ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Müge ŞENGÜL

LİPAZ ENZİMİNİN MAGNETİK NANOPARTİKÜLLERE FARKLI ARA KOLLAR ÜZERİNDEN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİPAZ ENZİMİNİN MAGNETİK NANOPARTİKÜLLERE FARKLI ARA KOLLAR ÜZERİNDEN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Müge ŞENGÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez ../07/2013 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

…….....	……	……
Prof.Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ	Prof. Dr.Seyhan TÜKEL	Prof.Dr.Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2012YL17

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİPAZ ENZİMİNİN MAGNETİK NANOPARTİKÜLLERE FARKLI ARA KOLLAR ÜZERİNDEN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Müge ŞENGÜL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
Yıl : 2013, Sayfa: 92
Jüri : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Son yıllarda, enzim immobilizasyonu için manyetik nanopartiküllerin kullanılmasına olan ilgi oldukça artmıştır.Bu çalışmada lipaz enziminin immobilizasyonu için yeni bir destek materyali olarak manyetik özellikte ve nanoboyutta Fe_3O_4 tanecikleri sentezlenmiş ve lipaz enziminin Fe_3O_4 manteyik nanopartiküllere farklı arakollar üzerinden(GA ve ECH) immobilizasyonu ve karakterizasyonu araştırılmıştır. Fe_3O_4 nanopartikülünün karakterizasyonu için SEM, FTIR, XRD kullanılmıştır. Sentezlenen nanopartiküllerin yaklaşık 158,2 nm çapında olduğu gözlemlenmiştir. Serbest ve immobilize lipazların ortam koşullarına göre aktivite ölçümleri yapılarak, optimum sıcaklık, optimum pH, depolama kararlılığı, termal kararlılığı ve tekrar kullanım kararlılığı incelenmiş ve kinetik sabitler belirlenmiştir.Serbest ve immobilize lipazlar için optimum pH 7,0 olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize lipazlar için optimum sıcaklık 40 ^{0}C olarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize lipazların farklı sıcaklıklarda belirlenen termal kararlılıkları karşılaştırılmış ve immobilize enzimlerin dayanıklılığının serbest haline göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda serbest lipaz için K_m, V_{max}, K_{cat}, K_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 0,48 mM, 420,7 U/mg protein, $2,82x10^4$ dk^{-1}, $58,8x10^3$ dk^{-1} mM^{-1}, immobilize lipaz (GA) için sırasıyla 1,3 mM, 33,6 U/mg protein, $2,25x10^3$ dk^{-1}, $1,73x10^3$ dk^{-1} mM^{-1}, immobilize lipaz (ECH) için sırasıyla 9,4 mM, 51,7 U/mg protein, $3,47x10^3$ dk^{-1}, $0,37x10^3$ dk^{-1} ^{m} M^{-1} olarak hesaplanmıştır. İmmobilize lipazın tekrar kullanılabilirliği kesikli reactor modelinde araştırılmıştır ve 20 kullanım sonrası immobilize lipazların başlangıç aktivitelerini sırasıyla % 71 (GA) ve % 63 (ECH) ' ünü koruduğu belirlenmiştir. Serbest lipazın 5^0C ve 25^0C' de 30 gün depolama süresi sonunda kalan aktivitesi sırasıyla başlangıç aktivitesin %37 ve %23' üdür. Bununla birlikte immobilize lipazların 5^0C ve 25^0C'de 30 gün depolama süresi sonunda sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %50 (GA), %44 (ECH) ve %44 (GA), %28 (ECH)' ini korumuştur.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, Magnetik nanopartikül, Epiklorohidrin, Glutaraldehit.

ABSTRACT

MASTER THESIS

IMMOBILIZATION AND CHARACTERIZATION OF ENZYME ON MAGNETIC NANOPARTICLES THROUGH DIFFERENT INTERMEDIATE ARMS

Müge ŞENGÜL

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
Year: 2013, Pages: 92
Jury : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

In recent years, much attention has been paid toward synthesis of magnetic nano sized particles and their use for immobilization of enzyme. In this study, magnetic nano sized Fe_3O_4 particles were synthesized and covalent immobilization and characterization of lipase enzyme on magnetic nanoparticles by various intermediate arms (GA and ECH) are researched. Characterization of Fe_3O_4 nanoparticles was conducted using FTIR, SEM and XRD. The size of prepared nano particles was found approximately 158,2 nm diameter. Activitiy measurements of free and immobilized lipases were conducted in order to determine optimum temperature, optimum pH, storage stabilitiy, heat stability and reusability as well as kinetic parameters (K_m, V_{max}, K_{cat}, K_{cat}/K_m). Optimum pH was determined as 7,0 for free and immobilized lipases. Optimum temperature was determined 40 ^{0}C for free and immobilized lipases. The termal stabilities of free and immobilized lipases have been improved greatly .For free lipase at optimum conditions K_m, V_{max}, K_{cat}, K_{cat}/K_m values were calculated as sırasıyla 0,48 mM, 420,7 U/mg protein, $2,82x10^4$ dk^{-1}, $58,8x10^3$ dk^{-1} mM^{-1} , the same values of immobilized lipase (GA) were calculated as respectively 1,3 mM, 33,6 U/mg protein, $2,25x10^3$ dk^{-1}, $1,73x10^3$ dk^{-1} $mM^{-1}$and for immobilized lipase (ECH) calculated as sırasıyla 9,4 mM, 51,7 U/mg protein, $3,47x10^3$ dk^{-1}, $0,37x10^3$ $dk^{-1\ m}$ M^{-1} .Reusability of immobilize lipases was investigated in a batch type reactor. After 20 reuses, residual activites of immobilized lipase were about %71 (GA) and %63 (ECH) of its initial activity. The residual activity for free lipase stored at 5^0C and 25^0C for 30 days were %37 and %23 of its initial activity, respectively. However, the immobilized lipases protected %50 (GA), %44 (ECH) and to %44 (GA) ,%28 (ECH) of its original activities at 5^0C and 25^0C,respectively for 30 days.

Keywords: Lipase, Magnetic nanoparticles, Epichlorohydrin, Glutaraldehyde.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, hoşgörüsü ve nezaketiyle destek olan danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda bana her zaman destek olan sayın hocalarım, Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e ve Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e çok teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarım sırasında bana her zaman çok destek olan Dr. Deniz YILDIRIM'a Dr. Dilek ALAGÖZ'e, Gözde ERGÖÇEN' e, Arş. Gör. Ali TOPRAK'a, Arş. Gör. Burcu DARENDELİ' ye, Asım EĞİTMEN' e, Caner BAYSAL' a teşekkür ederim. Beni her zaman destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmama maddi olarak destek sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER ..... …..IV
SİMGELER VE KISALTMALAR X
ÇİZELGELER DİZİNİ XI
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
1. GİRİŞ 1
1.1. Enzimler 1
1.2. Enzim İmmobilizasyonu 3
1.2.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri 3
1.2.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri 4
1.2.1.1.1. Bağlama 4
1.2.1.1.2. Tutuklama 12
1.2.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon 14
1.2.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması 14
1.3. Nanoteknoloji 15
1.3.1. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları 17
1.3.1.1. Tıp 17
1.3.1.2. Kimya ve Çevre 17
1.3.1.3. Enerji 17
1.4. Nanopartiküller 18
1.4.1. Magnetik Nanopartiküller 19
1.5. Lipaz 20
1.5.1. Lipazın Kullanım Alanları 22
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 24
3. MATERYAL VE METOD 26
3.1. Materyal 26
3.1.1. Kimyasallar 26

3.1.2. Araç ve Gereçler 26
3.2. Metod 26
3.2.1. Magnetik Nanopartikülerin Hazırlanması 26
3.2.2. Magnetik Nanopartiküllerin APTES Ara kolunun Bağlanması 27
3.2.3. Magnetik Desteğin Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi 27
3.2.4. Magnetik Nanopartiküllerin Silanlama Sonrası ve Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi Sonrası Kalan Serbest Amino Gruplarının Tayini 28
3.2.5 *Candida Rugosa* Lipazının Manyetik Nanopartiküller Üzerine Glutarladehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu 29
3.2.6. Magnetik Nanopartiküllerin Epiklorohidrin İle Aktifleştirilmesi 30
3.2.7. Lipaz Enziminin Epiklorohidrin Üzerinden Magnetik Nanopartiküllere Kovalent İmmobilizasyonu 30
3.2.8. Total Protein Tayini 31
3.2.9. Lipaz Enziminin Aktivitesinin Ölçülmesi 32
3.2.10. *Candida Rugosa* lipazının Glutaraldehit ve Epiklorohidrin Ara Kol-Ları Üzerinden Manyetik Nanopartiküllere Kovalent İmmobilizasyo-Nu için Koşulların Belirlenmesi 32
3.2.11. Serbest ve İmmobilize *Candida Rugosa* lipazlarının Karakterizasyonu 33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 34
4.1. Bulgular 34
4.1.1. Magnetik Nanopartikül Sentezi ile İlgili Bulgular 34
4.1.1.1. SEM Analizi 34
4.1.1.2. FT-IR Analizi 37
4.1.1.3. XRD Analizi 38
4.1.2. Serbest Lipazın Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular 39
4.1.2.1. Serbest Lipazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular .. 39
4.1.2.2. Serbest Lipazın Aktivitesine Tampon Derişiminin Etkisi İle İlgili Bulgular 40
4.1.2.3. Serbest Lipazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular 41

4.1.2.4. Serbest Lipazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular 42
4.1.2.5. Serbest Lipazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 43
4.1.2.6. Serbest Lipazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 44
4.1.3. Lipazın Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İle İlgili Bulgular 45
4.1.3.1. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular 46
4.1.3.2. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Tampon Derişiminin Etkisi İle İlgili Bulgular 47
4.1.3.3. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular 48
4.1.3.4. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular 49
4.1.3.5. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 49
4.1.3.6. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 50
4.1.3.7. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Tekrar Kullanım Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 51
4.1.4. Lipazın Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İle İlgili Bulgular 53
4.1.4.1. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular 53

4.1.4.2. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Tampon Derişiminin Etkisi İle İlgili Bulgular 54
4.1.4.3. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular 55
4.1.4.4. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular 56
4.1.4.5. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 57
4.1.4.6. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 58
4.1.4.7. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Tekrar Kullanım Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 59
4.1.5. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Aktivitelerinin Birlikte Gösterimleri 61
4.1.5.1. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular 61
4.1.5.2. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Aktivitesine Tampon Derişimlerinin Etkisi İle İlgili Bulgular 62
4.1.5.3. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak

İmmobilize Edilen Lipazların Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular 63
4.1.5.4. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular 64
4.1.5.5. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 65
4.1.5.6. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 66
4.1.5.7. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Tekrar Kullanım Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 67
4.2. Tartışma 68
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 76
KAYNAKLAR 77
ÖZGEÇMİŞ 84
EKLER 85

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması 17
Çizelge 3.1 Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar..... 22
Çizelge 3.2. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları..... 23
Çizelge 4.1. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin K_m, V_{max}, k_{cat}, k_{cat}/K_m değerleri..... 65
Çizelge 4.2. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin termal kararlılıkları..... 66
Çizelge 4.3. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin depolama kararlılıkları 67
Çizelge 4.4. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıkları 68

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri 3
Şekil 1.2. Kopolimerizasyon yöntemi. 5
Şekil 1.3. Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin gösterimi 6
Şekil 1.4. Enzimin desteğe kovalent immobilizasyonu 8
Şekil 1.5. Kovalent bağlanmada çok sıklıkla kullanılan aktif fonksiyonel grupların şematik gösterimi 9
Şekil 1.6. Enzimin desteğe doğrudan (a), doğrusal ara kol (b), dallanmış ara kol (c) ve yüklü ara kol (d) üzerinden immobilizasyonu 11
Şekil 1.7. Matrikste tutuklama yöntemi 12
Şekil 1.8. Mikrokapsülde tutuklama yöntemi 13
Şekil 1.9. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu 13
Şekil 1.10. Nanoölçek 16
Şekil 1.11. Nanoteknolojinin dolaylı, direkt ve yaklaşımsal uygulama alanları 18
Şekil 1.12. Lipaz tarafından katalizlenen bir ester-hidroliz sentez reaksiyonu 21
Şekil 3.1. Ninhidrinin –NH2 grubu ile verdiği reaksiyon 29
Şekil 4.1. Magnetik Fe_3O_4 nano partiküllerinin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü 35
Şekil 4.2. Magnetik Fe_3O_4 nano partiküllerine glutaraldehit ara kolu bağlı örneğin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü 36
Şekil 4.3. Magnetik Fe_3O_4 nano partiküllerine epiklorohidrin ara kolu bağlı örneğin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü. 37
Şekil 4.4. Sentezlenen magnetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu 37
Şekil 4.5. Sentezlenen magnetik nanopartiküllerin XRD spektrumu 39
Şekil 4.6. Serbest lipazım aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi 40
Şekil 4.7. Serbest lipaz aktivitesinin pH 7,5 fosfat tamponunun derişimine bağlı olarak değişimi… 41
Şekil 4.8. Serbest lipaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi 42
Şekil 4.9. Serbest lipaz için Lineweaver-Burk grafiği 43
Şekil 4.10. Serbest lipazın 40 ve 60ºC'deki aktivitesinin inkübasyon

süresine bağlı olarak değişimi 44
Şekil 4.11. Serbest lipazın 4ºC ve 25ºC'deki aktivitesinin depolama süresine bağlı olarak değişimi 45
Şekil 4.12. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi 46
Şekil 4.13. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazım aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi 47
Şekil 4.14. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi 48
Şekil 4.15. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın Lineweaver-Burk grafiği 49
Şekil 4.16. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın bağıl aktivitesinin 40 ve 60ºC'deki inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi 50
Şekil 4.17. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın bağıl aktivitesinin 4ºC ve 25ºC'deki depolama süresine bağlı olarak değişimi 51
Şekil 4.18. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (25 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişimi 52
Şekil 4.19. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (50 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişimi 52
Şekil 4.20. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (100 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişimi 53
Şekil 4.21. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi 54

Şekil 4.22. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi 55
Şekil 4.23. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi 56
Şekil 4.24. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın Lineweaver-Burk grafiği 57
Şekil 4.25. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazın bağıl aktivitesinin 40 ve 60ºC'deki inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi 58
Şekil 4.26. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın bağıl aktivitesinin 4ºC ve 25ºC'deki depolama süresine bağlı olarak değişimi 59
Şekil 4.27. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (25 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişimi.....60
Şekil 4.28. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (50 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim.....60
Şekil 4.29. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (100 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim.....61
Şekil 4.30. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreazların aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimleri.....62
Şekil 4.31. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitelerinin tampon derişimlerine bağlı değişimleri 63
Şekil 4.32. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize

edilen lipazların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri 64

SİMGELER VE KISALTMALAR

3-APTES : 3-Aminopropiltrietoksisilan
dak : Dakika
ECH : Epiklorohidrin
FT-IR : Fourier Transform Infrared
GA : Glutaraldehit
k_{cat} : Turnover sayısı
K_m : Michealis Menten hız sabiti
mL : Mili litre
mg : Mili gram
mM : Mili molar
nm : Nano metre
SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu
um : Birim kütle
V_{max} : Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği maksimum hız
XRD : X Ray Diffractometer

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalar tarafından üretilen, farklı maddeler içeren, belirli bir kimyasal reaksiyonu katalizleyen ya da kolaylaştıran, kendisi reaksiyondan bozulmadan ve değişikliğe uğramadan çıkabilen protein molekülleridir (Keha ve Küfrevioglu**,** 2004). Enzimler biyokimyasal reaksiyonların hızını kimyasal katalizli reaksiyonlara kıyasla 1 milyon kez artırırlar.

Enzimler substratlarına karşı çok iyi spesifite gösterdikleri için kendine özgü ve uyumlu tek bir substratla bağlanarak tek bir ürün oluştururlar (Chaplin ve Bucke, 1990). Canlı hücrelerin fonksiyon ve özelliklerini düzenleme görevinden, endüstriyel ölçekli birçok reaksiyona kadar geniş bir alanda görev yapabilen enzimlerin yararlı özelliklerinin yanında bazı sorunları da mevcuttur. Enzimlerin kararsız oluşları, üretim maliyetlerinin yüksek olması ve dar bir substrat spesifitesine sahip olmaları sentetik katalizörler olarak kullanılmalarındaki en önemli sorunlardır (Wong ve Whitesides, 1994). Kimyasal reaksiyonlarda serbest enzimlerin kullanılırken, katalizledikleri reaksiyondan sonra ürünü kontamine etmeleri ve tekrar elde edilme proseslerinin yüksek maliyetli olması gibi problemler de göz önüne alınmalıdır. Ayrıca, enzimlerin doğal ortamlarından izole edilmelerinden sonra aktivitelerinde düşüş gözlenmektedir (Aehle, 2004). Kimya ve biyolojideki yeni gelişmeler ve endüstrideki yeni gereksinimler enzimlerin bu dezavantajlarını ortadan kaldırmaya yönelik birçok çalışma yapılmasını sağlamıştır. Enzimlerin seçiciliklerini artırarak doğal ya da doğal olmayan substratları faydalı ara ürünlere ya da son ürünlere dönüştürecek çok sayıda enzimatik reaksiyonun varlığı kanıtlanmıştır. Enzimatik reaksiyonların kapasitelerinin büyütülmesi amacıyla, enzimlerin kararlılıklarının artırılması ve tekrar kullanılmak üzere geri kazanımlarının kolaylaştırılması için yeni teknikler geliştirilmiştir (Bugg, 1996).

Enzimler, çamaşır deterjanlarında, kimyasal sentezlerde, biyosensörlerde, biyoağartıcılarda, polimeraz zincir reaksiyonlarında, proteomik analizlerde, protein sindiriminde kullanılabilmektedir. Enzimler, özgüllükleri sayesinde pek çok uygulama alanına sahiptirler, fakat kısa ömürleri yüzünden kullanımları sınırlı kalmaktadır. Enzim

kararlılığındaki gelişmeler pek çok pratik uygulamalara olanak sağlamaktadır. Gereksinim duyulan enzim miktarı azaltılabilir, enzim reaktörlerinin ömrü uzatılabilir, enzimin tekrar kullanılabilirlik potansiyeli arttırılabilir, biyosensörler için mükemmel sinyaller sağlanabilir. Bu nedenle saflaştırılan enzimlerden en yüksek oranda faydalanmak için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (Telefoncu, 1997). Geliştirilen farklı immobilizasyon yöntemlerinin uygulanması ile; enzimler tekrar kullanılabilirliklerinin ve kararlılıkları artırılması, sürekli sistem çalışmalarına uygulanabilir olması, kısa işlem süresi, işletim maliyetinin azaltılmış olması ve ürünlerin saflık derecesi artırılabilmesi mümkün hale gelmektedir (Arıca, 2000; Bayramoğlu, Kaya ve Arıca, 2005).

