerisindeki toplam enzim birimlerini ifade eder. Spesifik aktivite ise toplam proteinin miligramı başına enzim birimi sayısıdır. Spesifik aktivite enzim saflığının bir ölçüsüdür. Enzim saflaştıkça artar tamamen saf olduğunda maksimum değere ulaşır ve sabit hale gelir (Nelson & Cox, 2004). Enzim aktivitesi ve enzimatik reaksiyon hızı enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, inhibitör ya da aktive edici ajanların varlığı, pH ve sıcaklık gibi faktörlerden etkilenir.

1.2.1. Enzim konsantrasyonu

Daha yüksek enzim konsantrasyonu substratı işlemek için daha fazla enzim molekülünün varlığını gösterir. Enzim-substrat kompleksinin yüksek seviyeleri, daha yüksek bir başlangıç hızı ile sonuçlanır dolayısıyla reaktant ürün dengesine doğru kaymada bir başlangıç sağlar. Enzim konsantrasyonunda gerçekleşen artmanın reaksiyon

hızı üzerindeki etkisini incelemek için, reaksiyonda substrat fazla miktarda olmalıdır; yani reaksiyon, substrat konsantrasyonundan bağımsız olmalıdır. Çünkü substratın tamamı bağlandığında, geriye kalan enzimlerin bağlanabileceği herhangi bir substrat olmayacağından reaksiyon artık hızlanmayacaktır (Şekil 1.4.). Bu reaksiyonlar, hızları substrat konsantrasyonundan bağımsız olduğu ve k sabitine eşit olduğundan “sıfır dereceli reaksiyonlar”dır. Reaksiyonda ürün oluşumu zamanla doğrusal bir hızda ilerler (Punekar, 2018).

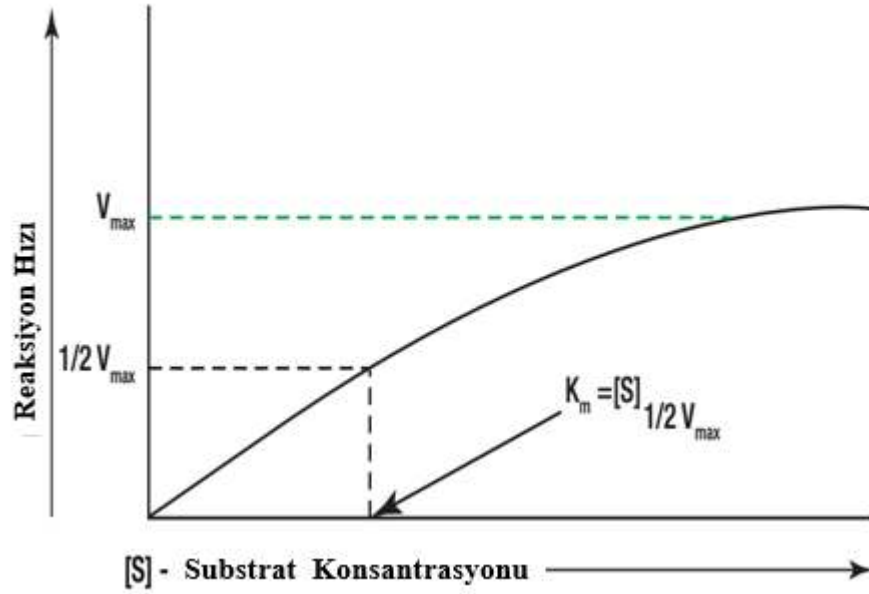


Şekil 1.4. Enzim konsantrasyonu ile değişen reaksiyon hızı (Worthington, 2021)

Şekil 1.4.te görüldüğü gibi grafiğin AB alanında reaksiyon hızı substrat konsantrasyonundan bağımsızdır. Bu sebeple lineer bir şekilde artı gösterir, ancak BC alanında ve sonrasında bu düzgün doğrusal artış görülmemektedir. Substrat konsantrasyonu kısıtlayıcı olduğunda reaksiyon daha fazla hızlanamaz. C noktası, reaksiyonun doygunluk noktasıdır. Bu noktadan sonra enzim konsantrasyonunda meydana gelecek olan artış reaksiyonu hızlandırmaz.

1.2.2. Substrat konsantrasyonu

Artan substrat konsantrasyonu, reaksiyon hızını belirli bir noktaya kadar artırır. Enzim miktarı sabit tutulursa ve substrat konsantrasyonu kademeli olarak artırılırsa, reaksiyon hızı maksimuma ulaşmaya kadar artacaktır (Şekil 1.5.). Bu noktadan sonra mevcut enzimler doymuş olacağından substrat konsantrasyonundaki artışlar reaksiyon hızını artırmaz. Bu maksimum hıza ulaşıldığında mevcut enzimin tamamının enzim/substrat kompleksine (ES) dönüştüğü varsayılır.



Şekil 1.5. Substrat konsantrasyonu ile değişen reaksiyon hızı (Worthington, 2021)

Çoğu enzim, enzim aktivitesi ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi iki aşamada tanımlayan Michaelis-Menten kinetiğini takip eder. İlk aşamada, ikisi arasındaki ilişki doğrusaldır ve bağlanmamış aktif bölgelerin sayısı azaldığında grafik platolaşır.

Kullanımı yaygın olan enzimlerin çoğu için Michaelis sabitleri belirlenmiştir. K_m sabitinin değeri belirli bir enzim hakkında bilgi verir.

- K_m değerinin küçük olması, enzimin doygun hale gelmesi için az miktarda substrat gerektiğini gösterir. Bu nedenle, maksimum hıza daha düşük substrat konsantrasyonlarında ulaşılır.
- K_m değerinin büyük olması, maksimum reaksiyon hızına ulaşmak için yüksek miktarda substrata ihtiyaç olduğunu gösterir.
- Enzimin katalizör görevi gördüğü en düşük K_m 'ye sahip substratın, çoğu zaman enzimin doğal substratı olduğu varsayılır, ancak bu tüm enzimler için doğru değildir (Punekar, 2018).

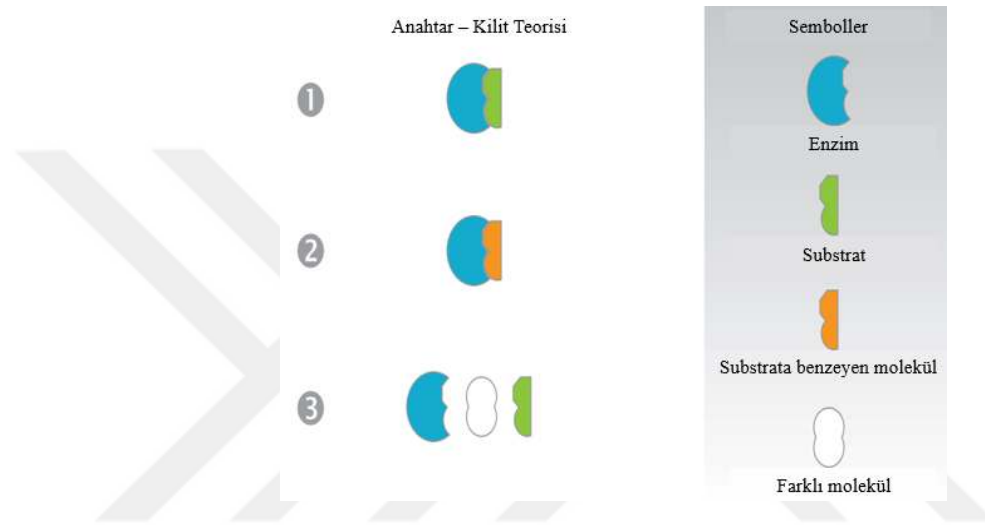
1.2.3. İnhibitör ya da aktivatör varlığı

Birçok enzim, katalitik işlevlerini artırmak veya başlatmak için substrat veya enzim olmayan moleküllere ihtiyaç duyarlar. Bazı enzimler Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Na^+ , K^+ gibi metal iyonlarını kullanırlar.

Enzim inhibitörleri ise enzimin katalitik aktivitesini etkileyen ve sonuç olarak katalizi yavaşlatan veya bazı durumlarda durduran maddelerdir. İnhibisyon

mekanizmalarıyla ilgili teorilerin çoğu, enzim-substrat kompleksi ES'nin varlığına dayanmaktadır. Enzim inhibisyonunun üç yaygın türü vardır: rekabetçi, rekabetçi olmayan ve substrat inhibisyonu.

Rekabetçi inhibisyon, hem substrat hem de substrata benzeyen bir madde enzime eklendiğinde meydana gelir. Enzim katalizörlerinin kilit-anahtar teorisi bu etkiyi açıklamak için kullanılabilir (Şekil 1.6.). Substrat molekülüne çok benzeyen moleküller aktif bölgeye bağlanır ve gerçek substratın bağlanmasını engeller.



Şekil 1.6. Anahtar-kilit teorisi – rekabetçi inhibisyon (Worthington, 2021)

Anahtar – kilit teorisi enzimlerin aktif bölgesiyle ilgilidir. En yüzeyindeki aktif bölgenin substrat için güçlü bir afiniteye sahip olmasına dayanır. Substrat, enzim yüzeyinde reaksiyon ürünlerine dönüşümü daha kolay olacak şekilde tutulur. Enzim kilit ve substrat bir anahtar gibi düşünüldüğünde, anahtar kilide sokulur, anahtar çevrilir ve kilit açılır (Şekil 1.6.(1)). Bununla birlikte substrata benzeyen bir inhibitör varlığında enzim kilidindeki pozisyon için substrat ve bu inhibitör arasında rekabet oluşur. İnhibitör kazandığında, kilit pozisyonuna yerleşir ancak kilidi açamaz (Şekil 1.6.(2)). Bu sebeple reaksiyon yavaşlar çünkü mevcut enzimlerden bazıları inhibitör tarafında işgal edilmiş olur. Enzimin aktif yüzeyine uymayan bir molekül olduğunda enzim bu molekülü reddeder ve substratı kabul eder, böylece reaksiyon normal şekilde ilerler (Şekil 1.6.(3)).

Rekabetçi olmayan inhibitörler, enzime eklendiklerinde, enzimi artık substratı kabul edemeyecek şekilde değiştirirler (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. Rekabetçi olmayan inhibitörler (Worthington, 2021)

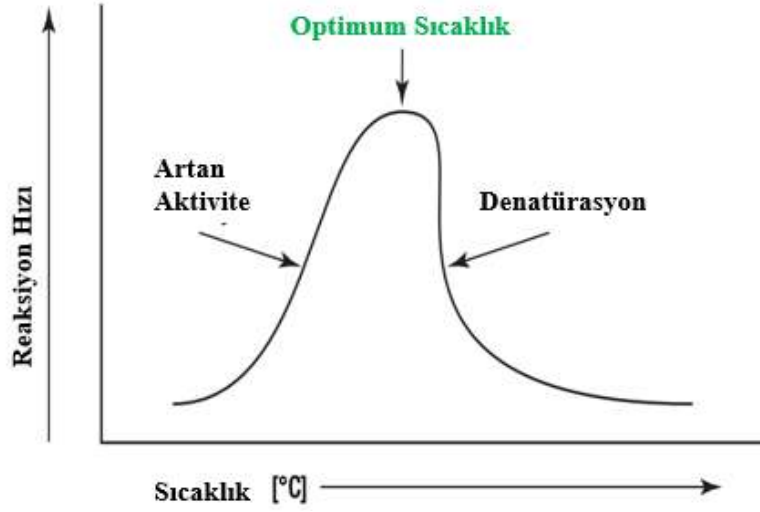
Substrat inhibisyonu bazen aşırı miktarda substrat mevcut olduğunda meydana gelir. Bir noktadan sonra reaksiyona eklenen substrat, reaksiyon hızını düşürür. Bunun sebebinin, enzim yüzeylerindeki aktif bölgeler için rekabet eden çok sayıda substrat molekülünün aktif bölgeleri bloke etmesi ve diğer substrat moleküllerinin aktif bölgeye ulaşmasını önlemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 1.8.). Bu da mevcut enzimin tamamı kullanılmadığından reaksiyon hızının düşmesine neden olur (Boyer, 2006).



Şekil 1.8. Substrat inhibisyonu (Worthington, 2021)

1.2.4. Sıcaklık

Çoğu kimyasal reaksiyonda olduğu gibi sıcaklık arttıkça enzim reaksiyonlarının da hızı belirli bir sıcaklığa kadar artacaktır. Reaksiyon hızının en yüksek olduğu, her enzimin daha aktif olduğu belirli bir optimum sıcaklık vardır. Enzimler protein yapılı olduklarından optimum sıcaklıktan sonra reaksiyon hızı düşmeye başlar. Çünkü protein yapılı enzimler denatüre olmaya başlar ve böylece şeklini kaybeder ve iyi çalışamaz duruma gelir (Şekil 1.9.).

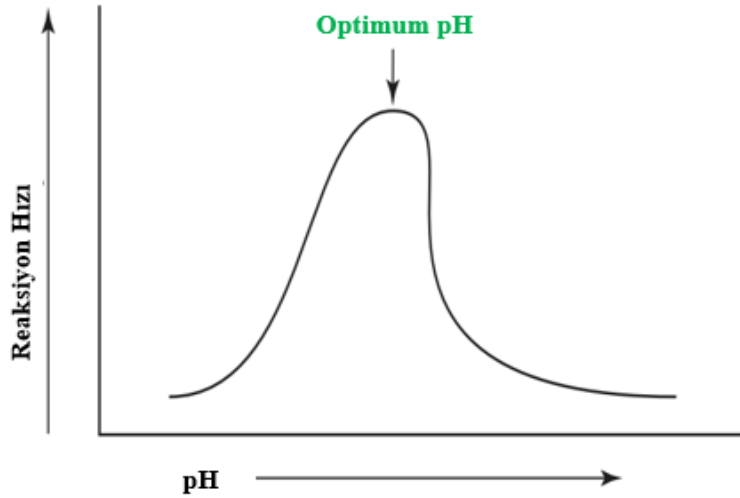


Şekil 1.9. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi (Worthington, 2021)

Bir süre sonra, enzimler uygun sıcaklıklarda bile aktivite göstermeyeceklerdir. Enzimlerin 5°C veya altında saklanması genellikle en uygundur. Bazı enzimler donduklarında aktivitelerini kaybederler.

1.2.5. pH

Enzimler asidik karboksilik grupları (COOH-) ve bazik amino grupları (NH₂) içeren protein yapılı katalizörlerdir. Bu nedenle enzimler pH değerinin değişmesinden etkilenir. Her enzimin maksimum verimlilikte çalıştığı optimum pH değeri vardır. Reaksiyon pH'ı optimum pH'dan düşük veya yüksekse, enzim aktivitesi çalışmayı durdurana kadar azalır (Şekil 1.10) (Voet, Voet, & Pratt, 2006).



Şekil 1.10. pH'in reaksiyon hızına etkisi (Worthington, 2021)

1.3. Enzimlerin Avantajları ve Kısıtlamaları

Enzimlerin yüksek aktivite, seçicilik ve özgüllük gibi kendilerine özgü özellikleri vardır. Geleneksel katalizörlerle karşılaştırıldığında, enzimler reaksiyon termodinamiğini etkilemeden reaksiyon hızını artırır. Böylece çoğu karmaşık kimyasal işlem uygun çevre koşullarında gerçekleşebilir. Ancak enzimlerin çoğu nispeten kararsızdır ve enzimlerin üretimi ya da saflaştırılması işlemleri ekonomik açıdan uygun değildir. Enzimleri verimli bir şekilde kullanmanın yolu, aktif enzimin geri kazanılmasında yatmaktadır, enzimlerin yeniden kullanılabilmesi enzimlerin maliyetini önemli ölçüde azaltmaktadır (Brena & Viera, 2006; Johannes, Simurdiak, & Zhao, 2006). Ayrıca, geleneksel heterojen kataliz ile karşılaştırıldığında, enzim katalizi homojen çözünmüş koşullar altında gerçekleştirilir. Enzim, yeniden kullanım için reaksiyon karışımından aktif formda geri kazanılmadığı takdirde ürünü kontamine edebilir ve safsızlıklara yol açar. Bu teknik kısıtlamalar, enzimlerin bir destek materyaline immobilize edilmesiyle aşılabılır (Mateo, Palomo, Lorente, Guisan, & Lafuente, 2007).

1.4. Enzim İmmobilizasyonu

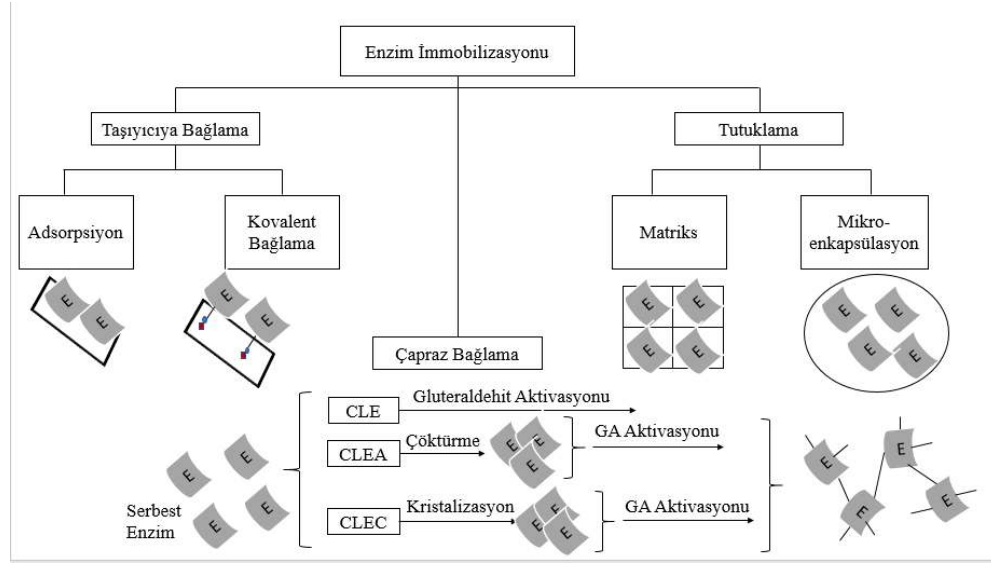
Suda çözünebilir ve çözelti içerisinde serbest halde hareket edebilen enzim moleküllerinin, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanarak hareketinin sınırlandırılmasına immobilizasyon denir. Enzim immobilizasyonu sayesinde enzim molekülleri reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilir ve tekrar tekrar kullanılabilir. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre avantaj ve dezavantajları vardır (Tablo 1.1) (Katchalski-Katzir, 1993).

Tablo 1.1. Enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Enzimin yeniden kullanımı	Aktivite kaybı
Üründen kolayca ayrılabilme	Ekstra maliyet (destek materyal ve kimyasal)
Yüksek seçicilik	Difüzyon kısıtlamaları
Daha kolay reaktör işletimi	
Daha geniş reaktör seçeneği	

1.4.1. İmmobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda kullanılan farklı teknikler vardır. Bu teknikler temel prensipler aynı kalmakla birlikte oldukça farklı biçimlerde sınıflandırılabilirler (Şekil 1.11.).



Şekil 1.11. Enzim immobilizasyonu için kullanılan yöntemler

1.4.1.1. Taşıyıcıya bağlama

Enzim immobilizasyonu yöntemlerinden taşıyıcıya bağlama metodu en eski yöntemlerdendir. Enzimin bağlanacağı uygun taşıyıcıyı seçmek önemlidir. İmmobilizasyonda kullanılacak taşıyıcının seçimi sırasında,

- Partiküllerin büyüklüğü,
- Toplam yüzey hidrofobik grupların hidrofilik gruplara oranı,
- Taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi özelliklerine bakılır.

Seçilecek taşıyıcının ise şu niteliklere sahip olması beklenir:

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Poröz yapı (gözeneklilik),
- Mekanik kararlılık,
- Uygun tanecik formu,
- Kimyasal ve termal kararlılık,
- Taşıyıcı kovalent bağlamada kullanılacaksa ılıman koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplara sahip olması,
- Ucuz olma,
- Mikroorganizmalara karşı dirençli olma,

Kovalent bağlama ile immobilizasyon

Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonuna enzim ve taşıyıcı ya da destek materyalinin fonksiyonel grupları arasında kovalent bağların oluşumu aracılık eder. Enzim ve destek arasındaki etkileşimin kararlılığı, destek üzerinde bulunan fonksiyonel gruplar tarafından yönetilir (Ispas, Sokolov, & Andreescu, 2009; Hsieh, Liu, & Liao, 2000). Bu yöntemdeki kritik adım, özellikle bağ oluşumu sırasında aktif katalitik merkezi korumak için enzimlerin fonksiyonel özelliklerinin korunmasıdır (Scouten, 1987). Taşıyıcı ya da destek materyalindeki kovalent bağ oluşturan fonksiyonel gruplar:

- Amino grupları,
- İmino grupları,
- Hidroksil grupları,
- Karboksil grupları,
- Tiyol grupları,
- Methiltiyol grupları,
- Guanidyl grupları,
- İmidazol grupları,
- Fenol halkaları

Enzimlerin destek materyali ile kovalent bağ oluşturan önemli fonksiyonel grupları:

- α - karboksi grubu (C-terminal uç)
- α – amino grubu (N-terminal uç)
- ϵ -amino grubu (lizin ve arjinin)
- β - ve γ - karboksil grupları (aspartat ve glutamat)
- Fenol halkası (tirosin)
- Tiyol grubu (sistein)
- Hidroksil grubu (serin ve treonin)
- İmidazol grubu (histidin)
- İndol halkası (triptofan)

Enzimin matrise kovalent bağlanması için çok çeşitli reaksiyonlar, matris üzerinde mevcut fonksiyonel gruplara dayalı olarak kullanılmıştır. Enzim ve taşıyıcı ya da destek materyal arasındaki kovalent bağ oluşumu şu reaksiyonlarla meydana gelmektedir:

- Diazotizasyon
Matris – N = N – Enzim
- Alkilasyon ve Arilasyon
Matris – CH₂ – NH – Enzim, Matris – CH₂ – S – Enzim
- Amid Bağı oluşumu
Matris – CO – NH – Enzim
- Amidasyon Reaksiyonu
Matris – CNH – NH – Enzim
- Schiff'in Baz Oluşumu
Matris – CH = N – Enzim
- Tiyol-Disülfit Yer Değiştirmesi
Matris – S – S – Enzim
- Bifonksiyonel Ayıraçlarla Taşıyıcı Bağlama
Matris – O(CH₂)N = CH(CH₂)₃CH = N – Enzim
- UGI Reaksiyonu
- Civa – Enzim Yer Değiştirmesi (Sheldon & Pelt, 2013; Brena & Batista-Viera, 2006)

Tablo 1.2. Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Nispeten basit bir yöntem	Aktivite kaybı
Enzim sızıntısı ya da desorpsiyon sorunu yok	Matris ve enzim yenilenemez
Sürekli sistemlere uygulanabilir	

Adsorbsiyon ile immobilizasyon

Enzimlerin bir destek materyal üzerine immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntem fiziksel adsorpsiyon yöntemidir. Bu yöntemde enzim, destek materyale hidrojen bağı, Van der Waals etkileşimleri ya da hidrofobik etkileşimler ile bağlanmaktadır. Genellikle enzimin katalitik aktivitesi korunur, ancak enzimi bağlı tutmak için bu bağlar zayıf olduğundan enzim taşıyıcıdan ayrılabilir. İmmobilizasyon işlemi, enzimin suda çözünmeyen bir destek materyali ile karıştırılıp enzim fazlalığının yıkanarak uzaklaştırılmasıyla gerçekleştirilir (Hofstee, 1973; Visser & Strating, 1975). Adsorpsiyon ile immobilizasyon yönteminin basit olması, ılımlı koşullarda gerçekleşmesi, ekonomik olması, tersinir olması sebebiyle taşıyıcının başka amaçlar için

tekrar kullanılabilmesi gibi avantajlarının yanında enzimle taşıyıcı arasında görece daha zayıf bir etkileşim olduğundan reaksiyonun kritik noktasında desorpsiyon olması ve ürünleri kirletebilmesi, optimum koşulları sağlanmanın zor olması gibi dezavantajları vardır (Roig, Estevez, Velasco, Ghais, & Silverio, 1986).

Tablo 1.3. *Adsorbsiyon ile enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları*

Avantajlar	Dezavantajlar
Basit ve ucuz bir yöntem	Desorpsiyon
Enzim katalitik aktivitesini korur	Az verimlilik
Aynı zamanda enzim saflaştırma	

İyonik bağlama ile immobilizasyon

İyonik bağlama ile enzim immobilizasyonu yönteminde enzim, suda çözünmeyen ve iyon değiştirme yeteneğine sahip bir destek materyaline iyonik olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Taşıyıcı olarak genellikle iyon değişim merkezine sahip polisakkaritler ve sentetik polimerler kullanılır. Taşıyıcı olarak seçilen materyaller anyonik ya da katyonik olabilir. Bu yöntem de oldukça basit bir yöntemdir. Bir enzimin destek materyaline bağlanması kolaylıkla gerçekleşebilir. İlmli koşullarda gerçekleştiğinden, enzimin konformasyonunda ve aktivitesinde çok az değişikliğe neden olur. Bu sebeple, bu yöntem çoğu durumda yüksek aktiviteye sahip immobilize enzimler verir. Enzim ve taşıyıcı materyal arasında bağlanma kuvveti kovalent bağlanmadaki etkileşimden daha zayıftır bu sebeple yüksek iyonik kuvvete sahip substrat çözeltileri ve pH değişimleri enzim sızıntısına sebep olabilir (Brena & Batista-Viera, 2006).

Tablo 1.4. *İyonik bağlama ile enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları*

Avantajlar	Dezavantajlar
Uygulaması kolay	Enzim kaçağı
Taşıyıcı yenilenebilir	Reaksiyon düşük spesifikliğe sahiptir
Enzim kimyasal olarak modifiye edilmez	Adsorpsiyon ve iyon değişimi aynı zamanda gerçekleşebilir.

1.4.1.2. Tutuklama

Tutuklama ile enzim immobilizasyonu yöntemi enzimin gözenekli bir polimer matris, jel ya da membran içinde tutulması ile gerçekleştirilir. Tutuklama işlemi substrat bu matristen içeri girebilirken proteini de içerde tutacak şekilde gerçekleşir. Bu yöntemde, diğer yöntemlerin aksine enzim çözelti içerisinde serbest durumdadır, jel matris ya da membran içerisinde tutularak hareketsizleştirilir. Bu özelliği sebebiyle

uygulama alanları oldukça geniştir (O'Driscoll, 1976). Bu immobilizasyon metoduyla enzimlerden farklı olarak organel ve hücreler de immobilize edilebilir. Yüksek molekül ağırlığına sahip olan substratlar enzime zorla tutunmaları ve taşıyıcıların tekrar kullanılamaması bu yöntemin dezavantajlarından. Bu dezavantajların önüne geçebilmek için ultrafiltrasyon membranı kullanılabilir ancak bu durum da aktive olmamış enzimler membran yüzeyine yapışarak reaksiyon solüsyonuna geçişte azalmaya sebep olur (Bickerstaff, Immobilization of Enzymes and Cells, 1997).

Tablo 1.5. Tutuklama yöntemiyle enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Uygulaması kolay	Enzim kaçağı
Aktivite kaybı düşük	Substratın küçük olma zorunluluğu
Enzim gereksinimi az	Kütle transferi sınırlandırması
Nötral ve suda çözünmeyen taşıyıcılar	Difüzyon bariyerleri

Enzimlerin tutuklama metoduyla immobilizasyonu, jel ya da fiber içine tutuklama ve mikro enkapsülasyon gibi tekniklerle yapılabilmektedir.

Jel tutuklama yöntemi

Jel tutuklama ile enzim immobilizasyonunda enzimler monomer (akrilamid), oligomerik ve polimerik (kolajen, jelatin, kalsiyum aljinat) maddelerden elde edilmiş, suda çözünmeyen polimer jeller içerisinde tutulur. Tutuklama işleminde sıcaklık, iyonik kuvvet, pH değişikliği ile çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleşir. Çapraz bağ yüzdesi aşırı olduğunda substratın enzimin aktif merkezine ulaşması engellenir ve enzimin yapısı bozulduğundan aktivite kaybı meydana gelebilir. Bu yöntemle immobilize edilen enzimler küçük moleküllü enzimler olmalıdır. Jel tutuklama yöntemi çok kolay kullanılabilir olması, gerçek bir fiziksel yöntem olması, çok az miktarda enzime ihtiyaç duyması, polimerleşmenin kolay ve hızlı olması gibi avantajlara sahiptir. Immobilizasyon işleminde jel oluşumu sırasında reaksiyon sıcaklığının enzimi inaktif hale getirmesi ve ayrıca çapraz bağlı polimerin ağ yapısından enzimin kaçması gibi dezavantajları da vardır (Bernfeld & Wan, 1963).

Fiber tutuklama yöntemi

Fiber tutuklama metodu ile enzim immobilizasyonu yöntemi, enzimin selüloz gibi ağsı yapıdaki bir polimerde tutuklanmasıyla gerçekleşir. Fiberlerin bazı organik

çözücülere karşı dirençli olması ve yüksek iyonik kuvvete sahip olmaları bu yönteme avantaj sağlar, fakat bu yöntemde de düşük moleköl ağırlığına sahip olan substratların kullanımı yöntemi sınırlamaktadır. Polimer çözücüsü olarak suda çözünmeyen sıvılar kullanıldığından enzimin aktif merkezi etkilenebilir ve enzim inaktive olabilir (Dinelli, Marconi, & Morisi, 1976).

Mikrokapsülleme yöntemi (membranda tutuklama yöntemi)

Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu yönteminde enzim yarı geçirgen membran içine hapsedilir. Kullanılan membranın gözenek çapları önemlidir. Gözenek çapları ve immobilize edilecek enzimin substratının moleköl büyüklüğü, substratların kapsüle girişini ve oluşacak ürünün kapsül dışına çıkışını engellemeyecek boyutlarda olmalıdır. Bu yöntemde kullanılan yarı geçirgen membranlar, büyük protein ve enzimlerin kapsül dışına çıkmasına engel olur ancak küçük substrat ve ürünlerin serbestçe girip çıkmasına imkan tanır. Bu sebeple substrat molekülleri küçük olan enzimler için uygulanamaz. İmmobilizasyon işleminde kullanılacak yarı geçirgen membranların hazırlaması için iki farklı yöntem vardır. Bunlardan birincisi kimyasal bir reaksiyon olmayan ve koagülasyona dayalı oldukça basit bir yöntemdir. Bu yöntem ile yarı geçirgen membran hazırlamak için, enzim ve membran için kullanılacak madde çözücü içerisinde çözülür ve hazırlanan çözelti çöktürücü madde içerine mikro damlacıklar halinde enjekte edilir. Bu yönteme faz ayrımı polimerizasyonu olarak da adlandırılır. Diğer bir yöntem ise kimyasal bir reaksiyon olan ara yüzey polimerizasyonu yöntemidir. Bu yöntemle membran oluşturabilmek için çöktürücü madde solüsyonu içerisinde enzim çözeltisinin mikro damlacıkları hazırlanır ve iki çözeltinin birleşme noktalarında polimerleşme görülür. Enzimleri mikrokapsülle immobilize etme yönteminde yaygın olarak kimyasal mikrokapsülleme yöntemi kullanılır. Bu yöntem de sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenir. Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve olan kullanılan membran katı sürekli olmayan mikrokapsüllerde ise çerçeve olan membran sıvıdır. Tüm mikrokapsülleme yöntemlerinde kullanılacak olan membran maddesinin yarı geçirgen olması gerekmektedir. Mikrokapsülleme yöntemiyle enzim immobilizasyonu enzime geniş yüzey alanı sağladığından ve sadece tekil enzimlerle değil farklı enzimlerle de kullanılabilindiğinden avantajlıdır. Ancak bu yöntemde de moleköl ağırlığı yüksek olan substratlarla kullanılamaması, enzimin bazı durumlarda aktivitesinin yitirmesi, membran duvarlarına yapışabilmesi gibi dezavantajları vardır (Wadiack & Carbonell, 1975).

1.4.1.3. *Çapraz bağlama*

Çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminde küçük molekülü bi- veya multi-fonksiyonel reaktifler aracılığıyla enzim molekülleri arasında bağlar oluşturulur ve işlem sonucunda suda çözünmeyen kompleksler ortaya çıkar. Bu çapraz bağlanmalar molekül içi olabileceği gibi moleküller arası da olabilmektedir. İmmobilizasyon işlemi protein ve reaktif konsantrasyonu, pH, sıcaklık, iyonik şiddet, reaksiyon süresi ve immobilize edilecek enzim gibi faktörlerden etkilenir. Bu yöntem oldukça basittir ancak enzimlerdeki fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılması için gereken şartların oluşturulması zordur. Çapraz bağlanma ile enzim immobilizasyonu için en yaygın kullanılan reaktifler:

- Gluteraldehit
- Kloroformat
- Karbonildiimidazol
- Heterosiklik halojenürler
- Bisoksiranlar
- Divinilsülfanlar
- P-benzokinonlar
- Epiklorhidrinler
- Geçiş metal iyonları (Sheldon & Pelt, 2013)

Proteinler ana destek maddesi gibi davranma eğiliminde olduklarından enzimler kendi içlerinde çapraz bağlanabilirler. Birbirlerine çapraz bağlanan enzimler daha sonra çözünemeyen makro moleküller haline gelirler ve bu da verimin göreceli olarak düşmesine ve maliyetin artmasına sebep olur. Bunun engellenmesi için çapraz bağlamanın başka yöntemlerle beraber kullanılabilir (Taylor, 1991).

Destek materyalini aktive etmek için en yaygın kullanılan yöntem amid ya da birincil amin içeren taşıyıcının gluteraldehit ile işlem görmesidir. Gluteraldehit doğrudan destek materyaline eklenerek aldehit son grubuyla reaksiyon elde edilir.

Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu yönteminde diğer immobilizasyon yöntemlerinden farklı olarak taşıyıcıya gereksinim duyulmaz. Taşıyıcı gereksinimi olmaması işlemin maliyetini düşürmesinin yanı sıra enzim aktivitesinin taşıyıcı ile seyreldesini de önleyeceğinden yöntem önemli bir avantaj sağlar. Bu immobilizasyon yönteminde, çapraz bağlanma reaksiyonunun ılımlı koşullarda gerçekleşmemesi,

koşulların kolay kontrol edilememesi ve bu koşulların enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişikliklere sebep olarak önemli ölçüde aktivite kaybına yol açması yöntemin en büyük dezavantajıdır. Bununla birlikte reaksiyon sonucunda elde edilen enzim preparatı jelatinimsi bir yapıya sahiptir. Taşıyıcının jelatinimsi yapısı birçok uygulamada kullanım kısıtlamasını beraberinde getirmektedir. Hazırlanan taşıyıcı jelatinimsi yapıda olduğundan mekanik kararlılığı ve tekrar tekrar kullanılabilirliği oldukça düşüktür. Taşıyıcının mekanik kararlılığını artırabilmek için enzim jel matrisinde çapraz bağlanabilir veya çapraz bağlanmadan önce bir destek materyaline adsorpsiyonu gerçekleştirilebilir. Ancak bu durumda tekrar bir taşıyıcı gereksinimi doğacağından tercih edilmez (Cao & L. Van Langen, 2003; Sheldon & Pelt, 2013).

Tablo 1.6. Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonunun avantajları ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Bağlanma kuvveti yüksek	Aktivite geri kazanımı düşük
Enzim kaçıışı düşük	İlımlı olmayan koşullar
Taşıyıcı gereksinimi yok	Mekanik kararlılık düşük
Aktivite taşıyıcıyla seyrelmez	Tekrar kullanım zorluğu
	Jelatinimsi yapı

Çapraz bağlama ile immobilizasyon yöntemindeki dezavantajlar sebebiyle immobilize enzimler için çapraz bağlı enzim kristallerine (Cross-Linked Enzyme Crystals, CLEC) ve enzim agregatlarına (Cross-linked enzyme aggregates, CLEA) dayalı yeni yöntemler üzerine çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Zelinski & Waldman, 1997; Suleka, Fernandez, Kneza, Habulina, & Roger, 2011). Bu yöntemlerle taşıyıcısız makro boyutta partiküller hazırlanabilir. Taşıyıcı kullanıldığında enzimin taşıyıcıyla seyrelmesi sorunu böylece ortadan kalkmaktadır. Çünkü immobilize enzim sistemlerinde taşıyıcı enzimin katalitik olmayan büyük bir kısmını oluşturur ve yüksek konsantrasyonlarda enzim kullanımı ile bu sorun çözülemez. Taşıyıcı üzerinde oluşacak birden fazla tabaka substratın enzime ulaşımını engeller. Spesifik aktivite açısından en verimli durum enzim molekülünün taşıyıcı üzerine tek tabaka şeklinde adsorblanmasıdır. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak çapraz bağlanmış enzim kristalleri (CLEC) ve çapraz bağlanmış enzim agregatları (CLEA) yöntemleri ile taşıyıcıya gereksinim duyulmayan immobilizasyon yöntemlerine duyulan ilgi artmaktadır. Bu yaklaşımlarla katalizörde enzimin yüksek konsantrasyonda bulunması, yüksek stabilite ve taşıyıcı gereksinimi

olmadığı için düşük maliyetli bir işlem olması gibi avantajlar elde edilir (Sheldon & Pelt, 2013).

Çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC), oldukça yüksek aktiviteye sahip, dayanıklı ve tanecik boyutları kontrol edilebilen immobilize enzim preparatlarıdır. Bu enzim preparatları özellikle organik çözücüler içerisinde gerçekleşen enzimatik reaksiyonlarda diğer enzimlerden çok daha yüksek aktivitelere sahiptirler. Fakat bu enzim preparatlarının hazırlanması için çok yüksek saflıktaki serbest enzimlerin uygun şekilde kristallendirilmesi gerekir. Bu işlem hem çok yüksek maliyetli hem de oldukça zordur. Bazı enzimler için bu işlemin uygulanması imkansızdır (Roy & Abraham, 2004).

Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA), çapraz bağlı enzim kristallerinin gerektirdiği yüksek saflıkta enzim ve kristal formda enzim gibi kısıtlamaları ortadan kaldırmak için geliştirilen bir yöntemdir. İyonik olmayan polimerlerin ve suyla karışmayan organik çözücülerin protein moleküllerinin su molekülleri ile etkileşimleri bazı nötral tuzlar kullanılarak azaltılır ve kovalent olmayan etkileşimler ile bir araya gelerek agregatlar oluşturup çökmeleri sağlanır. Bu yöntemle oluşturulmuş protein agregatları bi-fonksiyonel reaktifler ile çapraz bağlanarak çapraz bağlı enzim agregatlarını oluşturur. Bu nötral tuzlar ve organik çözücüler yardımıyla yapılan agregatlaştırma işlemi protein saflaştırmasında da yaygın olarak kullanılan bir yöntem olduğu için çapraz bağlı enzim agregatları yöntemi için saflaştırma ve immobilizasyonun bir arada olduğu bir yöntem denilebilir. Bu yöntem immobilizasyon için ön saflaştırma işlemi gerektirmediğinden oldukça kullanışlıdır (Suleka, Fernandez, Kneza, Habulina, & Roger, 2011).

Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) yönteminde diğer immobilizasyon yöntemlerinde de meydana gelen aktivite kaybı ve kütle transferindeki zorluklar gibi dezavantajları vardır. Çapraz bağlayıcı ve enzimin aktif merkezi arasında doğrudan etkileşim olduğunda aktivite kaybı yüksek olur (Cabirol, ve diğerleri, 2008). Çapraz bağlayıcı değiştirilerek bu durumun etkileri azaltılabilir (Mateo, Palomo, Langen, & Rantwiik, 2003). Kütle transferlerinde karşılaşılan zorluklar ise çapraz bağlı enzim agregatlarının boyutlarından kaynaklanır. Tanecik boyutunun kontrol edilebilmesi için enzim ve glutraldehit konsantrasyonu parametreleri çok önemlidir. Bu parametrelerde yapılacak değişimlerle tanecik boyutunu kütle transferinde kısıtlama yaratmayacak

biçimde ayarlamak mümkündür. Tüm bunlar göz önüne alındığında bu yöntem endüstriyel açıdan da ilgi duyulan ve üzerine çalışılan bir yöntemdir.

1.4.2. Destek materyali seçimi

Taşıyıcıya bağlama ve tutuklama ile enzim immobilizasyonu yöntemlerinde destek materyaline ihtiyaç duyulur. Enzim immobilizasyonunda seçilen taşıyıcı ya da destek materyalinin seçimi önemlidir. Seçilen matris, enzimin bağlanabileceği fonksiyonel gruplar içeren bir yapı iskeletine sahip olmasının yanında gözenek boyutu, hidrofil/hidrofobik yapısı, yüzey kimyası gibi fiziksel ve kimyasal özellikleri ile immobilize edilen enzimin katalitik özelliklerini belirler. İdeal bir destek materyalinde aranan özellikler şu şekildedir:

- Basınca karşı fiziksel direnç
- Hidrofiliklik,
- Enzimlere karşı ilgisizlik (inert olma),
- Türevlendirme kolaylığı,
- Biyouyumluluk,
- Suda çözünmeme,
- Mikrobiyal saldırılara karşı dirençli olma,
- Düşük maliyet,
- Kolay bulunabilirlik (Trevan, 1980)

Taşıyıcı olarak kullanılan destek materyalleri kimyasal bileşimlerine göre organik ve inorganik olarak sınıflandırılırlar (Cabral & Kennedy, 1991). Organik destek materyali kendi içerisinde doğal ve sentetik olarak iki alt gruba ayrılırlar. İnorganik taşıyıcılar fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal bozunmalara karşı yüksek stabilite gösterme gibi birçok avantaja sahip olsalar da endüstriyel uygulamaların çoğunda organik destek materyalleri tercih edilmektedir (Vaghari, ve diğerleri, Application of Magnetic Nanoparticles in Smart Enzym Immobilization, 2016).

Tablo 1.7. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri

Organik
<i>Doğal polimerler</i>
• Polisakkaritler: selüloz, dekstran, nişasta, agar, agaroz, kitin, aljinat • Protein: kollajen, albümin • Karbon

Tablo 1.7. (Devam) *Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri*

<i>Sentetik polimerler</i>
• Polistren
• Diğer polimerler: poliakrilat, polimetakrilat, poliakrilamid, poliamid, vinil
İnorganik
<i>Doğal mineraller</i>
Bentonit, silika
<i>İşlenmiş materyaller</i>
Cam, metaller, metal oksitler

Matrislerin ortalama partikül çapı, şişme davranışı, mekanik dayanıklılığı, sıkıştırma davranışı gibi fiziksel özellikleri immobilize enzim sistemlerinin performansı ve kullanılacak reaktör tipinin belirlenmesi için büyük önem taşımaktadır. Özellikle destek materyalinin gözenek yapısı ve partikül boyutu taşıyıcının yüzey alanını belirlediğinden enzimlerin taşıyıcıya bağlanma kapasitelerine de doğrudan etkiler. Gözenekli yapıya sahip olmayan destek materyalleri çok az difüzyon sınırlaması gösterir fakat yüzey alanları gözenekli destekler kadar geniş olmadığından düşük yükleme kapasitesine sahiptirler. Bu yüzden enzim immobilizasyonu için genellikle gözenekli malzemeler tercih edilir. Yükleme kapasitesinin ve akış özelliklerinin optimize edilebilmesi için gözenekli malzemelerin kontrollü bir gözenek dağılımına sahip olması istenir. Destek materyallerinde enzimin aktivitesini belirleyen diğer önemli özellik ise hidrofilik karakterdir (Gemeiner, 1992).

Agaroz yaygın olarak kullanılan bir matristir. Enzim immobilizasyonu için yüksek yükleme kapasitesine yol açan gözenekli yapısının yanı sıra hidrofilik karakteri, türevlendirme kolaylığı, yüklü grupların olmaması (substrat ve ürünlerin spesifik olmayan adsorpsiyonu önlenir) ve kolay bulunabilir olması gibi avantajlara sahiptir. Ancak agaroz ve diğer gözenekli destek materyalleri yüksek maliyetli taşıyıcılardır. Bu nedenle matris rejenerasyonuna ve matrislerin yeniden kullanımına izin veren tersinir immobilizasyon yöntemleri kullanılabilir (Khan & Alzohairy, 2010).

Günümüzde, destek materyali olarak kullanımı yaygınlaşan nanomalzemeler de oldukça avantajlı taşıyıcılardır. Biyokatalizörlerin verimliliğini belirleyen temel faktörleri dengelemek için yüzey alanı, kütle transfer direnci ve enzim yüklemesi gibi ideal özellikler sunar (Kim, Grate, & Wang, 2008; Feng & Ji, 2011). Nanoteknoloji, biyoteknoloji ve biyomedikal alanlarda potansiyel uygulamalara yol açan enzim

immobilizasyonu için çeşitli alternatifler sağlamıştır (Ansari & Husain, 2012). Son zamanlarda uygulamalarda polimer mikroküreler, nanolifler, nanotüpler gibi desteklere immobilize edilen enzimlerle birlikte çeşitli metal ve manyetik nano/mikro boyutta taneciklere yapılan immobilizasyon çalışmaları rapor edilmiştir (Kim, Grate, & Wang, 2006; Yim, Kim, Karajanagi, Kane, & Dordick, 2003).

Demir (II,III) oksit, Fe_3O_4 , koyu siyah renkli suda çözünmeyen ve düşük reaktiviteye sahip bir mineraldir. Nano/mikro boyutlu parçacık formunda kolaylıkla hazırlanabilir. Bu taşıyıcılar direkt ya da uygun destek materyalini oluşturmak için çeşitli yüzey aktif malzemelerle kaplanarak kullanılabilirler. Demir minerallerinden farklı olarak kobalt ve nikel ferritleri de magnetik özellik, dayanıklılık, inertlik gibi özellikleri sebebiyle tercih edilen destek materyalleridir. Bu tarz destek materyallerinin sahip olduğu manyetik özellik sayesinde immobilize edilmiş enzim solüsyon ortamından dışarıdan uygulanacak bir manyetik kuvvet ile kolaylıkla uzaklaştırılabilir (Zucca & Sanjust, 2014).

2. MANYETİK NANOPARTİKÜLLER

Nanopartiküller 100 nm altında partikül boyutuna sahip olan parçacıklar olarak tanımlanmalarına rağmen literatürde birkaç yüz nanometre partikül boyutuna sahip olan parçacıklar da nanopartikül olarak adlandırılmaktadır (Huang & Juang, 2011). Nanopartiküllerin sentezi için manyetik özelliği olan kobalt (Co), nikel (Ni), demir (Fe) gibi metaller veya metal oksitler kullanılır. Bu malzemeler arasında $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) ve Fe_3O_4 (manyetit) formu yaygın olarak kullanılan demir oksit manyetik nanopartiküller, diğer manyetik malzemelere kıyasla biyouyumlu, düşük maliyetli ve kolay sentezlenebilir olması sebebiyle tercih edilirler (Konwarh, Karak, Rai, & Mukherjee, 2009).

Günümüzde manyetik nanopartiküllerin yüksek yüzey alanı/hacim oranı, yüksek özgülük, iyi kütle transfer özellikleri, biyouyumluluk, süperparamanyetik özellikler ve hızlı ayrılabilme gibi özellikleri sebebiyle proteinlerin ve enzimlerin immobilizasyonu ve saflaştırılması, biyoayırma prosesleri, ilaç taşınımı, ilaç salınımı, biyosensörler, kirlilik giderme gibi geniş uygulama alanları vardır (Fuentes, Viseras, Ubiali, Terreni, & Alcantara, 2001). Özellikle protein ve enzimlerin immobilizasyonunda manyetik nanopartiküller oldukça tercih edilen bir destek materyalidir. Manyetik nanopartiküller üzerine immobilize edilen enzimler reaksiyon sonrasında katalizörün ortamdan ayrılarak tekrar kullanılmasına olanak sağladığından ikinci bir saflaştırma işlemine gerek duyulmamaktadır. Bu sebeple diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında daha ekonomik, hızlı ve çevreci bir yöntemdir (Vaghari, ve diğerleri, 2016) .

Demir oksit manyetik nanopartiküller genellikle yüksek reaktiviteye sahip tanecikler olduğundan bir ortama doğrudan maruz bırakıldıklarında bozunabilirler. Ayrıca biyoygulamalarda kullanılan demir manyetik nanopartiküllerinin oksitlenmesi istenmeyen durumlardan biridir. Bu sebeple bu tarz uygulamalarda ve protein immobilizasyonlarda kullanılacak manyetik nanopartiküller için çeşitli modifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Manyetik nanopartiküller manyetik çekirdek, bu çekirdeği korumak için yüzey kaplayıcı ve fonksiyonel kaplama olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Manyetik nanopartiküller fonksiyonel kaplama kısmı için seçilen malzeme ile kolaylıkla işlevselleştirilebilir ve çeşitli enzim türlerinin bağlanması için kullanılabilir. Bununla birlikte kullanılan fonksiyonel kaplama malzemeleri ile manyetik nanopartiküllerin kolloidal kararlılık kazanması ve istenmeyen kümeleşmelerin

önlenmesi, partiküllerin daha kararlı hale gelmesi ve toksisitelerin azalması sağlanabilir. (Barnakov, Yu, & Rosenzweig, 2005).

2.1. Manyetik Nanopartikül Sentezleme Yöntemleri

Manyetik nanopartiküller fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlarla sentezlenebilir.

2.1.1. Fiziksel yöntemler

Fiziksel yöntemler ile manyetik nanopartikül sentezleme yöntemi “yukarıdan aşağıya” ve “aşağıdan yukarıya” olarak adlandırılan yaklaşımlardan oluşmaktadır. Yukarıdan aşağıya sentez yaklaşımında daha büyük boyuttaki malzemeler bilyeli öğütmeyle nano boyutlu parçacıklar haline getirilir. Bu yöntem ile istenilen boyutlarda nanopartiküllerin elde edilmesi zordur (DeCastro & B.S. M, 2002). Aşağıdan yukarıya sentez yaklaşımında ise yukarıdan aşağıya yönteminin aksine daha iyi dağılmış ve nano ölçekli parçacıklar elde edilebilir. Lazerle buharlaştırma, tel patlama ve soygaz yoğunlaştırma gibi yöntemlerle yapılabilir (Biehl, Lühe, Dutz, & Schacher, 2018)

2.1.1.1. Bilyeli öğütme yöntemi / Mekanik yöntem

Bilyeli öğütme yöntemi yukarıdan aşağıya bir yaklaşımdır. Bu yöntemde daha büyük boyutlu parçacıkların mekanik olarak daha küçük boyutta parçacıklara öğütülmesi işlemidir (Fecht, Hellstern, Fu, & Johnson, 1990; El-Eskandarany, 2001). Çalışma prensibi oldukça basittir. Hammadde olarak kullanılacak malzeme öğütme işlemi için birçok bilyenin bulunduğu içi silindirik bir ortama alınır ve bilyeler ile katı malzeme arasındaki devam eden çarpışmaların sonucunda katı malzemeye uygulanan kinetik enerji nano ya da mikro boyutta toz ile sonuçlanır. Bilye/toz oranı, bilyelerin boyutu, titreşim hızları, öğütme süresi gibi parametreler nano/mikro boyutlu taneciklerin oluşumunu etkiler. Bu işlemin en büyük dezavantajı kontaminasyona çok açık bir yöntem olmasıdır. Bununla birlikte kimyasal yöntemlere kıyasla tanecikler arasında daha geniş boyut dağılımı vardır (Mohamed & Mohamed, 2019).

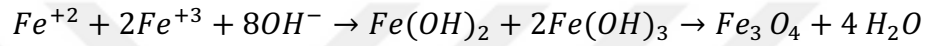
2.1.2. Kimyasal yöntemler

Kimyasal yöntemlerle nanopartikül sentezi aşağıdan yukarıya yaklaşımlardan oluşmaktadır.

2.1.2.1. İkili çöktürme yöntemi

İkili çöktürme yöntemi kontrol edilebilir büyüklük ve manyetik özelliklere sahip olan manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesi için yaygın olarak kullanılan

yöntemlerdendir (Kumar, 2013). Sentez sırasında kullanılan malzemelerin zararlı olmaması, uygulanmasının kolaylığı gibi sebeplerden dolayı biyomedikal uygulamalarda oldukça fazla kullanılır (Indira & Lakshmi, 2010). Bu sentez yöntemiyle büyük hacimlerde sentez yapmak mümkündür. Manyetik özelliklere sahip nanopartiküllerin üretimi için farklı metal iyonları kullanılır. Bu yöntemde manyetik nanopartiküller oda sıcaklığında veya yüksek sıcaklıklarda inert bir atmosferde bir baz ilave edilerek sulu metal tuzu çözeltilerinden hazırlanır (Faraji, Yamini, & Rezaee, Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications, 2010). Demir oksit manyetik nanopartiküllerin sentezi için gerçekleşen reaksiyon şu şekildedir (Indira & Lakshmi, 2010):



İkili çöktürme yönteminde pH, metal iyonları ve konsantrasyonları, kullanılan tuzun yapısı, reaksiyon sıcaklığı, iyonik kuvvet ve reaksiyon ortamı ve karıştırma hızı, bazik çözeltilerin eklenme hızı gibi parametreler manyetik nanopartiküllerin boyutu ve şeklini etkiler. pH ve iyonik kuvvet değiştirilerek sentezlenecek partiküllerin ortalama çapı kontrol edilebilir. pH ve iyonik kuvvet arttıkça partiküllerin çapı düşmektedir. Aynı zamanda bu parametreler partiküllerin yüzey kompozisyonlarını değiştirir böylece elektrostatik yüzey yükü de değiştirilmiş olur (Wu, He, & Jiang, 2008).

2.1.2.2. Termal ayrışma (termal bozunum) yöntemi

Termal bozunma ile monodispers nanopartikül sentezlemek için yüksek sıcaklık altında organometalik başlatıcılar kullanılır. Termal bozunma yöntemiyle sentezlenen manyetik nanopartiküller yüksek kristallığe sahip, boyutları kontrol edilebilen nanopartiküllerdir. Organometalik başlatıcıların bozunma süreci, manyetik nanopartiküllerin istenen boyut ve şekilde sentezlenebilmesi için organik yüzey aktif maddelerin varlığında gerçekleştirilir (Effenberger, ve diğerleri, 2017). Manyetik nanopartikül hazırlanması için kullanılan stabilize edici maddeler yağ asitleri, heksadesilamin ve oleik asittir. Termal bozunma işleminde kullanılan stabilize edici ajanlar, manyetik nanopartiküllerin büyümesini kontrol eden nanopartiküllerin çekirdeklenmesini yavaşlatır ve 30 nm'den daha küçük küresel şekil ve istenilen boyutun üretilmesini sağlayabilir. Reaksiyonun sıcaklık gereksinimi kullanılan organometalik başlatıcının tipine bağlıdır. Sıcaklık derecesi, reaksiyon süresi, yüzey aktif madde, çözücülerin türü gibi parametreler ile istenilen şekil ve boyutta nanopartikül

sentezlenebilir (Lu, Salabas, & Schüth, 2007; Patsula, ve diğerleri, 2016). Bu yöntem homojen, tek tip boyutta ve büyük ölçekli manyetik nanopartiküllerin sentezi için en iyi yöntemlerdendir (Kudr, ve diğerleri, 2017). Bu yöntemde toksik organik çözücülerin kullanımı sentezlenen partiküllerin biyomedikal alanlarda kullanılmasını sınırlar (Faraji, Yamini, & Rezaee, 2010).

2.1.2.3. Hidrotermal sentez yöntemi

Hidrotermal sentez (solvotermal sentez) yönteminde nanopartiküller otoklav gibi kapalı sistemler içerisinde yüksek basınç ve sıcaklık altında sulu bir çözelti içinde sentezlenir (Zhang, Zhang, Gao, & Zhang, 2016). Bu sentez yöntemi ile manyetik nanopartiküller sentezlenirken hidroliz ve oksidasyon reaksiyonları gerçekleşir (Reddy, Arias, Nicolas, & Couvreur, 2012). Bu yöntem ultra ince tozların üretimi ve farklı materyallerden kristal oluşturma başarılı bir yoludur (Faraji, Yamini, & Rezaee, 2010). Sentezlenecek nanopartiküllerin morfolojisi ve kristallliği çözücünün uygun şekilde karıştırılması, zaman, basınç miktarı ve sıcaklık gibi parametrelere bağlıdır. Hidrotermal sentez yönteminin yüksek kristallik ve istenen şekil ve boyutta nanopartikül sentezlenebilmesi gibi avantajları vardır (Zahid, ve diğerleri, 2019).

2.1.2.4. Mikroemülsiyon yöntemi

Mikroemülsiyon yönteminde birbirine karışmayan yağ ve su yüzey aktif madde ortamında kararlı izotropik olarak dağılması yöntemidir. Bu işlemde yağ yüzey aktif madde ile karıştırılır ve ortam sıcaklığında manyetik olarak karıştırılır. Bu yöntemde özel ekipmanlara, yüksek sıcaklığa ve basınca gerek duyulmaz. Sentez sonucunda elde edilen taneciklerin şekil, boyut, kristal yapısı gibi özellikleri sentez parametreleri değiştirilerek kontrol altına alınabilir (Agostiano, ve diğerleri, 2000). Nanopartiküllerin özellikleri sentez sırasında kullanılan yüzey aktif maddeye ve bu maddenin yapısına bağlı olarak değişir (Sanchez-Dominguez, Aubery, & Solans, 2012). Yüzey aktif madde, su ve yağ arasında oluşan ara yüzey gerilimini azaltarak şeffaf bir solüsyon oluşmasını sağlayan amfifilik bir moleküldür (Faraji, Yamini, & Rezaee, 2010).

Mikroemülsiyon yöntemi kullanılarak sentezlenen partiküllerin boyutları daha küçüktür ve doygunluk magnetizasyonunda daha yüksektir (Wu, He, & Jiang, 2008; Chin & Yaacob, 2007). Bu mikroemülsiyon sistemlerde organik faz ortamında, organik faz ve suyun oluşturduğu ara yüzey, yüzey aktif maddelerle kararlı hale getirilirken nano boyutlu su küreleri oluşur. Bu küreler yüzey aktif madde/su oranına göre değişir. Yüzey

aktif madde/su oranı 15'in altında olduğunda ters misel, üstünde olduğu durumlarda ise mikroemülsiyon sistemler oluşur. Oluşan nano boyutlu su küreleri moleküler bazda heterojen olmalarına rağmen termodinamik olarak kararlı yapıdadırlar. Nano boyutta taneciklerin sentezlenebilmesi için gerekli olan mikro reaktörler bu su küreleridir. Su kürelerinin büyüklüğü sentezlenen partiküllerin boyutunu etkileyen önemli parametrelerden biridir (Sato, 1995).

Mikroemülsiyon yöntemiyle sentezlenen nano boyutlu pariküllerin morfolojik özellikleri şu parametrelere bağlıdır:

- Malzemenin kristal, kompozit veya saf yapıda olması,
- Malzemenin derişimi,
- Yüzey aktif maddenin türü,
- Organik fazın türü,
- Su/organik faz molar oranı,
- İkinci organik fazın türü,
- Tepki süresi (Srikanth, Carpenter, Spinu, Wiggins, & O'Connor, 2001)

2.1.2.5. Sol-jel yöntemi

Sol-jel yöntemi nano boyutlu taneciklerin sentezi için kimyasal bir yöntemdir. Bu işlem, metal alkoksitlerin hidrolizini ve polikondenzasyon reaksiyonlarını içerir. Bu reaksiyonlar sonucunda oda sıcaklığında jel oluşur. Nanopartikül sentezi için kullanılan metal tuzları suda veya diğer çözücülerde çözülür ve kolloidal çözelti hazırlamak için homojen olarak dağılır. Bu işlemdeki tüm kimya, metal alkoksitlerin hidrolizi ve polikondenzasyon reaksiyonları ile oda sıcaklığında jel oluşumunu içerir. Metalik tuzlar suda veya diğer çözücülerde çözülür ve sol veya kolloidal çözelti hazırlamak için homojen olarak dağılır (Ansari, Ruffinatti, Stura, Argenziano, & Abollino, 2019). Parçacıklar arasında Van der Waals kuvvetleri meydana gelir ve aradaki etkileşim, karıştırma ve sıcaklık arttıkça artar. Elde edilen karışım çözücü çıkana kadar ısıtılır ardından çözelti kurutulur ve en sonunda jel oluşumu gerçekleşir (Hasany, Ahmed, Rajan, & Rehman, 2012; Mohamed & Mohamed, 2019). Bu yöntem istenilen yapıya sahip materyallerin deney parametreleri değiştirilerek elde edilebilmesi, partikül boyutunun kontrol edilebilmesi ve monodispers fazın elde edilebilmesi, reaksiyon ürünlerinin homojenliğinin kontrolünün kolay olması ve sol-jel matriks içinde kendi özelliklerini

koruyabilen moleküllerin yerleştirilebilmesi gibi avantajlara sahiptir. Öte yandan sistemin pahalılığı, iş gücü gerektirmesi ve veriminin az olması gibi dezavantajları vardır (Shaker, Zafarian, Chakra, & Rao, 2013).

2.1.3. Biyolojik yöntemlerle sentez

Biyolojik sentez yöntemiyle nanopartikül sentezlemek için bitkiler ve mantarlar, virüsler, bakteriler gibi canlı mikroorganizmalar kullanılır (Verma, Pathak, Srivastava, Praver, & Tomljenovic-Hanic, 2021). Sentezlenen partiküller biyoyumlu olduğundan biyomedikal alanlarda kullanıma uygundur. Verimli, çevre dostu ve temiz bir sentez yöntemidir. Ancak sentezlenen nanopartiküllerin dağılımı zayıftır (Komeili, 2012). Son zamanlarda bu yöntemle nanopartikül sentezine ilgi yoğunlaşmıştır ancak bitkilerin kullanılarak sentezlendiği nanopartiküllerin oluşum mekanizmaları iyi anlaşılamamıştır ve bu konu üzerine çalışmalar devam etmektedir (Komeili, 2012; Duan, Shapter, Qi, Yang, & Gao, 2018).