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen bir ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler.

İmmobilize enzimler, katalitik aktivitelerini koruyarak, sınırları belli bir bölgeye fiziksel olarak hapsedilmiş, tekrarlı ve sürekli kullanılabilen enzimler olarak tanımlanabilir (Worsfold, 1995). İmmobilize enzimler serbest enzimlerin dezavantajlarını ortadan kaldırarak daha kararlı olmalarına olanak sağlar. İmmobilizasyon prosesinin en önemli avantajı, enzimin katalizlediği reaksiyon ürünlerinden kolayca ayrılabilmesidir (Chaplin ve Bucke, 1990).

İmmobilize enzimler, filtrasyon ve santrifüjleme prosesleri ile tekrar kullanılmak üzere kolayca geri kazanılabilmeleri ve sabit yatak, akışkan yatak ve karıştırmalı tank reaktör gibi sürekli proseslerde kullanılabilmeleri gibi klasik heterojen katalizörlerin sağladığı avantajların tümüne sahiplerdir. İmmobilize enzimlerin diğer avantajları tekrarlı kullanılabilir olmaları, enzimin reaksiyon ortamından çekilmesiyle reaksiyonun hızlı bir şekilde sonlanması (ya da tam tersi) ve reaksiyonlardan sonra aktivitelerindeki kaybın az olmasıdır (Buchholz, Kasche ve Bornscheuer, 2005).

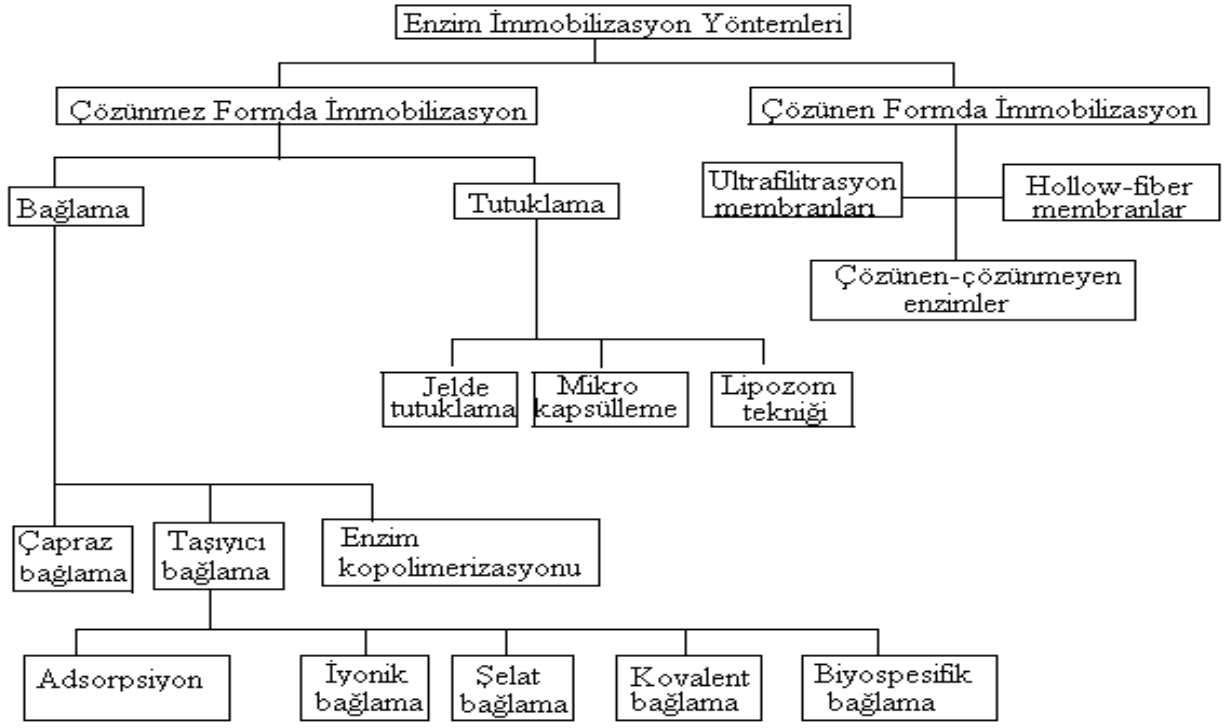
Diğer fiziksel ve kimyasal proseslerde olduğu gibi, immobilizasyonun hızı ve verimi özellikle taşıyıcının cinsine, immobilizasyon yöntemine, konsantrasyona, pH'a, sıcaklığa ve reaksiyon süresine bağlıdır (Buchholz, Kasche ve Bornscheuer, 2005).

1.2. Enzim İmmobilizasyonu

1.2.1.Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler (Telefoncu , 1986).

İmmobilizasyon yöntemleri çeşitli şekillerde sınıflandırılmakla beraber Şekil 1.1'de verildiği gibi sınıflandırmak mümkündür (Telefoncu, 1997).



Şekil 1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri (Telefoncu, 1997).

1.2.1.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri bağlama ve tutuklama olarak ikiye ayrılmaktadır.

1.2.1.1(1). Bağlama

Bağlama yöntemi; çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu ve taşıyıcıya bağlama olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

1.Çapraz bağlama; Küçük moleküllü iki veya çoklu fonksiyonel grupları olan reaktifler enzim molekülleri arasında çapraz bağlar yapmaktadırlar (Chibata, 1978). En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, klorformat ve karbonilimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorohidrinlerdir.

Genellikle pahalı olmadığı ve ticari olarak kolay bulunduğu için glutaraldehit çapraz bağlama reaktifi olarak kullanılmaktadır (Alptekin, 2009). Çapraz bağlama yöntemleri;

A. Çapraz bağlı enzim kristalleri; CLEC (cross-linked enzyme crystal)

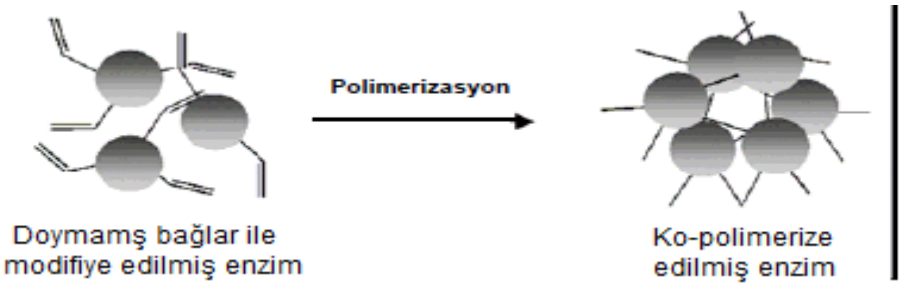
B. Çapraz bağlı enzim agragatları; CLEA (cross-linked aggregate enzyme),

C. Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim; CSDE (cross-linked spray dried enzyme),

D. Çapraz bağlı çözünmüş enzim; CLE (cross-linked dissolved enzyme)

olmak üzere 4 alt sınıfa ayrılabilir.

2.Enzim kopolimerizasyonu; Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır. Yöntem polimer matrikse tutuklanmaya benzemekle birlikte enzim kaçışının önlenmesi gibi üstünlüğü vardır (Telefoncu, 1997).



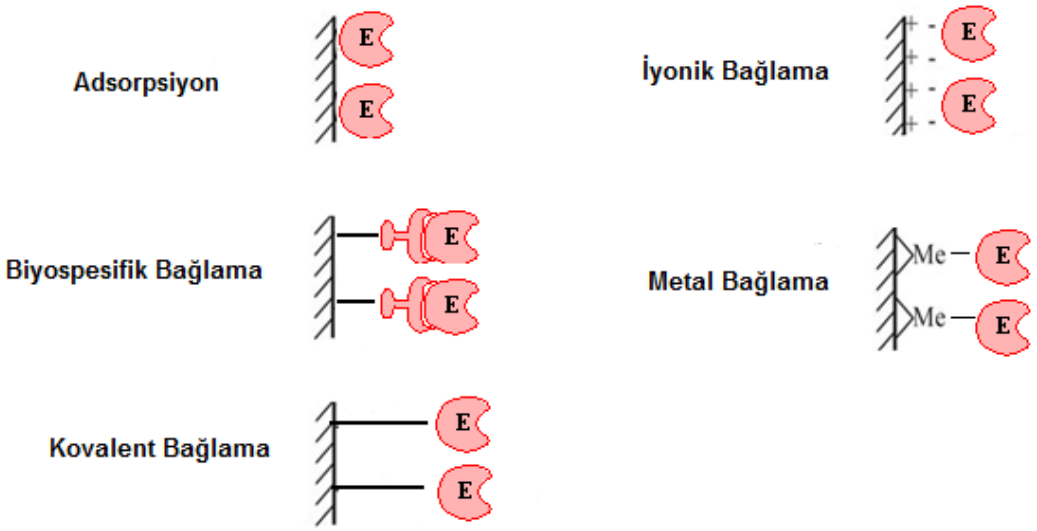
Şekil 1.2. Kopolimerizasyon yöntemi (Cao, 2005)

3.*Taşıyıcıya bağlama;* Adsorpsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama olarak beş gruba ayrılmaktadır. Bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanılır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar. Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler şunlardır:

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme, Gözenekli yapı,
- Mekanik stabilite uygun partikül formu,
- Kimyasal ve termal stabilite,
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcıların yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel grupları taşıması,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik,
- Rejenere olabilme.

Eğer kullanılacak olan taşıyıcı aktif değil ise uygun reaktifler kullanılarak taşıyıcı reaktif hale getirilerek immobilizasyonda kullanılır. Enzim ve taşıyıcı

arasında gerçekleşecek olan reaksiyonun, oda sıcaklığı ve nötral pH gibi ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesine dikkat edilmelidir (Telefoncu, 1997). Adsorpsiyon, iyonik bağlama, metal bağlama (şelat), kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama (affinite) olarak beş gruba ayrılmaktadır (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin gösterimi

Adsorpsiyon; enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, gözenekli cam, kül, silikajel, $CaCO_3$, nişasta, gluten gibi) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak ortamdan uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Nelson ve Griffen, 1916; Klibanov, 2001). Adsorbsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu işlemi ılımlı koşullarda gerçekleştirilir, bu şekilde kullanılan taşıyıcının aktifleştirilmesine gerek duyulmaz, ekonomik olarak avantajlıdır ve genellikle immobilizasyon işlemi sonunda enzim aktivitesini büyük ölçüde korur (Messing, 1976; Woodward, 1985). Her ne kadar yöntem basit gözükse de optimizasyon koşullarının belirlenmesi zordur. Eğer taşıyıcı ve enzim arasındaki non-kovalent etkileşim yeteri kadar büyük değilse desorpsiyon ile enzim ortama geçebilir ve böylelikle ürün kirlenmesine neden olur (Telefoncu, 1997).

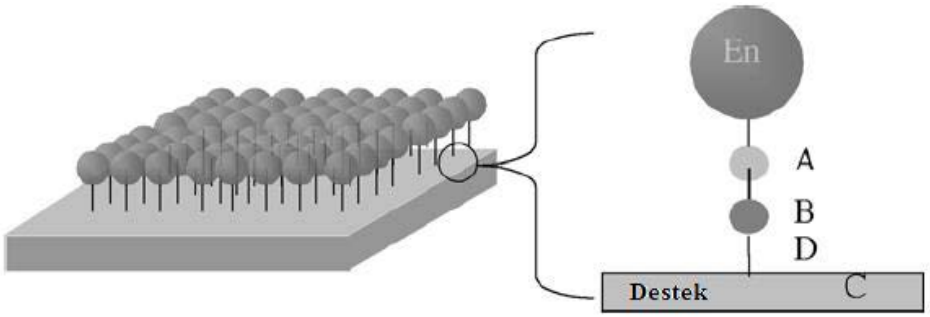
İyonik Bağlama; iyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanmaktadır (Wang, 1993). İyonik bağlama ile enzim immobilizasyonu basit bir yöntemdir. Bu yöntem enzimin desteğe hem kuvvetli bağlandığı hem de çok aktif olduğu şartları sağlamasından dolayı aynı anda bu şartları bulmak zordur. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde herhangi bir değişikliğe sebep olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzimin taşıyıcıdan ayrılması söz konusudur (Telefoncu, 1997).

Metal Bağlama (Şelat); bu yöntemde, bazı geçiş metallerinin (Titan(III), Titan(IV), Zirkonyum (IV)) şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması sağlanmaktadır (Kennedy ve ark., 1983). Metalin tuzu veya hidroksit formu destek yüzeyine (selüloz, kitin, alginik asit, silikat gibi) ısıtma veya nötralizasyon yöntemi ile çöktürülür. İmmobilizasyon işlemi metalin boş d orbitali ile enzim molekülündeki artık aminoasit grupları arasında gerçekleşir. Metal bağlama ile enzim immobilizasyon yöntemi oldukça basit bir yöntem olup immobilizasyon işlemi sonunda enzimin başlangıç aktivitesinin %30 ile %80 arasında koruduğu görülmektedir. Lakin, metalin taşıyıcı yüzeyinden uzaklaşması dolayısıyla immobilize enzimin operasyonel stabilitesinde değişken ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmeyi zorlaştırır (Porath, 1992; Brena ve ark., 1994).

Kovalent Bağlama; enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanması enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir (Zaborsky, 1973). Kovalent bağlama yöntemi ile yapılan enzim immobilizasyonu kovalent bağın doğası gereği enzim molekülü ve destek arasındaki bağın kararlı olması ve bu yüzden enzimin destek yüzeyinden kolaylıkla ayrılmasının mümkün olmaması sebebiyle enzim immobilizasyonunda çok yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir.

Kovalent enzim immobilizasyonunda dikkat edilmesi gereken önemli nokta, bağlanmanın enzimin aktif bölgesinden olmaması ve bağlanma esnasında sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Kovalent bağlama yöntemi genellikle çapraz bağlanmayla birlikte uygulanır. Böylece enzim ile destek arasında oluşmuş kovalent bağlar çapraz bağlanma sonucunda daha kararlı hale gelir.

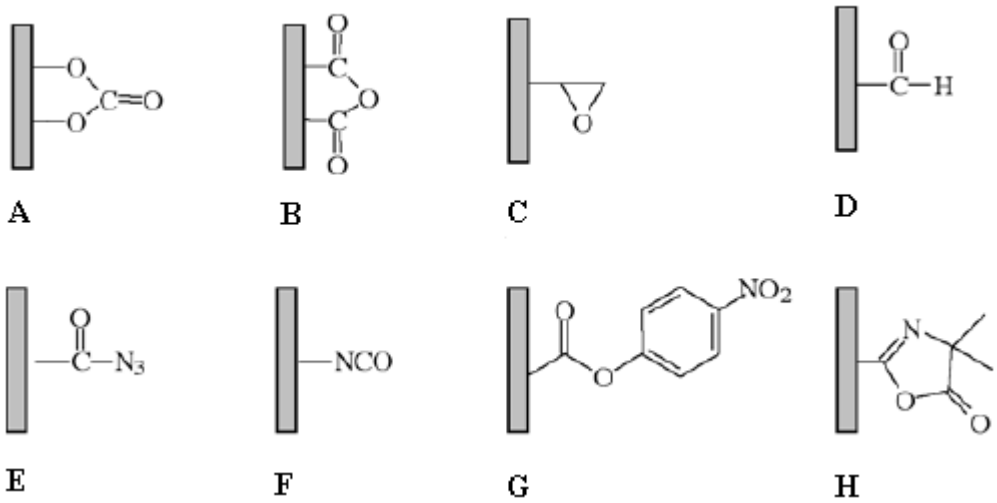
Bu amaçla ilk olarak bir bağ ajanı kullanılarak destek üzerindeki fonksiyonel gruplar aktif hale getirilir. İkinci olarak ise bu aktif hale gelen destekle enzimin birleştirilmesi ve immobilizasyon işleminin tamamlanması sağlanır. Aktivasyon işlemindeki amaç destek üzerindeki fonksiyonel grupların elektrofilik hale getirilmesi için yapılır. Daha sonra immobilizasyon reaksiyonunda, bu gruplar enzim yüzeyindeki belli amino asitlerin amino $(NH_2)^+$ fonksiyonel gruplarıyla kovalent bağ oluşturur (Bickerstaff, 1997). Enzimin yüzeyinde yer alan aminoasit artığı ile destek yüzeyinde yer alan fonksiyonel grup arasındaki kimyasal bağ Şekil 1.4.'de gösterilmiştir (Cao, 2005).



Şekil 1.4. Enzimin desteğe kovalent immobilizasyonu: (A) Aktif amino asit artığı; (B) desteğin fonksiyonel bağ yapacak grubu; (C) Destek; (D) Ara kol (Cao, 2005).

İnorganik ve organik yapıda birçok doğal ve yapay materyal kovalent immobilizasyonda destek materyali olarak kullanılabilmektedir. Destek suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik etkilere karşı dayanıklı olmalıdır. Bu tür desteklerin seçiminde enzim ile destek arasındaki bağın aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında desteğin enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir (Telefoncu, 1997). Kullanılan desteğin fiziksel ve kimyasal özellikleri immobilize enzimin durumunu (örneğin, aktivitesini,

seçiciliğini, kararlılığını) doğrudan etkilemektedir (Cao, 2005). Destek yüzeyine kovalent bağlanmada kullanılan farklı aktif fonksiyonel gruplar vardır. Bunlar Şekil 1.5.'da gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Kovalent bağlanmada çok sıklıkla kullanılan aktif fonksiyonel grupların şematik gösterimi (A: Karbonat, B: Anhidrit, C: Epoksit, D: Aldehit, E: Açilazid, F: İzosiyanat, G: Karboksilli asit fenil ester, H: Lakton) (Yıldırım 2010).

Kovalent bağlama yönteminin avantajlı ve dezavantajlı yönleri bulunmaktadır (Rao ve ark., 1998). Avantajlı yönlerini aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Kovalent bağlamadaki bağlar çok sıkı olduğu için, immobilizasyonu yapılmış enzimin kullanımı esnasında, ortamda yüksek iyonik karakterli çözücü veya substrat bulunması durumunda dahi enzimler destekten sızmaz.
- Enzim, destek yüzeyindeki belirli bölgelere lokalize olduğundan dolayı enzim ile substratın karşılaşma ihtimali artar.
- Enzim molekülleri ile destek arasındaki güçlü etkileşimden dolayı enzimin sıcaklık kararlılığında artış gözlenir.