2.2. Farklı Sentez Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Manyetik nanopartiküllerin sentezlenebilmesi için birçok farklı teknik geliştirilmiştir. Bu yaklaşımları fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak üç gruba ayrılabilir. Manyetik nanopartiküllerin sentezi için kullanılan yöntemlerin detayları Tablo 2.1.'de özetlenmiştir. Ancak, fiziksel ve kimyasal nanopartikül sentezleme yöntemleri arasında karşılaştırma yapılırsa partiküllerin boyutunu ve şeklini kontrol etmek fiziksel yöntemlerle zordur (Cuenya, 2010). Kimyasal yöntemlerde boyut, şekil gibi özellikler reaksiyon parametreleri ile kontrol edilebilir (W.Wu, He, & Jiang, 2008).

Tablo 2.1. Manyetik nanopartikül sentezi için kullanılan yöntemlerin avantajları ve dezavantajları

	Sentez Yöntemi	Avantajlar	Dezavantajlar
Fiziksel Yöntemler	Bilyeli öğütme	Kolay, ucuz	Kontaminasyon riski
	Gaz fazı biriktirme	Kolay	Partikül boyutu kontrolü zor
Kimyasal Yöntemler	Sol-jel yöntemi	Partikül boyutu kontrolü	Zayıf bağlar Yüksek geçirgenlik
	İkili çöktürme	Kolay, etkili	Safsızlık
	Hidrotermal sentez	Partikül boyutu ve şekli kontrolü	Yüksek sıcaklık ve basınç
	Oksidasyon metot	Aynı boyut ve dar boyut dağılımlı partiküller	Küçük boyutta kolloidler
Mikrobiyal Yöntemler	Mikrobiyal inkübasyon	Ucuz, yüksek verim	Uzun zaman gerekli

Basit bir sentez yöntemi olması ve sahip olduğu diğer dezavantajlar göz önünde bulundurulduğunda manyetik nanopartikül sentezi için ikili çöktürme yöntemi yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin boyut ve morfolojik özelliklerinin kontrolü göz önüne alındığında termal ayrıştırma (bozunma) en iyi yöntem gibi görülmektedir. Alternatif olarak, mikro emülsiyonlar, çeşitli morfolojilerde ancak düşük verimli monodispers halde nanopartikülleri sentezlemek için kullanılabilir. Bununla birlikte mikro emülsiyon yöntemi için büyük miktarlarda çözücü gerekmektedir. Hidrotermal sentez, yüksek kaliteli manyetik nanopartiküllerin üretimi için daha az kullanılan bir yöntemdir. Manyetik nanopartiküllerin sentezi için kullanılan yöntemlerden ikili çöktürme ve termal ayrıştırma (bozunma) en çok kullanılan ve çalışılan yöntemlerdir ve bu yöntemler büyük ölçekte hazırlanabilirler.

Bunun yanı sıra biyolojik yöntemlerle manyetik nanopartiküllerin sentezi çevre dostu, düşük maliyetli, sürdürülebilir, tekrarlanabilir ve yüksek verimli olması sebebiyle tercih edilen bir yöntemdir. Bitki aracılı biyolojik sentez yöntemi gelişme aşamasındadır (Gul, Khan, Rehman, Khan, & Khan, 2019). Mikroorganizmalarla sentezlenen nanopartiküller monodispers değildir ve sentez süresi kimyasal ve fiziksel yöntemlere göre çok daha fazla zaman alır (Narayanan & Sakthivel, 2010). Tüm bunlar göz önüne alındığında, manyetik nanopartiküllerin sentezi için kullanılacak yöntemlerin seçimine ilişkin görüşler farklılık gösterir. Bu sebeple tek bir yöntemin optimal ve en iyi yöntem olarak tanımlanması doğru değildir. Her yöntemin kendi avantajları ve dezavantajları vardır ve yöntem seçimi nanopartiküllerin verimi, morfolojisi, boyutları, şekilleri, yöntemin maliyeti gibi faktörlere bağlıdır.

2.3. Demiroksit (Fe_3O_4) Manyetik Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonları

Manyetik nanopartiküllerin çok farklı uygulama alanları vardır. Çeşitli yapı ve kompozisyonlarda manyetik nanopartiküllerin sentezi için farklı birçok uygun sentez yöntemi geliştirilmiş olmasına rağmen, farklı disiplinlerde etkin şekilde kullanımlarına uygun olarak işlevselleştirilmeleri gerekebilir. Uygun şekilde yüzey modifikasyonu yapılan partiküllerde aglomerizasyon önlenabilir ve stabiliteleri artırılabilir. Yapılan çalışmalarda çoğunlukla yüzey aktif madde olarak polimerik, organik maddeler ve enzim kullanılmıştır.

Çıplak demir oksit manyetik nanopartiküller, asidik çözeltilerde genellikle kararsızdırlar ve yeniden kullanılabilirlikleri sınırlıdır. Yüzey alanı/hacim oranının büyük

olması da uygulamada parçacıkların zor toplanmasına ve dolayısıyla parçacıklar arasındaki güçlü manyetik çekimler sebebiyle yüzey enerjilerinde minimizasyon meydana getirerek sulu çözeltilerdeki dağılımının sınırlanmasına sebep olur. Enzimlerin bu tür ara yüzlere maruz kalması aktivitelerinin azalmasına veya kaybolmasına sebep olabilir.

Sentez işlemi sırasında veya sonrasında manyetik nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu ile bu tür sınırlamaların üstesinden gelinebilir. Yapılan bu yüzey modifikasyon işlemleri ile manyetik nanopartiküllerin biyouyumluluğu, dağılılabilme özellikleri ve biyobozunurluğu gibi yüzey özellikleri optimize edilir ve bunun yanında hidrofobik demir oksit nanopartiküllerin hidrofilik bir sistemde kullanılabilmesi için bir ortam sağlar. Partiküllerin yüzey modifikasyonu için oleik asit, laurik asit, alkilsülfonik asitler ve alkilfosfonik asitler gibi yüzey aktif maddeler yaygın olarak kullanılır (Sahoo, ve diğerleri, 2001).

Polietilen glikol (PEG), polivinilpirolidon (PVP), poli (etilen-ko-vinil asetat), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve polivinil alkol (PVA) gibi çeşitli polimerler de manyetik nanopartiküllerin kaplamasında kullanılabilir (Lee, ve diğerleri, 2006). Ayrıca jelatin, dekstran, polilaktik asitler, nişasta, albümin, lipozomlar, kitosan, etil selüloz gibi doğal malzemeler de kaplama amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu, ve diğerleri, 2007).

Fiziksel ve kimyasal özellikleri manyetik nanopartiküllerin uygulanabilirliği üzerinde belirleyicidir. Bu nedenle yüzey morfolojisi, kimyasal bileşim ve fonksiyonel grupların dağılımı gibi yüzey özelliklerinin bilinmesi için yüzey karakterizasyon teknikleri kullanılır. Yüzey karakterizasyonu için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), X-ışını kırınım analizi (XRD) ve termogravimetrik analiz (TGA) gibi temel teknikler kullanılır.

2.4. Demiroksit (Fe₃O₄) Manyetik Nanopartiküllerin Yüzey Aktivasyonu

2.4.1. Gluteraldehit aktivasyonu

Gluteraldehit, immobilizasyonda yaygın olarak kullanılan bir çapraz bağlama ajanıdır. Gluteraldehit, manyetik nanopartiküllerin fonksiyonelleştirilmesi için kaplama ajanları ile kullanılır. Kaplama malzemesinin üzerindeki amino grupları, gluteraldehitin

karboksil grubuyla reaksiyona girer ve böylece aktive edilmiş partiküllerin yüzeyi glutraldehitin karboksil grubuna sahiptir. Partikülle oluşacak bağlantı, glutraldehitin ve diğer birkaç fonksiyonel grupla iki işlevli bir reaktifin polimerizasyonu sebebiyle oluşur. Bu işlem birden fazla noktada gerçekleşen kovalent bağlamayı kolaylaştıran yüksek pH ve sıcaklıklarda son derece kararludur (Barbosa, ve diğerleri, 2014; Adriano, Mendonça, Rodrigues, Mammarella, & Giordano, 2005; Habeeb & Hiramoto, 1968).

2.4.2. Karbodiimid aktivasyonu

Karbodiimid aktivasyonu ile bağlanma basit ve yüksek verimli olduğundan son dönemlerde üzerine çalışmalar yapılan bir konudur (Chen & Liao, 2002). 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimid hidroklorür (EDC), suda çözünen bir çapraz bağlama ajanıdır. Bu bağlama maddesi karboksil gruplarını birincil aminlere bağlamak için kullanılır. Birincil aminlerle spontan reaksiyon için karboksil gruplarını aktive eden çapraz bağlayıcı, amin bağlarının oluşumunu kolaylaştırılır. Karbodiimidin çapraz bağlanması, suda çözünür olduğu için organik çözücüler eklenmeden de gerçekleştirilebilir. Bunun yanı sıra, fazla reaktif ve çapraz bağlanma yan ürünleri, reaksiyondan su ya da seyreltik asitlerle yıkandığında kolaylıkla uzaklaştırılabilir (Sheehan, Cruickshank, & Boshart, 1961).

2.5. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Manyetik nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini incelemek için farklı karakterizasyon teknikleri kullanılır. Nanopartiküllerin boyutlarındaki küçük bir değişiklik bile özelliklerini değiştirebilir. Manyetik nanopartikülleri karakterize etmek için zeta potansiyeli, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), X-ışını kırınım analizi (XRD) ve termogravimetrik analiz (TGA), titreşimli örnek magnetometresi (VSM) gibi analiz yöntemleri kullanılır.

Zetasizer, partiküllerin boyutu ve yüzey yükü gibi özelliklerinin karakterizasyonu için kullanılır. pH ve izoelektrik nokta partiküller için önemli bir parametredir. Zeta potansiyeli bir süspansiyondaki partiküller tarafından sergilenen fiziksel bir özelliktir. Bir partikül yüzeyindeki net yükün oluşturulması iyonların dağılımını etkiler. Zeta potansiyelinin büyüklüğü sistemin kararlılığını etkileyen bir değerdir. Partiküllerin zeta potansiyeli büyük bir negatif ya da pozitif bir değerse birbirlerini itmeye meyillidirler dolayısıyla partiküllerin bir araya gelme eğilimleri bulunmaz. Değer düştükçe

partiküllerin bir araya gelme olanağı artar. Topaklanmanın en yüksek değeri zeta potansiyeli 0 olduğunda görülür. Bir süspansiyon içinde negatif yüklü zeta potansiyeline sahip partikül olduğu durumda bu süspansiyona daha fazla alkali ilavesi olduğunda partiküller daha fazla negatif yükü yüklenirler. Ancak bu süspansiyona asit ilave edildiğinde belirli bir zaman sonra yükün nötralize olacağı bir noktaya ulaşır. Daha fazla asit ilavesi ile pozitif yük oluşur. Eğrinin 0 zeta potansiyelinden geçtiği nokta izoelektrik nokta olarak adlandırılır. Uygulamada bu değer önemlidir çünkü kolloidal sistemin en kararlı olduğu nokta izoelektrik noktasıdır. Kararlı ya da kararsız süspansiyonlar arasındaki ayırım genellikle +30 mV veya -30 mV olarak kabul edilir. Zeta potansiyeli +30 mV değerinden daha yüksek ya da -30 mV değerinden daha düşük olduğunda partiküllerin kararlı olduğu kabul edilir.

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM), partiküllerin çekirdek boyutunu, boyut dağılımını ve şeklini belirlemek için kullanılır. Yüksek çözünürlüklü TEM, kristal yapıları nanopartiküllerin yüzey atomik düzenlemelerini belirlenmesi için kullanılır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM), mikro ve nano boyutlu manyetik nanopartiküllerin morfolojisini ve boyutunu belirlemek için kullanılır. SEM, TEM'den daha düşük çözünürlüğe sahiptir (Profeta, ve diğerleri, 2005).

X-ışını difraksiyonu (XRD) kullanılarak sentezlenen partiküllerin kristal yapısı, malzemenin faz değişimi ve ortalama parçacık boyutu hesaplanabilir (Inouye, ve diğerleri, 1982). XRD'nin keskin tepe noktaları, Debye Scherrer denkleminde (Eşitlik 1) kullanılarak tanecik boyutu hesaplanır. Boyutlarının belirlenmesi zor olan ve kristal yapıda olmayan nanopartiküller için geniş tepeler elde edilir.

$$D_{nm} = k\lambda/\beta\cos\theta \quad (1)$$

Bu eşitlikte D ortalama tanecik boyutu, k kristal biçimine bağlı bir sabittir ve genelde 0,89 olarak alınır; λ X-ışını dalga boyu (1.54060Å), β FWHM (full width at half max) pikin yarısındaki maksimum genişlik ve θ Bragg açısıdır.

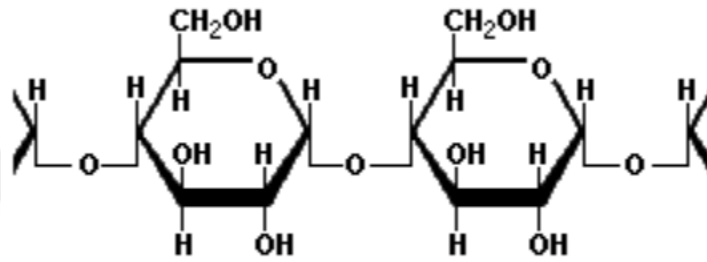
Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR), manyetik nanopartiküllerin yapısı ve bağlanma özelliklerini belirlemek için kullanılır. Özellikle işlevselleştirilmiş manyetik nanopartiküllerin her aşaması sırasında herhangi bir organik molekülün işlevsel grup varlığını belirlemek için bu teknik önemlidir. Bu analizle bileşiklerin bağlanması, uygun pik oluşumlarıyla kanıtlanabilir (Grass, Athanassiou, & Stark, 2007).

Termogravimetrik analiz (TGA) ile manyetik nanopartiküllerin yüzey aktif maddelerle kaplanmasından sonra yüzey kaplaması ve polimerler ile kaplama oluşup oluşmadığı ve bu bağlanmanın etkinliğini belirlemek için kullanılır. Bu analizde artan sıcaklıkla partiküllerin ağırlığının azalması, kaplamanın dış ve iç katmanlarının kütle kayıplarına bağlanır (Shen, Laibinis, & Hatton, 1999).

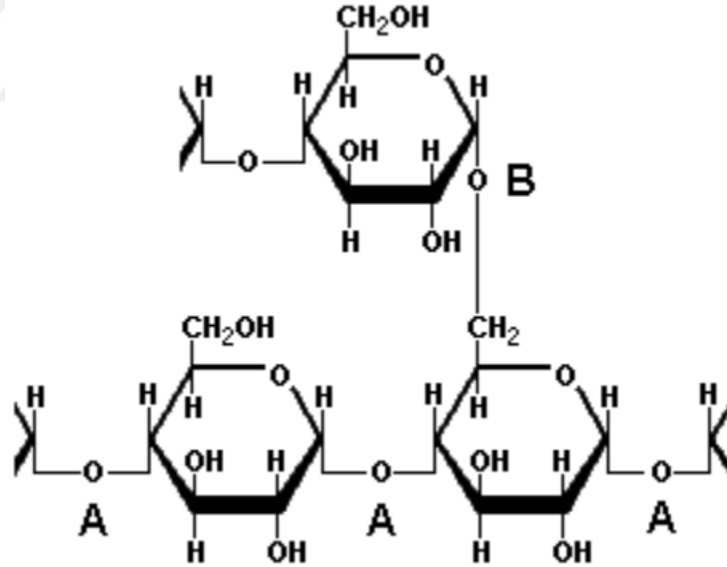
Titreşimli numune magnetometresi (VSM) tekniği ile manyetik nanopartiküllerin manyetizasyon özelliğini belirlemek için kullanılır. Bu teknikte oda sıcaklığında uygulanan bir dış manyetik alan altında sentezlenen manyetik nanopartiküllerin manyetik özellikleri belirlenir. Manyetik nanopartiküllerin boyutu nano ve mikro ölçekler arasında değişir, süperparamanyetik özellikler gösterir. Bu nanopartiküllere uygulanan manyetik alana karşı hassasiyet gösterip etkileşime girebilirler (Pathak, Jain, Kumar, Wang, & Pant, 2019). Manyetik alan uygulandığında manyetik nanopartiküllerin manyetizasyonları genellikle -3 ile 3 T arasında değerlendirilebilir. Ayrıca kabuğun manyetizasyona etkisinin etkin bir şekilde belirlenmesi için de kullanılır (Foner, 1959).

3. AMİLAZLAR

Amilazlar, hidrolazların mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bir sınıfıdır. Bitkilerdeki bir depolama polisakkariti olan nişastadaki O-glikosidik bağları spesifik olarak parçalayabilirler. Nişasta, lineer glikoz polimeri α -1,4 bağları içeren amiloz ve α -1,4 glikoz kalıntılarının lineer zincirlerinin α -1,6 bağlarıyla birbirine bağlandığı dallı bir polimer olan amilopektin olmak üzere iki bileşenden oluşur (Şekil 3.1-2.). Amilazlar tarafından gerçekleştirilen nişasta depolimerizasyonu birçok uygulamada kullanılır.



Şekil 3.1. Amiloz molekülünde tekrar eden glukoz birimleri



Şekil 3.2. Amilopektin molekülündeki dallanma bölgesi (A): α -1,4 glikozidik bağlantı, (B): α -1,6 glikozidik bağlantı

3.1. Amilaz Tipleri

Amilazlar, etki biçimlerine göre üç ana gruba ayrılabilir: endoamilazlar, ekzoamilazlar ve dallanmayı kesen enzimler.

3.1.1. Endo-amilazlar

Sıvılaştırıcı enzimler olarak da bilinen bu enzimler substratın iç bölgesinde bulunan bağları hidrolize eder. Endoamilazlar, nişasta içeriğindeki bileşenleri (amilo, amilopektin ve ilgili polisakkaritlerdeki α -1, 4 glikozidik bağları) parçalayan ve nişasta çözeltisinin viskozitesinin hızlı bir şekilde azalmasına ve ayrıca iyot boyama gücünün azalmasına neden olan α -amilazlar en iyi bilinen endo-amilazlardır (Jin, Leeuwen, & Patel, 1999).

3.1.2. Ekzo-amilazlar

Ekzo amilazlar kompleks bir karbonhidratın kendisini oluşturan basit monosakkaritlerine dönüştürülmesi işlemini yapan enzimler olarak bilinir. İndirgen olmayan uç kısımlarda itibaren enzimi parçalayan β -amilazlar, amiloglikozidaz/glikoamilaz ve α -glukosidazlar ekzoamilazlardır. β -amilazlar, α -1,4-glikozidik bağlarını hidrolize edebilir fakat α -1,6 dallanma noktalarını geçemez ve nişasta zincirini indirgen olmayan ucundan itibaren parçalar. Amiloglikozidaz/glikoamilaz, α -1,4 ve α -1,6 glikozidik bağları parçalar. α -glukosidazlar, özellikle amilo ve amilopektine etki eden diğer enzimler sayesinde meydana gelmiş kısa zincirli oligosakkaritler üzerindeki α -1,4bağlarını hidrolize eder. Endoamilazın etkisine kıyasla bu enzimleri nişastanın viskozitesinde ve iyot boyama gücünde yavaş bir azalma ile sonuçlanırlar.

3.1.3. Dallanmayı kesen enzimler

Nişasta bileşenlerindeki dallanma noktaları α - ve β -amilazların saldırılarına karşı direnç gösterirler. Pullulanaz spesifik olarak bu bağlantılara saldırır. Glukoamilaz da bu bağlantılara ve dallanmaya saldırabilir ancak reaksiyon pullulanaz etkisine kıyasla daha yavaş ilerler (Muralikrishna & Nirmala, 2005).

3.2. Alfa Amilaz

α -amilazlar (EC 3.2.1.1 endo-1,4- α -glukohidrolaz), lineer amilaz zincirinde bulunan bitişik glikoz birimleri arasında 1,4- α -D-glukosidik bağları rastgele parçalayan hücre dışı enzimlerdir. Substrat moleküllerinin iç kısmındaki bağlarını parçalayan endoenzimler sınıfına aittirler. α -amilazlar, moleküler ağırlığı 20-55 kDa olan küçük proteinlerdir. Tek bir polipeptit zincirine sahip aynı zamanda kalsiyum içeren enzimlerdir. α -amilazlar farklı kaynaklardan elde edilebilirler ve farklı kaynaklardan elde

edilmiş α -amilazın amino asit bileşimi birbirlerinden oldukça farklıdır, ancak katalitik işlevi aynıdır (Vander, Uitdehaag, Leemhuis, & Dijkhuizen, 2002).

3.2.1. Alfa amilaz kaynakları

3.2.1.1. Bitkisel kaynaklı alfa amilazlar

α -amilazlar buğday, çavdar, pirinç, mısır, yer fıstığı ve birçok bitkide bulunur ve bu bitkilerden izole edilebilir.

3.2.1.2. Hayvansal kaynaklı alfa amilazlar

Hayvanların pankreasında ve tükürük salgısında α -amilaz bulunur. Pankreatik amilazlar, pişmiş nişastayı ve pişmemiş nişastayı hidroliz eder ve dekstrin ve maltoza dönüştürür. Ağır metal iyonları tarafından hızla inaktive olurlar. Klorür iyonlarının varlığında, pH 7.0'de optimum aktivite gözlenir ve stabilite için kalsiyum klorür iyonları gerekir (Granger, Abadie, & Marchis-Mouren, 1975). Tükürük amilazı, pişirilmiş nişastayı dekstrin ve maltoza hidrolize edebilir (optimum pH 6.7 ve klorür iyonları tarafından aktive edilir).

3.2.1.3. Mikroorganizma kaynaklı alfa amilazlar

α -amilazlar hayvanlar ve bitkilerden izole edilmesine rağmen, kontrollü koşullarda ve kısa sürede ürün elde edilmesi sebebiyle asıl kaynağı mikroorganizmalar oluşturmaktadır (Lonsane & Ramesh, 1990). Mikroorganizmalar içerisinde de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus candidus* gibi bazı funguslar ve *Pseudomonas saccharophila* ve doğada yayılımı geniş olan *Bacillus* türleri ve alt türleri gelmektedir (Pandey, ve diğerleri, 2000).

Funguslardan izole edilen fungal α -amilazlar sıcaklığa bakteriyel kaynaklı α -amilazlardan daha az dirençli ve daha az stabildir. Bu nedenle çalışmalarda yoğunluklu olarak bakteriyel kaynaklı amilazlar özellikle de *Bacillus* amilazlar kullanılmaktadır (Wolfgang, 2007).

3.2.2. Alfa amilaz kullanım alanları

α -amilazlar, gıda, fermentasyon ve tekstilden kağıt endüstrisine kadar farklı bir çok endüstriyel uygulamalarla günümüz biyoteknolojisinde büyük önem taşımaktadır (Pandey, ve diğerleri, 2000). α -amilazlar, endüstriyel amilazların en popüler ve önemli formlarından biridir. α -amilazlar pahalı olmaması ve ticari olarak temin edilebilir olması,

buna ek olarak analizlerinin hızlı, basit ve ucuz olması sebebiyle oldukça ilgi çekicidir (Patcharin, Juming, & Barbara, 2003).

α -amilazlar, özellikle bakteri ve fungus kaynaklı olanlar olmak üzere önemli bir endüstriyel enzimdir. α -amilazlar için birçok uygulama mevcuttur:

- İlaç endüstrilerinde uygulama (Arica, Bayramoglu, & Yilmaz, 2004)
- Kağıt üretiminde, gıda ve fermantasyon endüstrisinde (Pandey, ve diğerleri, 2000)
- Fırıncılık ve tekstil endüstrisinde
- Deterjanlarda
- Nişastadan faydalı biyokimyasallar elde etmek için, nişasta sıvılaştırma, nişasta bozunması, oligosakkaritlerin üretimi için sentetik kimyada (Terashima & Katoh, 1996)
- Klinik kimya ve klinik tıpta akut pankreatit teşhisi serum veya idrar, α -amilazlar aktivitesinin belirlenmesi için biyoteknolojide uygulama (Panteghini, ve diğerleri, 2002)

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 4.1.'de listelenmiştir.

Tablo 4.1. *Kullanılan kimyasallar*

Kimyasal	Formül	Marka
Demir (II) klorür	$\text{FeCl}_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$	Carlo Erba
Demir(III)klorür heksahidrat	$\text{FeCl}_3 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$	AFG Bioscience
Sodyum hidroksit	NaOH	AFG Bioscience
Agar	$(\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_9)_n$	Sigma-Aldrich
Karboksimetilselüloz sodyum	NaCMC	Fischer Scientific
Pektin (Elma)		Sigma-Aldrich
Fungal Alfa Amilaz (EA20)		Tito
Nişasta	$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$	AFG Bioscience
Di-sodyum hidrojen fosfat (dodekahidrat)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12(\text{H}_2\text{O})$	Sigma-Aldrich
Sodyum di-hidrojen fosfat	NaH_2PO_4	Sigma-Aldrich
Sitrik Asit	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	AFG Bioscience
Orto-fosforik asit (%85)	H_3PO_4	Merck
Etanol (%95)	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G 250	$\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin		Biowest
Gluteraldehit (%25)	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$	Sigma-Aldrich
Potasyum iyodür	KI	Carlo Erba
İyot	I_2	Carlo Erba
Hidroklorik Asit ($\geq 37\%$)	HCl	Fluka
Potasyum bromür (FT-IR saflığında, $\geq 99\%$)	KBr	Sigma-Aldrich

4.2. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmaları sırasında kullanılan cihazlar ve modelleri Tablo 4.2.'de listelenmiştir.

Tablo 4.2. *Kullanılan cihazlar*

Cihaz	Marka/Model
Hassas Terazı	AXIS/ACN 220
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph/MR Hei-Standard
Santrifüj	Nuve/NF 200

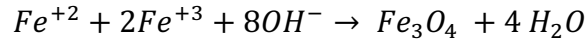
Tablo 4.2. (devam) Kullanılan cihazlar

Vakumlu Etüv	Binder/VD 23
pH Metre	Mettler Toledo/SG2
Ultra Saf Su Cihazı	Milli-Q®
Ultrasonik Su Banyosu	ÇalışkanLab/LAB.ULT.4045
Çalkalamalı Su Banyosu	Mikrotest/MCS-30
X- Işını Kırınımı (XRD)	Rigaku/MiniFlex 600
Fourier Dönüşüm Spektroskopisi (FTIR)	Shimadzu/IRTracer-100
SEM - Desktop	HITACHI/TM3030Plus
Termogravimetrik Analiz Cihazı (TGA)	Perkin Elmer /STA 6000
UV-Vis Spektroskopisi	Shimadzu/UV-2600
Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM)	Crygonic Limited PPMS

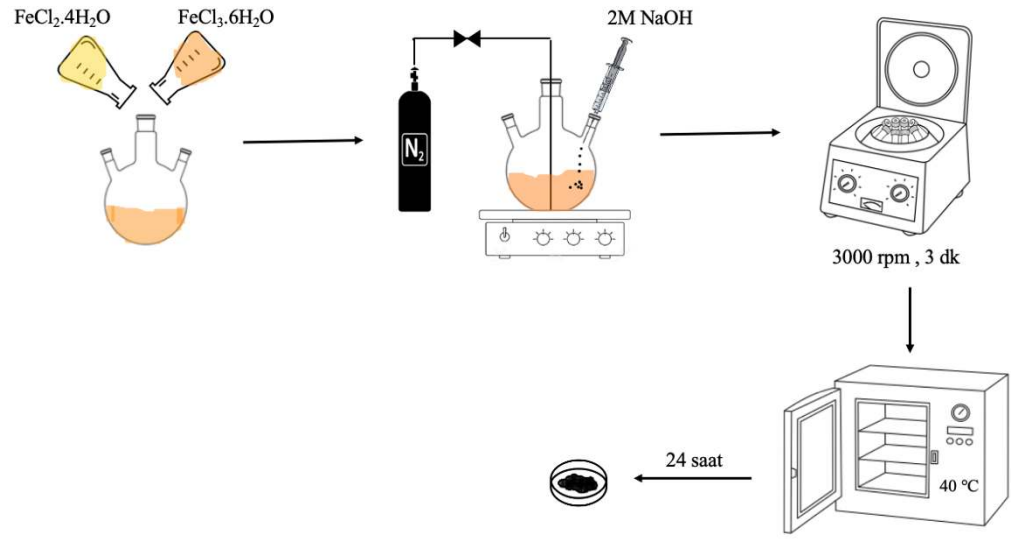
4.3. Manyetik Nanopartikül Sentezi

4.3.1. Çıplak manyetik nanopartiküllerin sentezi

Manyetik nanopartiküller literatürde örnekleri bulunan ikili çöktürme yönteminde bazı değişiklikler yapılarak sentezlendi. Manyetik nanopartiküllerin sentez reaksiyonu şu şekildedir (Diaz-Hernandez, ve diğerleri, 2018) :



0,25 M FeCl₂ . 4H₂O ve 0,5 M FeCl₃ . 6H₂O çözeltileri Milli-Q saf su cihazından elde edilen ultra saf suyla (15.0 MΩcm at 21.8 °C) hazırlandı. 2:1 molar oranda hazırlanan ferrik ve ferröz çözeltilerinde eşit hacimlerde alınarak karıştırıldı. Oluşturulan karışıma N₂ gazı altında, manyetik karıştırıcıda, oda sıcaklığında solüsyon tamamen siyah olana kadar 2 M NaOH çözeltisi damla damla eklendi. 30 dakika sonunda karıştırıcıdan alınan solüsyon 3000 rpm’de 3 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstte kalan süpernatant kısmının pH’ı nötr olana kadar partiküller saf suyla yıkandı. Ardından çökelti petrilere alınarak 40°C’de vakum altında etüvde kurutuldu (Şekil 4.1.). Petrilere kazınan partiküller sonraki kullanımlar için 4°C’de saklandı.



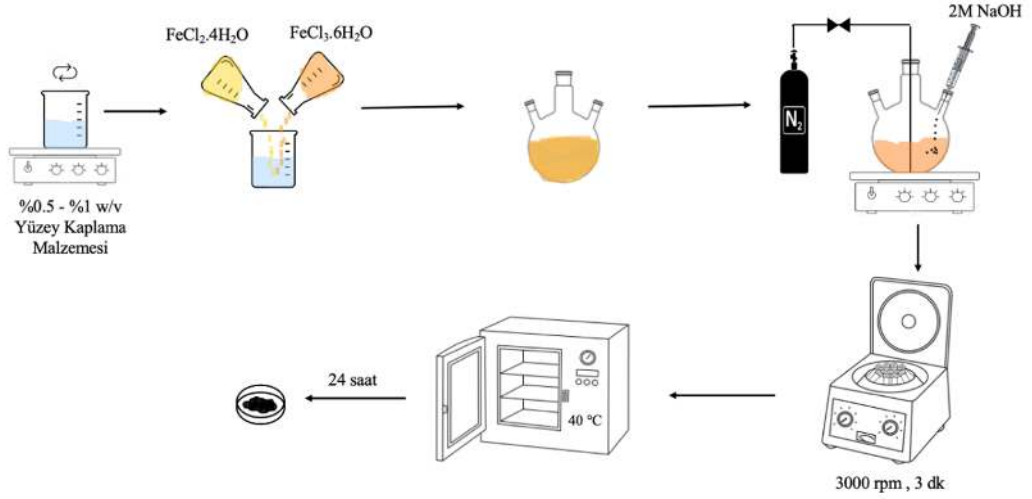
Şekil 4.1. Çıplak manyetik nanopartiküllerin sentez aşamaları



Şekil 4.2. Sentezlenen manyetik nanopartiküller saf su içerisinde (solda), kurutulup kazındıktan sonra (sağda)

4.3.2. Yüzey aktif madde ile kaplı manyetik nanopartiküllerin sentezi

Yüzey aktif madde ile kaplı manyetik nanopartiküllerin sentezinde izlenen genel akış Şekil 4.3'te şematize edilmiştir.

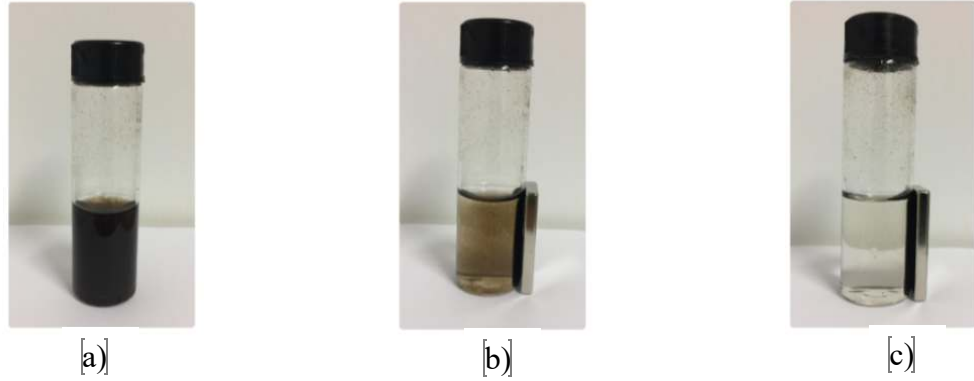


Şekil 4.3. Yüzey aktif madde ile kaplı manyetik nanopartiküllerin sentez aşamaları

4.3.2.1. Agar kaplı manyetik nanopartikül sentezi

Manyetik nanopartiküllerin sentezi ve yüzeylerinin agar ile kaplanması simultane olarak gerçekleştirildi. Önceki aşamalarda hazırlanan Fe^{+2} ve Fe^{+3} içeren çözeltilerden eşit hacimler alınarak 100 mL'lik solüsyonlar hazırlandı. Bu solüsyonlar, %0,5 (w/v) veya %1 (w/v) olarak hazırlanan agar çözeltilerine damla damla eklendi. Oluşan karışım manyetik karıştırıcıya alındı, oda sıcaklığında, N_2 gazı altında 2 M NaOH damla damla olacak şekilde eklendi. Solüsyon tamamen siyah olduğunda reaksiyon sonlandırıldı. Karıştırıcıdan alınan solüsyon 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Çözelti nötr pH'a gelene kadar saf suyla yıkandı. Ardından çökelti olan partiküller petrilere alınarak 40°C'de vakum altında etüvde kurutuldu. Elde edilen partiküller sonraki kullanımlar için buzdolabında 4°C'de saklandı.

Sentezlenen partiküllerin sıvı ortamda dışarıdan uygulanan manyetik bir kuvvete verdiği tepki incelendi.



Şekil 4.4. Sentezlenen %0,5 w/v agar kaplı manyetik nanopartiküllerin uygulanan manyetik kuvvet karşısında gösterdikleri manyetik özellik (a) 0 s, (b) 15 s, (c) 71 s

4.3.2.2. Pektin kaplı Manyetik nanopartiküllerin sentezi

Her birinden 500 mL olacak şekilde %0,5 (w/v) ve %1 (w/v) pektin solüsyonları saf suyla hazırlandı. Karışımlar 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda, oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan 0,5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 0,25 M $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltilerden eşit hacimler alınarak 100 mL'lik solüsyonlar hazırlandı. Pektin solüsyonlarına hazırlanan demir solüsyonu damla damla eklendi. Solüsyonun tamamı eklendikten sonra karışım manyetik karıştırıcıya alındı ve oda sıcaklığında N_2 gazı altında damla damla 2 M NaOH eklemesi yapıldı. Solüsyonun rengi tamamen siyaha döndüğünde reaksiyon durduruldu. Karışım 3000 rpm'de 3 dakika süreyle santrifüjlendi, çözeltiler üzerindeki çözeltiler pH'ı nötr olana kadar partiküller saf suyla yıkandı. Çökeltiler petrilere koyularak kuruması için 40°C 'de vakumlu etüvde bekletildi. Tamamen kuruyan partiküller daha sonra kullanılmak üzere 4°C 'de saklandı.

Sentezlenen partiküllerin sıvı ortamda dışarıdan etki eden bir manyetik kuvvete verdiği cevap gözlemlendi.

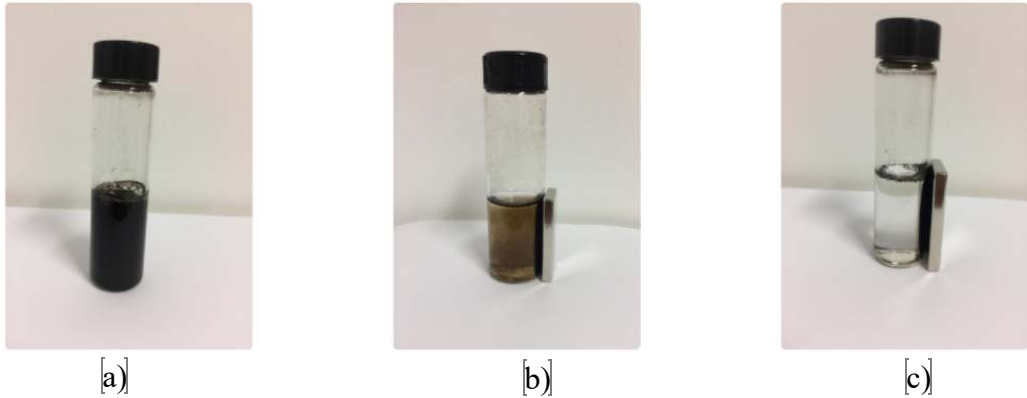


Şekil 4.5. Sentezlenen %0,5 w/v pektin kaplı manyetik nanopartiküllerin uygulanan manyetik kuvvet karşısında gösterdikleri manyetik özellik (a) 0 s, (b) 30 s, (c) 165 s

4.3.2.3. Karboksimetil selüloz sodyum kaplı manyetik nanopartikül sentezi

500 mL %0,5 (w/v) ve 500 mL %1 (w/v) NaCMC çözeltileri 24 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda bekletilerek hazırlandı. 1:2 molar oranda karıştırılan Fe^{+2} ve Fe^{+3} çözeltisi damla damla NaCMC solüsyonlarına eklendi. Oluşan karışım manyetik karıştırıcıya alınarak, oda sıcaklığında, N_2 gazı altında, 2M NaOH damlatılarak eklendi. Solüsyon tamamen siyaha döndüğünde reaksiyon sonlandırıldı. Karışım 3000 rpm'de 3 dakika sürelerle santrifüj edilerek, süpernatant nötr pH olana kadar, partiküller saf suyla yıkandı. Çökelti kısmı petrilere toplanarak vakum altında 40°C'de etüvde kurutuldu. Tamamen kuruyan partiküller petrilere toplanarak 4°C'de depolandı.

Sentezlenen partiküllerin sıvı içerisinde dışarıdan uygulanan bir manyetik kuvvet karşısındaki davranışları incelendi.



Şekil 4.6. Sentezlenen %0,5 w/v CMC kaplı manyetik nanopartiküllerin uygulanan manyetik kuvvet karşısında gösterdikleri manyetik özellik (a) 0 s, (b) 20 s, (c) 105 s

4.3.3. Glutaraldehit ile manyetik nanopartiküllerin fonksiyonelleştirilmesi (Glutaraldehit Aktivasyonu)

İmmobilizasyonda kaplama malzemeleri ile çapraz bağlayıcı ajan olarak glutaraldehit kullanıldı. Sentezlenen partiküllerin glutaraldehit aktivasyonu için 0,05 M pH 8 fosfat tampon çözeltisi ile hazırlanan %0,5, %1, %3 ve %5 (v/v)'lik glutaraldehit solüsyonları kullanıldı. Partiküller glutaraldehit solüsyonları içerisinde oda sıcaklığında ultrasonik su banyosunda, 1 saat boyunca bekletildi, ardından pH 8 tampon çözeltisiyle üçer kez yıkandı ve 40°C'de etüvde kurutuldu.

4.4. Sentezlenen Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen partiküller Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), X-ışını kırınımı (XRD), Termogravimetrik analiz (TGA), titreşimli örnek magnetometresi (VSM), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) gibi yöntemlerle karakterize edildi.

4.4.1. FT-IR

Sentezlenen partiküllerin yapısındaki fonksiyonel grupların belirlenmesi ve yüzeylerinin kaplandığının ispatlanması için FTIR spektroskopisi kullanıldı. Manyetik partikül numuneleri sabit tartıma gelene kadar 2 gün boyunca 40°C’de vakum altında kurutuldu. Ardından her numune 0,1 gram %99 saflıkta KBr tozunda kütlece %1 oranda olacak şekilde KBr ile karıştırılıp pellet haline getirildi. Partiküllerin spektrumları Shimadzu, IR-Tracer 100 cihazıyla 350-4700 cm^{-1} aralığında kaydedildi (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. FTIR analizleri için kullanılan Shimadzu, IR-Tracer 100 cihazı

4.4.2. XRD

Sentezlenen partiküllerin kristal yapısı 40 kV voltaj, Cu K α radyasyon kaynağı ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) ile çalışan Rigaku marka MiniFlex 600 model difraktometre kullanılarak incelendi. Numunelerin analizi 10-80° (2 θ) aralığında 0.02° s⁻¹ tarama hızında gerçekleştirildi. Elde edilen verilerden yola çıkılarak Debye Scherrer eşitliği ile partiküllerin tanecik boyutları hesaplanmıştır (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. XRD analizleri için kullanılan Rigaku, MiniFlex 600

4.4.3. TGA

Partiküllerin termal bozunumları $10^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızı ile, 20°C - 600°C sıcaklık aralığında, azot gazı akışında Perkin Elmer/STA6000 cihazı kullanılarak incelendi (Şekil 4.9). 6 – 8 mg aralığında alınan çıplak ve kaplanmış manyetik nanopartiküllerin elde edilen termogramları doğrultusunda her bir numunenin sahip olduğu polimer yüzdesi hesaplandı.



Şekil 4.9. TGA analizleri için kullanılan STA6000

4.4.4. VSM

Sentezlenen partiküllerin manyetik histerezis ölçümleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı tarafından oda sıcaklığında, Cryogenic Limited PPMS cihazıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. VSM analizleri için kullanılan Cryogenic Limited PPMS (Elektrik, Manyetik ve Optik Özellikler Ölçüm Laboratuvarı (EMOL), 2021)

4.4.5. SEM

Sentezlenen partiküllerin yüzey morfolojisi “Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama Merkezi” (AÜBİBAM) tarafından HITACHI TM3030Plus Masaüstü Tip Taramalı Elektron Mikroskobu cihazıyla 15 kV işlem koşulunda 5k ve 10k büyütme oranları ile incelenmiştir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. SEM analizleri için kullanılan HITACHI TM3030Plus Masaüstü Tip Taramalı Elektron Mikroskobu (HITACHI Hightech: Technical Explanation, 2021)

4.5. Sentezlenen Partiküller Üzerine Enzim İmmobilizasyonu

Sentezlenen çıplak ve %0,5 (w/v), %1 (w/v) agar kaplı manyetik nanopartiküller üzerine alfa amilaz enziminin fiziksel (adsorpsiyon) ve kimyasal (kovalent bağlama) immobilizasyonu çalışıldı.

Adsorpsiyon ile immobilizasyon işlemleri sırasında aşağıdaki parametrelerin bağlanan protein, enzim aktivitesi ve spesifik aktiviteye etkisi incelendi:

- Yüzey kaplama malzemesinin varlığı ve konsantrasyonu (%0,5 ve %1 w/v agar),
- Sonikasyon etkisi,
- İmmobilizasyon pH'ı (3 – 4 – 5 – 6 – 7),
- İmmobilizasyon süresi (0,5 – 1 – 2 – 4 – 8 – 16 saat)

Kovalent bağlama ile immobilizasyon, partiküllerin glutaraldehit aktivasyonu akabinde gerçekleştirildi. İmmobilizasyon süreçlerinde:

- Yüzey kaplama malzemesinin varlığı ve konsantrasyonu (%0,5 ve %1 w/v agar),
- Glutaraldehit konsantrasyonu (%0,5, %1, %3, %5 v/v),
- İmmobilizasyon pH'ı (pH 4-5-6-7-8)

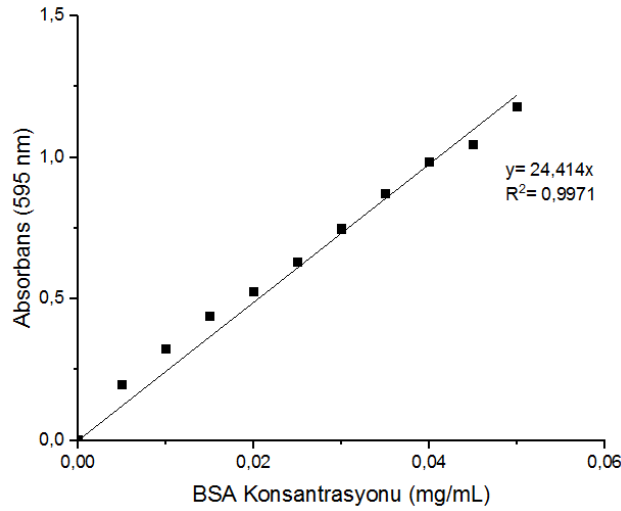
parametrelerinin bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi incelenmiştir.

Manyetik nanopartiküller üzerine alfa amilaz enziminin adsorpsiyon ile immobilizasyonu için 0,01 g partikül, 1 mL 10 mg/mL alfa amilaz enzimi solüsyonuna eklendi. Alfa amilaz enzim solüsyonu incelenecek parametreye bağlı olarak farklı pHlarda (pH 3-4-5-6-7-8) hazırlandı. Bekleme süreleri sonunda partiküller mıknatıs yardımıyla toplanarak uygun pH değerindeki tampon çözeltisiyle iki kez yıkanarak immobilize olmayan enzimler partiküllerden uzaklaştırıldı.

4.5.1. İmmobilize edilen protein miktarının belirlenmesi

Çıplak ve farklı konsantrasyonlarda agar ile kaplı manyetik nanopartiküllerin üzerine ne kadar enzim bağlandığını tespit edebilmek için immobilizasyon süresi sonunda partiküller mıknatıs yardımıyla toplandıktan sonra geriye kalan yıkama solüsyonları içindeki protein miktarları belirlendi. Proteinlerin kantitatif olarak tayin edilebilmesi için Bradford metodu (Bradford, 1976) kullanıldı. Bu metot için fosforik asit ortamında

Bradford ayıracı hazırlandı (EK-1). Çözelti içinde protein olmadığında kıvılc kahve bir renge sahip olan bu ayıraç, protein miktarına bağı olarak mavi renk verir. Çözeltinin 595 nm’de okunan absorbans değerleri ile çözelti içerisindeki protein miktarı hesaplanır. Hesaplamalarda kullanmak üzere farklı pH’lar için, Bovine Serum Albümin (BSA) model protein olarak kullanılarak, standart eğriler hazırlanmıştır. pH 8 için hazırlanan standart protein eğrisi Şekil 4.12. gösterilmiştir.



Şekil 4.12. pH 8 tampon çözeltisi için BSA ile hazırlanan Bradford standart eğrisi

Partiküller üzerine immobilize edilen enzim miktarı Eşitlik 2 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Immobilize edilen enzim miktarı} = (C_0 V_0 - C_s V_s - C_1 V_1 - C_2 V_2) \quad (2)$$

Bu eşitlikte

C_0 : başlangıçta, orijinal solüsyonun protein derişimini (mg/mL),

C_s : partiküller uzaklaştırıldıktan sonra solüsyonda kalan protein çözeltisinin konsantrasyonunu (mg/mL),

C_1 ve C_2 : sırasıyla, 1. ve 2. yıkama çözeltilerindeki protein derişimini (mg/mL),

V_0 : orijinal enzim çözeltisinin hacmi (mL),

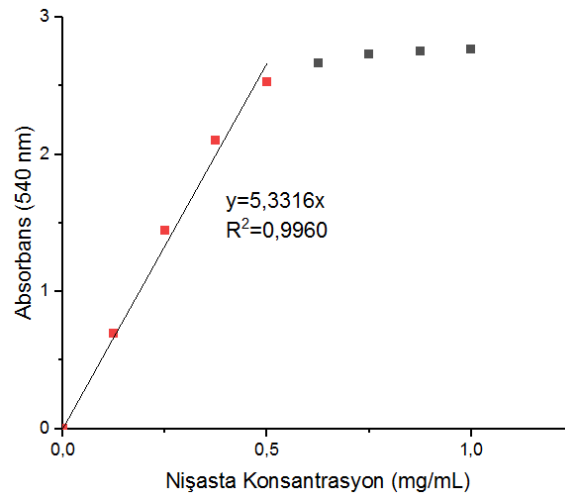
V_1 ve V_2 : sırasıyla, 1. ve 2. yıkama solüsyonlarının hacmini (mL) göstermektedir.

4.5.2. Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize alfa amilaz enziminin aktivitesi çözünür nişastanın substrat olarak kullanıldığı nişasta-iyodin metoduyla tayin edildi (Manonmani & Kunhi, 1999).

Yöntemde kullanılmak üzere iyodin (5 mM I₂- 50 mM KI) çözeltisi ve 1 M HCl çözeltisi hazırlandı. Bu yöntemde nişasta iyot ile koyu mavi renkte bir kompleks oluşturur ve aşamalı olarak hidrolizi ile kırmızı kahverengi ve ardından sarı renkli çözeltiler oluşur. Oluşan çözeltilerin 580 nm’de okunan absorbans değerleri ile enzim aktivitesi tayin edilir.

Serbest enzimin spesifikasyonları dikkate alınarak enzimin en aktif olduğu 55°C sıcaklıkta çalışıldı. Substrat olarak kullanılan nişastanın hidroliziyle çözeltide azalan derişiminin takibi için öncelikle pH 4,50’deki sitrat tampon çözeltisi kullanılarak farklı nişasta konsantrasyonlarıyla standart eğri hazırlandı (Şekil 4.13). Bu eğriden yola çıkılarak eğrinin henüz platolaşmadığı ve lineer bir trend izlediği 0- 0,5 mg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı (Şekil 4.13.). Farklı enzim/substrat oranları, enzim konsantrasyonları, substrat konsantrasyonları ve pH’lar denendi ve optimum çalışma koşulları belirlenerek diğer aşamalarda aktivite çalışmaları için bu koşullar kullanıldı.



Şekil 4.13. *Nişasta standart eğrisi (pH 4.50)*

Nişasta-iyodin yöntemi ile alfa amilazın aktivitesinin belirlenmesi için tüplere, reaksiyonu durdurması için, 100 µL 1M HCl çözeltisi koyuldu. Çalkalamalı su banyosunda 55°C’de kısa bir süre ısıtılan nişasta çözeltisine 0,01 g enzim immobilize edilmiş manyetik nanopartiküller veya 0,1 mL serbest enzim solüsyonları eklendi. Belirli zaman aralıklarında alınan 400 µL enzim-substrat karışımından örnekler önceden hazırlanan 100 µL 1M HCl içeren çözeltisi koyulmuş tüplere eklendi. Tüpler üzerine 500 µL iyodin çözeltisi eklendikten sonra vorteks ile karıştırıldı. Elde edilen örnek solüsyonlarda koyu kahverengiden sarıya doğru renk değişimi gözlemlendi (Şekil 4.14.).

UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak 580 nm’de solüsyonların absorbans değerleri okundu.



Şekil 4.14. Alfa amilaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan nişasta-iyodin yönteminde, zamanla nişasta konsantrasyon düşüşünün gözlemlenmesi

Bir birim aktivite (U), 1 dakikada hidroliz edilen 1 mg nişasta olarak tanımlandı.

Serbest enzim aktivitesi hesaplanmasında Eşitlik 3 den yararlanıldı.

$$\text{Aktivite (U/mL)} = (\text{Abs (580 nm) / Zaman (dk)}) / \text{Nişasta standart eğrisinin eğimi (Abs / (mg nişasta/mL))} \times \text{seyreltme oranı} \quad (3)$$

İmmobilize edilmiş alfa amilazın aktivite hesabı için ise Eşitlik 4 kullanıldı.

$$\text{Aktivite (U/g destek maddesi)} = ((\text{Abs (580 nm) / Zaman (dk)}) \times V_t \text{ (mL)} / \text{Nişasta standart eğrisinin eğimi (Abs / (mg nişasta/mL))}) / m \text{ (g)} \quad (4)$$

V_t : t zamanda reaksiyon solüsyonunun hacmi (mL)

m : immobilize enzim içeren destek madde kütlesi (g)

Spesifik aktivite hesaplanmasında, serbest enzim için Eşitlik 5, immobilize enzim için Eşitlik 6 kullanıldı.

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg)} = \text{Aktivite (U/mL)} / [P] \text{ (mg/mL)} \quad (5)$$

[P]: serbest enzim içeren solüsyonun protein derişimi (mg/mL)

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg)} = \text{Aktivite (U/g destek maddesi)} \times \text{MP (g destek maddesi / bağlanan protein (mg))} \quad (6)$$

MP: kullanılan immobilize enzim içeren manyetik partikül miktarı (g)

4.5.3. İmmobilize ve serbest enzimin termal stabilitesi

İmmobilize ve serbest enzimlerin termal stabilitelerinin belirlenmesi amacıyla serbest ve immobilize enzimler 45 – 50 – 55 – 60 °C’de çalkalamalı su banyosunda 5 dakika bekletilmiş ve ardından enzim aktivitesi tayinleri yapılmıştır.

4.5.4. İmmobilize ve serbest enzimin pH stabilitesi

İmmobilize ve serbest enzimlerin değişen pH’larda aktivitesinde meydana gelen değişimleri incelemek için 55°C’de çalkalamalı su banyosunda pH 4 – 5 – 6 – 7’de hazırlanan 0,5 mg/mL nişasta çözeltileriyle enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı.

4.5.5. İmmobilize enzimin işlemsel stabilitesi (tekrar kullanılabilirliği)

Seçilen optimum koşullarda immobilize edilen alfa amilaz enziminin en iyi aktivite koşullarında tekrarlı kullanılabilirliği incelendi. Nişasta hidrolizi için kullanılan immobilize enzimler, manyetik partiküllerin mıknatıs ile reaksiyon ortamından uzaklaştırılıp, tampon çözeltisiyle yıkandıktan sonra, tekrar substrat çözeltisine konuldu ve aktivite ölçümü yapıldı. Arka arkaya en az 5 kez tekrarlanan kullanım sonucunda, bağlı enzim aktivitesi Eşitlik 7 ile hesaplandı.

$$\% \text{ Bağıl aktivite} = (\text{Tekrarlı kullanım aktivitesi} / \text{İlk kullanım aktivitesi}) \times 100 \quad (7)$$

4.5.6. İmmobilize ve serbest enzimin saklama stabilitesi

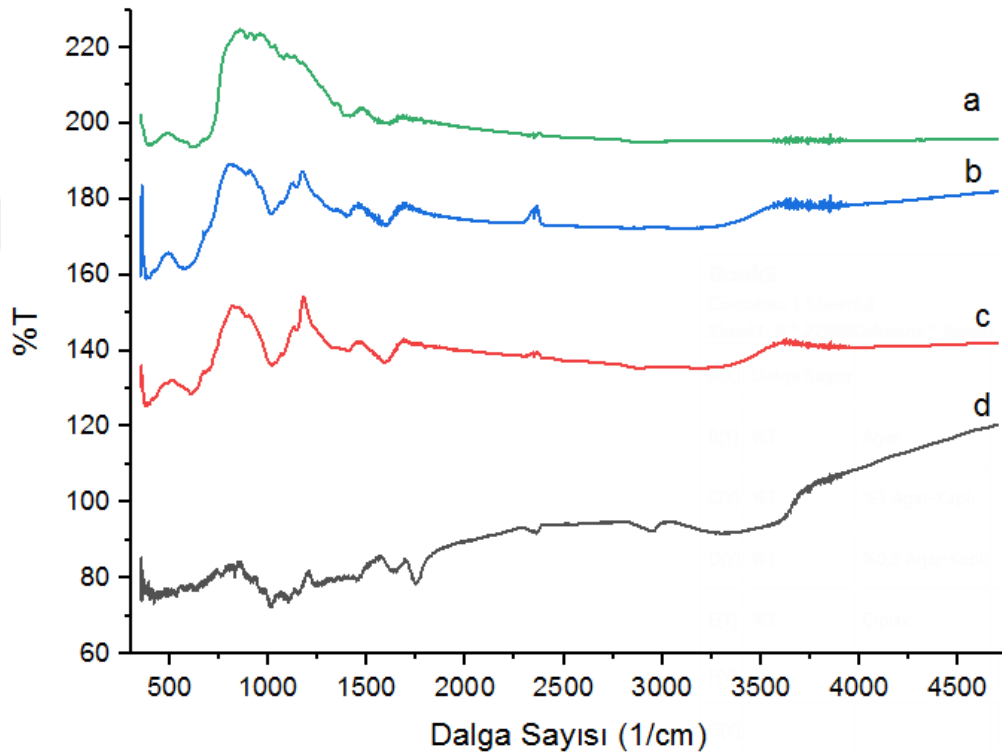
İmmobilize ve serbest enzimin saklama stabilitelerini belirlemek için kuru manyetik parçacıklar ve 10 mg/mL derişimindeki serbest enzim solüsyonu 4°C’de belli bir süre bekletildikten sonra, örneklerin aktivite tayinleri yapıldı.

5. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Sentezlenen Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

5.1.1. FT-IR

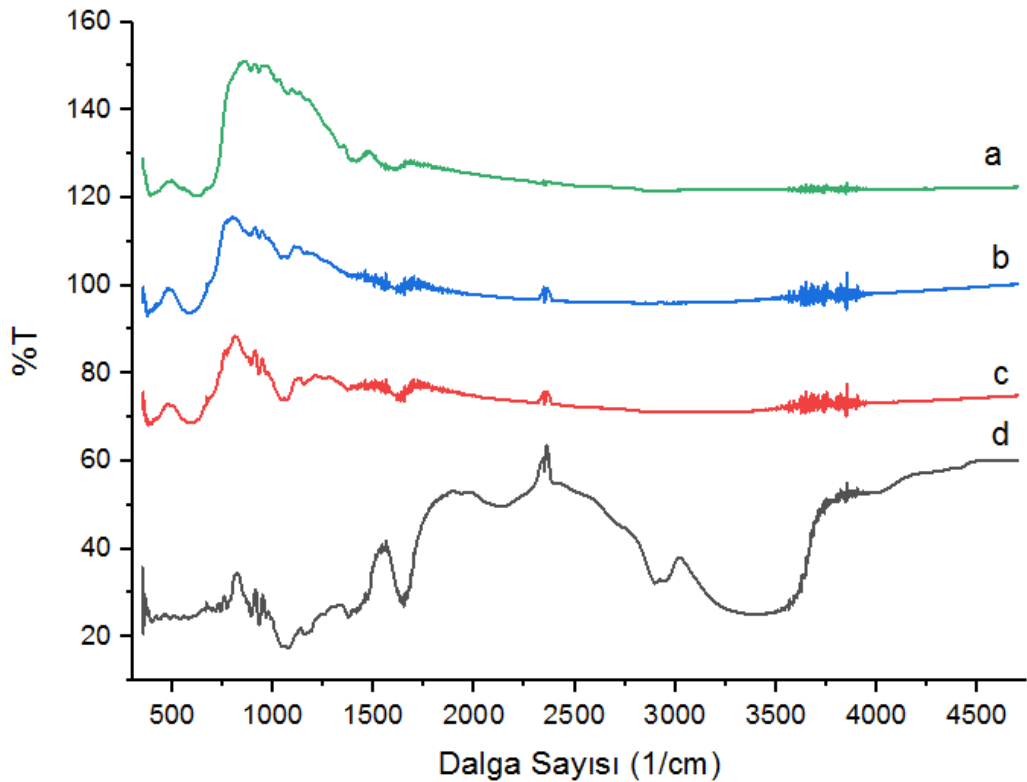
Sentezlenen çıplak ve kaplı manyetik nanopartiküllerin FTIR analizi ile partiküllerin kimyasal yapısı ve fonksiyonel gruplar incelenmiş ve yüzey kaplamaları doğrulanmıştır.