Kovalent bağlama yönteminin dezavantajlı yönleri ise aşağıdaki gibi sıralanabilir;

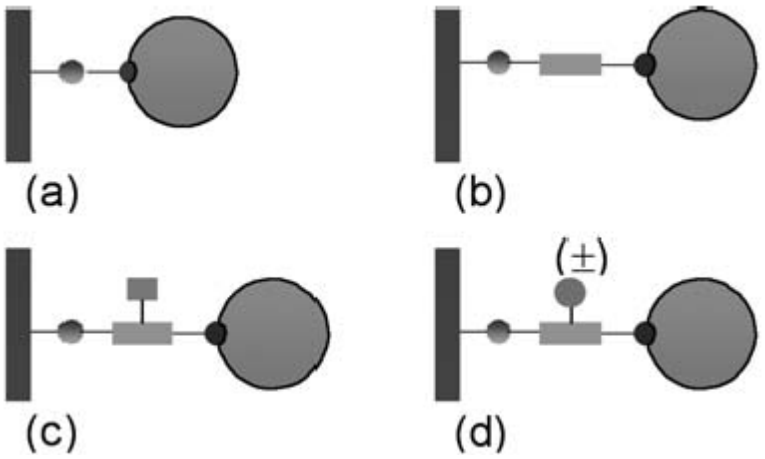
- Kısmi modifikasyondan dolayı enzim moleküllerinin aktif yapıları bozulmaya eğilim gösterir.
- Enzim molekülleri ile destek arasındaki kuvvetli etkileşimler, enzim moleküllerinin serbest hareket etmesini engelleyerek enzimin aktivitesinin düşmesine sebep olabilir.
- İmmobilizasyon için optimum koşulları bulmak zordur (Rao ve ark., 1998).

Kovalent immobilizasyonda kullanılacak inorganik desteğin yüzeyine daha fazla enzimin bağlanabilmesi için desteğin mümkün olan en küçük gözenek büyüklüğüne sahip olması gerektiği bildirilmiştir (Weethall, 1976). Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktifleştirilmesi gerekir. İmmobilizasyon çok ılımlı koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Aktifleştirilmiş desteklere enzimlerin immobilizasyonunda düşük immobilizasyon etkinliği ve enzim kararlılığında artış veya azalış meydana gelebilmektedir. Buna sebep olan faktörler şu şekilde sıralanabilir;

- Sterik engeller,
- Desteğin çevresel etkileri (hidrofobik yüzeyler genellikle enzimin inaktivasyonuna neden olur),
- Matriksin özellikleri,
- Enzim molekülü ile destek arasında istenmeyen etkileşimler,
- Enzimin desteğe yanlış yönlenmesi (aktif bölgesinden bağlanması),
- Uygun olmayan mikro çevre,
- Aşırı çoklu noktadan bağlanma,
- Enzim hareketliliğinin veya konformasyonel esnekliğin etkilenmesi.

Enzim immobilizasyonu çalışmalarında enzim ile destek arasına çeşitli ara kollar eklenerek enzim aktivitesinin artırılmasına yönelik teknikler araştırılmaktadır

(Alptekin, 2009). Enzimin desteğe doğrudan immobilizasyonunda enzim hareketi sınırlı iken ara kol üzerinden immobilizasyonunda enzim daha serbest hareket edebilmektedir. Ara kolun immobilize enzim aktivitesi üzerine etkisi karmaşıktır. Bunun nedeni ara kol varlığında mikro çevredeki, enzim yönlenmesindeki ve enzimin esnekliğindeki değişimlerdir. Uygun ara kol (uzunluk, hidrofiliklik, dallanmışlık veya doğrusallık v.b.) kullanımıyla immobilizasyon sonunda immobilize enzim aktivitesi yüksek olabilmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Enzimin desteğe doğrudan (a), doğrusal ara kol (b), dallanmış ara kol (c) ve yüklü ara kol (d) üzerinden immobilizasyonu (Cao, 2005).

Biyospesifik Bağlama (Affinite); biyolojik sistemlerdeki gelişmiş biyospesifik etkileşme veya tanıma sistemleri kullanılarak yapılan immobilizasyon tekniğidir. Bir enzimin, antikor veya lektinler kullanılarak immobilizasyonu biyospesifik bir immobilizasyondur. Burada kullanılan lektinler belirli karbohidrat dizisine sahip enzimlere etkili bir şekilde bağlanabilir. Son zamanlarda monoklonal antikorlar kullanılarak da biyospesifik immobilizasyon yapılmaktadır (Telefoncu, 1997).

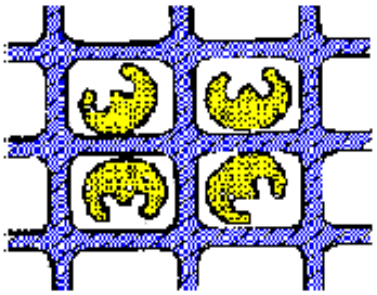
Biyospesifik bağlama yönteminde en sık kullanılan sistem ise biyotinavidin sistemidir. Avidin, ayrışma katsayısı 10^{-15} M civarında olan spesifik iyon çifti etkileşimiyle dört adet biyotin ligandı bağlayabilen, tetramerik bir proteindir. Bu tip bir immobilizasyonda reaktif fonksiyonel gruba bağlı biyotin türevleri hem taşıyıcı yüzeye hem de proteine kovalent bağlanmıştır. Biyotinlenmiş taşıyıcı öncelikle

avidin ile daha sonra da biyotinlenmiş enzim ile mualeme edilir. Kapsamlı manipülasyonların kullanımını gerektirdiği ve maliyet yüksekliği nedeniyle bu yöntem sadece sulu sistemlerde, pahalı enzimlerin kullanıldığı durumlarda uygun olmaktadır (Öztürk, 2009).

1.2.1.1.(2). Tutuklama

Tutuklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir ortamda durdurulmaya zorlanmaktadır. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştiği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilmektedir. Bu immobilizasyon yöntemini diğer üç yöntemden ayıran en önemli özelliği bu teknikte enzim molekülünün diğer tekniklerde olduğu gibi herhangi bir taşıyıcıya kovalent veya non-kovalent olarak bağlanmamış olmasıdır (Telefoncu, 1997). Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olarak üçe ayrılmaktadır;

Polimer Matrikse Tutuklama Yöntemi; bu yöntem, polimerizasyon ve çapraz bağlamanın oluştuğu ortamda enzimin de bulunması durumunda çapraz bağlama sonucu oluşan kafeslerde enzimin tutulması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemin avantajlı ve dezavantajlı yönleri bulunmaktadır. Yöntemin avantajları; çok kolay uygulanabilir, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktarda enzime ihtiyaç duyulmasıdır. İmmobilizasyon işlemi sırasında nötral ve suda çözünmeyen taşıyıcılar kullanıldığından yüklü taşıyıcılara gerek duyulmamaktadır. Yöntemin dezavantajları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun, deney koşullarına oldukça bağımlı olması ve immobilize enzimin sadece küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir. Diğer bir dezavantajı ise polimer sentezlenirken gözenek çapının hassas kontrolü çoğunlukla mümkün olmadığından kütle transferinin kısıtlanması tutuklanmış enzim için önemli bir problem teşkil etmektedir (Telefoncu, 1997).



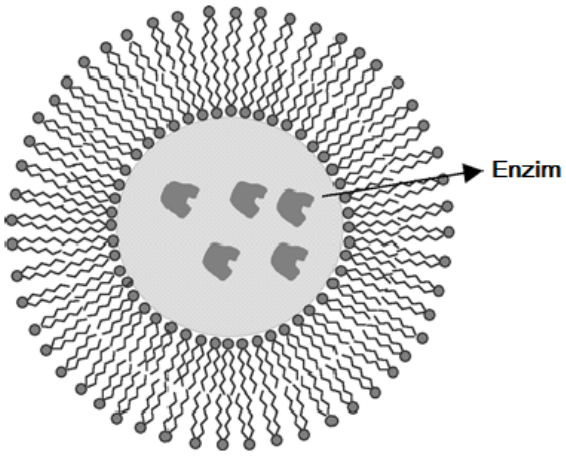
Şekil 1.7. Matrikste tutuklama yöntemi

Mikrokapsülleme; bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanmaktadır. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μ arasında değişmektedir. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır (Chang, 1976).



Şekil 1.8. Mikrokapsülde tutuklama yöntemi

Lipozom Tekniği; bu yöntem, sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanmaktadır (Regen ve ark., 1984). Süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel bir yöntemdir. Oldukça büyük bir kontak yüzeyine sahip olup, aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlamaktadır (Şekil 1.9). Bunların yanında, substrat ve ürünün membrandan geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin aktivite kaybetmesi ve sıvı olan membrandan enzim kaçma olasılığı bulunmaktadır (Luisi ve Magid, 1986).



Şekil 1.9. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu (Cao, 2005)

1.2.1.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin herhangi bir taşıyıcıyla fiziksel veya kimyasal etkileşiminden çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir yöntemdir (Weethall, 1976). Enzimler çözünür formda kullanılmadan önce düşük veya yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerle kimyasal olarak modifiye edilerek daha kullanışlı ve kararlı hale getirilebilirler. Örneğin bazı enzimlerin düşük molekül ağırlıklı bileşiklerle açillenmesi enzimin kararlılığını artırmaktadır (Tükel ve Alptekin, 2007).

Enzimin membran içerisinde immobilizasyonunda ise enzimin kaçışı ve mikrobiyal kontaminasyon söz konusu değildir. Membranlar kolaylıkla rejene edilip kullanılabilir. Birden fazla enzimin bir arada immobilize edilmesi mümkündür. Ürün ve substratlar, membran sayesinde seçimli olarak kontrol edilebilir. Kütle transferinde önemli bir engel oluşu ve membranda zamanla tabakalaşma gözlenmesi bu tekniğin dezavantajları arasında sayılabilir. (Telefoncu, 1997).

Yarı geçirgen özellik gösteren oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu immobilizasyon yöntemi hiçbir kimyasal bileşiğin veya tekniğin kullanılmasının gerekmediği son derece kolay bir yöntemdir. Oyuk elyaf membranlar ile ultrafiltrasyon membranları enzimi geçirmezken substrat ve ürünün geçişine izin

verir. Ayrıca mikropların enzime ulaşmasını engelleyerek koruyucu etki gösterirler. Enzim desteğe herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmez, ancak substratın membrandan geçip enzime ulaşmasındaki kısıtlamalar bu yöntemin en önemli dezavantajlarından birini oluşturur. Substrat molekülü ne kadar küçükse membrandan geçişi o denli kolay olacağından enzimin etkinliği de o oranda artacaktır (Yıldırım, 2010).

1.2.1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

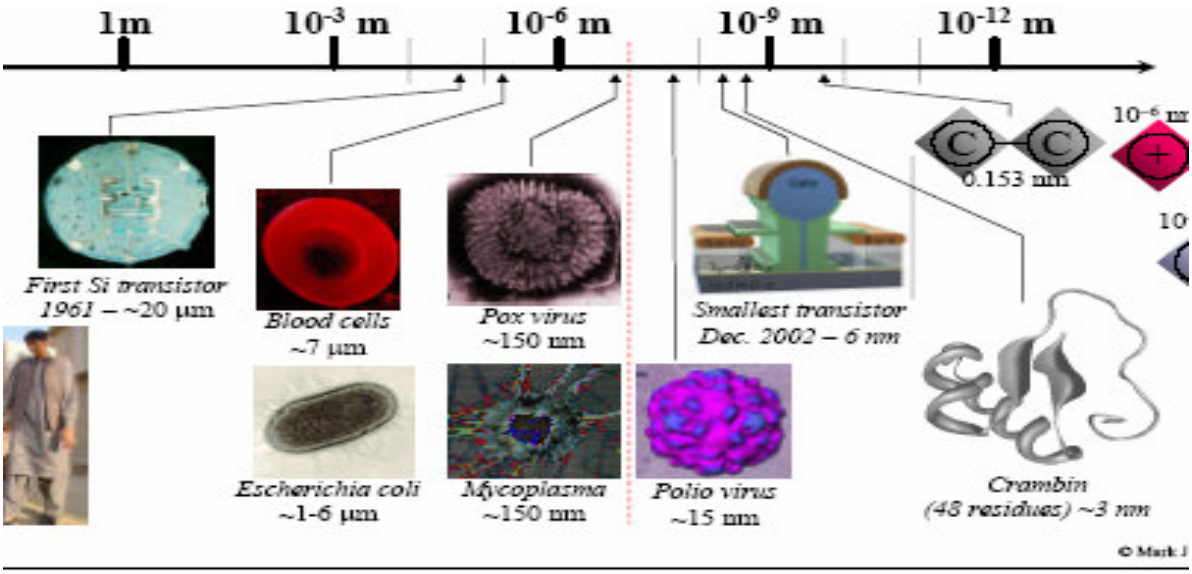
Enzimlerin immobilizasyonu için çok sayıda teknikler geliştirilmesine karşın, enzimlerin yapılarının ve kimyasal özelliklerinin birbirinden çok farklı olması, oluşan ürünlerin ve kullanılan substratların farklı özelliklere sahip olmaları nedeniyle enzimler veya uygulamaları için geçerli tek bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen her farklı enzim için ve her farklı durumda bir veya birkaç değişik yöntem önerilebilir. Çizelge 1.1'de immobilizasyon yöntemlerinin karşı kıyaslanmaları gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (Wiseman, 1986; Telefoncu,1997).

Karakteristik	Karşı Bağlama	Fiziki Adsorpsiyon	İyonik Bağlanma	Şelat veya Metale Bağlama	Kovalent Bağlanma	İçinde Tutma
Hazırlama	Orta	Kolay	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Bağlanma Gücü	Güçlü	Zayıf	Orta	Orta	Güçlü	Orta
Enzim Aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	İmkansız	Mümkün	Mümkün	Mümkün	Nadiren	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Orta	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
Enzimin Mikrobiyal Ataklara Karşı Korunabilmesi	Mümkün	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet

1.3. NANOTEKNOLOJİ

Nano, kelime anlamı ile herhangi bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri demektir. Nanoyapılar uzunluk olarak bakıldığında yaklaşık 10–100 atomluk sistemlere karşılık gelmektedirler. 1–500 nanometre büyüklük aralığına nanoölçek denir (Mark J. Biggs, 2003).



Şekil 1.10. Nanoölçek (Mark J. Biggs, 2003).

Nanoteknoloji, maddenin tek bir atom veya tek bir molekül düzeyinde ayrılması, birleştirilmesi ve deforme edilmesi süreçlerinden oluşur şeklinde tanımlanmıştır.

Nanoteknoloji uygulamalarının temelinde materyal boyutlarının küçültülmesi sonucu fiziksel özelliklerin değişmesi vardır. Örneğin nanopartiküller çok büyük yüzey alanı / hacim oranına sahiptirler. Buna bağlı olarak floresans gibi optik özellikler partikül çapının bir fonksiyonu haline gelirler. Nanopartiküller kullanılarak yapılan malzemelerde sertlik ve elastikiyet özellikleri değişir. Geleneksel polimer yapıların nanopartiküller kullanılarak güçlendirilmesi mümkündür. Böyle nanoteknolojik olarak güçlendirilmiş materyallerin ağırlığı azalırken dayanıklılık ve fonksiyon çeşitliliği artmaktadır (Papazoğlu ve Parthasarathy, 2007).

1.3.1. Nanoteknolojinin uygulama alanları

1.3.1.1.Tıp

Biyoloji ve tıp alanındaki çeşitli uygulamalarda nanomateryallerin benzersiz özelliklerinden yararlanılmaktadır. Nanomateryallerin biyolojik molekül veya yapılarla birlikte kullanılması uygulamaları da giderek artmaktadır.

Nanomateryallerin boyutları pek çok biyolojik molekül ve yapıların boyutları ile benzerlik gösterdiğinden nanomateryaller *in vivo* ve *in vitro* biyomedikal araştırmalarda da kullanılabilmektedir. Medikal tanı uygulamalarında, İlaç iletiminde, Hedeflenmiş veya kişiye özel ilaç üretimlerinde ve doku mühendisliği alanında da zarar görmüş dokunun tamiri veya yeniden üretilmesi konusunda nanoteknolojiden yararlanılmaktadır.

1.3.1.2. Kimya ve Çevre

Kimyasal kataliz ve filtrasyon teknikleri nanoteknolojinin şimdiden öne çıkan uygulamalardır. Belirli bir kimyasal çevreye (ligandlar) veya spesifik optik özelliklere sahip nanopartiküller gibi yapıların sentezlenmesi, istenen kimyasal özelliklere ulaşılmasını mümkün kılmaktadır.

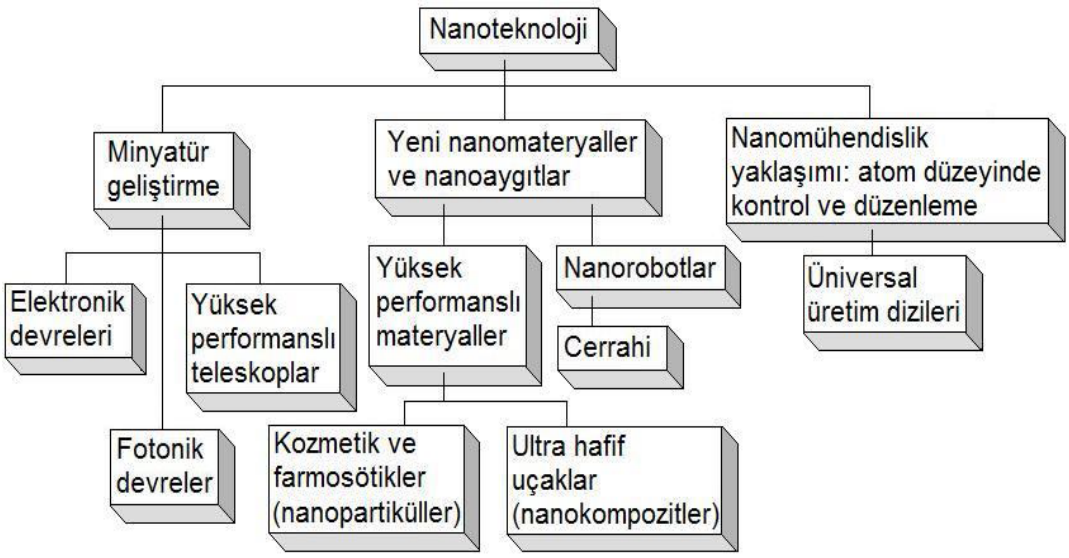
Çok yüksek yüzey/hacim oranı sağlanması nedeniyle nanoteknolojiden kimyasal kataliz alanında çok yararlanılmaktadır. Nanopartiküllerden katalizde yararlanma potansiyeli yakıt pillerinden katalitik dönüştürücü ve fotokatalitik aygıtlara kadar geniş bir alanı kapsamaktadır. Atık-su arıtılması, hava temizlenmesi ve enerji depolama aygıtlarının geliştirilmesi üzerine de nanokimyanın önemli katkıları olmaktadır**.**

1.3.1.3. Enerji

Nanoteknolojinin enerji ile ilgili uygulamaları başlıca enerji depolanması, dönüşümü, tasarrufu ve yenilenebilir enerji kaynaklarının geliştirilmesi konularında

yoğunlaşmaktadır. Örneğin, enerji tüketiminin azaltılması ışık-yayan diodların (LED) veya kuantum kafes atomların (QCA) üretilmesinde nanoteknolojiden yararlanılması şeklinde olmaktadır. Ayrıca nanopartiküllerin, yüzey alanını büyütmesi nedeniyle daha verimli güneş pillerinde (solar cells) kullanılması veya çevre dostu enerji sistemlerinin üretilmesinde kullanılması da son zamanlardaki uygulamalardır.