Şekil 5.1. Çıplak ve pektin kaplı manyetik partiküllerin FTIR spektrumları (a) çıplak, (b) %0,5 (w/v) pektin ile hazırlanmış, (c) %1 (w/v) pektin ile hazırlanmış manyetik partiküller ve (d) pektin

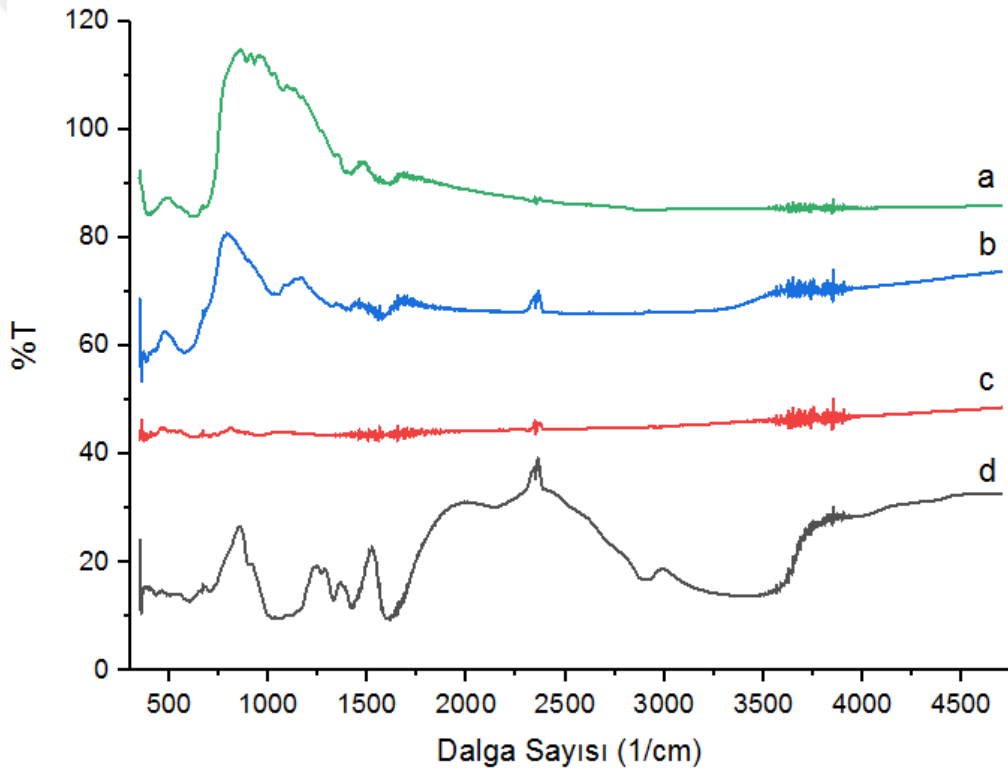
Pektine ait FTIR spektrumu (Şekil 5.2.d) 3444, 2928, 1711 cm^{-1} 'de karakteristik pikler göstermiştir. Bu pikler sırasıyla ikincil hidroksil gruplara, karboksilik hidroksil gruplara ve ester gruplarının karbonil gerilmesinden meydana gelen titreşimlere karşılık gelmektedir. 1203 cm^{-1} de görülen pik C – O ve -O- bükülüm titreşimlerinden kaynaklanmış olabilir (Gong, ve diğerleri, 2012). Ayrıca 1020 cm^{-1} de, iki galakturonik asiti birbirine bağlayan glikozid bağının titreşiminden kaynaklanır ve pektin kaplı manyetik nanopartikül numunelerinde bu pikin şiddeti azalır (Namanga, Foba, Ndinteh, Yufanyi, & Krause, 2013). Şekil 5.1.'de sırasıyla çıplak, %0,5 w/v pektin kaplı, %1 w/v pektin kaplı manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumlarını göstermektedir. Çıplak ve

pektin kaplı manyetik nanopartiküllerde $800-850\text{ cm}^{-1}$ de görülen pikler Fe-O-Fe gerilme titreşimlerini temsil etmektedir (Baby & Ramaprabhu, 2010). Buna ek olarak yaklaşık 500 cm^{-1} civarlarında gözlemlenen ve pektin spektrumunda görülmeyen pik Fe-O bağının titreşimine karşılık gelmektedir. Diğer taraftan manyetik nanopartiküller pektin kapladığında ek pikler görülmüştür. 1014 cm^{-1} de konumlanan pik alkolik grupların C-OH gerilme titreşimlerinden ve pektin şeker monomerlerinin iskelet halka yapılarından ve karboksilik asitlerden kaynaklanmaktadır (Gong, ve diğerleri, 2012). 1400 cm^{-1} civarlarında görülen pik Fe-O gerinim titreşimlerini ve pektin kaplı manyetik nanopartiküllerinde simetrik ve asimetrik COO-Fe etkileşimlerini temsil etmektedir (Quy, Hieu, Nam, & Nguyen, 2013). 1716 cm^{-1} de oluşan pik serbest karboksilik asitlerin C-O titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Liu, Zhao, & Jiang, 2008). 3535 cm^{-1} 'deki pik hidroksil gruplarındaki titreşimlerine tekabül etmektedir (Liang, Guo, Feng, & Tian, 2010). Böylece pektinin karboksilik grubu ile Fe_3O_4 partiküllerinin Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonları arasındaki etkileşim yoluyla pektinin başarılı bir şekilde manyetik nanopartiküllerin yüzeyine kaplandığı doğrulanmıştır (Attallah, Al-ghobashy, & Nebsen, 2018).



Şekil 5.2. Çıplak ve agar kaplı manyetik partiküllerin FTIR spektrumları (a) çıplak, (b) %0,5 (w/v) agar ile hazırlanmış, (c) %1 (w/v) agar ile hazırlanmış manyetik partiküller ve (d) agar

Şekil 5.2., sırasıyla %1 w/v agar kaplı, %0,5 w/v agar kaplı, çıplak manyetik nanopartikül ve agar FTIR spektrumlarını göstermektedir. Agara ait spektrumda 1634 cm^{-1} de gözlemlenen pik agar içeriğindeki polisakkaritlerin spesifik pikidir. 840 cm^{-1} ve 1225 cm^{-1} arasındaki pik C-O gerilme titreşimini ifade eder, 3000 cm^{-1} civarlarındaki pik ise -OH genişlemesinden kaynaklanmaktadır. 1034 cm^{-1} civarlarındaki pik C-O-C yi yansıtır ve glikozidik bağlanma titreşiminden görülmektedir. Agar kaplı manyetik nanopartiküllerin spektrumlarında görülen 884 cm^{-1} 'de Fe-O titreşimlerine denk gelen pik manyetik nanopartikül varlığını 1030 cm^{-1} civarlarında görünen pik ise spesifik C-O-C agar pikini temsil etmektedir. 1634 cm^{-1} de gözlemlenen pik agar ile ilgilidir. Manyetik nanopartiküllerde gözlenen agara ait pikler manyetik nanopartiküllerin başarılı bir şekilde kaplandığını gösterir (Zhang, Li, He, Li, & Sauli, 2015).



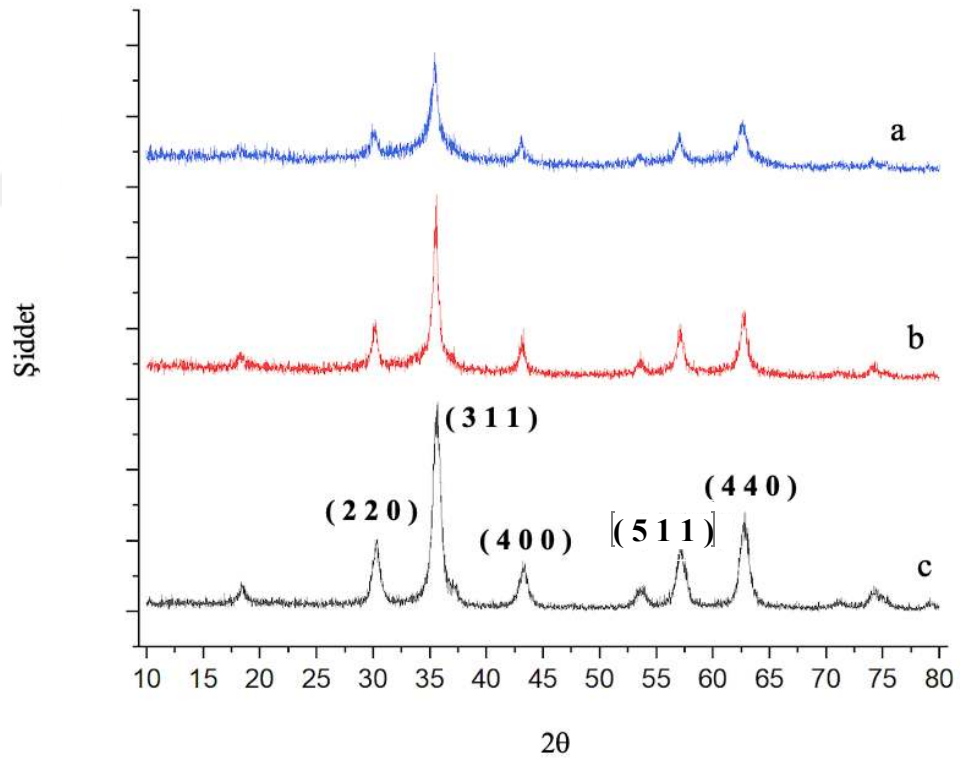
Şekil 5.3. Çıplak ve CMC kaplı manyetik partiküllerin FTIR spektrumları (a) çıplak, (b) %0,5 (w/v) CMC ile hazırlanmış, (c) %1 (w/v) CMC ile hazırlanmış manyetik partiküller ve (d) NaCMC

Sentezlenen partiküllerin ve NaCMC Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları (Şekil 5.3.) de gösterilmiştir. Bu spektrumlara bakıldığında Şekil 5.3.d spektrumunda $2500 - 3000\text{ cm}^{-1}$ bandında gözlenen pikler OH- gerilme titreşimi, C - H gerilme titreşimini göstermektedir. 1500 cm^{-1} civarlarındaki pik CH_2 eğilme titreşimine karşılık

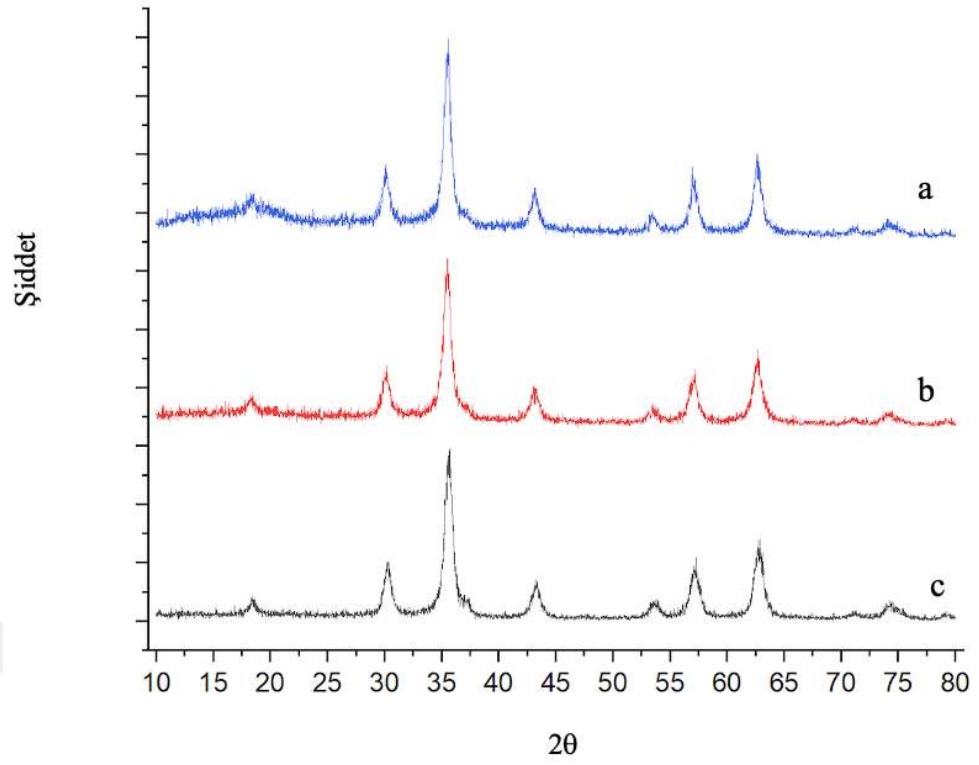
gelmektedir (Yáñez, Matsuhira, Maldonado, González, & Luengo, 2018). Bununla birlikte manyetik nanopartiküllerde ve NaCMC spektrumunda ortak olarak gözlenen $1000\text{ }1700\text{ cm}^{-1}$ partikül yüzeyinde CMC varlığından dolayı C-O ve C-C bağlarını temsil etmektedir (Qiu, Shao, Liu, Wang, & Li, 2014). $800\text{ ile }1100\text{ cm}^{-1}$ arasındaki frekanslarda ortaya çıkan pikler yüzeydeki aminopropilsilanın varlığından kaynaklanan yeni titreşim bantlarını gösterir. 1725 cm^{-1} ve 1628 cm^{-1} 'deki pikler COOH grubunun sırasıyla OH ve C=O gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Sheena, Priyanka, Sabu, & Varghese, 2014).

5.1.2. XRD

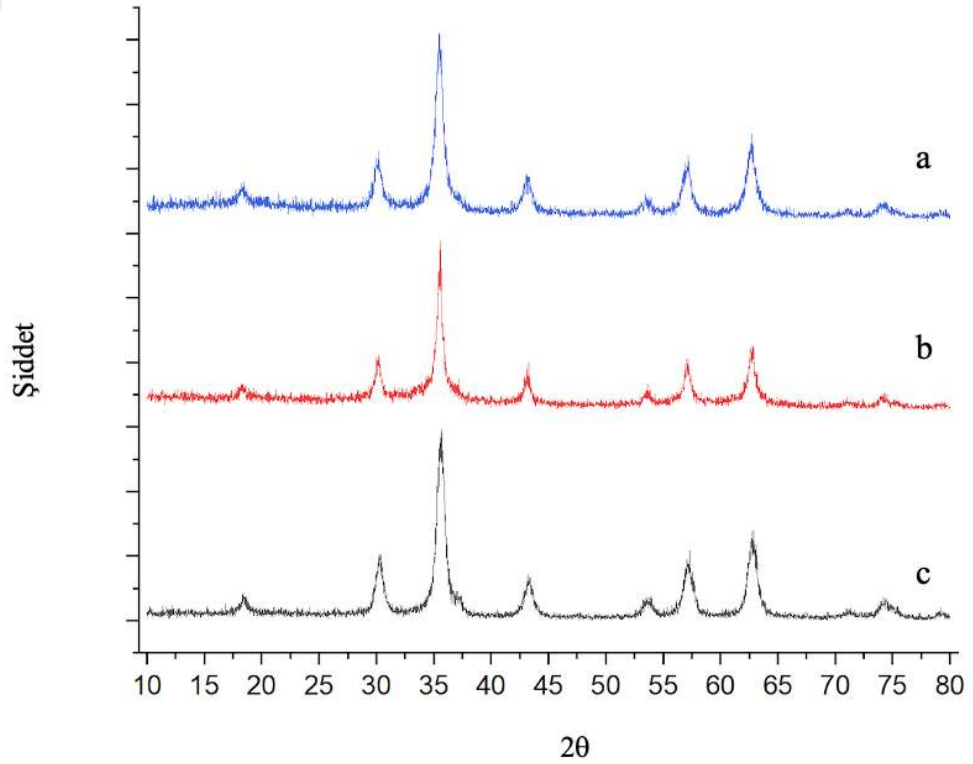
Şekil 5.4-6. çıplak ve farklı doğal polimer maddelerle kaplanmış manyetik nanopartiküllerin XRD difraktogramları verilmiştir.



Şekil 5.4. Çıplak ve pektin kaplı manyetik partiküllerin XRD difraktogramları (a) %1 Pektin kaplı, (b) %0,5 pektin kaplı, (c) çıplak manyetik partikül



Şekil 5.5. Çıplak ve agar kaplı manyetik partiküllerin XRD difraktogramları (a) %1 Agar kaplı, (b) %0,5 Agar kaplı, (c) çıplak manyetik partikül



Şekil 5.6. Çıplak ve CMC kaplı manyetik partiküllerin XRD difraktogramları (a) %1 CMC kaplı, (b) %0,5 CMC kaplı, (c) çıplak manyetik partikül

Sentezlenen çıplak manyetik nanopartiküllere ait difraktogramda 2θ 18.4,30.36, 35.7, 43.38, 53.9, 57.32, 62.9 civarlarında sırasıyla **(1 1 1)**, **(2 2 0)**, **(3 1 1)**, **(4 0 0)**, **(4 2 2)**, **(5 1 1)** ve **(4 4 0)** karakteristik pikler gözlenmiştir. Literatürdeki verilere göre bu karakteristik pikler Fe_3O_4 ve kübik spinel yapıda olduğunu göstermektedir (Todaka, Nakamura, Hattori, Tsuchiya, & Umemoto, 2003). Bu karakteristik piklerin yüzey modifikasyonları yapılmış partiküllerde de gözlenmesi modifikasyon işleminin partiküllerin kristal yapısını değiştirmedığını gösterir (Xu, ve diğerleri, 2013). Manyetik nanopartiküllerin XRD desenlerinde karakteristik piklerden farklı piklerin olmaması sentezlenen partiküllerde istenmeyen ve manyetik olmayan safsızlıklar olmadığını gösterir (Eivari, Rahdar, & Arabi, 2012).

Buna ek olarak XRD difraktomları kullanılarak partiküllerin ortalama tanecik boyutları hesaplandı (Tablo 5.1.). Kristalit boyutu (tane boyutu), partikül yapısındaki en küçük tek kristaldir. Partikül tek bir kristalden oluşabileceği gibi birkaç kristalin bir araya gelmesiyle de olabilir. Bu sebeple partikül hiçbir zaman kristalit boyutundan küçük olamaz. Bazı durumlarda partikül boyutu ve kristalit boyutu aynı olabilir (Park, Rhee, & Park, 2010).

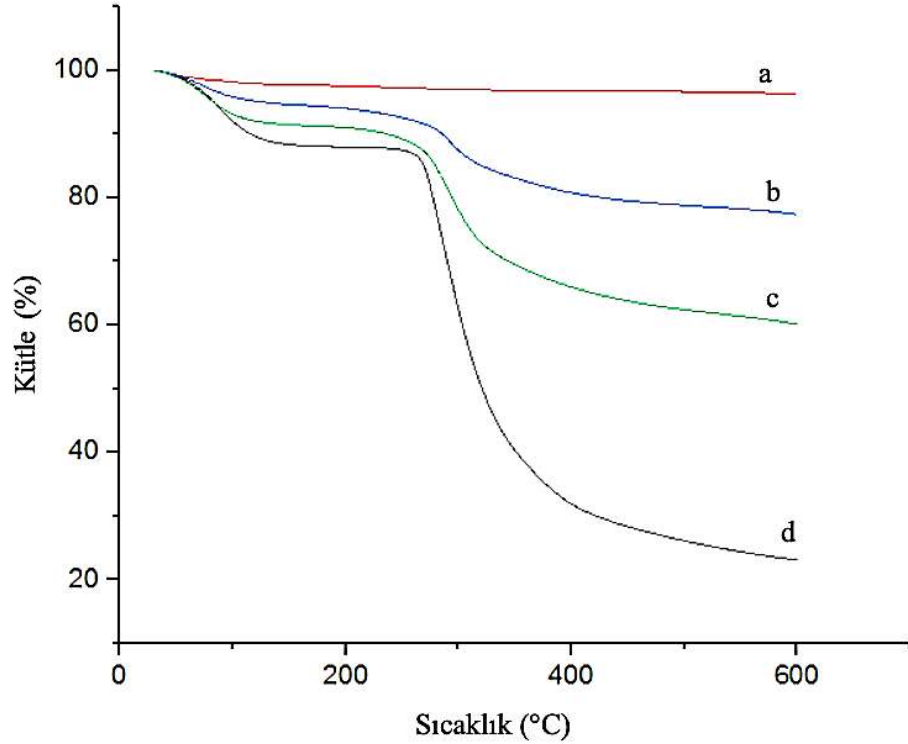
Tanecik boyutu hesaplamak için gerekli olan yarı maksimumdaki tam genişlik değeri (FWHM-full width at half maximum) OriginLab programından bulunmuştur (EK-2).

Tablo 5.1. Sentezlenen partiküllerin tanecik boyutları (nm)

Partikül	2θ	FWHM	Tanecik Boyutu (nm)
MNP	35,70	0,91313	9,55
%0,5 Pektin MNP	35,56	0,78204	11,15
%1 Pektin MNP	35,48	1,41339	6,17
%0,5 Agar MNP	35,46	0,92886	9,38
%1 Agar MNP	35,60	0,86275	10,11
%0,5 CMC MNP	35,48	1,14485	7,61
%1 CMC MNP	35,48	1,05966	8,22

Pik genişliği arttığında kristalit boyutu küçülür. İşlemler sırasında daha küçük boyutta kristaller yaklaşma ve bir araya gelerek büyüme eğilimindedirler (Horváth, ve diğerleri, 2011). XRD analizi sonucunda elde edilen verilere bakıldığında %1 (w/v) pektin ile kaplanan manyetik partiküllerin tanecik boyutu için kullanılan (3 1 1) pikinin

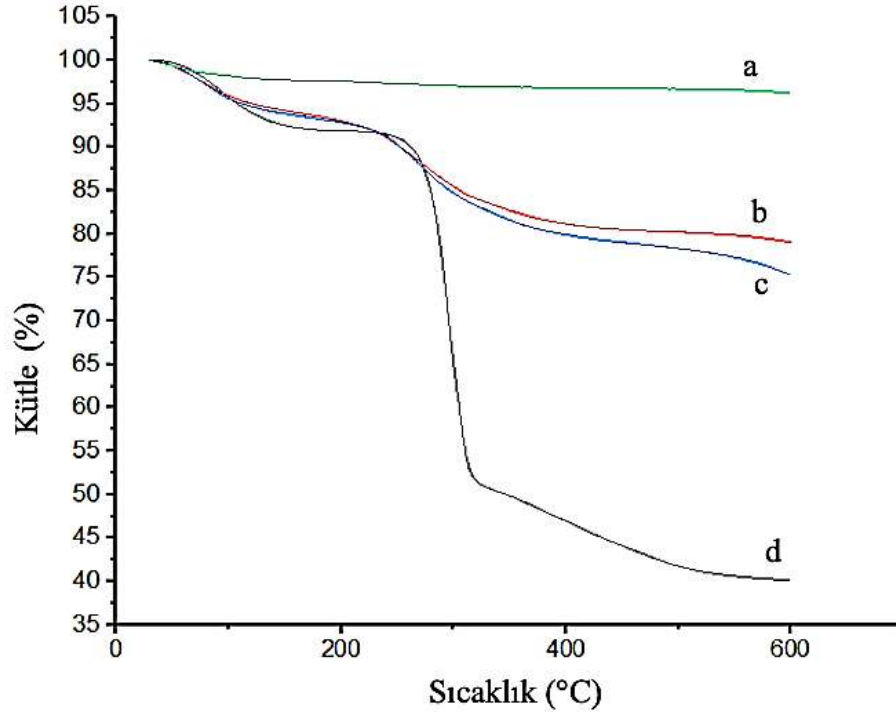
ise kademeli bir düşüş gözlenmiştir. Pektin kaplı manyetik nanopartiküllerin termogramları incelendiğinde, çıplak manyetik nanopartiküllerle karşılaştırıldığında pektine benzer düşüşler göstermiştir. %0,5 pektin kaplı manyetik nanopartiküllerde ve %1 Pektin kaplı manyetik nanopartiküllerde 320-600 °C’de meydana gelen sırasıyla %6,86 ve %12,31’lik kütle kaybı partiküllerin yüzeyindeki pektinin polimer yapısından kaynaklanmaktadır.



Şekil 5.8. Çıplak ve agar kaplı manyetik partiküllerin termogramları (a) çıplak, (b) %0,5 agar kaplı, (c) %1 agar kaplı manyetik partikül ve (d) agar

Şekil 5.8. çıplak, %0,5 agar kaplı, %1 agar kaplı manyetik nanopartiküllerin ve yüzey kaplama malzemesi agarın termogramlarını göstermektedir. Manyetik nanopartiküllerde sadece 100-120 °C aralığında adsorblanmış su moleküllerinden kaynaklanan %2,07’lik kütle kaybı kaydedilmiştir. Artan sıcaklıkla partiküllerde herhangi bir bozunma kaydedilmemiştir. Bu da partiküllerin termal olarak stabil olduklarını gösterir. Agara ait termogramda 240-350 °C civarlarında %44,78 ‘lik ani bir kütle kaybı gözlenmiştir. Agar polimerinin yapısındaki organik moleküllerin bozunması bu kütle kaybına sebep olmuştur. Agar kaplı manyetik nanopartiküllerin termogramları incelendiğinde agar polimerinin termogramına benzer yerlerde düşüş göstermiştir. %0,5 agar kaplı manyetik nanopartiküllerde ve %1 agar kaplı manyetik nanopartiküllerde 240-

350 °C’de meydana gelen sırasıyla %9,88 ve %20,28’lik kütle kaybı partiküllerin yüzeyindeki agarın polimer yapısından kaynaklanmaktadır.

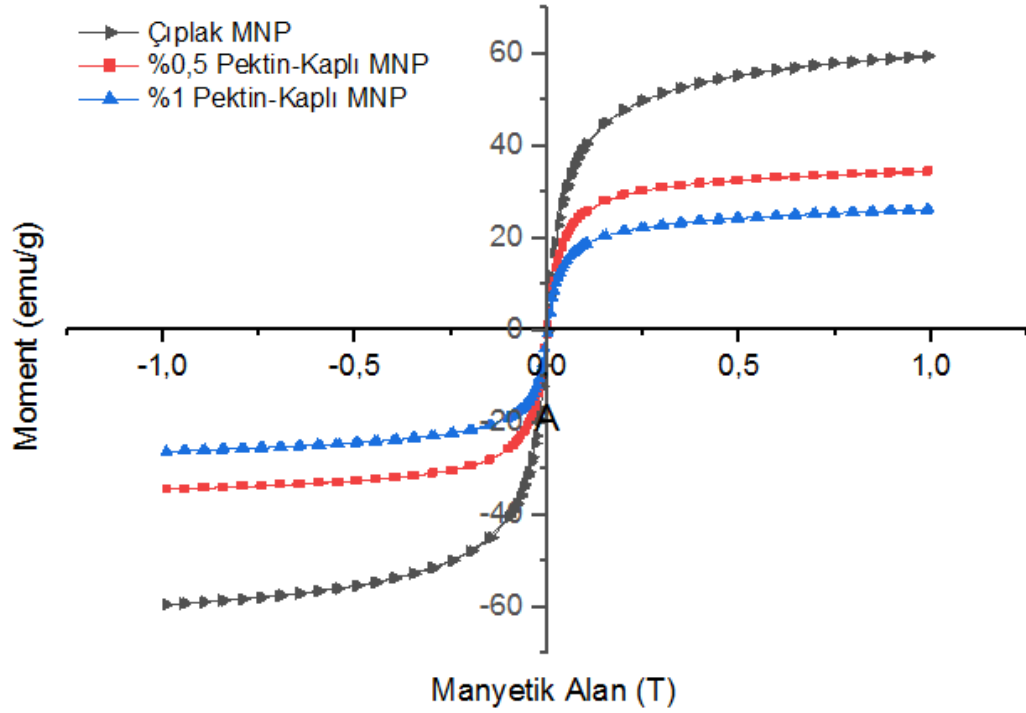


Şekil 5.9. Çıplak ve CMC kaplı manyetik partiküllerin termogramları (a) çıplak, (b) %0,5 CMC kaplı, (c) %1 CMCKaplı manyetik partikül ve (d) NaCMC

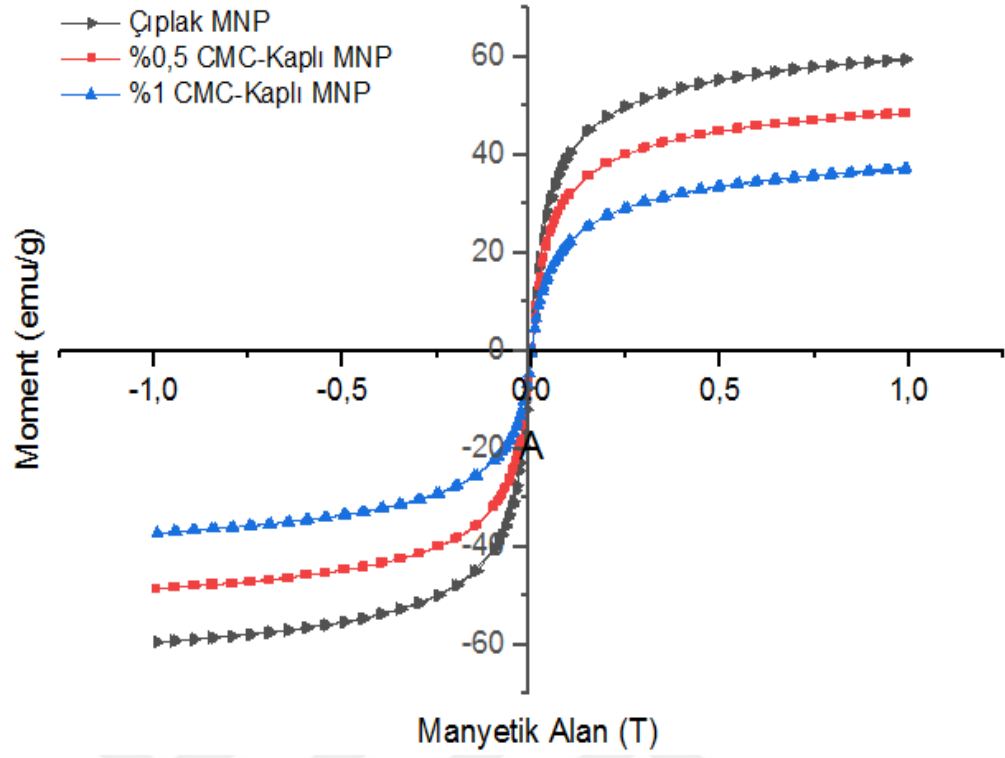
Şekil 5.9. CMC kaplı manyetik nanopartiküllerin TGA ölçümleri verilmiştir. Manyetik nanopartiküllerin termogramları (Şekil 5.9.a) 100-120 °C arasında %2,07’lik bir kütle kaybını göstermektedir bu da partiküller tarafında adsorblanmış suyun kaybını ifade eder. Sentezlenen partiküller 120-600 °C aralığında stabilite göstermiştir. NaCMC termogramında (Şekil 5.9.d) 100 °C civarlarında %4,24’lük kütle kaybı mevcuttur. Bu kütle kaybı yine adsorblanmış su molekülleriyle ilişkilidir. 250-320 °C arasında %39,46’lık keskin bir kütle kaybı görülmektedir. CMC polimerinin organik yapısındaki bozulmalar bu düşüşe sebep olmuştur. Ayrıca 320-500 °C arasında kademeli olarak %11,5’lik kütle kaybı gözlenmiştir. CMC-kaplı manyetik partiküller NaCMC termogramına benzer bir termogram göstermiştir. 100 °C’de fiziksel olarak adsorblanan suyun sebep olduğu %4’lük bir kayıp vardır. 250-320 °C aralığında NaCMC’nin polimerik yapısındaki termal bozunmalardan kaynaklanan %6,14lük kütle kaybı gözlenmiştir.

5.1.4. VSM

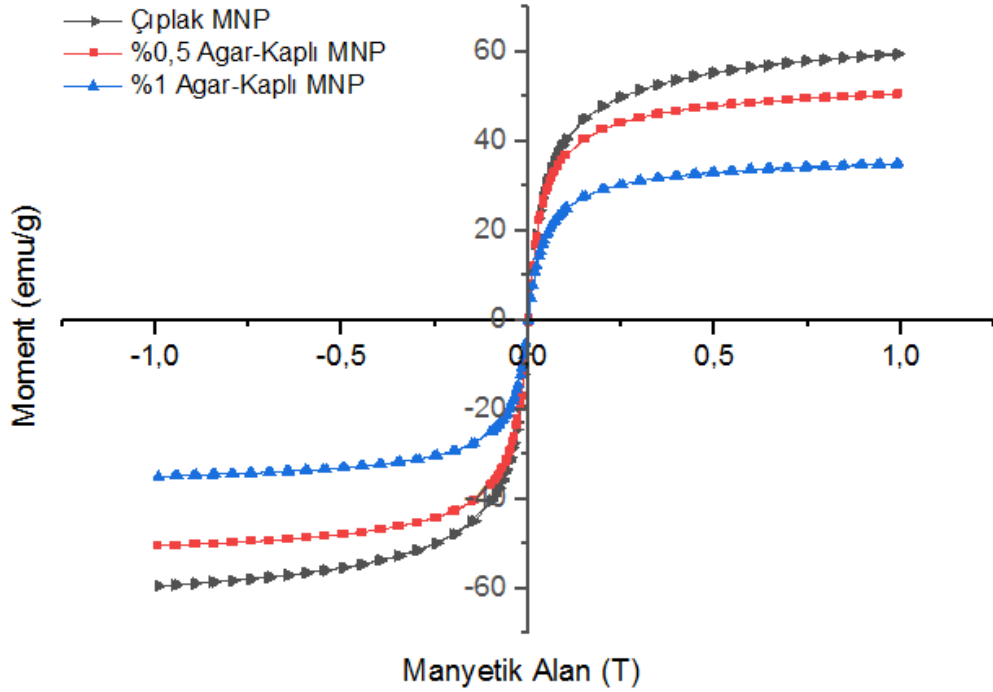
Üretilen çıplak ve pektin-, agar-, CMC- kaplı manyetik nanopartiküllerin manyetik özellikleri VSM analizi ile incelenmiştir. Şekil 5.10-11-12 sırasıyla pektin-, agar- ve CMC- kaplı manyetik nanopartiküllerin manyetik histerisis eğrilerini göstermektedir.