Ayrıca; yiyeceklerin üretimi, işlenmesi, güvenliği ve paketlenmesinde, Nanokompozit materyaller anti-mikrobiyal ajanların kaplama filmlerine yerleştirilmesinde, Seramik veya cam yüzeylere kendi kendini temizleme veya kolay temizlenebilir olma özelliklerinin kazandırılmasında da nanoteknolojiden yararlanılmaktadır. Nanoteknolojinin uygulama alanları Şekil 2.2'deki gibi genelleştirilebilir.



Şekil 1.11. Soldan sağa doğru nanoteknolojinin dolaylı, direkt ve yaklaşımsal uygulama alanları (Ramsden, 2005).

1.4. NANOPARTİKÜLLER

Enzim immobilizasyonu, sürekli operasyon ve enzim saflığı için kullanılan geniş ölçekte uygulanabilen popüler bir stratejidir. İmmobilize enzimlerin zayıf biyokatalitik etkileri ticari kimyasal proseslerle yarışmak için geniş ölçekte

biyoproseslerin gelişimini kısıtlamaktadır. Biyokatalitik etkinliğin gelişiminde, taşıyıcı materyallerin difüzyon kısıtlaması görülür. Diğer yandan, gözenekli materyaller yüksek enzim yükleme özelliği gösterseler de substrat difüzyon kısıtlaması daha fazla olur (Jungbae ve ark. , 2006).

Enzim taşıyıcı materyalin boyutundaki azalma genellikle immobilize enzimin etkinliğini geliştirir. Yüzeye bağlanmalarda, küçük partiküller enzimin tutulabilme için daha geniş yüzey alanına sahiptirler bu sayede partikülün birim kütlesi basına bağlanan enzim miktarı artar (Jia ve ark., 2003). Gözenekli materyallere enzim immobilizasyonunda, küçük gözenekli partiküllerde büyük gözenekli partiküllere oranla substrat difüzyonu az olduğundan, daha düşük kütle transfer direnci beklenir.

Son yıllarda, enzim immobilizasyonu için, destek materyal olarak nanoyapıların kullanımına büyük ilgi vardır (Daubresse ve ark ., 1996; Chen ve Su, 2001; Chen ve ark., 2001; Jia ve ark., 2003). Nanopartiküllerin birim kütlesi basına düsen yüzey alanı geniş olduğundan dolayı, nanopartiküller üzerine enzim bağlanması etkili bir şekilde başarılabilir (Chen ve Su, 2001).

Performans özelliklerine ek olarak, nanopartiküllerin çözeltideki davranışları, hem homojen hem de heterojen katalizler arasındaki geçiş bölgesini de vurgular. Partikül boyutu ve çözelti viskozitesine bağlı olan partikül hareketliliği, partiküllere immobilize edilmiş enzimin asıl aktivitesini etkiler (Jia ve ark., 2003).

1.4.1.1. Magnetik nanopartiküller

Magnetik nanopartiküller proteinlerin ve enzimlerin immobilizasyonu, biyoayırma, immunoanalizler, ilaç dağılımı, biyosensörler ve buna benzer geniş uygulamaları nedeniyle oldukça dikkat çekmektedir. Magnetik nanopartiküller ticari olarak önemli oldukları kadar analitik kimyada da özel bir öneme sahiptirler. Çünkü herhangi bir analitik protokolün başında veya sonunda magnetik alanlar kullanılarak magnetik nanopartikülleri ele geçirme olasılığı ile analitlerin tek bir adımda hızlı saflaştırılmasına izin verir (Fuentes ve ark., 2001).

Magnetik nanopartiküller bir destek materyali olarak çeşitli avantajlara sahiptir. Bunlar:

- İyi kütle transfer özellikleri
- Kolay ayırmaya ve immobilize enzimlerin tekrar kullanılmasına olanak
- Enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan geniş spesifik yüzey alanı olarak sıralanabilir. Magnetik nanopartiküller şimdiye kadar lipazların, proteazların ve diğer enzimlerin immobilizasyonu için kullanılmıştır (Kuroiwa ve ark., 2008).

1.5. LİPAZLAR

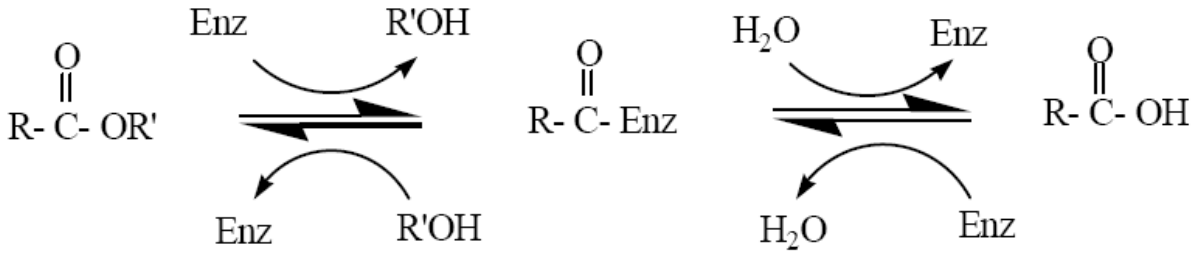
Lipazlar (triaçilgliserol açil hidrolazlar, E.C.3.1.1.3.) gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerinden oluşan esterlerin sentezini ve hidrolizini katalizlerler. Lipazlar hidrolaz sınıfı enzimlerdendirler. Gliserin esterlerini triolein ve tripalmitin gibi uzun zincirli yağ asitlerini parçalarlar.

Lipazlar biyoteknoloji çalışmalarında çok amaçlı kullanılabilirlikleri, spesifikliğin olmadığı kimyasal proseslere spesifiklik kazandırmaları, yan reaksiyonları önlemeleri ve reaksiyon ürünlerinin ayrılmasıyla ilgili problemleri kolaylaştırmaları gibi birçok özellikleri nedeniyle her geçen gün artan bir ilgi ve talep vardır. Lipazların enzim pazarındaki payının büyümesinde, bu enzimlerin enantio seçicilik, bölgesel seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi özellikleri etkili olmuştur. Lipaz enzimleri yeryüzü flora ve faunasında geniş bir yere sahip olmalarına karşın daha çok bakteri, mantar ve mayalardan oluşan mikrobiyal florada yer almaktadırlar. Lipazlar, domuz ve insan gibi memelilerde, kene otu tohumu (*Ricinus communis*) ve kolza tohumu (*Brassica napus*) gibi yüksek yapılı bitkilerde de bulunmaktadır. Enzim üretiminde daha çok mikrobiyal kaynak tercih edilmekle birlikte, *Candida sp.* , *Pseudomonas sp.* ve *Rhizopus sp.* ön planda yer alan enzim kaynaklarıdır. Lipazlarla yapılan endüstriyel uygulamalarda genellikle saflaştırılmış ticari enzimler tercih edilmektedir. 1960'ların sonuna doğru lipaz, tıpta sindirim yardımcısı olarak kullanılıyordu. Gelişen teknoloji ile beraber lipazların kullanım alanı da artmıştır. Lipazlar, yağ asit esterlerinin hem hidrolizini hem de sentezini katalizleyebilirler. Esterazların aksine, lipazlar sadece su-yağ arayüzeylerine adsorbe

olduklarında aktive edilirler. Katalizleme, su ile çözünmez substratın oluşturduğu ara yüzeyde gerçekleşir. Su ve yağın oluşturduğu bu arayüzey enzim aktivitesi için gereklidir. Lipazın immobilizasyonu sırasında lipaz ile birlikte immobilize edilmiş olan su, bu arayüzeyin oluşmasını sağlar.

Lipazlar, su-yağ arayüzeyinde suya karışmayan trigliseridlerin hidrolizini katalize eder. Belirli koşullar altında reaksiyon karışımındaki su miktarı, lipaz tarafından katalize edilen reaksiyonun yönünü belirler. Suyun çok az miktarda olduğu ya da hiç olmadığı zamanlarda yalnızca esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları meydana gelirken su içeriğinin yüksek olduğu koşullarda hidroliz reaksiyonları oluşur (Telefoncu, 1997).

Lipaz tarafından katalizlenen bir ester-hidroliz sentez reaksiyonu aşağıdaki gibi verilebilir:



Şekil 1.12. Lipaz tarafından katalizlenen bir ester-hidroliz sentez reaksiyonu

Lipaz katalizli biyoteknolojik uygulamalara aşağıda bazı örnekler verilmiştir:

1. Sentez Reaksiyonları

a) Balmumu sentezi

b) Poli

c) Mikroemülsiyon içerisindeki lipaz katalizli esterifikasyon reaksiyonları

d) Şeker esterlerinin sentezi

e) Açillenmiş glukoz sentezi gibi.

2. İnteresterifikasyon ve Transesterifikasyon

a) Tereyağının interesterifikasyonu

b) Trigliseritlerin interesterifikasyonu

c) Süt yağının oleik asitle interesterifikasyonu

d) Hurma yağının transesterifikasyonu

e) Kilogram ölçekli ester sentezi gibi.

3. Hidroliz

a) Zeytin yağının hidrolizi

b) Balık yağı ile zenginleştirilmiş doymamış yağ asidi sentezi gibi.ol-yağ asidi esterlerinin sentezi gibi.

1.5.1. Lipaz enziminin kullanım alanları

Çok yönlü mikrobiyal lipazlar hızla gelişmekte olan modern biyoteknolojide vazgeçilmez bir role sahip olmuşlardır. Biyolojik önemlerinin yanında lipazlar, yağların işlenmesi, deterjan ve yağ temizleyicilerin üretimi, gıdaların işlenmesi, ilaç ve kimyasal madde sentezleri, kağıt üretimi ve kozmetik ürünlerinin sentezi gibi pek çok alanda karşımıza çıkmaktadır. Lipazlar aynı zamanda yağ atıkları ve poliüretanın parçalanmasını hızlandırmak için kullanılabilmektedir. Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar(Telefoncu, 1997).

Tip	Kaynak	Uygulama Alanı	Üretici Firma
Fungal	*C.rugosa*	Organik sentez	Amano, Biocatalysists, Boehringer
			Mannheim, Fluka, Sigma, Genzyme
	C.antarctica	Organik sentez	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	T.lanuginosus	Deterjan katkısı	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	R.miehei	Gıda işlenmesi	Novo Nordisk, Biocatalysists, Amano
Bakteriyel	*B.cepacia*	Organik sentez	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	P.alcaligenes	Deterjan katkısı	Genencor
	P.mendocina	Deterjan katkısı	Genencor
	Ch. Viscosum	Organik sentez	Asahi, Biocatalysists

Çizelge 3.2. Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

Endüstri	Görevi	Ürün ya da Uygulama
Deterjan	Yağların Hidrolizi	Kumaşlardan yağ lekelerinin uzaklaştırılması
Sür ürünleri	Süt yağının hidrolizi	Peynir ve tereyağındaki tatlandırıcı ajanların geliştirilmesi
	Hızlı olgunlaştırma	Peynir
	Yağların modifikasyonu	Tereyağ
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, nemlendiriciler
Kağıt	Hidroliz	Geliştirilmiş kalitede kağıt
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması
İlaç	Transesterifikasyonu	Sindirimi kolaylaştırıcı düzenleyiciler
	Hidroliz	Özel lipidler
Yağ	Transesterifikasyon	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol
	Hidroliz	Mono ve diaçil gliseroller
İçecek	Aroma geliştirilmesi	İçecekler
Ekmek	Tat geliştirilmesi	Raf ömrünün uzatılması

Stereo seçici özelliklerinden dolayı lipazlar, birbiriyle karışmayan tek fazlı sistemlerde çeşitli rasemik organik asit karışımlarını çözmek için de kullanılmaktadır. Rasemik alkoller aynı zamanda, lipazların kataliz ettiği transesterifikasyon reaksiyonları ile oluşturulan saf enantiyomerler içinde de çözülebilirler (Telefoncu, 1997).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Literatürde farklı destek materyalleri kullanılarak lipaz immobilizasyonuna yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır**. Alexander E. Ivanov ve ark. 1997**; *Pseudomonas fluorescens* lipazını beş farklı destek materyaline (celite, oktil-silika, aminopropil-silika, glutardialdehit ile aktive edilmiş silika ve Eupergit C 250L) immobilize ederek tasarlanan immobilize sistemlerin işlem kararlılıklarını ve aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada, en iyi işlem kararlılığı gösteren Eupergit-C250L üzerine immobilize edilen enzimin birbirini izleyen 11 döngü sonunda başlangıç aktivitesinin %30'unu koruduğu göstermişlerdir.

IE. Fuentes ve ark. 2001; *Rhizomucor miehei* ve *Candida cylindracea* lipazlarını üç farklı polisilikat yapı üzerine (sepiolite, palygorskite, montmorillonite) immobilize etmişler ve ticari olarak kullanılan bir destek materyali olan Duolite-A 568 reçinesiyle geliştirdikleri immobilizasyon yöntemlerinin aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Ölçülen aktivite ve seçicilik sonuçları, biyodönüsümlerde sıklıkla kullanılan, göreceli olarak düşük mol kütleli proteinlerin immobilizasyonu için sepiolite ve palygorskitin destek materyali olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

F. Panzavolta ve ark. 2005; Destek materyali ile enzim arasındaki hidofobik etkileşimlere dayanan baksa bir çalışmada; hidrofobik polifenil asetilen polimerine *Candida rugosa* lipazı immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzim serbest enzime göre sıcaklık değişimlerine, pH değişimlerine ve organik çözücülere yüksek kararlılık gösterdiği çalışmada rapor edilmiştir.

G. Bayramoğlu ve ark. 2005; Epoksi grubu içeren poli(GMA-HEMA-EGDMA) mikrokürelerine *Candida rugosa* lipaz immobilizasyonunu çalışmışlardır. Bu çalışmada süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile hazırlanan epoksi grubu içeren poli(GMA-HEMA-EGDMA) mikrokürelerine uzatıcı kol olarak 1,6-diaminohekzan takılmış, ardından bağlama ajanı olarak glutarik dialdehit kullanılmıştır. Geliştirilen immobilizasyon yönteminde maksimum lipaz adsorpsiyon kapasitesini 28,3 mg/g polimer olarak bulmuşlar ve immobilizasyon koşullarını optimize ederek, kinetik parametreleri hesaplamışlardır.

Bai ve ark. , 2006; Nano ölçekte hazırlanan SiO_2 küreleri aldehit gruplarıyla fonksiyonel hale getirilmiş ve lipaz enzimi bu destek materyaline kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Geliştirilen immobilizasyon yönteminde zeytin yağının hidrolizi için domuz pankreas lipazının optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 8,0 ve 50-60ºC olarak saptamışlardır.

Kim ve ark. 2006; Bu çalışmada *Mucor javanicus* lipazı Stöber yöntemiyle hazırlanan silika nanopartiküller üzerine glisidil metakrilat (GMA) ile epoksi grupları bağlayıp, aktive ettikten sonra lipaz immobilize etmişlerdir. Yine aynı çalışmada GMA'nın epoksi grupları, etilen diamin reaktifi (EDA) ile amin gruplarına dönüştürülerek *Mucor javanicus* lipazının yapılara kovalent immobilizasyonu sağlamışlardır. Çalışma sonunda fonksiyonel hale getirilen silika nanopartiküllerin enzim yükleme kapasiteleri ve aktivitelerinde gözle görülür bir artış olduğunu, immobilizasyonla birlikte gerek pH, gerekse ısıl kararlılıkların serbest enzime göre daha iyi olduğunu rapor etmişlerdir.

Yang ve ark., (2008); Yaptıkları çalışmalarında serbest lipaz ve manyetik kürelere immobilize ettikleri *Candida rugosa* lipazı için optimum sıcaklığın serbest ve immobilize lipazlar için 35-40 ^{0}C arasında olduğunu saptamışlardır.

Nadia Kharrat ve ark. 2010; *Rhizopus oryzae* lipazın (ROL) silika aerojel üzerine immobilizasyonunu ve serbest enzimle karşılaştırılmasıyla ilgili çalışmayı yürütmüşlerdir. Bu iki türün aktivitesi için de optimum sıcaklık 37^0 C olarak belirlemişler ve jel üzerine immobilize edilen lipazın kararlılığının yüksek sıcaklık ve zor değişen pH aralığıyla birlikte artış gösterdiğini belirtmişlerdir. İmmobilize lipazın apolar çözücülere karşı tolerans gösterdiği ve 4^0C de 4 ay boyunca aktif kaldığını saptamışlardır.

Chia-Hung ve ark., (2011); Yaptıkları çalışmalarında kitosan-Fe_3O_4 destek materyali üzerine lipaz enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmişler ve immobilize enzimin depolama koşulları altında aktivitesini koruduğunu ama serbest lipazın gün geçtikçe aktivitesini kaybettiğini belirtmişlerdir**.**

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Sigma, Fluka ve Merck firması tarafından sağlanmıştır.

3.1.1. Araç ve Gereçler:

UV-Vis Spektrofotometre (ATI UNICAM), pH metre (HANNA 8417), Magnetik karıştırıcı, Santrifüj, Analitik terazi, Isıtıcı, Derece, Otomatik pipet, Su banyosu kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasallar

Lipaz, $FeCl_3.6H_2O$, $FeCl_2.4H_2O$, Amonyum Hidroksit, Sodyum Hidroksit, HCl, Etanol, Glutaraldehit, 3-APTES, Fosfat Tamponu, *p*-nitrofenil palmitat, Epiklorohidrin, Sodyum Karbonat, $CuSO_4.5H_2O$, Sodyum Sitrat, Folin-Ciocalteu, NaCl, Etilendiamin.

3.2. Metod

3.2.1. Magnetik Nanopartiküllerin Hazırlanması:

Magnetik nanopartiküller birlikte çökeltme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Valenzuela ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 300 mL 0,1 M $FeCl_3.6\ H_2O$ çözeltisiyle, 300 mL 0,05 M $FeSO_4.7H_2O$ çözeltisi hazırlanıp bir beherde 25°C'de 250 devir/dak hızla karıştırarak ısıtılmıştır. Daha sonra bu çözeltinin sıcaklığı 36°C'ye ulaştığında üzerine damla damla 1 N NaOH siyah bir çökelti oluşturuncaya kadar eklenmiştir. Bu işlem süresince çözelti karıştırılmış ve ısıtılmaya devam edilmiştir. Çözeltinin

sıcaklığı 52ºC'ye ulaştığında ısıtıcı kapatılmıştır. Daha sonra çözeltinin üzerine damla damla 3 N NaOH eklenerek siyah çökeltinin yoğunluğu arttırılmıştır. Elde ettiğimiz çökelekler etanol ile yıkanarak süzülmüş ve bir gece boyunca 74ºC'de etüvde kurutulmuştur.

3.2.2. Magnetik Nanopartiküllere APTES Ara Kolunun Bağlanması:

Lipaz enziminin immobilizasyonunda kullanılacak olan magnetik nanopartiküllerin immobilizasyonundan önce yüzeylerinin aktifleştirilmesi ve daha sonra glutaraldehit ile muamele edilmesi gerekmektedir. Magnetik nanopartiküllerin aktifleştirilmesinde Weethall (1976) tarafından bildirilen yöntem esas alınmış ve 3-APTES ile desteğin alkilamin türevi (silanlama) oluşturulmuştur. Magnetik nanopartikülün 2,0 gramı %4'lük (v/v) 3-APTES'in aseton içerisinde hazırlanmış çözeltisine eklenerek 45ºC'de 24 saat bekletilerek aktifleştirilmiştir. Daha sonra aktifleştirilen destek saf su ile yıkanarak etüvde 115ºC'de 1 gece kurutulmuştur. 3-APTES ile aktifleştirilen magnetik nanopartikül desteğindeki serbest amino gruplarının miktarının belirlenmesinde Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.

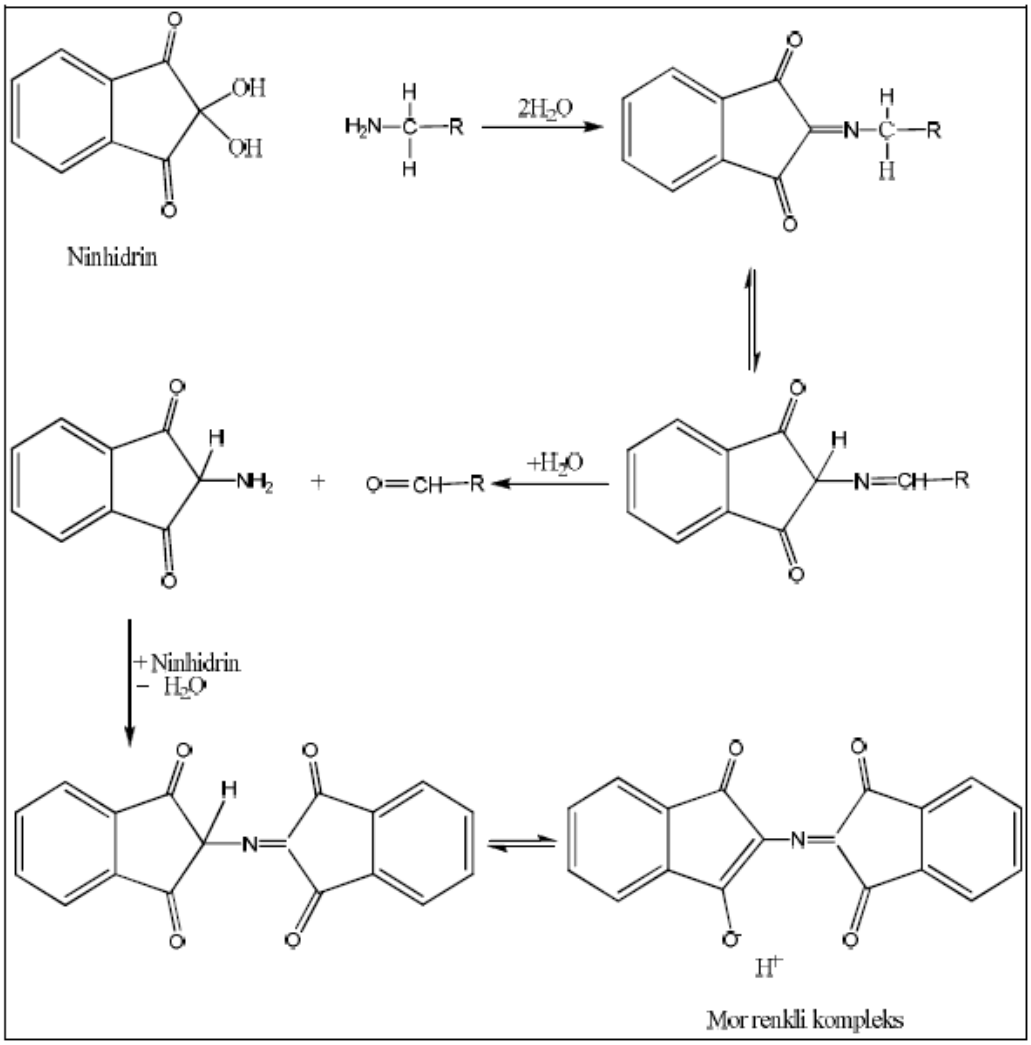
3.2.3. Magnetik Desteğin Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi:

1 g destek üzerine 50 mM pH=7.0 fosfat tamponunda %25 (W/v) olacak şekilde hazırlanmış glutaraldehit çözeltisinin 25 mL si eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılır (Cho ve Rhee, 1993). Destek saf suyla, süzüntüde Glutaraldehit gözlenmeyinceye kadar iyice yıkanır ve 50^0C de 1 gece boyunca kurutulur.

3.2.4. Magnetik Nanopartiküllerin Silanlama Sonrası ve Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi Sonrası Kalan Serbest Amino Gruplarının Tayini

Magnetik nanopartiküller silanlandıktan sonra destek yüzeyinde bulunan amino ($–NH_2$) grubunun miktarı Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Aynı yöntem silanlanan desteklerin glutaraldehit ile etkileştirilmesinden sonra glutaraldehit bağlanmadan kalan serbest $–NH_2$ grubu tayini içinde kullanılmıştır. Yöntemin esası, –NH2 grubunun ninhidrinle verdiği reaksiyon sonucunda oluşan kompleksin etanol fazına alınarak spektrofotometrik olarak 570 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. Amino gruplarının tayini için,

- Derişimi $6x10^{-4}$, $9x10^{-4}$, $12x10^{-4}$, $15x10^{-4}$, $18x10^{-4}$, $21x10^{-4}$ M olan 3-APTES çözeltileri hazırlanmıştır.
- Hazırlanan çözeltilerden 100 μL tüplere alınarak ve üzerine 200 μL ninhidrin (%2 (w/v)) çözeltisi eklenmiştir. Kör tüpü için 100 μL su alınarak üzerine 200 μL ninhidrin çözeltisi eklenmiştir.
- Tüpler 15 dakika kaynayan su banyosunda bekletildikten sonra buz banyosunda soğutulması için bekletilmiştir.
- Her bir tüpe 50:50 etanol:su karışımından 5 mL eklenerek girdap karıştırıcıda karıştırılmıştır.
- Çözeltilerin absorbansı köre karşı 570 nm'de okunmuştur. Amino grubu belirlenecek destek materyalinden 10 mg tartılarak üzerine 100 μL su eklendikten sonra standart çalışmasındaki basamaklar aynen uygulanmıştır. Örnekler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan kompleks etanol-su fazına alınarak absorbansı 570 nm'de okunmuştur.



Şekil 3.1. Ninhidrinin –NH2 grubu ile verdiği reaksiyon

3.2.5. *Candida rugosa* Lipazının Manyetik Nanopartiküller Üzerine Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu

1 g manyetik destek üzerine 1 mg /mL olacak şekilde 50 mM pH =7.0 fosfat tamponunda hazırlanmış lipaz çözeltilerinin 4 mL si oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılır. İmmobilizasyon süresi sonrasında magnet yardımıyla ayrılmaları sağlanır ve kendi tampon çözeltileriyle yıkanır. Süzüntülerde protein miktarı tayini Lowry ve Ark.(1951)'nın önerdiği yönteme göre yapılır ve başlangıçta ortama ilave edilen protein miktarından süzüntüde bulunan bağlanmayan protein miktarı çıkarılarak desteğe bağlanan protein miktarı hesaplanır.

3.2.6. Magnetik Nanopartiküllerin Epiklorohidrin İle Aktifleştirilmesi

Magnetik nanopartiküllere 1-kloro-2,3-epoksipropan'ın (epiklorohidrin) bağlanmasında Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 2,0 g destek üzerine 50 mL 2 M'lık NaOH olacak şekilde hazırlanmış çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra NaOH ile muamele edilen magnetik nanopartiküllerin üzerine 3,9 mL 0,05 mol epiklorohidrin eklenerek oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. Epiklorohidrin ile aktifleştirilen magnetik nanopartiküller süzülerek yıkanmış ve 24 saat süresince kurutulmuştur. Epoksi gruplarının olup olmadığını kontrol etmek için literatürde Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 0,5 g destek alınarak üzerine 2,6 mL 1,3 M'lık sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3$) ve bir damla fenolftalein eklenmiştir ve 0,1 M'lık HCl ile titrasyon yapılmıştır.

3.2.7. Lipaz Enziminin Epiklorohidrin Üzerinden Magnetik Nanopartiküllere Kovalent İmmobilizasyonu

Lipaz enziminin magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin üzerinden kovalent immobilizasyonu Sahoo ve ark., (2011) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Yukarıda bahsedildiği şekilde modifiye edilen magnetik nanopartiküllerden 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış derişimi 0,25 mg/mL olan lipaz çözeltisinin 8 mL'si 2,0 g desteğe ilave edilmiştir. Karışım 12 saat boyunca 4ºC'de karıştırılmıştır. İmmobilizasyon süresi sonunda immobilize lipaz preparatları süzülerek fosfat tamponu (50 mM, pH 7,0) ile süzüntüde protein kalmayıncaya kadar yıkanmıştır. Bu şekilde desteğe bağlanmayan serbest lipazın ortamdan tamamen uzaklaştığını anlamak için süzüntünün 280 nm'deki absorbansları ölçülmüştür. Süzüntülerdeki protein miktarı tayini Lowry ve ark., (1951) önerdiği yönteme göre yapılmıştır. Protein tayini yapıldıktan sonra immobilizasyonun başlangıcında ortama eklenen lipaz miktarı çıkartılarak 1,0 g desteğe bağlanan enzim miktarı hesaplanmıştır. İmmobilize enzimler kullanılıncaya kadar 4ºC'de saklanmıştır

3.2.8. Protein Tayini

Protein tayini için Lowry ve ark., (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşur. Bu kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şu önemli kaideye dikkat etmek gerekir ki bu reaktif yalnız asidik ortamda dayanıklıdır. Tarif edilen bu redüklenme ise pH 10'da gerçekleşmektedir. Bundan dolayı folin reaktifi alkali bakır-protein çözeltisine hemen ilave edilmeli ve derhal şiddetle karıştırılmalıdır. Bu suretle fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifi parçalanmadan önce indirgenme olayı gerçekleşir. Standart çözelti olarak albümin çözeltisi kullanılmıştır.

Total protein tayininde kullanılacak çözeltiler: Bunun için içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

- Çözelti A: 20 g Na_2CO_3 4,0 g NaOH saf suda birlikte çözülüp son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- Çözelti B: 0,5 g CuSO4.5H2O, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülüp son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- Çözelti C: 50 mL Çözelti A ve 1 mL Çözelti B karıştırılarak hazırlanmıştır.
- Folin Ciocalteu reaktifi: Folin Ciocalteu reaktifi saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
- Standart protein çözeltisi: 100 mL'de 14 mg sığır albümini olacak şekilde saf su içerisinde hazırlanmıştır.
- Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0, 50, 100, 125, 250, 500, 750 ve 1000 µL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi su ile 1 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin-

Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuş ve bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein grafiği kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.9. *Candida rugosa* Lipazının Aktivitelerinin Ölçümü:

Lipaz aktivitesinin ölçümü Wu ve Ark.(2004) önerdiği yöntem kullanılır. 0.9 mL fosfat tamponu (50mM, pH=7,0)içerisine derişimi 1mg/mL olacak şekilde hazırlanmış lipaz çözeltisinin 0,1 mL si veya 10 mg immobilize lipaz ilave edilir. Reaksiyon derişimi 0.2 mg/mL olacak şekilde etanol içerisinde hazırlanmış *p*-nitrofenil palmitat (*p-NNP)* çözeltisinin 1 mL sinin ilavesiyle 35 ^{0}C de başlatılmıştır. 5 dakika reaksiyon süresi sonunda reaksiyon 2 mL, 0.5N Na_2CO_3 ilavesiyle durdurulduktan sonra açığa çıkan *p*-nitrofenolün absorbansı 410 nm de ölçülmüştür.

3.2.10. *Candida rugosa* Lipazının Glutaraldehit ve Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Manyetik Nanopartiküllere Kovalent İmmobilizasyonu İçin Optimum Koşullarının Belirlenmesi:

- En uygun immobilizasyon pH sının belirlenmesi için pH; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 da immobilizasyonlar yapılır.
- En uygun tampon derişimin belirlenmesi için belirlenen uygun pH da 25, 50, 75, 100 mM tampon derişimlerinde immobilizasyon yapılır.
- En uygun immobilizasyon sıcaklığının belirlenmesinde belirlenen pH ve tampon derişiminde 5, 15, 25 ^{0}C de immobilizasyon yapılır.
- En uygun immobilizasyon süresinin belirlenmesinde 1, 2, 3, 6, 12 ve 24 saat süresi için immobilizasyonlar yapılır.
- En uygun enzim derişimlerinin belirlenmesinde 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0 mg/mL enzim derişimlerinde immobilizasyonlar yapılır.

- Desteğe bağlanan lipaz miktarı, gram desteğe bağlanan lipazın immobilizasyon sırasında ortama eklenen toplam lipaz miktarına oranı (%) şeklinde verilir.

3.2.11 Serbest ve İmmobilize *Candida rugosa* Lipazlarınn Karakterizasyonu:

- Serbest ve immobilize lipaz için optimum pH ın belirlenmesinde pH 5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; da aktiviteler ölçülür.
- Serbest ve immobilize lipaz örnekleri için en uygun tampon derişiminin belirlenmesinde optimum pH da 25, 50, 75 ve 100 mM tampon derişiminde lipaz aktivitesi ölçülülür.
- Serbest ve immobilize lipaz örnekleri için optimum sıcaklığın belirlenmesi için 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 ^{0}C de lipaz aktiviteleri ölçülür. Belirlenmiş olan optimum koşullarda, 0,1-16 mM *p*-nitrofenil palmitat derişimleri için serbest ve immobilize lipaz aktiviteleri ölçülür. Maksimum aktivite (Vmax) ve Michaeles-Menten sabitinin (Km), grafiksel değerlendirilmesinde, 1/V ye karşı 1/[S] değerlerinin çizilmesiyle elde edilen Linewever-Burk grafiği kullanılır.
- Ayrıca serbest ve immobilize lipaz için geri dönüşüm sayısı ($K_{cat}=V_{max}$ /[E]t ve katalitik etkinlik (K_{cat}/Km) hesaplanır.
- Serbest ve immobilize lipaz örneklerinin termal kararlığının belirlenmesi için serbest ve immobilize lipazlar maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklıkta ve 60^{0}C de belli süre bekletildikten sonra kalan aktiviteleri ölçülür.
- Serbest ve immobilize lipazların depolama kararlılığının belirlenmesinde lipaz örnekleri 5^{0}C ve oda sıcaklığında bekletilerek belli aralıklarla belli günlerde kalan aktiviteleri ölçülür.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

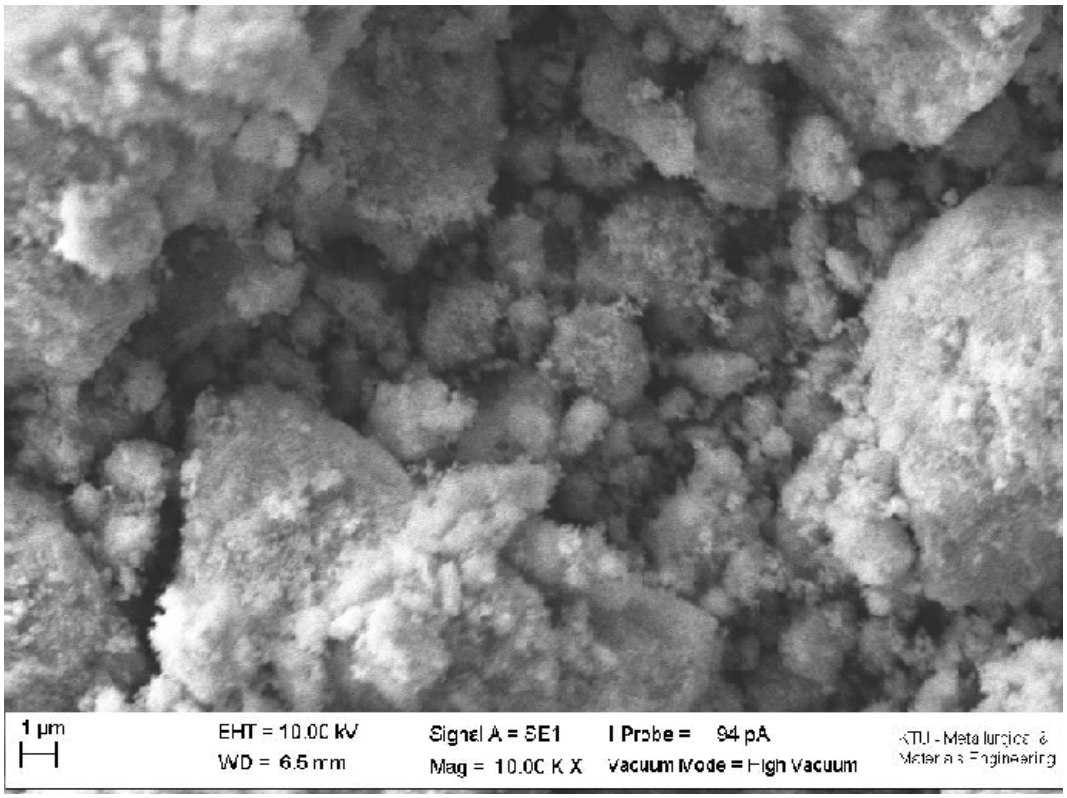
4.1. Bulgular

Bu çalışmada *Candida rugosa* lipazının aktifleştirilmiş magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilizasyonu araştırılmıştır. Serbest ve immobilize lipaz örneklerinin karakterizasyonu (optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, kinetik parametreler, termal ve depolama kararlılıkları) belirlenen optimum koşullardaki aktiviteleri ölçülerek yapılmıştır. Bu araştırma sonuçları aşağıda verilen alt başlıklarda detaylı bir şekilde verilmiştir.