Şekil 5.10. Çıplak ve pektin kaplı manyetik partiküllerin VSM sonuçları, (a) çıplak , (b) %0,5 Pektin kaplı, (c) %1 Pektin kaplı manyetik partikül



Şekil 5.11. Çıplak ve CMC kaplı manyetik partiküllerin VSM sonuçları, (a) çıplak , (b) %0,5 CMC kaplı, (c) %1 CMC kaplı manyetik partikül



Şekil 5.12. Çıplak ve agar kaplı manyetik partiküllerin VSM sonuçları, (a) çıplak , (b) %0,5 agar kaplı, (c) %1 agar kaplı manyetik partikül

Histerisis eğrileri incelendiğinde, eğrilerin tamamı orijin noktasından geçmektedir. Bu da sentezlenen tüm partiküllerin oda sıcaklığında süperparamanyetik özellikler gösterdiğine işarettir. Başka bir deyişle, sentezlenen partiküller dışarıdan uygulanan bir manyetik kuvvet ile manyetize olurlar. Ancak bu manyetizma kalıcı değildir, uygulanan manyetik kuvvet ortadan kalktığında manyetizma durumu olmayacaktır.

En yüksek manyetik doygunluk (M_s) değeri çıplak manyetik nanopartiküller için 59,5 emu/g olarak ölçülmüştür. Partikül yüzeyi polimerle kaplandıkça bu değerde düşüş gözlenmiştir. Manyetik doygunluk değerleri Tablo 5.2.de özetlenmiştir.

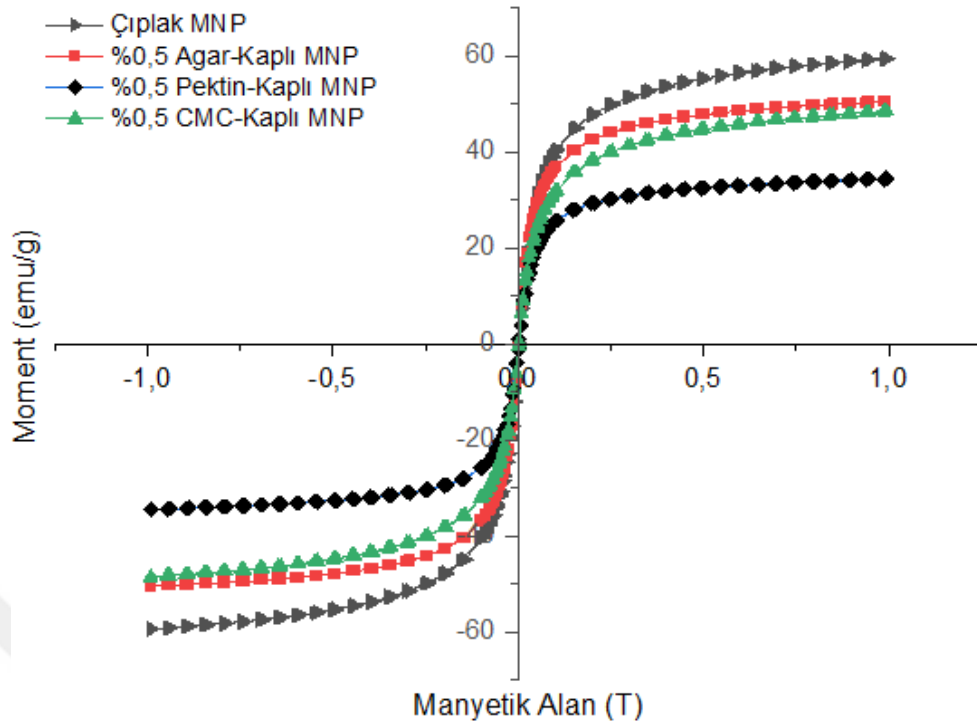
Tablo 5.2. Sentezlenen partiküllerin manyetik doygunluk değerleri

Partikül	MNP	%0,5 PCMNP	%1 PCMNP	%0,5 ACMNP	%1 ACMNP	%0,5 CMC-MNP	%1 CMC-MNP
M_s (emu/g)	59,5	29,6	22,5	43,4	29,9	41,6	31,9

(PCMNP:Pektin-Kaplı MNP; ACMNP:Agar-Kaplı MNP;CMC-MNP;CMC-kaplı MNP)

Partiküllerin yüzey kaplamalarının konsantrasyonlarındaki artışla M_s değerinin düştüğü gözlenmiştir. TGA analizinden elde edilen termogramlarda da görüldüğü üzere kaplama malzemeleri %1 w/v konsantrasyonda kullanıldığında partiküllerin yüzeyindeki polimer oranı diğer partiküllerden fazladır. %1 w/v polisakkarit içeren solüsyonda kaplanan manyetik partiküllerin manyetik doygunluk değerlerindeki düşüşün sebebi manyetik nanopartiküllerin yüzeyindeki polimer varlığıdır (Kalkan, Aksoy, & Hasirci, 2012; Zang, 2014; Kuo, ve diğerleri, 2012).

Şekil 5.13. %0,5 w/v farklı polisakkarit varlığında kaplanan manyetik nanopartiküllerin manyetik doygunluk değerlerinin çıplak manyetik nanopartiküllere kıyasla azalışını göstermektedir.



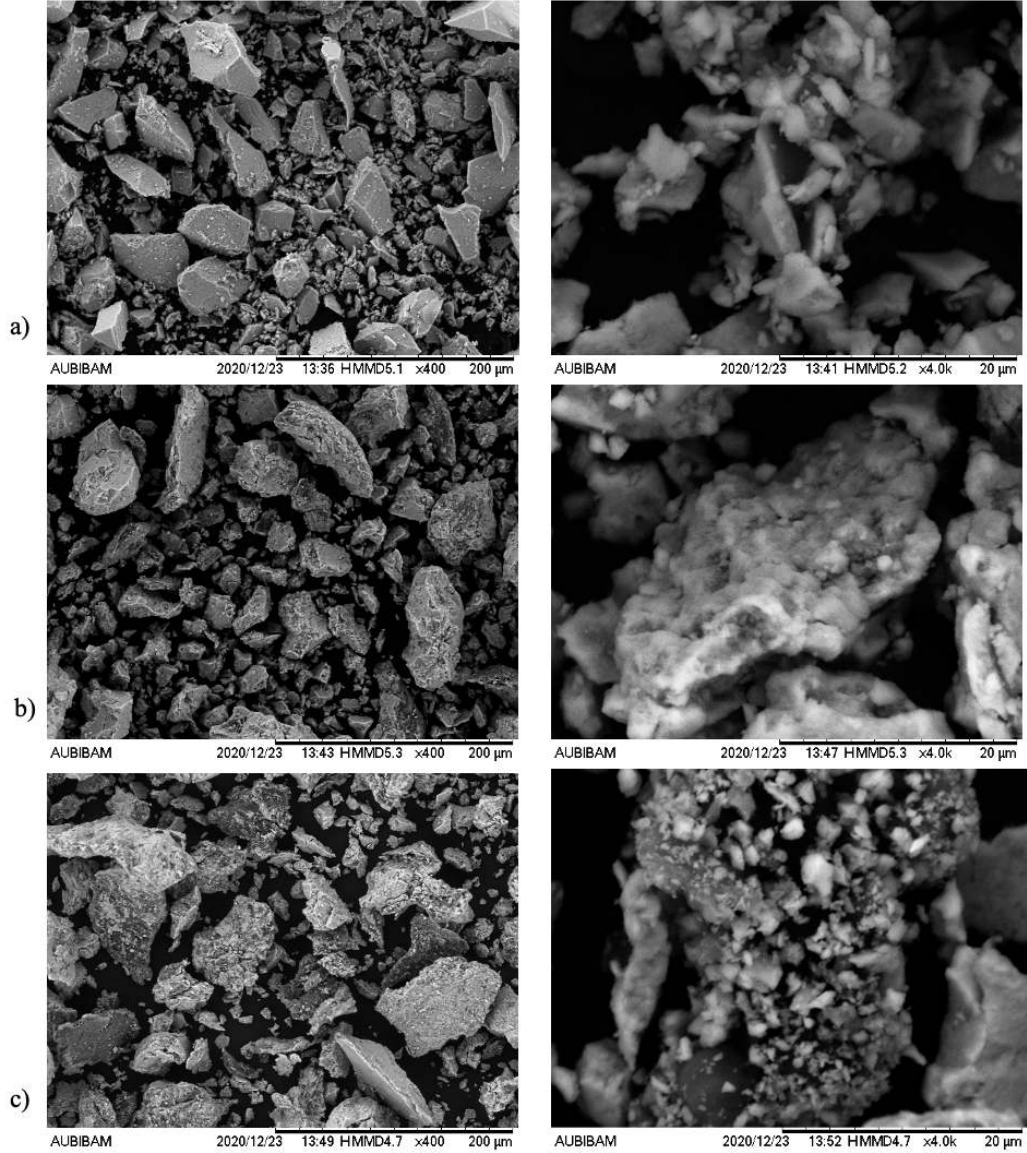
Şekil 5.13. (a) çıplak, (b) %0,5 Agar kaplı, (c) %0,5 NaCMC kaplı, (d) %0,5 Pektin kaplı manyetik partiküllerin VSM sonuçları

Şekil 5.13e bakıldığında %0,5 w/v agar kaplı manyetik nanopartiküllerin manyetik doygunluk değerinde diğer kaplama malzemelerine kıyasla daha az bir düşüş olduğu görülmüştür. Deneysel yöntem bölümünde Şekil 4.5-7.' ye bakıldığında da %0,5 w/v agar-, CMC- ve pektin- kaplı manyetik nanopartiküllerin eşit miktarlarda alındığında saf su içerisinde sırasıyla 71, 105 ve 165 saniyede mıknatıs yardımıyla tüp duvarına adsorplanmıştır.

Partiküllerin tamamının süperparamanyetik özellik göstermesi ve manyetik alan ortadan kalktığında çözelti içine kolayca dağılabilecek olması partiküllerin enzim immobilizasyonu için kullanımına fayda sağlar. Üzerine enzim immobilize edilmiş manyetik nanopartiküller manyetik etki ortadan kalktığında çözelti içerisine dağılır ve böylece enzim substratla daha iyi etkileşebilir. Sonuç olarak, polisakkarit ile kaplanan manyetik partiküllerin özellikleri ışığında, enzim immobilizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, dış manyetik alana tepkisi daha yüksek olan, agar-kaplı parçacıklar seçildi.

5.1.5. SEM

Sentezlenen ve sonrasında enzim immobilizasyonu için kullanılan çıplak, %0,5 w/v agar kaplı ve %1 w/v agar kaplı manyetik partiküllerin SEM-Banchtop Taramalı Elektron Mikroskobu altında görüntüleri alınarak partiküllerin yüzey morfolojileri incelenmiştir.



Şekil 5.14. Çıplak (a), %0,5 w/v agar kaplı (b) ve %1 w/v agar kaplı (c) partiküllerin 400X (solda) ve 4.0kX (sağda) büyütmelerde SEM görüntüleri

Şekil 5.14. de görüldüğü üzere manyetik nanopartiküller agar ile kaplandığında daha geniş bir yüzey alanına sahip olurlar. Yüzey aktif maddenin konsantrasyonunda meydana gelen artış, partikül yüzey alanını daha da genişletir. Böylece partikül üzerine immobilize olan enzim miktarının daha fazla olması beklenir.

5.2. Sentezlenen Partiküller Üzerine Alfa Amilaz İmmobilizasyonu Çalışmaları

5.2.1. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyon çalışmaları

5.2.1.1. Sonikasyon işleminin immobilizasyon verimine etkisi

Çıplak manyetik nanopartiküller ve %0,5 w/v agar ile kaplı manyetik nanopartiküller üzerine 0,05 M pH 7 fosfat tampon çözeltisi ile hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyonda alfa amilaz immobilize edildi. İmmobilizasyon işleminde, 1 mL (1 mg/mL) enzim çözeltisi içerisine 0,01 g partikül konulmuş ve 30 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Oluşturulan ikinci deney seti hazırlandıktan sonra, enzim solüsyonu içerisindeki partiküller 30 dk boyunca 40 kHz ultrasonik su banyosu içerisinde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tampon çözeltiyle iki kez yıkanan partiküller üzerine bağlanan enzim miktarı Bradford metoduyla tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.3.de listelenmiştir.

Tablo 5.3. Sonikasyon işleminin enzim immobilizasyonu üzerine etkisi

	pH	Partikül	Bağlanan Protein (%)
Sonikasyon işlemi yok	7	Serbest Enzim	100 (0,09*)
	7	Çıplak MNP	53,10
	7	%0,5 Agar-Kaplı MNP	65,61
Sonikasyon işlemi var	7	Serbest Enzim	100 (0,12*)
	7	Çıplak MNP	53,95
	7	%0,5 Agar-Kaplı MNP	44,72

*serbest enzim içeriğindeki protein miktarı (mg protein)

Tablo 5.3.de verilen sonuçlar incelendiğinde, sonikasyon işleminin çıplak manyetik nanopartiküller üzerine enzim immobilizasyonu işleminde herhangi bir olumlu etkisi olduğu görülmemiştir. Ancak %0,5 w/v agar kaplı partiküller için sonuçlar incelendiğinde sonikasyon işlemi uygulandığında immobilizasyon oranı %65,61'den %44,72'ye düşmüştür.



Şekil 5.15. Sonikasyon işlemi uygulanmayan (soldaki) ve uygulanan (sağdaki eppendorflar) a) çıplak ve b) %0,5 w/v agar solüsyonunda kaplanan partiküller

Sonikasyon işlemi uygulanan partikül solüsyonlarında renk değişimi olduğu ve parçacıkların deformasyona uğradığı gözlenmiştir. Bu nedenle protein tayini için yapılan Bradford analizinde doğru sonuçlar elde edilemediği düşünülmektedir.

Sonikasyon işleminin enzim immobilizasyonuna olumlu bir etkisi olduğu gözlenmediğinden enzim immobilizasyonu işlemlerinde sonikasyon uygulanmamıştır.

Ek olarak, sonikasyon altında gerçekleşmeyen immobilizasyon işlemlerinde, çıplak ve polimer kaplı partiküllere bağlanan protein miktarı kıyaslandığında, agar kaplı partiküllere yaklaşık %12,5 fazla protein adsorplandığı görülmektedir. Kaplamanın oluşumuyla, manyetik partiküllerin yüzey alanının artması sonucu adsorplanma bölgelerin çoğaldığı ve bağlanan protein miktarının artması beklenen bir sonuçtur.

5.2.1.2. *İmmobilizasyon pH'ının immobilizasyon verimine ve spesifik aktiviteye etkisi*

Değişen pH'ın alfa amilaz immobilizasyonuna etkisini incelemek için sitrik asit – fosfatla hazırlanan 0,05 M pH 3 – 4 – 5 – 6 – 7 tampon çözeltileriyle hazırlanan alfa amilaz enziminin 30 dakika süreyle immobilizasyonuna çalışılmıştır. İlgili pH ortamında fiziksel immobilizasyon gerçekleştirildikten sonra, manyetik partiküller iki kez yıkandı ve bağlanan enzimlerin aktivitesi pH=4,5 olan tampon çözeltisinde çözünen nişasta ile 55°C'de ölçüldü. Elde edilen veriler Tablo 5.4.'te listelenmiştir.

Tablo 5.4. Değişen pH'ın bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi

pH	Partikül	Bağlanan Protein (%)	Enzim Aktivitesi (U)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Bağlı Aktivite (%)
3	Serbest Enzim	100 (0,11*)	0,56	4,95	100
3	%0,5 Agar-Kaplı	99,89	0,45	4,00	80,81
4	Serbest Enzim	100 (0,07*)	14,72	221,73	100
4	%0,5 Agar-Kaplı	20,92	0,57	40,72	18,36
5	Serbest Enzim	100 (0,09*)	19,35	223,05	100
5	%0,5 Agar-Kaplı	3,74	0,49	152,21	68,24
6	Serbest Enzim	100 (0,06*)	18,08	291,31	100
6	%0,5 Agar-Kaplı	18,13	0,45	39,95	13,71
7	Serbest Enzim	100 (0,12*)	24,16	198,37	100
7	%0,5 Agar-Kaplı	26,21	0,59	18,45	9,30

*serbest enzimin içerdiği protein miktarı (mg protein)

İmmobilizasyon işlemi için tampon çözeltinin değeri pH 3 olduğunda bağlanan protein miktarı %99,89 olduğu görülmüştür. Ancak partiküller ile yapılan enzim aktivitesi deneylerinde mutlak aktivitenin çok düşük olduğu ve bağlanan enzimlerin nispeten çalışmadığı görülmüştür. İmmobilizasyon işlemi farklı pH'larda tekrarlanmıştır. Enzim tutuklamanın asıl amacı, enzimleri defalarca ve en verimli şekilde kullanılması olduğundan, bağlanan protein miktarından ziyade, yüksek spesifik aktiviteye sahip manyetik partiküller elde etmek daha elzemdir. Bundan dolayı, yapılan değerlendirmeler sonucunda spesifik aktiviteler değerlendirildiğine pH 4 ve 5 tampon çözeltileriyle yapılan immobilizasyon işlemlerinin daha verimli sonuçlar verdiği görüldü ve çalışmanın devamında bu pH değerlerine sahip ortamlarda devam edildi.

5.2.1.3. İmmobilizasyon sürelerinin bağlanan protein miktarına ve spesifik aktiviteye etkisi

Optimum pH için yapılan değerlendirmeler sonucunda pH 4 ve 5 tampon çözeltileriyle yapılan immobilizasyon işlemindeki enzimin daha aktif olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple immobilizasyon süresi için yapılan denemeler pH 4 ve pH 5 tampon çözeltileri kullanılarak yapılmıştır. İmmobilizasyon süresinin, immobilizasyon verimi üzerine etkilerinin incelenebilmesi için 0,5 – 1 – 2 – 4 – 8 – 16 saatlik bekleme sürelerinde immobilizasyon işlemi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.5'te listelenmiştir.

Tablo 5.5. Bekleme sürelerinin bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi

Zaman (saat)	pH	Partikül	Bağlanan Protein (%)	Enzim Aktivitesi (U)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Bağlı Aktivite (%)
	4	Serbest Enzim	100 (0,067*)	6,43	96,10	100
	5	Serbest Enzim	100 (0,078*)	11,04	141,46	100
0.5	4	%0,5 Agar-Kaplı	17,078	0,482	42,14	43,85
	5	%0,5 Agar-Kaplı	7,612	0,422	71,06	73,94
1	4	%0,5 Agar-Kaplı	4,353	0,370	127,14	131,87
	5	%0,5 Agar-Kaplı	6,158	0,363	81,73	57,77
2	4	%0,5 Agar-Kaplı	3,907	0,424	162,19	168,77
	5	%0,5 Agar-Kaplı	4,167	0,375	115,43	120,11
4	4	%0,5 Agar-Kaplı	10,716	0,348	48,52	50,49
	5	%0,5 Agar-Kaplı	0,962	0,382	509,28	360,01
8	4	%0,5 Agar-Kaplı	57,149	0,098	2,57	2,67
	5	%0,5 Agar-Kaplı	2,725	0,084	39,32	27,79

16	4	%0,5 Kaplı	Agar-	72,218	0,125	2,58	2,68
	5	%0,5 Kaplı	Agar-	13,223	0,074	7,16	5,06

İmmobilize alfa amilazın bağıl aktivitesinde meydana gelen azalma immobilizasyon süresinin uzamasıyla destek materyali üzerine daha fazla protein immobilizasyonu sonucunda substratın enzimin aktif bölgesine ulaşmasını kısıtlamasından dolayı meydana gelmiştir (Jiang, Long, Huang, Xiao, & Zhou, 2005).

Ek olarak, adsorpsiyon ile yapılan immobilizasyon işlemleri sonrasında partiküller ile yapılan enzim aktivitesi tayinlerinde partiküller substrat olarak seçilen nişasta çözeltisinden mıknatıs ile ayrılmasına rağmen nişasta hidrolizinin devam ettiği görülmüştür. Partiküller üzerine immobilize edilen enzimin partiküller üzerinde stabil olmadığı ve çözelti içerisine enzim kaçağı olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2.2. Kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyon çalışmaları (glutaraldehit aktivasyonu)

Adsorpsiyon yöntemiyle yapılan immobilizasyonda partiküller üzerine immobilize edilen enzimlerin koptuğuna dair sonuç görülmüştür. Enzimin partikül üzerine tutunmasını sağlamlaştırmak amacıyla alfa amilaz immobilizasyonu için kovalent bağlama yöntemi denenmiştir. Kovalent bağlama yöntemi için immobilizasyon çalışmasında kullanılacak partiküllerin yüzeyleri GA ile aktive edilmiştir. GA ile aktivasyon destek materyalinin yüzeyinin kimyasal olarak reaktif gruplarla kaplanmasını sağlar. Bu gruplar ile protein kovalent olarak immobilize edilebilir. Ancak bu katyonik gruplar (amino grupları) destek materyalini iyon değiştirici yapar. Aslında düşük iyon şiddeti olan ortamda GA ile aktive edilen destek materyali üzerine enzim adsorpsiyonu kovalent bağlamadan daha çabuk gerçekleşmektedir.

5.2.2.1. İmmobilizasyon pH'ının immobilizasyon verimine ve spesifik aktiviteye etkisi

Optimum immobilizasyon pH'ının belirlenebilmesi için önceden %0,5 glutaraldehit ile aktive edilmiş manyetik partiküller üzerine pH 4 – 5 – 6 – 7 – 8 değerlerinde 1 saat oda sıcaklığında immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.6.'da listelenmiştir.

Tablo 5.6. Değişen pH'ın GA aktivasyonu yapılan partiküllerde bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi

pH	GA (%)	Partikül	Bağlanan Protein (%)	Enzim Aktivitesi (U)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
4	-	Serbest Enzim	100 (0,06*)	3,50	58,66
		Çıplak	-	0,11	-
	0,5	%0,5 Agar-Kaplı	-	0,11	-
		%1 Agar-Kaplı	-	0,11	-
5	-	Serbest Enzim	100 (0,08*)	2,83	35,32
		Çıplak	3,83	0,12	39,56
	0,5	%0,5 Agar-Kaplı	-	0,14	-
		%1 Agar-Kaplı	-	0,11	-
6	-	Serbest Enzim	100 (0,08*)	8,55	103,25
		Çıplak	0,50	0,21	465,00
	0,5	%0,5 Agar-Kaplı	10,40	0,21	24,09
		%1 Agar-Kaplı	18,30	0,23	15,26
7	-	Serbest Enzim	100 (0,08*)	4,76	63,08
		Çıplak	-	0,23	-
	0,5	%0,5 Agar-Kaplı	2,80	0,20	95,32
		%1 Agar-Kaplı	-	0,25	-
8	-	Serbest Enzim	100 (0,41*)	16,06	39,57
		Çıplak	35,12	6,49	45,51
	0,5	%0,5 Agar-Kaplı	34,60	6,79	48,37
		%1 Agar-Kaplı	5,25	6,20	291,24

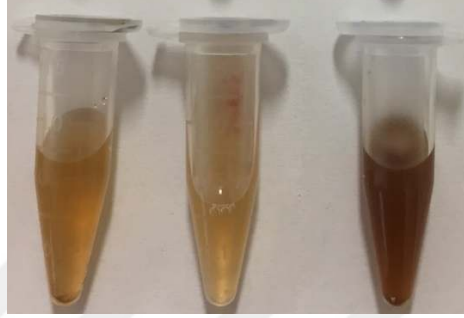
*serbest enzim içeriğindeki protein miktarı (mg protein)

Yapılan deneylerde pH 4 ve pH 5'te yapılan immobilizasyon işlemlerinde solüsyonların renk değiştirdiği görülmüştür (Şekil 5.16-17). Partiküllerin deformasyona uğradığı düşünülmektedir. Bu sebeple değerlendirme yapılamamıştır.

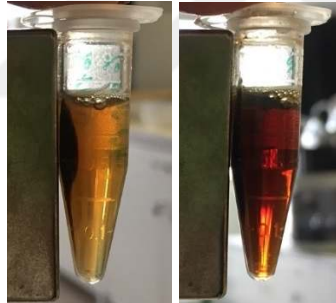
Tablo 5.6.'da listelenen sonuçlar incelendiğinde genelde bağlanan protein miktarı arttığında spesifik aktivitenin düştüğü görülmüştür. Spesifik aktivitedeki düşüş enzim molekülleri arasındaki sterik engellemelerin sonucunda, enzimlerin aktif merkezi ve substrat arasındaki etkileşimin zorlaşmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir (Feng, Yu, Li, Moa, & Li, 2016).

Tablo 5.6.'daki sonuçlara göre immobilizasyon veriminin en yüksek olduğu pH'ın 8 olduğu görülmüştür. Spesifik aktivite değerleri incelendiğinde en yüksek spesifik aktivite değerinin pH 6 %0,5GA-çıplak manyetik nanopartiküllerde olduğu görülsede

rölatif aktiviteye bakıldığında pH 8 ile yapılan immobilizasyonun daha verimli olduğu sonucu ortaya çıkar. pH 6 ile yapılan immobilizasyon işlemlerinde çıplak manyetik nanopartiküllerin spesifik aktivitesi serbest enzimin spesifik aktivitesinin 4 katıdır bununla birlikte pH 8 ile yapılan immobilizasyon işlemlerinde %1 Agar-Kaplı manyetik nanopartiküllerin spesifik aktivitesi serbest enzimin spesifik aktivitesinin yaklaşık 7,4 katıdır. Bu sebeple incelenecek diğer parametreler için yapılan deneyler pH 8 tampon çözeltisi ile immobilize edilmiş %1 Agar-Kaplı manyetik nanopartiküller ile yapılmıştır.



Şekil 5.16. %0,5 v/v GA ile aktive edilen ve pH 4'te immobilizasyon yapılan (soldan sağa) çıplak, %0,5 agar-kaplı ve %1 agar-kaplı partiküllerin yıkama solüsyonları



Şekil 5.17. %0,5 v/v GA ile aktive edilen ve pH 5'te immobilizasyon yapılan %0,5 agar-kaplı (solda) ve %1 agar-kaplı (sağda) partiküllerin yıkama solüsyonları

5.2.2.2. GA konsantrasyonunun immobilizasyon verimine ve spesifik aktiviteye etkisi

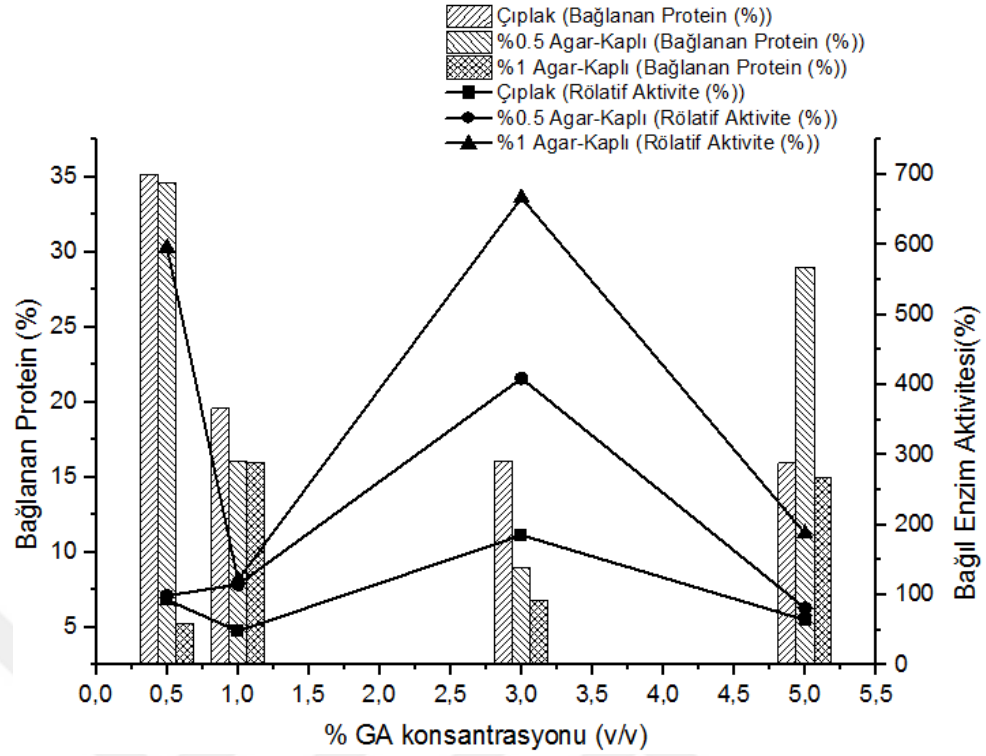
GA konsantrasyonunun enzim immobilizasyon verimine ve spesifik aktiviteye olan etkileri incelenmesi için immobilizasyon işlemleri pH 8'de %0,5 – 1 – 3 – 5 GA ile aktive edilen %1 Agar-Kaplı manyetik nanopartiküller üzerine alfa amilaz immobilizasyonu yapılmış ve ardından partiküllere enzim aktivitesi deneyleri yapılmıştır elde edilen veriler Tablo 5.7.'de verilmiştir.

Tablo 5.7. GA konsantrasyonunun bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi

pH	GA (%)	Partikül	Bağlanan Protein (%)	Enzim Aktivitesi (U)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Bağlı Aktivite (%)
8	-	Serbest Enzim	100 (0,41*)	16,06	48,92	100
		Çıplak	35,12	6,49	45,51	93,02
	0,5	%0,5 Agar-Kaplı	34,60	6,79	48,37	98,88
		%1 Agar-Kaplı	5,25	6,20	291,24	595,34
8	-	Serbest Enzim	100 (0,41*)	16,06	48,92	100
		Çıplak	19,58	1,88	23,64	48,32
	1	%0,5 Agar-Kaplı	16,08	3,67	56,18	114,84
		%1 Agar-Kaplı	15,95	3,84	59,37	121,36
8	-	Serbest Enzim	100 (0,41*)	26,39	64,83	100
		Çıplak	14,55	7,12	120,18	185,37
	3	%0,5 Agar-Kaplı	8,99	9,71	265,23	409,12
		%1 Agar-Kaplı	6,84	12,04	432,16	666,61
8	-	Serbest Enzim	100 (0,41*)	16,06	48,92	100
		Çıplak	29,41	3,75	31,41	64,20
	5	%0,5 Agar-Kaplı	29,00	4,66	39,63	81,01
		%1 Agar-Kaplı	15,01	5,58	91,63	187,31

*serbest enzim içeriğindeki protein miktarı (mg protein)

Tablo 5.7.'deki sonuçlar incelendiğine %0,5 v/v GA ile aktive edilen manyetik partiküller üzerine alfa amilaz immobilizasyonu veriminin en yüksek değerlere sahip olduğu görülmüştür. Ancak spesifik aktivite değerlerine bakıldığında %3 v/v GA ile aktive edilen ve üzerine alfa amilaz immobilize edilen partiküllere bağlı enzim daha fazla aktivite göstermiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda da benzer şekilde destek materyal üzerine immobilize edilen enzim miktarının artması enzim aktivitelerinde düşüşle sonuçlanmıştır (Akhond ve diğerleri, 2016; Sohrabi, Rasouli ve Torkzadeh, 2014). Bunun sebebi GA stabilitesinin zamanla azalması ve/veya manyetik partiküller üzerine bağlı GA fonksiyonel grubunun sayısının artmasının sonucu olarak ortaya çıkan sterik etki ile immobilize alfa amilazın aktivitesinin kısıtlanması olabilir (Pan, ve diğerleri, 2009; Eslamipour & Hejazi, 2015)



Şekil 5.18. GA konsantrasyonunun bağlanan protein miktarına ve bağlı enzim aktivitesine etkisi

Şekil 5.18. değişen GA konsantrasyonunun bağlanan protein miktarına ve bağlı enzim aktivitesine etkisini göstermektedir. GA konsantrasyonu %0,5 v/v iken, enzim immobilizasyonu için MNP'ler üzerine yeterli aldehit grubunun bağlanamadığından bağlı aktivite düşüktür. Bununla birlikte optimum değer olan %3 v/v GA'nın üzerindeki GA konsantrasyonunda da bağlı enzim aktivitesi düşüktür, bu GA konsantrasyonu alfa amilazın konformasyonunda değişime neden olmuş olabilir.