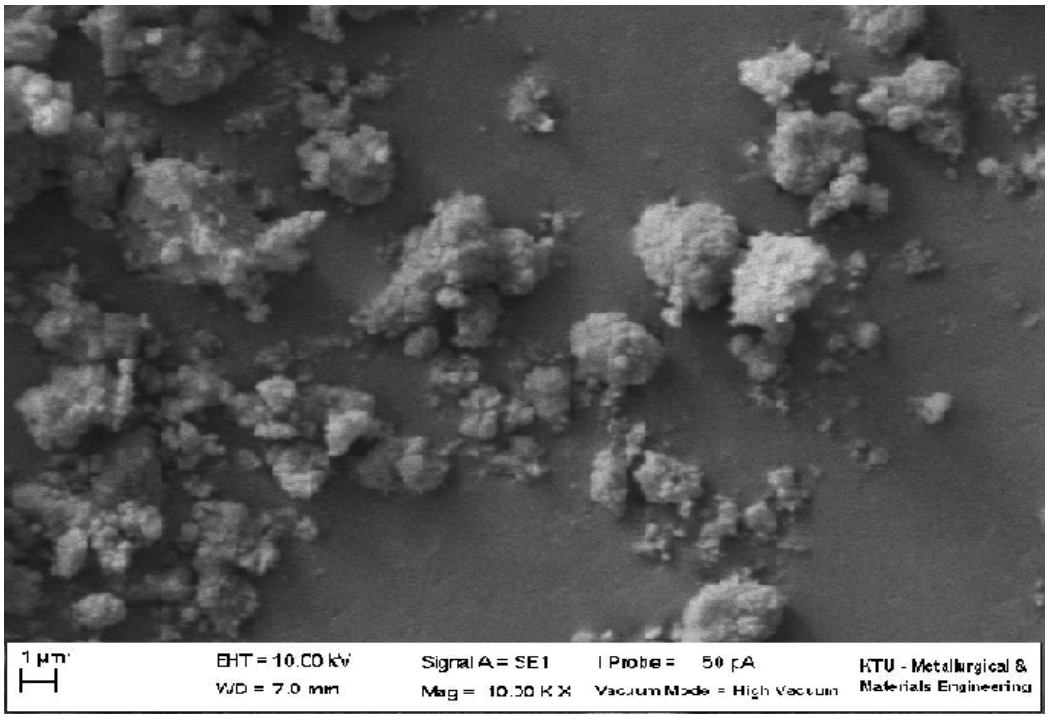
4.1.1. Magnetik Nanopartikül Sentezi İle İlgili Bulgular

4.1.1.1. SEM Analizi

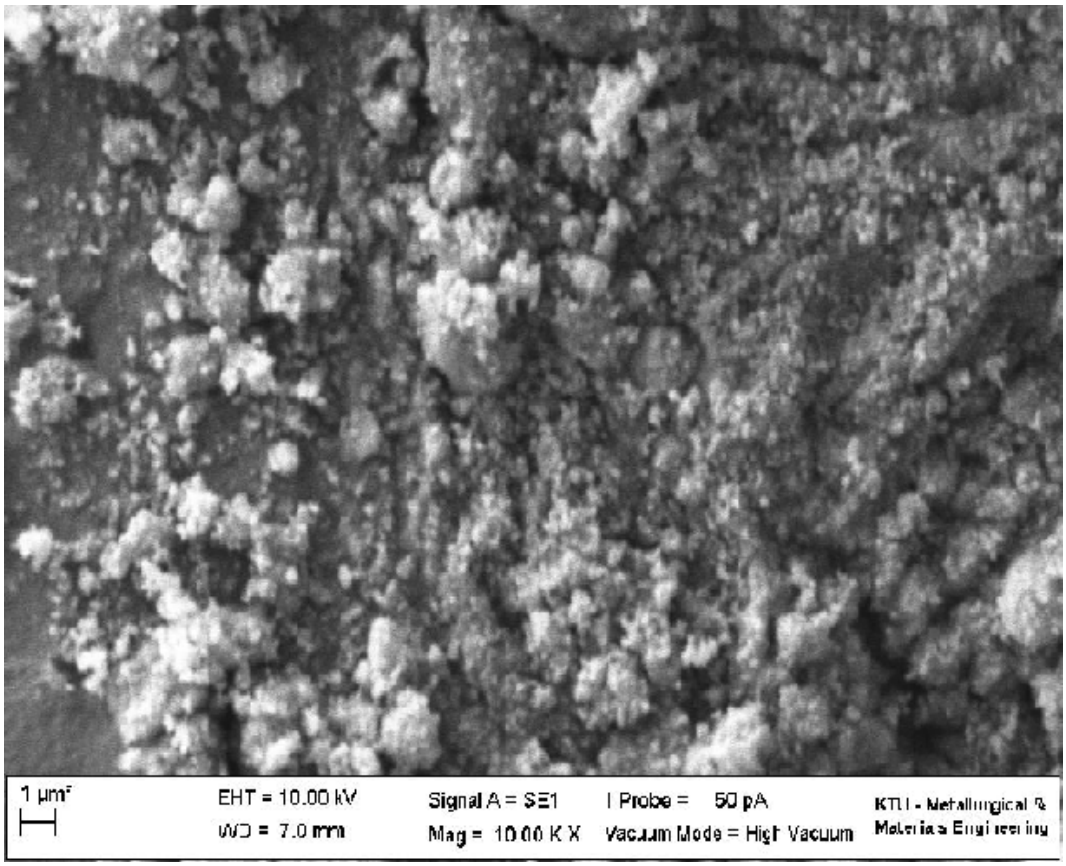
Sentezlenen Fe_3O_4 magnetik nano yapılarının boyut analizi, Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile ölçülmüş ve karakterizasyonu SEM (Zeis) mikroskobunda yapılmıştır. Ortalama spesifik ağırlığı 0,843 m^2/g, ortalama yüzey ağırlığı 7,113 um ve ortalama hacim ağırlığı 30,262 um olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hazırlanan nano yapıların ortalama boyutunun 158,2 nm olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.1. Magnetik Fe_3O_4 nanopartiküllerinin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü



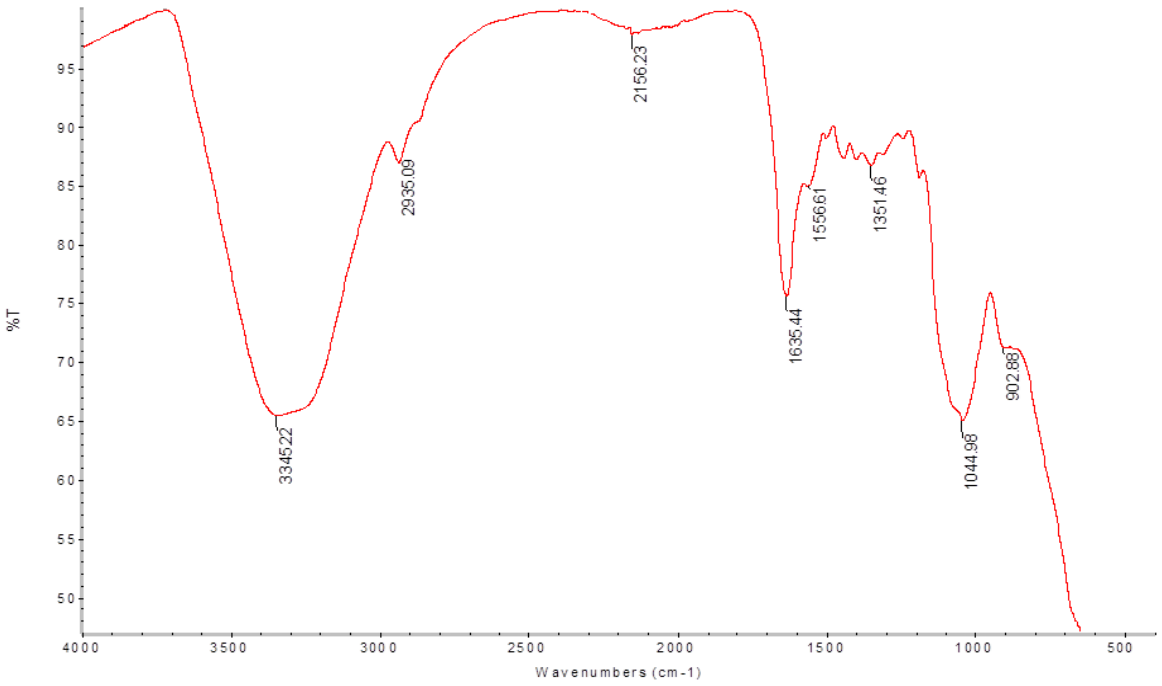
Şekil 4.2. Magnetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine glutaraldehit ara kolu bağlı örneğin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü



Şekil 4.3. Magnetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine epiklorohidrin ara kolu bağlı örneğin 10.000 kat büyütülmüş genel görünümü

4.1.1.2. FT-IR Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin FT-IR grafiği incelendiğinde (Şekil 4.4) 3345 cm^{-1} deki pikin numunenin tuttuğu suya veya hidrojen bağlı –OH gruplarına ait olan O-H gerilim titreşimi olduğu görülür. Yine 1635 cm^{-1} ve 1351 cm^{-1} deki pik suya ait olan O-H gerilim titreşiminden, 1044 cm^{-1} deki pikin epoksi gerilim titreşiminden (Ek 3, Ek 4) kaynaklanmıştır. 902 cm^{-1}'deki pikler ise α-FeOOH'i göstermektedir (Chen-Xiao ve ark., 2012).

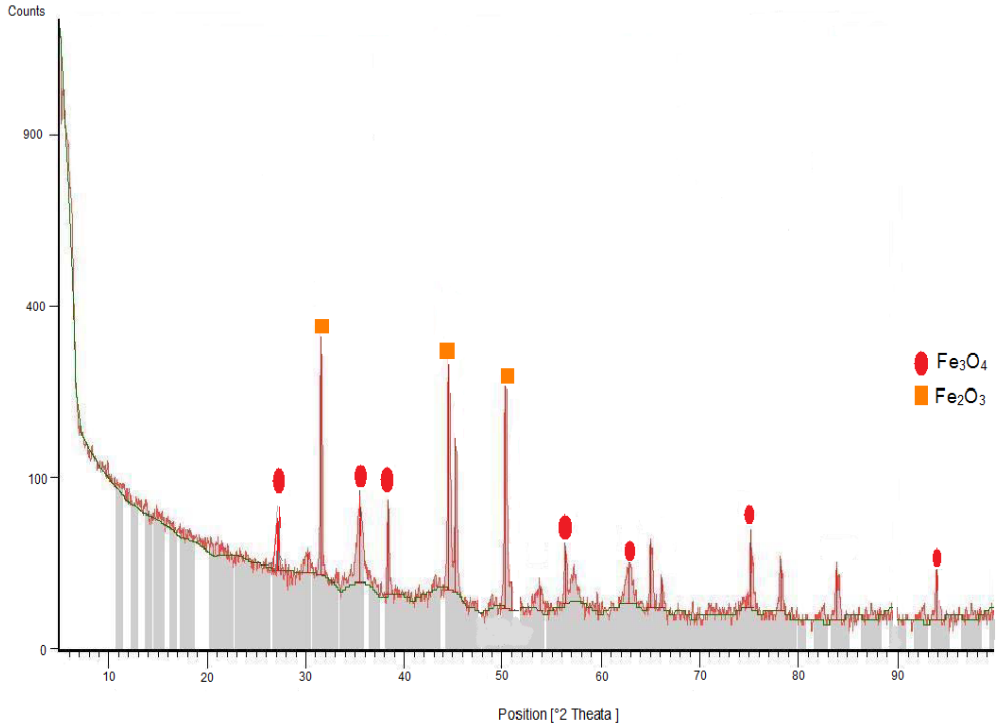


Şekil 4.4. Sentezlenen magnetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

4.1.1.3. XRD Analizi

X-ışını kırınımı kristalin bileşiklerin kalitatif olarak tanınmasında pratik ve uygun bir yöntemdir. Kristal malzemelerin atomlarının geometrik yapıları ve aralarındaki mesafe hakkındaki bilgilerin çoğu doğrudan kırınım çalışmalarıyla belirlenmiştir (Kılıç ve ark., 1998). Sentezlenen nanopartiküllerin nitel yapı analizinde Rigaku SmartLab marka X-Işını Kırınım Cihazı (X Ray Diffractometer) kullanılmıştır. XRD analizine göre sentezlediğimiz maddenin yapısında Fe_3O_4 ve Fe_2O_3 bulunmaktadır (Şekil 4.5). Piklerin

çoğu sentezlemek istediğimiz Fe_3O_4'e aittir.

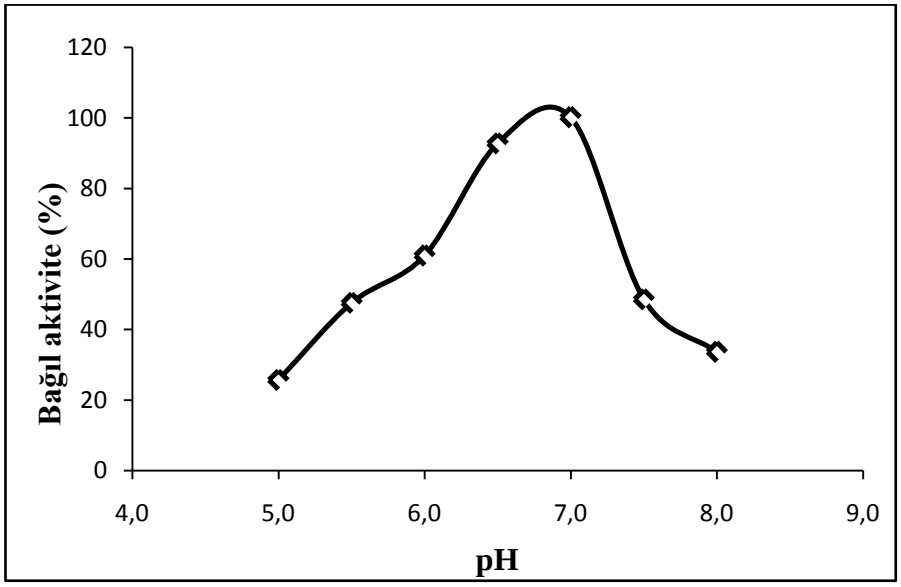


Şekil 4.5. Sentezlenen magnetik nanopartiküllerin XRD spektrumu

4.1.2. Serbest Lipazın Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular

4.1.2.1. Serbest Lipazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

Serbest lipazın aktivitesi farklı pH'larda (4,5 asetat, 5,5 sitrat, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 fosfat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 1 mg/mL derişimdeki çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.6).

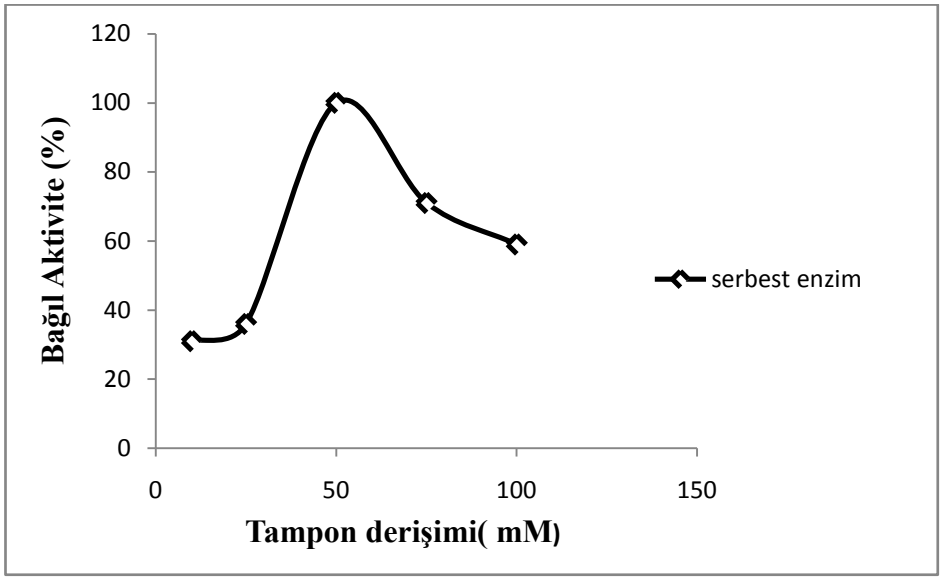


Şekil 4.6**.** Serbest lipazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi

Şekil 4.6'dan görüleceği gibi serbest lipaz için optimum pH 7,0 olarak belirlenmiştir.

4.1.2.2. Serbest Lipazın Aktivitesine Tampon Derişimin Etkisi İle İlgili Bulgular

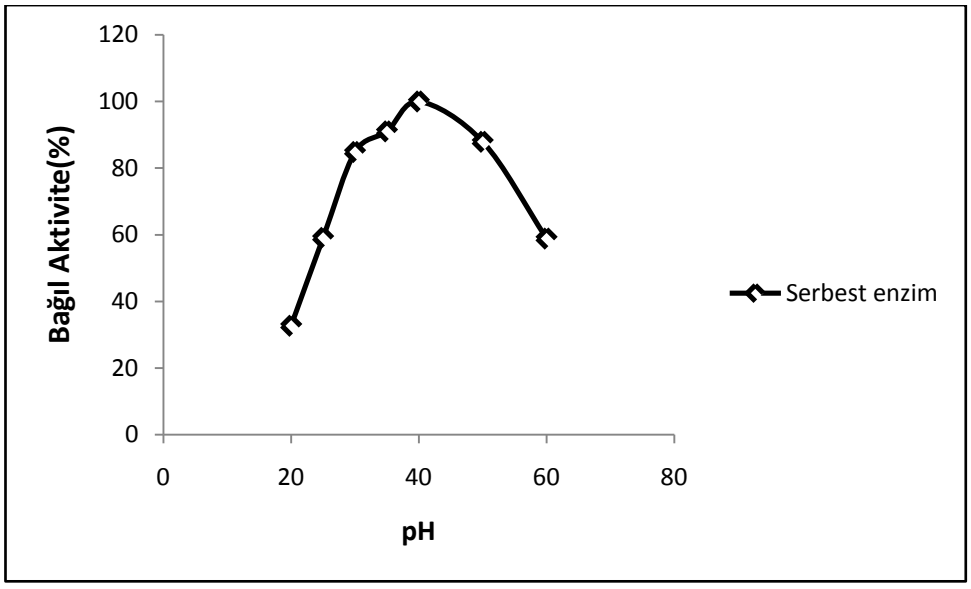
Serbest lipazın aktivitesi daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da (7,0) ve farklı tampon derişimlerinde (10, 25, 50, 75 ve 100 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüş ve sonuçlar % bağıl aktivite olarak şekil 4.7'de verilmiştir . Şekil 4.7'de görüldüğü gibi serbest lipaz enzimi için tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Serbest lipaz aktivitesinin pH 7,0 fosfat tamponunun derişimine bağlı olarak değişimi

4.1.2.3. Serbest Lipazın Aktivitesine Sıcaklık Etkisi İle İlgili Bulgular

Serbest lipazın daha önce belirlenmiş olan optimum pH 7,0 ve derişimi 50 mM tampon çözeltisi kullanılarak farklı sıcaklıklardaki (30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) aktiviteleri ölçülmüştür. Aktivitenin sıcaklığa bağlı olarak değişimi % bağıl aktivite olarak Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.

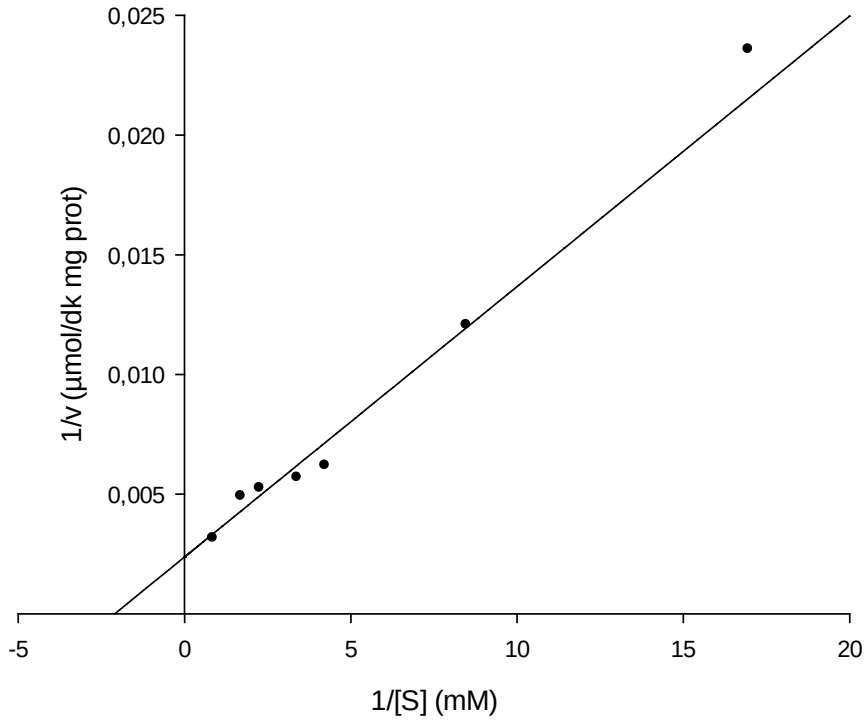


Şekil 4.8. Serbest lipazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

Serbest lipazın optimum çalışma sıcaklığı 40ºC olarak belirlenmiştir. 40ºC'nin üstündeki sıcaklık değerlerinde lipazın aktivitesi düşmektedir.

4.1.2.4. Serbest Lipazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

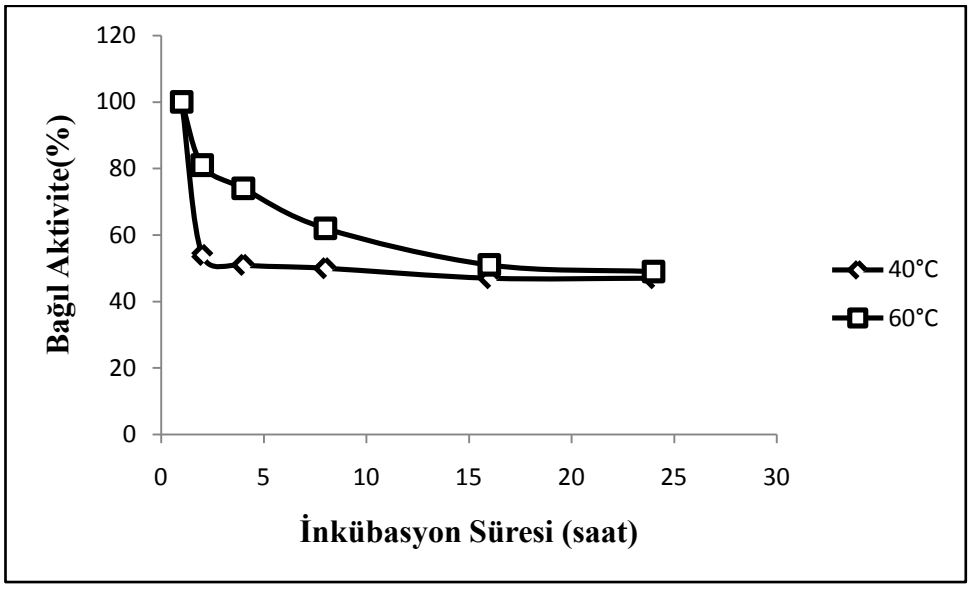
Serbest lipazın aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş (Şekil 4.9) ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. K_m, V_{max}, K_{cat} ve K_{cat}/K_m, değerleri sırasıyla 0,48 mM, 420,7 U/mg protein, $2,82x10^4$ dk^{-1}, $58,8x10^3$ dk^{-1} mM^{-1} olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. Serbest Lipaz için Lineweaver-Burk grafiği

4.1.2.5. Serbest Lipazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Serbest lipaz 2 farklı sıcaklıkta (40 ve 60°C) 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 2, 4, 8, 16 ve 24 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.10.). Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi % bağıl aktivite ve inkübasyon süresine karşı grafiğe geçirilmiştir.

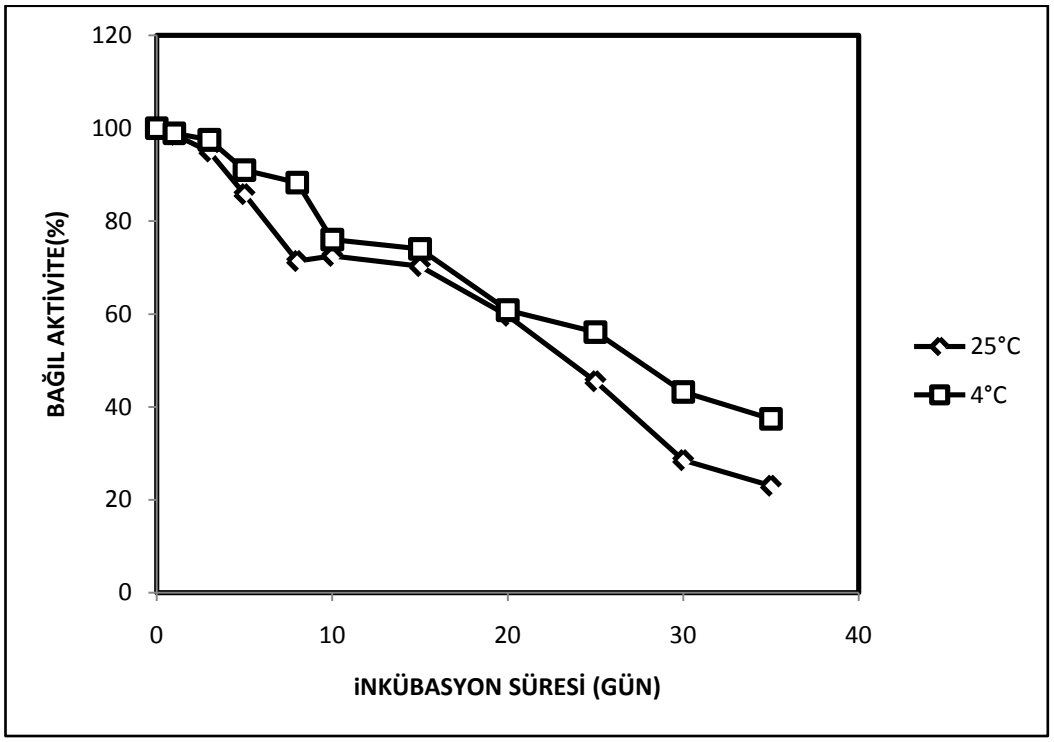


Şekil 4.10. Serbest lipazın 40 ve 60ºC'deki aktivitesinin inkübasyon süresine bağlıolarak değişimi

Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi % bağıl aktivite ve inkübasyon süresine karşı grafiğe geçirilmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda serbest lipazın 40 ve 60ºC'de başlangıç aktivitesinin sırasıyla %49 ve %39'unu koruduğu belirlenmiştir.

4.1.2.6. Serbest Lipazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Serbest lipaz başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Serbest lipazın 4ºC ve 25ºC'deki aktivitesinin depolama süresine bağlı olarak değişimi

Serbest lipazın 4ºC ve oda sıcaklığındaki başlangıç aktivitesinin sırasıyla %37'unu ve %23'ünü korudukları belirlenmiştir.

4.1.3. Lipazın Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İle İlgili Bulgular

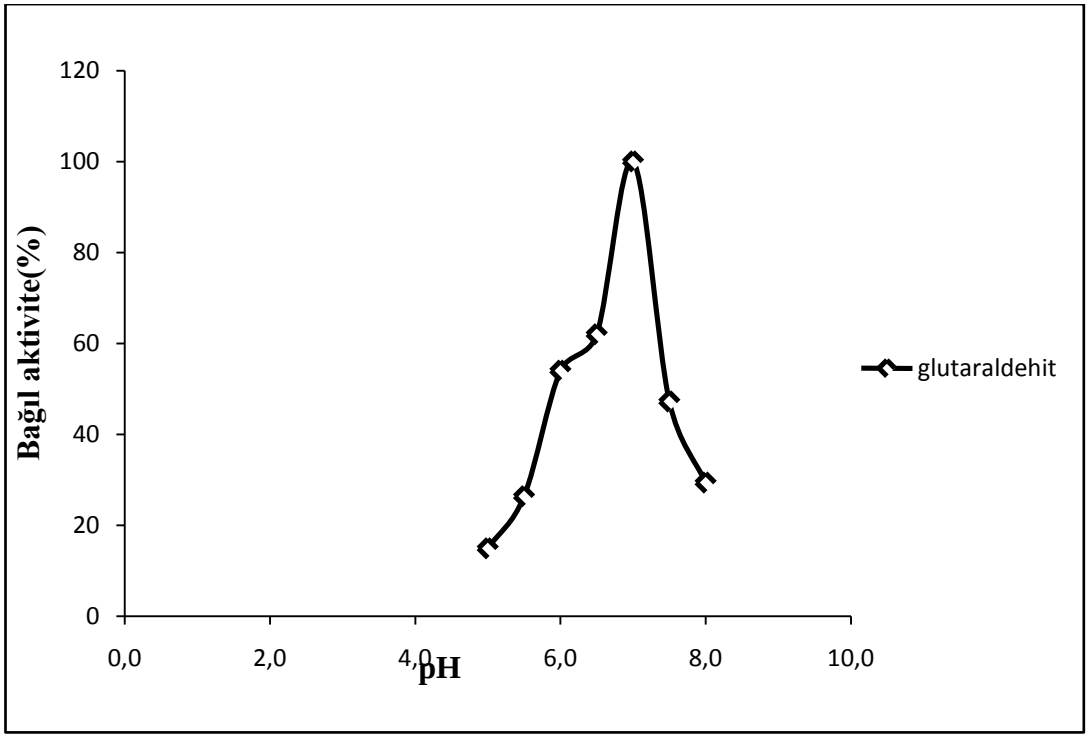
Lipazın magnetik nanopartiküllere immobilizasyonunda önce magnetik nanopartiküller 3-APTES ile silanlanmıştır. Silanlama işlemi sonunda destek yüzeyindeki –OH gruplarına bağlanan 3-aminopropil dietoksisilil gruplarının miktarı (dolayısıyla $–NH_2$ gruplarının miktarı) spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Silanlanmış magnetik nanopartiküllerin yüzeyindeki $–NH_2$ grubu miktarı 231 μmol/ g destek olarak bulunmuştur.

Silanlanan magnetik nanopartiküller glutaraldehit ile muamele edilmiştir. Glutaraldehit muamelesinden sonra magnetik nanopartiküllerden glutaraldehit

uzaklaşıncaya kadar yıkanmıştır. Silanlanan destekteki $–NH_2$'nin %78'ine glutaraldehitin bağlandığı saptanmıştır. Ayrıca destek üzerine bağlanan protein miktarı %28,08 mg prot./g olarak belirlenmiştir.

4.1.3.1. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın farklı pH'larda (4,5 asetat, 5,5 sitrat, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 fosfat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 1 mg/mL derişimdeki çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.12).

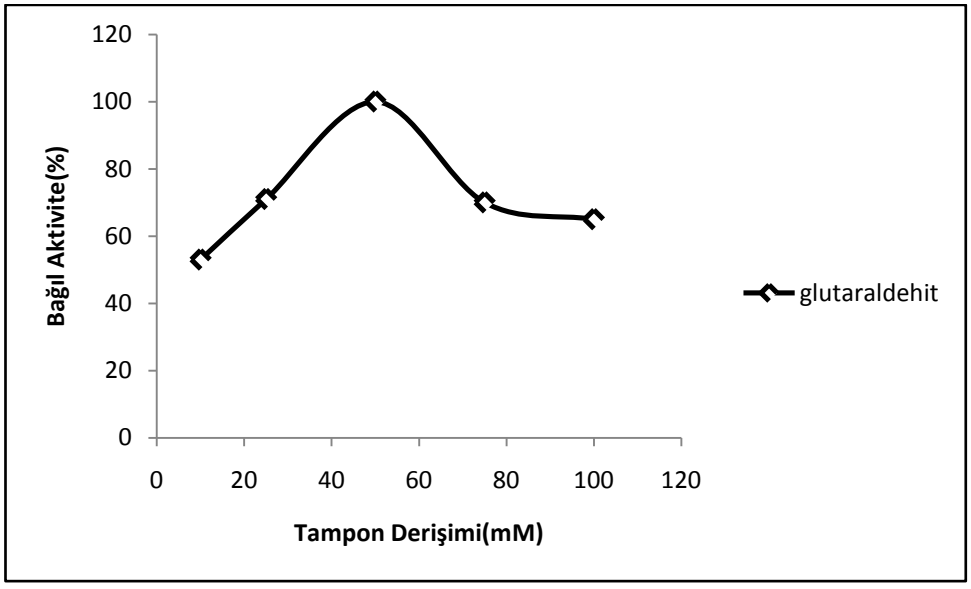


Şekil 4.12. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi

Şekil 4.12'de görüleceği gibi immobilize lipaz için optimum pH 7,0 olarak belirlenmiştir.

4.1.3.2. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazım Aktivitesine Tampon Derişiminin Etkisi İle İlgili Bulgular

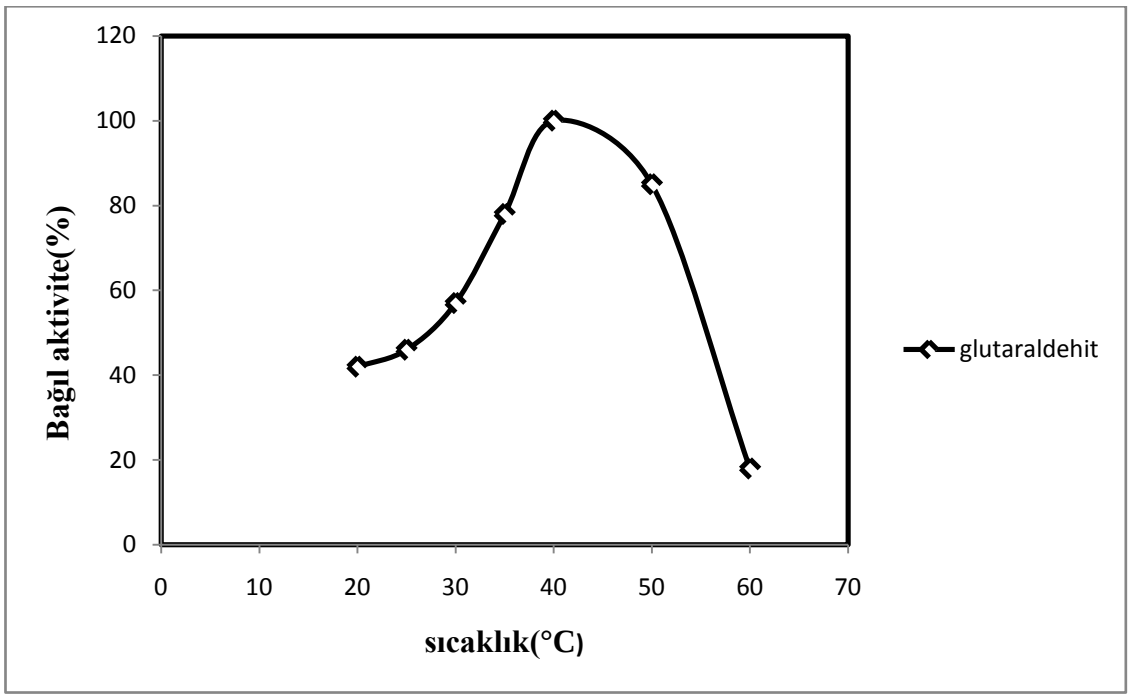
Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesi daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da (7,0) ve farklı tampon derişimlerinde (10, 25, 50, 75 ve 100 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 4.12). Şekil 4.13'de görüldüğü gibi magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipaz için tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesinin tampon derişimine bağlı değişimi

4.1.3.3. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesinin optimum pH 7,0 ve tampon derişimi 50 mM kullanılarak farklı sıcaklıklardaki (20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60°C) aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.14).