Ayrıca %3 v/v GA'nın üzerinde immobilize enzim aktivitesi ve bağlanan protein miktarında görülen keskin düşmenin nedeni, GA'nın reaktif uç grupları arasında oluşan çapraz bağlanma sonucunda enzim bağlanması için gerekli reaktif grupların azalması olabilir.

5.2.2.3. *İmmobilizasyon pH'nın immobilizasyon verimine ve spesifik aktiviteye etkisi*

%3 GA ile aktive edilmiş partiküller üzerine alfa amilaz immobilizasyonunda değişen pH'nın etkisini görebilmek için immobilizasyon işlemi pH 4 ve pH 6'da yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.8.'da listelenmiştir.

Tablo 5.8. %3GA konsantrasyonunda pH'in bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkisi

pH	GA (%)	Partikül	Bağlanan Protein (%)	Enzim Aktivitesi (U)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Bağlı Aktivite (%)
4	-	Serbest Enzim	100 (0,64*)	14,83	23,02	100
		Çıplak	27,46	0,91	5,15	22,37
	3	%0,5 Agar-Kaplı	25,88	0,99	5,62	24,41
		%1 Agar-Kaplı	13,64	1,04	11,89	51,65
6	-	Serbest Enzim	100 (0,96*)	21,48	22,32	100
		Çıplak	24,02	0,38	1,65	7,39
	3	%0,5 Agar-Kaplı	12,78	1,41	11,46	51,34
		%1 Agar-Kaplı	12,16	1,48	12,67	56,77
8	-	Serbest Enzim	100 (0,41*)	26,39	64,83	100
		Çıplak	14,55	7,12	120,18	185,37
	3	%0,5 Agar-Kaplı	8,99	9,71	265,23	409,12
		%1 Agar-Kaplı	6,84	12,04	432,16	666,60

*serbest enzim içeriğindeki protein miktarı (mg protein)

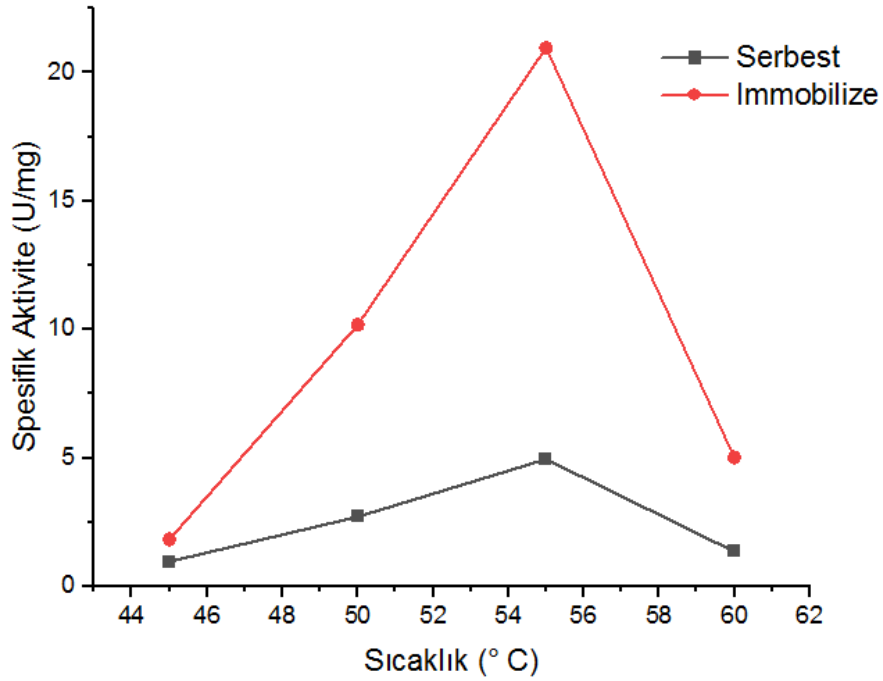
%3GA v/v konsantrasyonu ile aktive edilen manyetik nanopartiküllerin üzerine farklı pH'larda alfa amilaz immobilizasyonu çalışıldı. Bağlanan protein miktarlarına bakıldığında en verimli immobilizasyonun pH 4'te olduğu görülmektedir. Ancak spesifik aktivite değerleri incelendiğinde spesifik aktivite değerleri pH 8 de görülmüştür.

Partiküller üzerine enzim immobilizasyonun verimi partikül yüzeyindeki kaplama malzemesinin konsantrasyonuyla ters orantılıdır. Kaplama malzemesi konsantrasyonunun artışı bağlanan protein miktarlarını düşürmüştür. En yüksek immobilizasyon verimleri çıplak manyetik nanopartiküller için görülürken en düşük verimin %1Agar-Kaplı manyetik nanopartiküllerde olduğu gözlenmiştir. Buna rağmen nişasta çözeltisi üzerinde yapılan aktivite tayinlerinde %1Agar-Kaplı manyetik nanopartiküller en yüksek aktiviteyi gösteren partiküller olmuşlardır.

Sıcaklık stabilitesi, pH stabilitesi, çoklu kullanım (işlemsel stabilite) ve saklama stabilitesi gibi deneylerde %1Agar-Kaplı manyetik nanopartikül üzerine immobilize edilen alfa amilaz kullanılmıştır.

Sıcaklık değişimleri karşısındaki enzim davranışlarını görebilmek için 45 – 50 – 55- 60 ° C sıcaklıklarda pH 4,50'ta serbest ve immobilize enzim için aktivite deneyleri yapılmıştır.

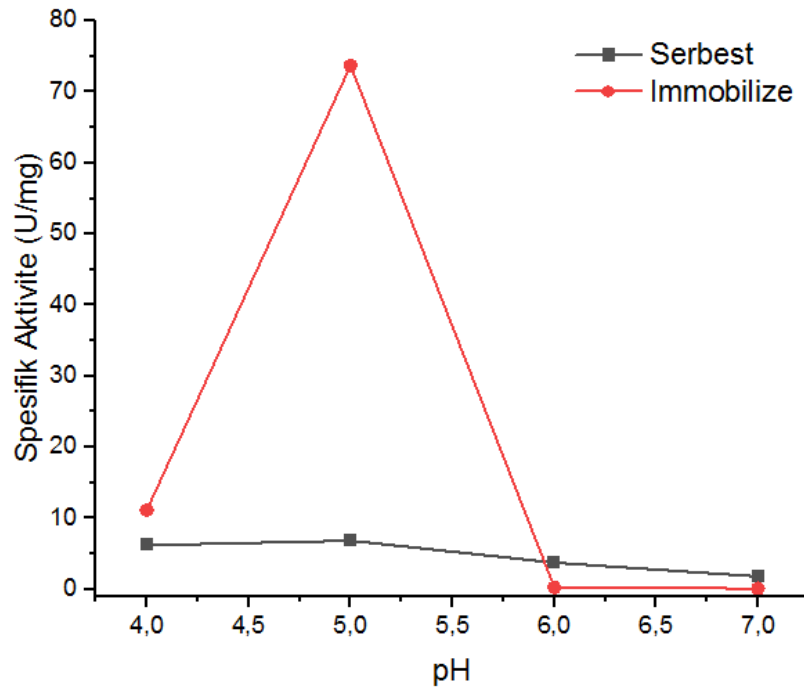
5.2.3. Serbest ve immobilize enzimin termal ve pH stabilitesi



Şekil 5.19. Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı (pH 4,50)

Küflerden izole edilen fungal α -amilazlar sıcaklığa bakteriyel kaynaklı α -amilazlardan daha az dirençli ve daha az stabildir (Wolfgang, 2007). Yapılan deneyler sonucunda en yüksek spesifik aktivite serbest ve immobilize enzim için de 55°C gözlenmiştir. İmmobilizasyon işleminin sıcaklık optimumu değiştirmedeği ancak enzim aktivitesinin 4 kat yükselmesini ve korumasını sağladığı görülmektedir.

Enzimin multipoint immobilizasyonu sonucu, rijid yapı elde edilmektedir ve enzimin hareketliliği kısıtlanmaktadır. Bu durumun konformasyonel değişimi engelleyerek enzimin stabilitesini artırdığı ve yüksek sıcaklıklarda denatürasyona karşı daha dirençli olduğu belirtilmiştir (Wang, Jiang, Li, X., & Hou, 2015).

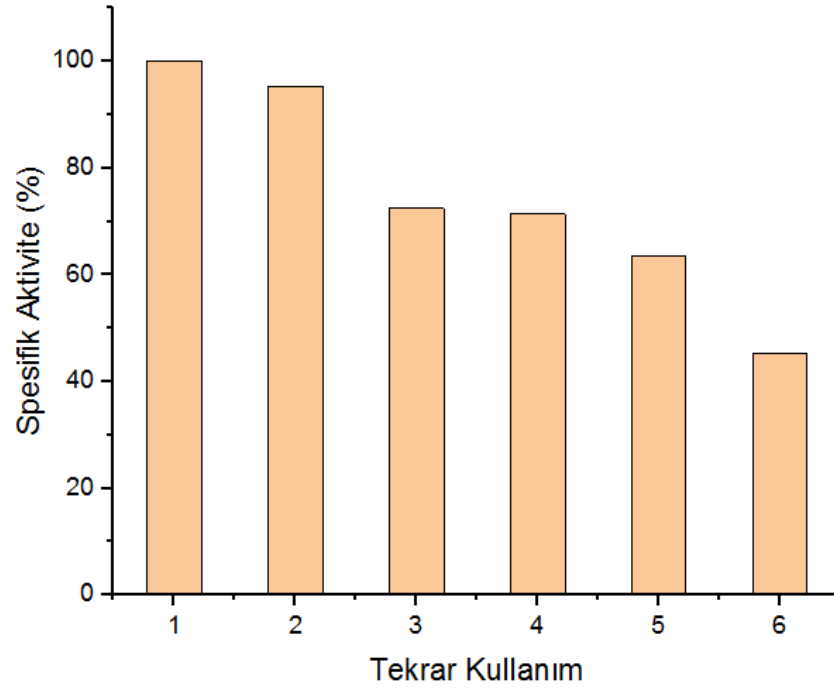


Şekil 5.20. Serbest ve immobilize enzimin pH kararlılığı (55°C)

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlerle karşılaştırıldığında pH kararlılığının daha fazla olması beklenir.

5.2.4. İmmobilize enzimin işlemsel stabilitesi (çoklu kullanım)

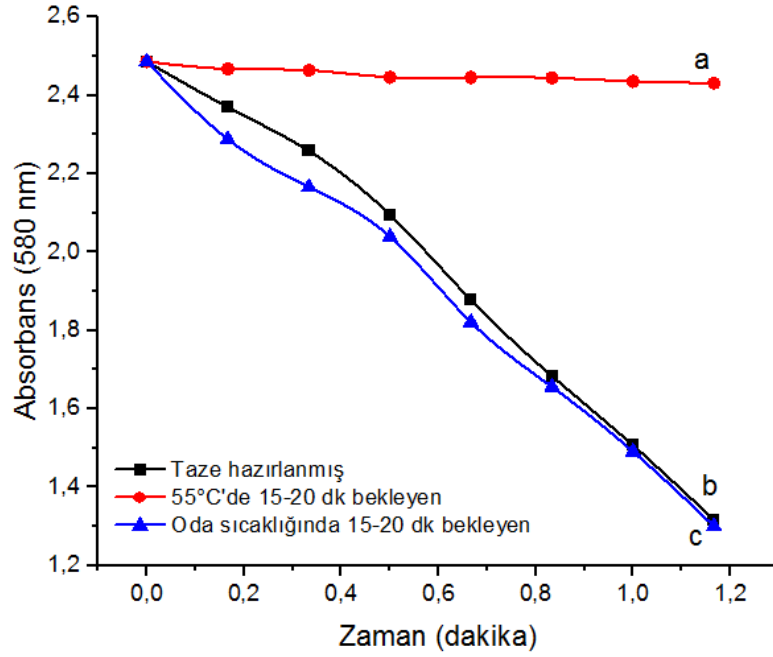
İmmobilize enzimlerin en büyük avantajlarından biri de tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Alfa amilaz manyetik özellikli nanopartiküller üzerine immobilize edildiğinden bir mıknatıs yardımıyla çözelti içerisinde kolaylıkla çıkarılabilmektedir. Önceki deneylerde en yüksek spesifik aktivite değerinin saptandığı %1 Agar-Kaplı manyetik nanopartiküller üzerine immobilize edilen alfa amilaz için çoklu kullanımda spesifik aktivitesinde meydana gelen değişimler incelenmiştir (Şekil 5.22.).



Şekil 5.21. *İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği (55°C’de, pH 4,50)*

İmmobilize alfa amilaz 6. kullanım sonunda spesifik aktivitesinin yaklaşık %55’ini korumuştur. Spesifik aktivitede meydana gelen kayıp manyetik izolasyon sırasında partiküllerin agrege olmasından veya protein denatürasyonundan kaynaklanabilir. Bu sonuç immobilize alfa amilazın işlemsel kararlılığının olduğunu ve tekrar tekrar kullanılabilirliğini göstermiştir.

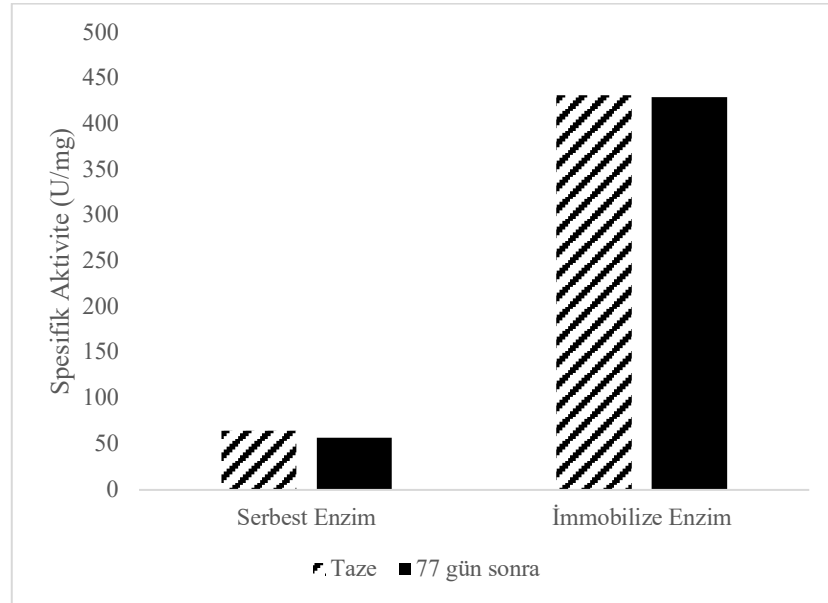
Serbest enzim için yapılan stabilite çalışmasında, yeni hazırlanan enzim solüsyonu, oda sıcaklığında ve 55°C’de 15-20 dakika süreyle bekletilen serbest enzimlerin aktiviteleri incelendi (Şekil 5.23.). Görüldüğü üzere, 15-20 dakika 55°C’de bekletilen enzim örneğinde hiç aktivite gözlenmez iken, oda sıcaklığı ve taze hazırlanmış solüsyonların aktiviteleri aynı çıkmaktadır. Ön çalışmalarda, başlangıç reaksiyon hızlarına göre optimum sıcaklık 55°C olarak belirlenmesine rağmen, buradaki sonuçlar uzun süreli yüksek sıcaklığa maruz kalma, serbest enzimin üzerinde olumsuz etkisi olduğu ve aktiviteyi tamamen yok ettiği ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple, serbest enzimin tekrar kullanım deneylerinde ikinci kullanımda veya sonrasında aktivite göstermeyeceği düşünülmektedir.



Şekil 5.22. Farklı serbest enzim çözeltilerinin zamana karşı nişasta derişimde meydana gelen değışimi; a) 15-20 dk 55°C'ye maruz kalma, b) taze hazırlanmış, c) oda sıcaklığında bekletilmiş solüsyon

5.2.5. Serbest ve immobilize enzimin saklama stabilitesi

Serbest enzim ve %1Agar-Kaplı manyetik nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş enzimin saklama stabiliteelerini değerlendirmek için taze hazırlanmış enzim çözeltilisi, yeni immobilize edilmiş enzimler ve bunların 77 gün süreyle +4°C' de bekletilen paralelleriyle aktivite tayinleri yapılmıştır.



Şekil 5.23. Taze hazırlanmış ve 77 gün süreyle bekletilmiş serbest ve immobilize enzim çözeltilerinin spesifik aktivitesi

Taze hazırlanan pH 8 alfa amilaz enzim çözeltisinin spesifik aktivite değeri 64.83 U/mg olarak bulunmuştur. 77 gün sonra yapılan aktivite tayinlerinde bu değerin 57,27 U/mg'a düştüğü görülmüştür. Bununla birlikte yeni immobilize edilmiş alfa amilazın aktivite tayinlerinde spesifik aktivitesi 432,16 U/mg olarak hesaplanmış ve bu değerin 77 gün sonra yapılan değerlendirmeler sonucunda çok az bir düşüşle 429,83 U/mg olduğu gözlenmiştir. Enzimin saklama stabilitesi, biyosensörler ve biyosentez gibi endüstriyel uygulamalarda kullanım için oldukça önemli olduğundan (Cumana, Simons, Liese, Hilterhaus, & Smirnova, 2013), geliştirilen bu fonksiyonel destek maddesiyle, alfa amilazın geniş uygulama potansiyeli olduğu ortaya konmuştur. Önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlar Tablo 5.9.'da listelenmiştir.

Tablo 5.9. Mevcut çalışmadaki immobilize α -amilazın özelliklerinin önceki çalışmalar ile karşılaştırılması

α -amilaz	pH opt.	T opt. (°C)	Saklama sonrası korunan spesifik aktivite (%)	Referans
Serbest	6,5	30	15 gün sonra tamamını kaybetti	(Sheldon,1993)
Halkalı karbonat yatağında hibrit malzemeye immobilize edilmiş	6,5	30	25 gün sonra %70	(Sheldon,1993)
Serbest	6,5	30	15 gün sonra tamamını kaybetti	(Gupta vd, 2003)
İşlevselleştirilmiş cam boncuklara immobilize edilmiş	5,5	50	25 gün sonra %80	(Gupta vd, 2003)
Serbest	6,2	40	12 gün sonra %40	(Pandey vd,2000)
Na-bentonit üzerine immobilize edilmiş	6,2	60	12 gün sonra %35	(Pandey vd,2000)
Serbest	4,5	55	77 gün sonra %88	Bu çalışma
%1 w/v Agar kaplı, %3GA ile aktive edilmiş manyetik nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş	4,5	55	77 gün sonra %99	Bu çalışma

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, ikili çöktürme yöntemiyle manyetik nanopartiküller sentezlenmiş ve farklı konsantrasyonlarda çeşitli polisakkaritlerle kaplanarak enzim immobilizasyonu için kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında ikili çöktürme yöntemi kullanılarak çıplak, %0,5 w/v- agar-, pektin-CMC- kaplı ve %1 w/v- agar-, pektin-, CMC- kaplı manyetik nanopartiküller sentezlenmiştir. Oda sıcaklığında ve azot gazı altında sentezlenen partiküller FTIR, XRD, TGA, SEM ve VSM yöntemleriyle karakterize edilmiştir.

Sentezlenen partiküllerin istenilen polisakkaritlerle kaplandığı FTIR spektrumlarıyla doğrulanmıştır. Daha sonra yapılan TGA analizi ile partikül yüzeyindeki polimer yapının yüzdeleri hesaplanmıştır. XRD analizleri sonucunda elde edilen difraktogramlar literatürdeki verilerle karşılaştırılmış ve sentezlenen partiküllere ait difraktogramların literatürle uyumlu olduğu görülmüştür. Elde edilen karakteristik pikler ile partiküllerin Fe_3O_4 ve kübik spinel yapıda olduğu kanıtlanmıştır. Karakteristik piklerin yüzey aktif maddelerle kaplı manyetik nanopartiküllerde de görülmesi yapılan modifikasyon işlemlerinin partikülün kristal yapısını değiştirmedığını, bununla birlikte difraktogramlarda karakteristik pikler haricinde herhangi bir pik varlığının olmaması sentezlenen partiküllerde istenmeyen ve manyetik olmayan safsızlıklar olmadığını göstermiştir. Bu karakteristik piklerden yola çıkılarak Debye Scherrer denklemi ile partiküller için tanecik boyutları hesaplanmıştır. SEM görüntüleri ile partikül yüzeyinde meydana gelen değişimler gösterilmiştir. Partiküllerin manyetik davranışlarını incelemek için VSM analizi yapılmış ve elde edilen histeresis eğrileri doğrultusunda partiküllerin süperparamanyetik (dış manyetik alan ortadan kaldırıldığında manyetik özelliğin kaybolması) davranış sergilediği görülmüştür. Partikül yüzeyindeki kaplama malzemesi konsantrasyonu arttıkça manyetik doygunluk değerleri düşmüştür.

Çalışmanın ikinci aşamasında sentezlenen bu partiküllerde çıplak, %0,5- %1 w/v agar kaplı manyetik nanopartiküller üzerine alfa amilaz immobilizasyonu çalışılmıştır. İmmobilizasyon çalışmaları kapsamında yüzey kaplama malzemesinin konsantrasyonu, sonikasyon, immobilizasyon pH'ı, immobilizasyon süresi, immobilizasyon yöntemi gibi parametrelerin bağlanan protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye olan etkileri incelenmiştir. İmmobilizasyon çalışmaları adsorpsiyon ve kovalent bağlama olarak iki yöntem üzerinden yapılmıştır. Partiküller üzerine immobilize edilen enzim

miktarları Bradford analizi ile hesaplanmış ve immobilize enzimlerin aktivitesi nişasta substrat olarak kullanılarak nişasta-iyodin metoduyla tayin edilmiştir.

İmmobilizasyon çalışmaları sırasında sonikasyon işlemi uygulanmayan çıplak manyetik nanopartiküller %53,10 protein bağlandığı, immobilizasyon esnasında sonikasyon işlemi uygulandığında bu oranın %53,95 olduğu görülmüştür. %0,5 w/v agar kaplı manyetik nanopartiküllerle immobilizasyon işlemi tekrarlandığında sonikasyon uygulanmayan partiküllere %65,61 protein bağlanırken sonikasyon işlemi uygulandığında bu oran %44,71'e düşmüştür. Sonikasyon işleminin immobilizasyona olumlu etkisi olduğu görülmediğinden immobilizasyon işlemleri sonikasyon olmadan devam etmiştir. Farklı pH (3 - 4- 5- 6- 7) ortamlarında adsorpsiyon ile immobilizasyon işlemi yapılmış pH 3 ortamında proteinlerin %99,89'unun bağlandığı görülmüştür. Ancak bağlanan proteinlerin aktivite tayinlerinde mutlak aktivitenin çok düşük olduğu ve bağlanan proteinlerin nispeten çalışmadığı belirlenmiştir. Enzim immobilizasyonunda asıl amaç, enzimlerin defalarca ve en verimli şekilde kullanılması olduğundan bağlanan protein miktarından ziyade yüksek spesifik aktiviteye sahip olan manyetik partiküller elde etmek amaçlanmıştır. Bu sebeple yüksek spesifik aktivite gösteren pH 4 ve pH 5 ortamında yapılan immobilizasyon işlemleriyle devam edilmiştir. İmmobilizasyon süresinin bağlanan protein miktarına ve enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi amacıyla pH 4 ve pH 5 ortamında yapılan immobilizasyon işlemlerinde farklı bekleme süreleri (0.5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 saat) çalışılmıştır. Uzun immobilizasyon sürelerinde bağlanan protein miktarının fazla olduğu görülse de destek materyali üzerine daha fazla protein immobilizasyonu sonucunda substratın enzimin aktif bölgesine ulaşmasını kısıtlamasından dolayı bu partiküllerin bağıl aktivite değerleri diğer partiküllerle kıyaslandığında oldukça düşük olduğu görülmüştür.

Adsorpsiyon ile alfa amilaz immobilizasyonu sonrasında yapılan enzim aktivitesi tayinlerinde partiküller mıknaşsı yardımıyla solüsyon içerisinde alınmasına rağmen nişasta hidrolizinin devam ettiği saptanmıştır. Partiküller üzerine immobilize olan enzimin stabil olmadığı ve enzim kaçığı yaşanması sebebiyle immobilizasyon metodu olarak kovalent bağlama yöntemi denenmiştir.

Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu için partiküller farklı konsantrasyonlarda (%0,5; %1; %3; %5 v/v) gluteraldehit ile aktive edilmiştir. GA konsantrasyonu sabit tutularak (%0,5 v/v) partiküller üzerine farklı pHlarda (4-5-6-7-8) immobilizasyon çalışmaları yapılmış ve değişen immobilizasyon pH'ının bağlanan

protein miktarına, enzim aktivitesine ve spesifik aktiviteye etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda pH 8’de yapılan immobilizasyon işlemlerinde %0,5GA ile aktifleştirilmiş %1Agar-Kaplı MNP’lerde bağlanan protein miktarı diğer parametrelerdeki partiküllerle karşılaştırıldığında %5,25 gibi düşük bir oranda olmasına rağmen spesifik aktivite oranının en yüksek olduğu partikül olarak belirlenmiştir. Daha sonra GA konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla immobilizasyon pH’ı sabit (pH 8) tutularak farklı GA konsantrasyonlarda immobilizasyon verimi, enzim aktivitesi, spesifik aktivite tayinleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda ise bağlanan protein miktarı diğer partiküllerle karşılaştırıldığında düşük olmasına rağmen partiküllerin rölatif aktivitesinin en yüksek değeri %3GA ile aktive edilmiş %1Agar-Kaplı MNP’lerde saptanmıştır. %3GA ile aktive edilmiş partiküller için pH 4 ve 6’ da immobilizasyon çalışmaları yapılmış ancak bağlanan protein miktarı artmasına rağmen spesifik aktivite değeri olarak daha yüksek bir sonuç elde edilememiştir. Yapılacak diğer çalışmalar için en yüksek spesifik aktiviteye sahip olan %3GA%1Agar-Kaplı MNP’ler kullanılmıştır.

İmmobilize ve serbest enzimler için termal stabilite, pH stabilitesi ve saklama stabilitesi incelenmiştir. İmmobilize ve serbest enzim için farklı sıcaklıklarda ve pH 4,50 ortamında yapılan aktivite tayinlerinde her iki enzim için de en yüksek spesifik aktivitenin 55°C’de olduğu görülmüştür. İmmobilizasyon işleminin sıcaklık optimumunu değiştirmedeği ancak enzim aktivitesinin 4 kat yükselmesini ve korunmasını sağladığı görülmüştür. İmmobilize ve serbest enzimin saklama stabilitesini belirlemek amacıyla taze hazırlanmış ve 77 gün süreyle +4°C’ de bekletilmiş immobilize ve serbest enzimlerle aktivite tayinleri yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda taze hazırlanan pH 8 alfa amilaz enzim çözeltisinin spesifik aktivite değeri 64,83 U/mg olarak bulunmuş ve 77 gün sonra yapılan aktivite tayinlerinde bu değer 57,27 U/mg’a düştüğü görülmüştür. Bununla birlikte yeni immobilize edilmiş alfa amilazın aktivite tayinlerinde spesifik aktivitesi 432,16 U/mg olarak hesaplanmış ve bu değer 77 gün sonra yapılan değerlendirmeler sonucunda çok az bir düşüşle 429,83 U/mg olduğu gözlenmiştir. İmmobilize edilen enzimler serbest enzimlere kıyasla aktivitelerini büyük oranda korumuşlardır.

İmmobilize enzimlerin en büyük avantajlarından biri de enzimlerin tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Manyetik partiküller üzerine immobilize edilen alfa amilazın çoklu kullanım sonucunda enzim aktivitesinde meydana gelen değişimin gözlenmesi amacıyla partiküller mıknatıs yardımıyla nişasta çözeltisinden toplanarak tekrar tekrar nişasta

ortamına koyulmuş ve aktiviteleri incelenmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda immobilize enzimler 6.kullanım sonunda spesifik aktivitelerinin %55'ini korumuşlardır. Bu sonuç enzimin aktivitesinde gözle görünür bir fark olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilirliğini göstermektedir.



KAYNAKÇA

- Adriano, W., Mendonça, D., Rodrigues, D., Mammarella, E., & Giordano, R. (2005). Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 8, 2170-2179.
- Agostiano, A., Curri, M., Della, M., Manna, L., Vasanelli, L., & Catalano, M. (2000). Synthesis and structural characterisation of CdS nanoparticles prepared in a four-components "water-in-oil" microemulsion. *Micron* 31 , 253-258.
- Akbarzadeh, A., Samiei, M., & Davaran, S. (2012). Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters* , 144.
- Akhond, M., Pashangeh, K., Karbalaei-Heidari, H.R., Absalan, G. (2016). Efficient Immobilization of Porcine Pancreatic α -amylase on Amino-Functionalized Magnetic Nanoparticles: Characterization and Stability Evaluation of the Immobilized Enzyme. *Appl. Biochem. Biotechnol* 180, 954-968.
- Ansari, A., & Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotech Adv*, 512-523.
- Ansari, S., Ruffinatti, E. F., Stura, I., Argenziano, M., & Abollino, O. (2019). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the central Nervous System. *Materials* 12, 465.
- Arica, Y., Bayramoglu, G., & Yilmaz, M. (2004). Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. *Food Chemistry*, 84:, 591- 599.
- Attallah, O., Al-ghobashy, M., & Nebsen, M. (2018). Assessment of pectin-coated magnetite nanoparticles in lowenergy water desalination applications. *Environ Sci Pollut Res* 25, 18476–18483.
- Baby, T., & Ramaprabhu, S. (2010). SiO₂ coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticle dispersed multiwalled carbon nanotubes based amperometric glucose biosensor. *Talanta*, 2016–2022.

- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R., & Lafuente, F. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *Royal Society of Chemistry Advances*, vol. 4, 1583-1600.
- Barnakov, Y., Yu, M., & Rosenzweig, Z. (2005). Manipulation of the magnetic properties of magnetite-silica nanocomposite materials by controlled stober synthesis. *Langmuir : The ACS Journal Of Surfaces And Colloids*, 7524-7527.
- Bernfeld, P., & Wan, J. (1963). Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattices of synthetic polymers. *Science* 142, 678-679.
- Bickerstaff, G. (1997). Immobilization of enzymes and cells. *Methods in Biotechnology*, vol. 1, 1-11 .
- Bickerstaff, G. (1997). *Immobilization of Enzymes and Cells*. New Jersey: Humana Press.
- Biehl, P., Lühe, M. V., Dutz, S., & Schacher, F. (2018). Synthesis, Characterization, and Applications of Magnetic Nanoparticles Featuring Polyzwitterionic Coatings. *Polymers*, 91.
- Boyer, R. (2006). *Concepts in Biochemistry*. New Jersey : John Wiley & Sons.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. *Analytical Biochemistry*, 248-254.
- Brena, B., & Batista-Viera, F. (2006). Immobilization of Enzymes. J. Guisan içinde, *In Immobilization of Enzymes and Cells (15-30)* (s. 450). New York: Springer.
- Brena, B., & Viera, B. (2006). *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. New Jersey: Humana Press.
- Brown, H. (2013). *Introduction to Organic and Biochemistry*. California: Brooks/Cole Publishing Company.
- Bullock, C. (1995). Immobilised enzymes. *Science Progress*, 119-134.
- Cabirol, F. L., Tan, P. L., Tay, B., Cheng, S., Hanefeld, U., & Sheldon, R. (2008). Linum usitatissimum Hydroxynitrile Lyase Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Recyclable Enantioselective Catalyst . *Adv. Synth. Catal.*, 2329-2338.

- Cabral, J., & Kennedy, J. (1991). Covalent and coordination immobilization of proteins. R. Taylor içinde, *Protein immobilization: Fundamentals and applications* (s. 73-138). New York: Marcel Dekker.
- Cao, L., & L. Van Langen, R. S. (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier free? *Curr Opin Biotechnology*, 387-394.
- Chen, D., & Liao, M. (2002). Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 16, no. 5-6, 283-291.
- Chin, A., & Yaacob, I. (2007). Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure. *J Mater Process Technol.* 191, 235–237.
- Cuenya, B. R. (2010). Synthesis and Catalytic Properties of Metal Nanoparticles: Size, Shape, Support, Composition, and Oxidation State Effects. *Thin Solid Films* 518, 3127–3150.
- Cumana, S., Simons, J., Liese, A., Hilterhaus, L., & Smirnova, I. (2013). Immobilization of Glucose 6-phosphate dehydrogenase in silica-based hydrogels: A comparative study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 220-228.
- D'Souza, S. (1999). Immobilized enzyme in bioprocess. *Current Science*, vol. 77, no. 1,, 69-79.
- DeCastro, C., & B.S. M, t. (2002). Nanoparticles from Mechanical Attrition. M. Baraton içinde, *Synthesis, Functionalization and Surface Treatment of Nanoparticles* (s. 1-14). Valencia,CA: American Scientific Publishers.
- Diaz-Hernandez, A., Gracida, J., Garcia-Almendarez, B. E., Regalado, C., Nunez, R., & Amaro-Rves, A. (2018). Characterization of Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan: A Potaential Approach for Enzyme Immobilization. *Journal of Nanomaterials*, 11.
- Dinelli, D., Marconi, W., & Morisi, F. (1976). Fiberentrapped enzymes. K. Mosbach içinde, *Methods in enzymology* (s. 227-243). New York: Academic Press.

- Duan, M., Shapter, J., Qi, W., Yang, S., & Gao, G. (2018). Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Applications. *Nanotechnology* 29.
- Effenberger, F., Couto, R., Kiyohara, P., Machado, G., Masunaga, S., & Jardim, R. (2017). Economically Attractive Route for the Preparation of High Quality Magnetic Nanoparticles by the thermal Decomposition of Iron(III) Acetylacetonate. *Nanotechnology* 28.
- Eivari, H., Rahdar, A., & Arabi, H. (2012). Preparation of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Investigation their Magnetic Properties. *International Journal of Science and Engineering Investigations*, 1, 70–72.
- Elektrik, Manyetik ve Optik Özellikler Ölçüm Laboratuvarı (EMOL)*. (2021, Aralık 25). ODTU Merkezi Laboratuvar : <https://merlab.metu.edu.tr/tr/elektrik-manyetik-ve-optik-ozellikler-olcum-laboratuvari-emol> adresinden alındı
- El-Eskandarany, M. (2001). *Mechanical Alloying: For Fabrication of Advanced Engineering Materials*. William Andrew Publishing.
- Eslamipour, F., & Hejazi, P. (2015). Effects of Surface Modification and Activation of MAGnetic nanoparticles on the Formation of Amylase Immobilization Bondsunder Different Ionic Strength Conditions . *Journal if Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 119, 1-11.
- Faraji, M., Yamini, Y., & Rezaee, M. (2010). Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. *J Iran Chem Soc.* 7, 1–37.
- Faraji, M., Yamini, Y., & Rezaee, M. (2010). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications. *Jics* 7, 1–37.
- Fecht, H., Hellstern, E., Fu, Z., & Johnson, W. (1990). Nanocrystalline Metals Prepared by High-Energy ball Milling. *Metall Trans A*, 2333-2337.
- Feng, J., Yu, S., Li, J., Moa, 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.

- Feng, W., & Ji, P. (2011). Enzyme immobilized on carbon nanotubes. *Biotech Adv*, 889-895.
- Fennema, O. R. (1985). *Food Chemistry*. New York: Marcel Decker Inc.
- Foner, S. (1959). Versatile and sensitive vibrating sample magnetometer. *Review of Scientific Instruments*, vol. 30, no. 358,, 548.
- Funtes, I., Viseras, C., Ubiali, D., Terreni, M., & Alcantara, A. (2001). Different phyllosilicates as supports for lipase immobilisation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 657-663.
- Gemeiner, P. (1992). Materials for enzyme engineering. P. Gemeiner içinde, *Enzyme Engineering* (s. 13-119). New York: Ellis Horwood.
- Gong, J., Wang, X., Zeng, G., Chen, L., Deng, J., Zhang, X., & Niu, Q. (2012). Copper (II) removal by pectin– iron oxide magnetic nano-composite adsorbent. *Chem Eng J*, 185-186, 100–107.
- Granger, M., Abadie, B., & Marchis-Mouren, G. (1975). Limited Action of Trypsin on Porcine Pancreatic Amylase: Characterization of the fragments. *FEBS Lett*, 56, 189.
- Grass, R., Athanassiou, E., & Stark, W. (2007). Covalently functionalized cobalt nanoparticles as a platform for inexpensive magnetic separations in organic synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, no. 26, 4909-4912.
- Gul, S., Khan, S. B., Rehman, I. U., Khan, M., & Khan, M. (2019). A Comprehensive Review of Magnetic Nanomaterials Modern Day Theranostics. *Front. Mater.* 6, 179.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Gasunami, V.K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, *Process. Biochem.* 38, 1599-1616.
- Habeeb, A., & Hiramoto, R. (1968). Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 126, no. 1, 16-26.
- Hasany, S., Ahmed, I., Rajan, J., & Rehman, A. (2012). Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. *Nanosci. Nanotechnol.* 2, 148–158.

- HITACHI Hightech: Technical Explanation*. (2021, 12 25). HITACHI Hightech: https://www.hitachi-hightech.com/global/sinews/technical_explanation/07071/adresinden_alindi
- Hofstee, B. (1973). Immobilization of enzymes through non-covalent binding to substituted agaroses. *Biochemizal and Biophysical Research Communications* , 1137-1144.
- Horváth, L., Magrez, A., Golberg, D., Zhi, C., Bando, Y., Smajda, R., . . . Schwaller, B. (2011). In vitro investigation of the cellular toxicity of boron nitride nanotubes. *ACS Nano*., 3800-3810.
- Hsieh, H., Liu, P., & Liao, W. (2000). Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnology Letters*(22), 1459-1464.
- Huang, S., & Juang, R. (2011). Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles : a review. *Journal of Nanoparticle Research*, 4411-4430.
- Indira, T., & Lakshmi, P. (2010). Magnetic Nanoparticles—A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnology* 3, 1035–1042.
- Inouye, K., Endo, R., Otsuka, Y., Miyashiro, K., Kaneko, K., & Ishikawa, T. (1982). Oxygenation of ferrous ions in reversed micelle and reversed microemulsion. *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 86, no.8, 1465-1469.
- Ispas, C., Sokolov, I., & Andreescu, S. (2009). Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*(393), 543-554.
- Jafarizadeh-Malmiri, H., Ghaz-Jahanian, M., & Berenjian, A. (2012). Potential applications of chitosan nanoparticles as novel supports in enzyme immobilization. *Am J Biochem Biotechnol* 8, 203–219.
- Jiang, D., Long, S., Huang, J., Xiao, H., & Zhou, J. (2005). Immobilization of Pycnporous sanguineus laccase on magnetic chitosan microspheres. *Biochem Eng.*,25, 15-23.

- Jin, B., Leeuwen, J. V., & Patel, B. (1999). Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Process Biochem.*, 34:, 335-340.
- Johannes, T., Simurdiak, M., & Zhao, H. (2006). *Encyclopedia of Chemical Processing*. New York: Taylor and Francis.
- Kalkan, N., Aksoy, E., & Hasirci, N. (2012). Preparation of Chitosan Coated Magnetite Nanoparticles and Application for Immobilization of Laccase . *Journal of Applied Polymer Sciences*, 707-716.
- Katchalski-Katzir, E. (1993). Immobilized enzymes: learning from past, successes and failures. *Trends Biotechnology*, 471-478.
- Khan, A., & Alzohairy, A. (2010). Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. *Res J Biol Sci*, 565-575.
- Kim, J., Grate, J., & Wang, P. (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem Eng Sci*, 1017-1026.
- Kim, J., Grate, J., & Wang, P. (2008). Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends Biotechnology*, 639-646.
- Kim, J., Grate, J., & Wang, P. (2008). Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends in Biotechnology*, vol.26, no.11, 639-646.
- Komeili, A. (2012). Molecular Mechanisms of Compartmentalization and Biomineralization in Magnetotactic Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 232–255.
- Konwarh, R., Karak, N., Rai, S., & Mukherjee, A. (2009). Polymer-Assisted Iron Oxide Magnetic Nanoparticle Immobilized Keratinase. *Nanotechnology*, 225-235.
- Koolman, J., & Roehm, K. (2005). *Color Atlas of Biochemistry*. New York.
- Krishna, S. H. (2002). Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnology Advances*, 239-267.
- Kudr, J., Haddad, Y., Richtera, L., Heger, Z., Cernak, M., & Adam, V. (2017). Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications. *Nanomaterials* 7, 243.

- Kumar, V. S. (2013). Magnetic Nanoparticles-Based Biomedical and Bioanalytical Applications. *J. Nanomed. Nanotechol.* 4.
- Kuo, C., Liu, Y., Chang, C., Chen, J., Chang, C., & Shieh, C. (2012). Optimum Conditions for Lipase Immobilization on Chitosan-Coated Fe₃O₄ Nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 2538-2545.
- Lee, H., Lee, E., Kim, D., Jang, N., Jeong, Y., & Jon, S. (2006). Antibiofouling polymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 7383–7389.
- Liang, S., Guo, X., Feng, N., & Tian, Q. (2010). Isotherms, kinetics and thermodynamic studies of adsorption of Cu²⁺ from aqueous solutions by Mg²⁺/K⁺ type orange peel adsorbents. *J Hazard Mater* 174(1–3), 756–762.
- Liu, H., Ko, S., Wu, J., Jung, M., Min, J., Lee, J., . . . Kim, Y. (2007). One-pot polyol synthesis of monosize PVP-coated sub-5 nm Fe₃O₄ nanoparticles for biomedical applications. *J. Magn. Magn. Mater.* , 815–817.
- Liu, J., Zhao, Z., & Jiang, G. (2008). Coating Fe₃O₄ magnetic nanoparticles with humic acid for high efficient removal of heavy metals in water. *Environ Sci Technol* 42(18), 6949–6954.
- Lonsane, B., & Ramesh. (1990). Production of bacterial thermostable α-amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. *Advances in applied microbiology*, vol. 35, 1-56.
- Lu, A.-H., Salabas, E., & Schüth, F. (2007). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 1222–1244.
- Manonmani, H., & Kunhi, A. (1999). Interference of thiol-compounds with dextrinizing activity assay of α-amylase by starch-iodine colour reaction: Modification of the method to eliminate this interference. *World J Microbiol Biotechnol* , 485.

- Mateo, C., Palomo, J., Langen, L. V., & Rantwiik, F. A. (2003). Mid Cross-Linking Methodology to prepare Crosslinked Enzyme Aggregates. *Biotechnology and Bioengineering*, 273-276.
- Mateo, C., Palomo, J., Lorente, G., Guisan, J., & Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity and stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 1451-1463.
- Mohamed, A. E.-M., & Mohamed, M. (2019). Nanoparticles: Magnetism and Applications. *Magnetic Nanostructures*, 1–12.
- Moss, G. P., & Webb, E. C. (2001, August 15). Enzyme nomenclature. Londra, İngiltere.
- Muralikrishna, G., & Nirmala, M. (2005). Cereal α -amylases—an overview. *Carbohydrate Polymers*, 60, 163–173.
- Namanga, J., Foba, J., Ndinteh, D. T., Yufanyi, D. M., & Krause, R. W. (2013). Synthesis and Magnetic Properties of a Superparamagnetic Nanocomposite “Pectin-Magnetite Nanocomposite”. *Journal of Nanomaterials*, 87-95.
- Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological Synthesis of Metal Nanoparticles by Microbes. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 156, 1–13.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W. H. Freeman & Co.
- O'Driscoll, K. (1976). Techniques of enzymes entrapment in gels. K. Mosbach içinde, *Methods in Enzymology* (s. 169-183). New York: Academic Press.
- Pan, C., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Ye, H., & Zeng, X. (2009). Novel and Efficient Method for Immobilization and Stabilization of B-D-galactosidase by covalent Attachment onto Magnetic Fe₃O₄-Chitosan Nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 61, 208-215.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Soccol, V., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 135-152.
- Panteghini, M., Ceriotti, F., Pagani, F., Secchiero, S., Zaninotto, M., & Franzini, C. (2002). Recommendations for the routine use of pancreatic amylase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40, 97-100.

- Park, J., Rhee, K., & Park, S. (2010). Silane treatment of Fe₃O₄ and its effect on the magnetic and wear properties of Fe₃O₄/epoxy nanocomposites. *Appl. Surf. Sci.*, 256, 6945–6950.
- Patcharin, R., Juming, T., & Barbara, A. (2003). Thermal stability of α -amylase from *Aspergillus oryzae* entrapped in polyacrylamide gel. *Agriculture and Food chemistry*, 51, 5462-5466.
- Pathak, S., Jain, K., Kumar, P., Wang, X., & Pant, R. (2019). Improved thermal Performance of Annular Fin-Shell Tube Storage System Using Magnetic Fluid. *Appl. Energ.* 239, 1524–1535.
- Patsula, V., Kosinová, L., Lovrić, M., Hamzić, L. F., Rabyk, M., & Konefal, R. (2016). Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles: Synthesis by Thermal Decomposition of Iron(III) Glucuronate and Application in Magnetic Resonance Imaging. *ACS Appl. Mater. Inter* 8, 7238-7247.
- Profeta, S., Arrio, M., Tronc, E., Menguy, N., Letard, I., Moulin, C., . . . Saintcavit, P. (2005). Magnetic order in γ -Fe₂O₃ nanoparticles: a XMCD study. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 288, 354-365.
- Punekar, N. S. (2018). Hallmarks of an Enzyme Catalyst. N. Punekar içinde, *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms* (s. 43-51). Singapore: Springer.
- Qiu, L., Shao, Z., Liu, M., Wang, J., & Li, P. (2014). Synthesis and electrospinning carboxymethyl cellulose lithium (CMC-Li) modified 9,10-anthraquinone (AQ) high-rate lithium-ion battery . *Carbohydrpolym* 102, 986-992.
- Quy, D., Hieu, N., Nam, N., & Nguyen, H. (2013). Synthesis of silica-coated magnetic nanoparticles and application in the detection of pathogenic viruses. *Jornal of Nanomaterials* 9:, 1–6.
- Reddy, L., Arias, J., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2012). Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* 112, 5818–5878.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes:principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.*, 1-41.

- Roig, M., Estevez, F., Velasco, F., Ghais, N., & Silverio, J. (1986). Biotechnology and Applied Biology Section Method for Immobilizing Enzymes. *Biochemical Education*, 180-184.
- Roy, J., & Abraham, T. (2004). Strategies in Making Cross-Linked Enzyme Crystals. *Chem. Rev.*, 3705-3721.
- Sahoo, Y., Pizem, H., Fried, T., Golodnitsky, D., Burstein, L., Sukenik, C., & Markovich, G. (2001). Alkyl phosphonate/phosphate coating on magnetite nanoparticles: A comparison with fatty acids. *Langmuir* 17, 7907–7911.
- Sanchez-Dominguez, M., Aubery, C., & Solans, C. (2012). New Trends on the Synthesis of Inorganic Nanoparticles Using Microemulsions as Confined Reaction Media. D. A. Hashim içinde, *Smart Nanoparticles Technology* (s. 195-220). InTech.
- Sato, H. (1995). Mechanism of formation of composite CdS-ZnS ultrafin particles. *Ind. Eng. Chem. Res* 34, 2493-2498.
- Scouten, W. (1987). *Methods in Enzymology*. London: Academic Press.
- Shaker, S., Zafarian, S., Chakra, S. H., & Rao, K. (2013). Preparation and characterization of magnetite nanoparticles by sol-gel method for water treatment. *Int J Inn Res Sci Eng Technol.* 2, 2969–2973.
- Sheehan, J., Cruickshank, P., & Boshart, G. (1961). A convenient synthesis of water-soluble carbodiimides. *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 26, no. 7, 2525-2528.
- Sheena, P., Priyanka, K., Sabu, B., & Varghese, T. (2014). Effect of calcination temperature on the structural and optical properties of nickel oxide nanoparticles. *Physics Chemistry Mathematics* 5:, 441-449.
- Sheldon, R., & Pelt, S. (2013). Enzyme Immobilization in Biocatalysis: Why, What and How. *Chemical Society*, 6223-6235.
- Sheldon, R.A. (1993). *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compound*, Marcel Dekker, New York.
- Shen, L., Laibinis, P., & Hatton, T. (1999). Bilayer surfactant stabilized magnetic fluids: synthesis and interactions at interfaces. *Langmuir*, vol. 15, no.2,, 447-453.

- Srikanth, E., Carpenter, E., Spinu, L., Wiggins, W., & O'Connor, C. (2001). Dynamic transverse susceptibility in Au-Fe-Au nanoparticles. *Materials Science and Engineering*, 304, 901-904.
- Sohrabi, N., Rasouli, N., Torkzadeh, M. (2014). Enhanced stability and catalytic activity of immobilized α -amylase on modified Fe₃O₄ nanoparticles. *Chemical Engineering Journal* 240, 426-433.
- Suleka, F., Fernandez, D. P., Kneza, Z., Habulina, M., & Roger, A. (2011). Immobilization of horseradish peroxidase as crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Process Biochem*, 765-769.
- Taylor, R. (1991). Commercially available supports for protein immobilization. R. Taylor içinde, *Protein Immobilization: Fundamentals and applications* (s. 139-160). New York: Marcel Dekker.
- Terashima, M., & Katoh, S. (1996). Modification of α -amylase functions by protein engineering. *ANNALS of the New York Academy of Science* 799, 65-69.
- Todaka, Y., Nakamura, M., Hattori, S., Tsuchiya, K., & Umemoto, M. (2003). Synthesis of Ferrite Nanoparticles by Mechanochemical Processing Using a Ball Mill. *Materials Transactions*, 44, 277-284.
- Trevan, M. (1980). Techniques of immobilization. *Immobilized enzymes: An introduction and applications in biotechnology* (s. 1-9). içinde New York: Wiley Chichester.
- Vaghari, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mohammadlou, M., Berenjian, A., Anarjan, N., Jafari, N., & Nasiri, .. (2016). Application of Magnetic Nanoparticles in Smart Enzyme Immobilization. *Biotechnology Letters*, 223-233.
- Vaghari, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mohammadlou, M., Berenjian, A., Anarjan, N., Jafari, N., & Nasiri, S. (2016). Application of Magnetic Nanoparticles in Smart Enzyme Immobilization. *Biotechnology Letters*, 223-233.
- Vander, M., Uitdehaag, J., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Biotechnol*, 94, 137-55.

- Velde, V., Lourenco, N., Pinheiro, H., & Bakker, M. (2002). Carrageenan: a food-grade and biocompatible support for immobilization techniques. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 815-835.
- Verma, R., Pathak, S., Srivastava, A., Prawer, S., & Tomljenovic-Hanic, S. (2021). ZnO Nanomaterials: Green Synthesis, Toxicity Evaluation and New Insights in Biomedical Applications. *J. Alloys Comp.* 876 , 160-175.
- Visser, J., & Strating, M. (1975). Enzymatic behaviour of lipoamide dehydrogenase immobilized on N-alkyl Sepharose matrixes. *FEBS Letters*, 183-186.
- Voet, D., Voet, J., & Pratt, C. (2006). *Fundamentals of Biochemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- W.Wu, He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res. Lett.* 3, 397–415.
- Wadiack, D., & Carbonell, R. (1975). Kinetic behavior of microencapsulated β -galactosidase . *Biotechnology Bioengineering*, 1157-1181.
- Wang, X., Jiang, X., Li, Y., X., L., & Hou, P. (2015). Reversible Immobilization of Glucoamylase onto Magnetic Chitosan Nanocarriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 681-692.
- Wiseman, A. (1986). *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Chichester: Ellis Horwood Ltd.
- Wolfgang, A. (2007). *Enzyme in Industry: Production and Applications. Thirdh Completely Revised Edition*. Wiley-VCH Pres.
- Worthington, C. C. (2021, Aralık 2). Introduction to Enzymes. New Jersey, Lakewood, Amerika Birleşik Devletleri. Worthington Biochemical Cooperation. adresinden alındı
- Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res Lett.* 3, 397–415.
- 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. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 34,, 2408-2412.

- Yáñez, S., Matsuhira, B., Maldonado, S., González, R., & Luengo, J. (2018). Carboxymethylcellulose from bleached organosolv fibers of *Eucalyptus nitens*: synthesis and physicochemical characterization. *Cellulose* 25(5), 2901-2914.
- Yim, T., Kim, D., Karajanagi, S., Kane, T. L., & Dordick, J. (2003). Silicon nanocolumns as novel nanostructured supports for enzyme immobilization. *J. Nanosci Nanotechnol*, 479-482.
- Yürekli, A. (2019). Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü*, 1-12.
- Zahid, M., Nadeem, N., Hanif, M., Bhatti, I., Bhatti, H., & Mustafa, G. (2019). Metal Ferrites and Their Graphene-Based Nanocomposites: Synthesis, Characterization, and Applications in Wastewater Treatment. *Magnetic Nanostructures* , 181-212.
- Zang, L. (2014). Preparation of Magnetic Chitosa Nanoparticles As Support for Cellulase Immobilization. *Industrial Engineering Chemistry Research* , 3448-3454.
- Zelinski, T., & Waldman, H. (1997). Cross-linked enzyme crystals (CLECs): efficient and stable biocatalyst for preparative organic chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* , 722-724.
- Zhang, F., Li, X., He, N., Li, T., & Sauli, E. (2015). Novel Synthesis of Magnetic Agar and Its Application in Cu Ions Adsorption. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9721-9725.
- Zhang, P., Zhang, Y., Gao, M., & Zhang, X. (2016). Dendrimer-assisted Hydrophilic Magnetic Nanoparticles as Sensitive Substrates for Rapid Recognition and Enhanced Isolation of Target Tumor Cells. *Talanta* 161, 925–931.
- Zucca, P., & Sanjust, E. (2014). Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules*, 14139-14194.

EKLER

EK -1

BRADFORD AYIRACI

Bradford stok çözeltisi (x5 stok) hazırlamak için aşağıdaki kimyasallar verilen oranlarda karıştırılır:

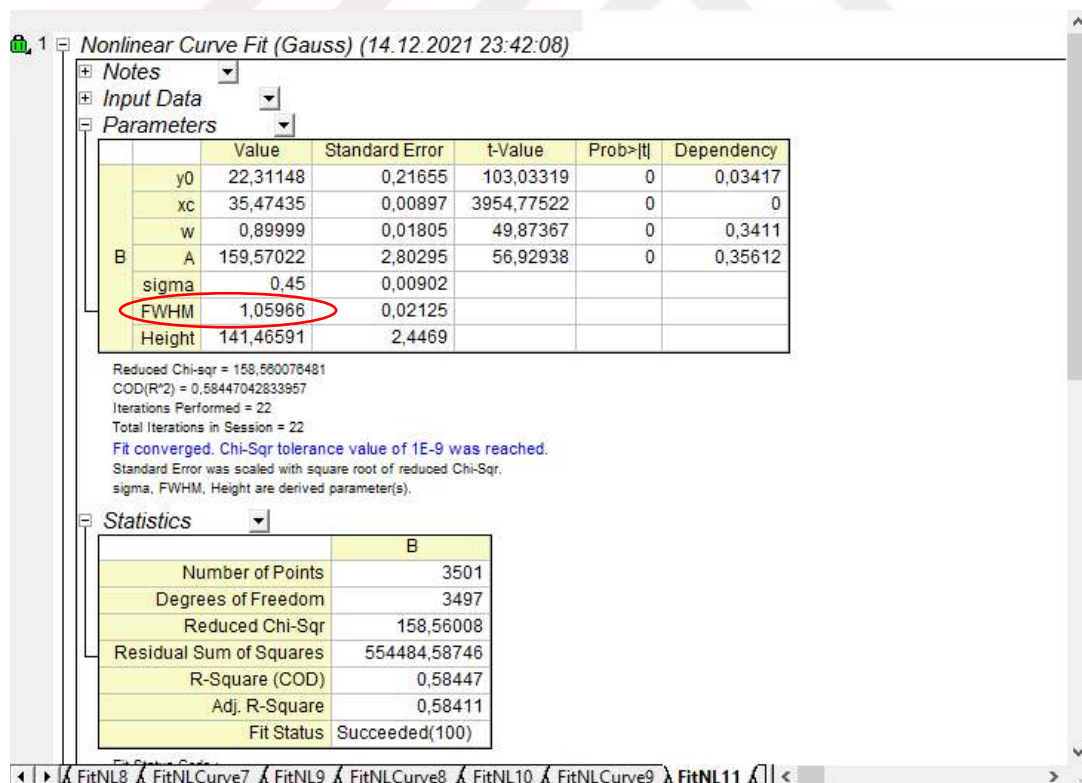
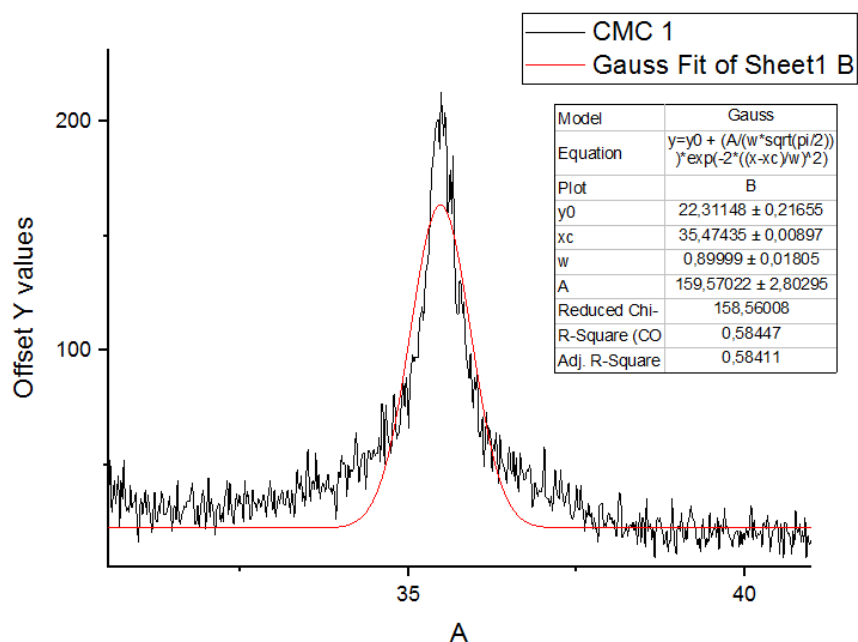
- 500 mL %85 orto-fosforik asit
- 250 mL %95 etanol (spektroskopik)
- 500 mg Brilliant Blue G-Dye

Karışıma toplam hacim 1 L olacak şekilde distile su eklenir. Konsantre karışım buzdolabında saklanır. Boya ışığa karşı hassa olduğu için alüminyum folyo ile sarılır.

Protein tayininde kullanılacak çözelti stok çözeltiden 1 hacim, distile sudan 4 hacim alınarak hazırlanır. Hazırlanan karışım iyice karıştırılır ve filtre kağıdından geçirilir. Kullanılmadan önce en az 24 saat oda sıcaklığında beklemelidir.

EK-2

FWHM



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nihal YILMAZ

Eğitim Bilgileri

- 2009-2013: Eskişehir Anadolu Lisesi
- 2013-2017: Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü
- 2018-2022: Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimyasal Teknolojiler Bilim Dalı

Yayınları ve Bilimsel Faaliyetler

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

- Yılmaz N., Biran Ay S., Hoşgün E.Z., “Nonspecific and Substrate Affinity Immobilization of Pectinases from Model Mixture on Magnetic Support”, *3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020)*, Ankara, Türkiye, Mart 19-20, 2020, Proceedings Book, s. 620-626. ISBN: 978-605-69426-1-7
- Yılmaz N., Biran Ay S., “Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Momordica charantia Peel Extract”, *1st International Conference on Experimental Sciences and Biotechnology*, Muğla, Türkiye, Eylül 8-10, 2021, Abstract Book, s. 58. ISBN: 978-605-74044-0-4
- Kalaycı M., Yılmaz N., Kosku Perkgöz N., Biran Ay S., “Effect of Different Green Synthesis Methods on Antimicrobial Efficacy of Metallic Nanoparticles”, *1st International Conference on Experimental Sciences and Biotechnology*, Muğla, Türkiye, Eylül 8-10, 2021, Abstract Book, s. 56. ISBN: 978-605-74044-0-4
- Yılmaz N., Biran Ay S., “Synthesis and Functionalization of Iron Oxide Magnetic Particles for Dye Removal Applications in Wastewater Treatment”, *International Symposium on Engineering, Natural and Social Sciences (ISENS 2021)*, Batman, Türkiye, Kasım 25-28, 2021, Abstract Book, s. 20.

- Kalaycı M., Yılmaz N., Kosku Perkgöz N., Biran Ay S., “Photocatalytic and Heat-Induced Biological Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Catalytic and Antimicrobial Properties”, *International Symposium on Engineering, Natural and Social Sciences (ISENS 2021)*, Batman, Türkiye, Kasım 25-28, 2021, Proceedings Book, s. 127-134.

Burslar

- TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurtiçi Yüksek Lisans Burs Programı