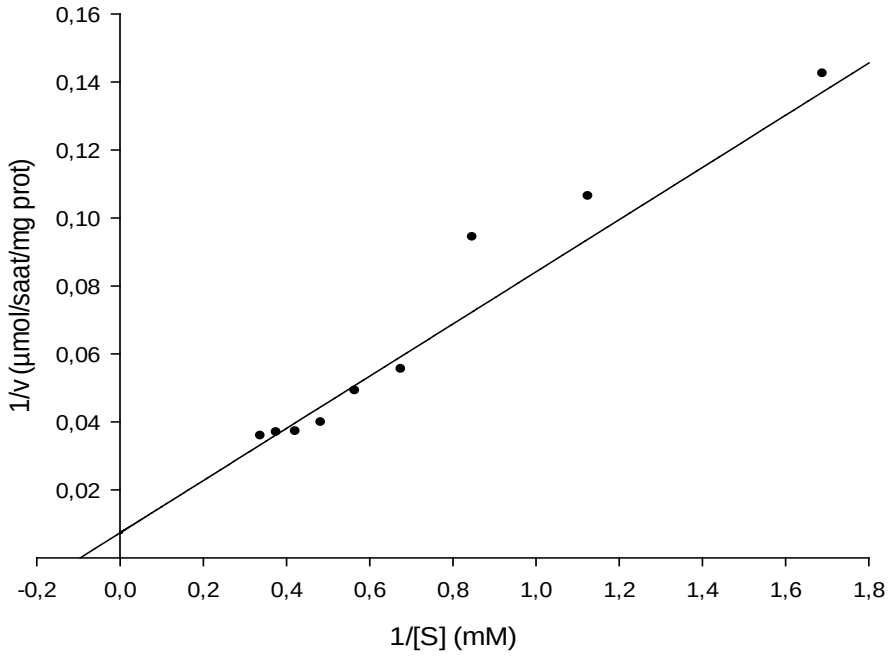


Şekil 4.14. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

Şekil 4.14'de görüldüğü gibi magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipaz için sıcaklık 40°C olarak belirlenmiştir.

4.1.3.4. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş (Şekil 4.15.) ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. K_m, V_{max}, K_{cat} ve K_{cat}/ K_m, değerleri sırasıyla 1,3 mM, 33,6 U/mg protein, $2{,}25x10^3$ dk^{-1}, $1{,}73x10^3$ dk^{-1} mM^{-1} olarak hesaplanmıştır.

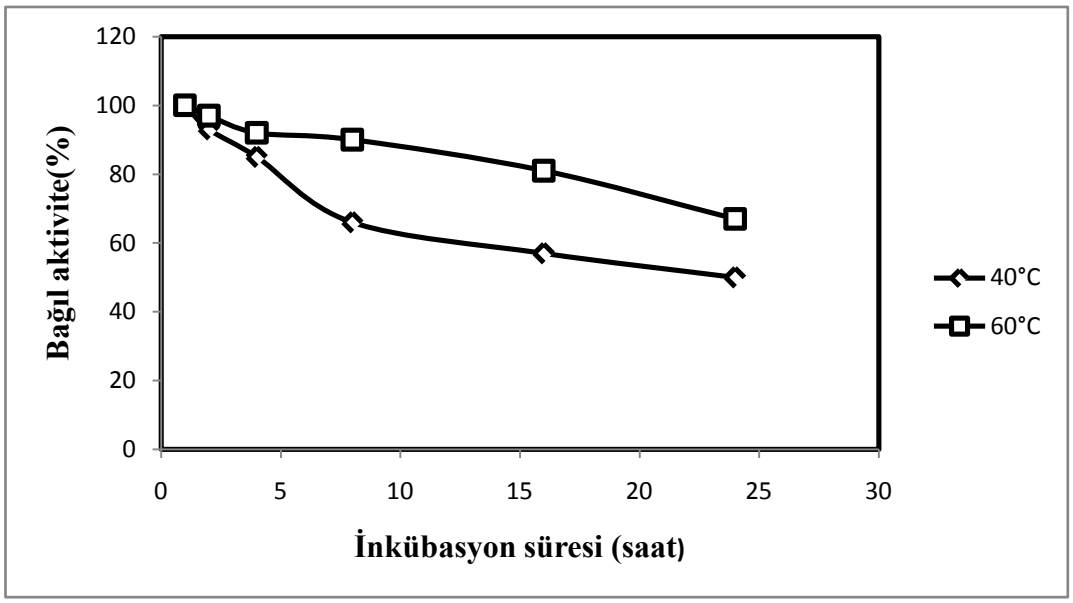


Şekil 4.15. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın Lineweaver-Burk grafiği

4.1.3.5. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen lipazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipaz 2 farklı sıcaklıkta (40 ve 60°C) 24 saat süreyle inkübe

edilmiş belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 2, 4, 8, 16 ve 24 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.16).

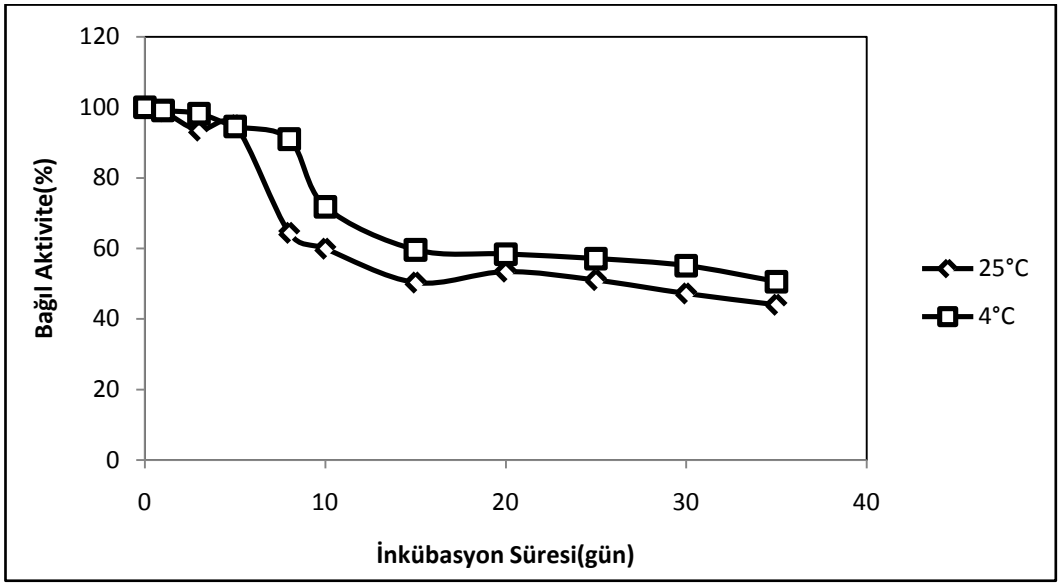


Şekil 4.16. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın bağıl aktivitesinin 40 ve 60ºC'deki inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi

24 saat inkübasyon süresi sonunda magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın 40 ve 60ºC'deki başlangıç aktivitelerini sırasıyla %50 ve %67'sini koruduğu belirlenmiştir.

4.1.3.6. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

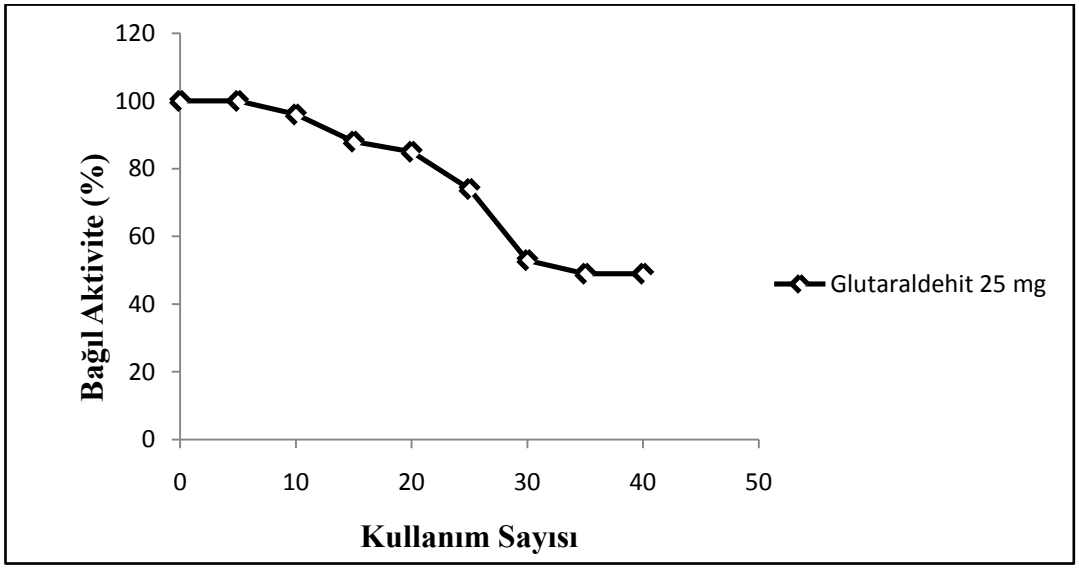
Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında lipaz aktivitesi ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır (Şekil 4.17).



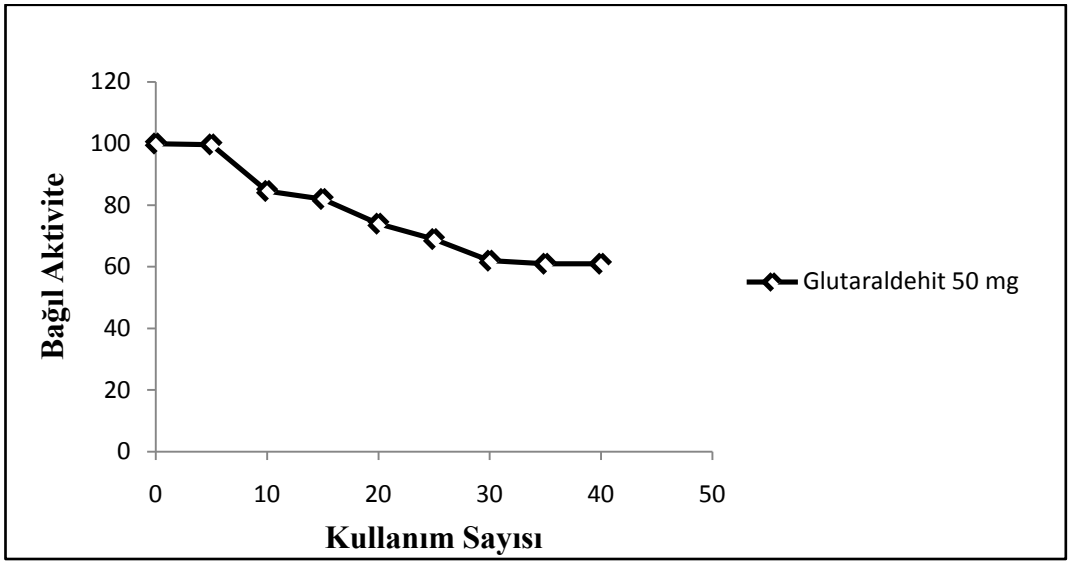
Şekil 4.17. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın bağıl aktivitesinin 4^0C ve 25^0C' deki depolama süresine bağlı olarak değişimi.

4.1.3.7. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Tekrar Kullanım Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

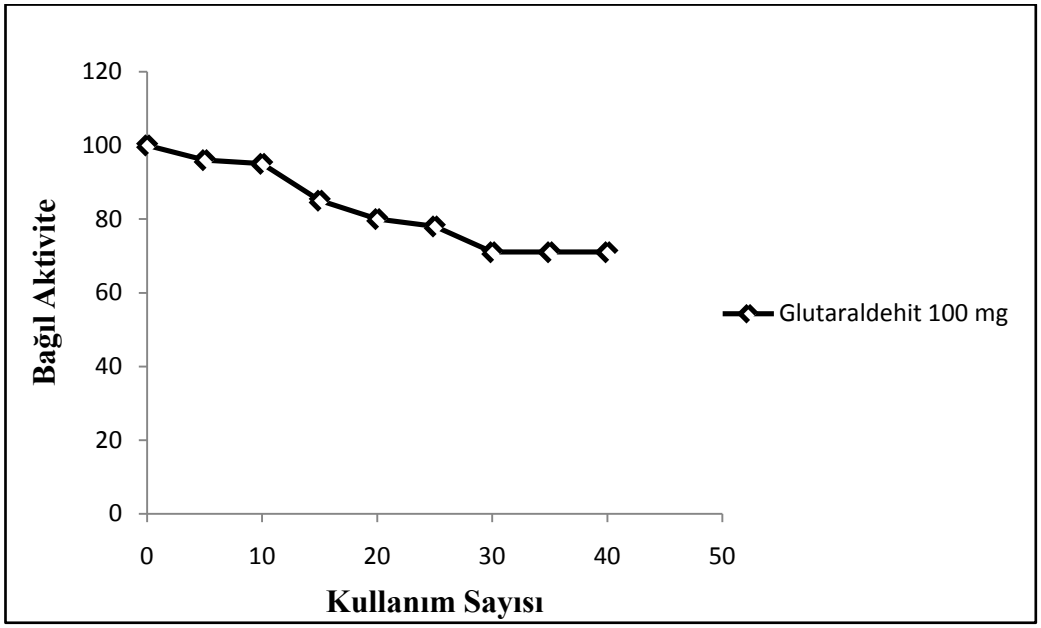
Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın tekrar kullanım kararlılığı belirlenmiştir (Şekil 4.18, 4.19, 4.20). 25, 50 ve 100 mg örnekler alınarak 20 kez kesikli reaktörde kullanımı sonunda magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın başlangıç aktivitelerini yaklaşık olarak sırasıyla %49, %61 ve %71'sini koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (25 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişimi



Şekil 4.19. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (50 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişimi



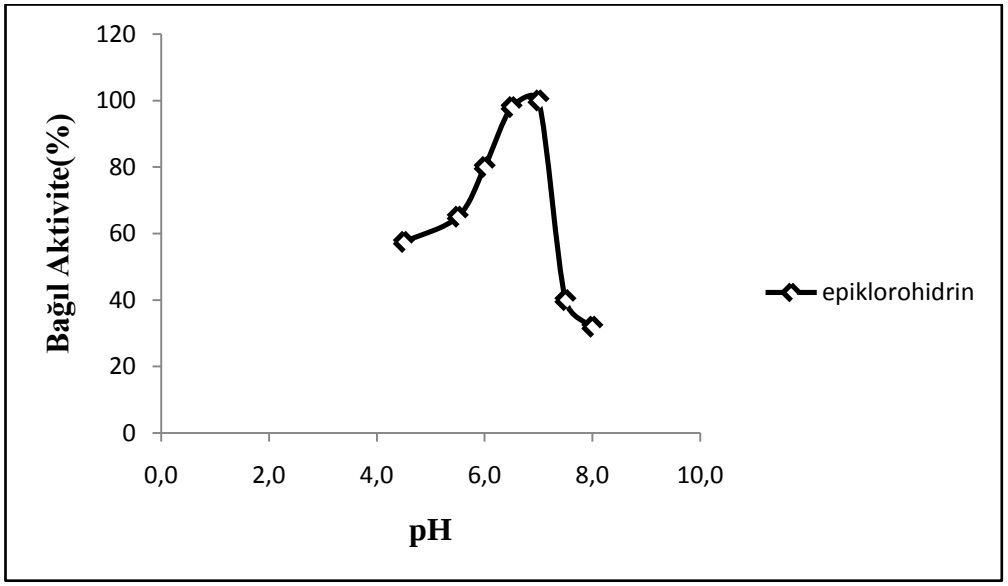
Şekil 4.20. Manyetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (100 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişimi

4.1.4. Lipazın Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İle İlgili Bulgular

Epiklorohidrin ile aktifleştirilen magnetik nanopartiküller süzülerek yıkanmış ve 24 saat süresince kurutulmuştur. Epoksi gruplarının olup olmadığını kontrol etmek için literatürde Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 0,5 g destek alınarak üzerine 2,6 mL 1,3 M'lık sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3$) ve bir damla fenolftalein eklenmiştir ve 0,1 M'lık HCl ile titrasyon yapılmıştır. Bunun sonucunda magnetik nanopartiküllerin yüzeyindeki epoksi grubu miktarı 400 μmol/g destek olarak bulunmuştur. Ayrıca destek üzerine bağlanan protein miktarı %87,5 mg prot./g olarak belirlenmiştir.

4.1.4.1. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın farklı pH'larda (4,5 asetat, 5,5 sitrat, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 fosfat) 50 mM tampon içinde hazırlanmış 1 mg/mL derişimdeki çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir.Sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil.4.21.).



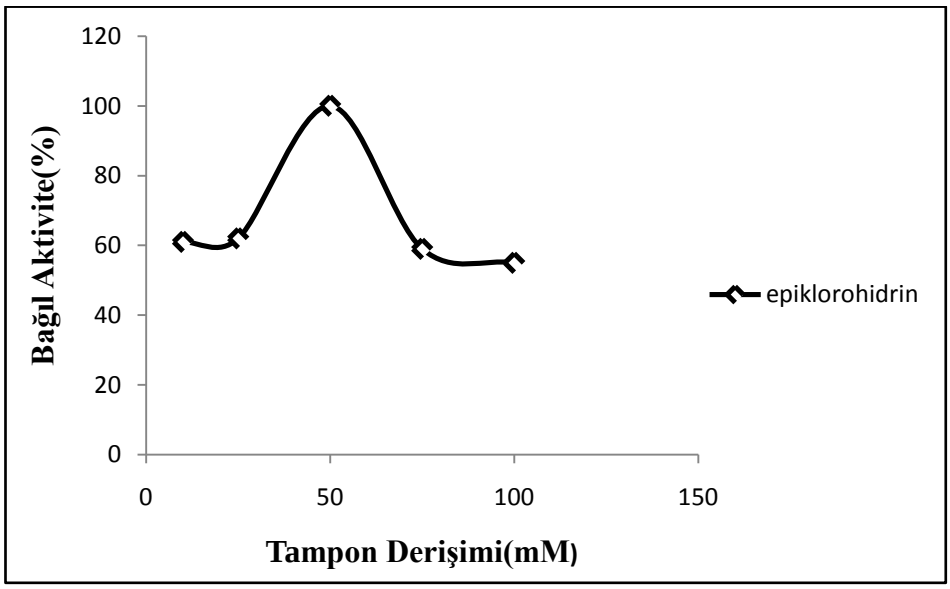
Şekil 4.21. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden İmmobilize edilen lipazın aktivitesinin pH' ya bağlı değişimi

Şekil 4.21. dan da görüleceği gibi immobilize lipaz için optimum pH 7,0 olarak bulunmuştur

4.1.4.2. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Tampon Derişiminin Etkisi İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesi daha önce belirlenmiş olan optimum pH'da (7,0)

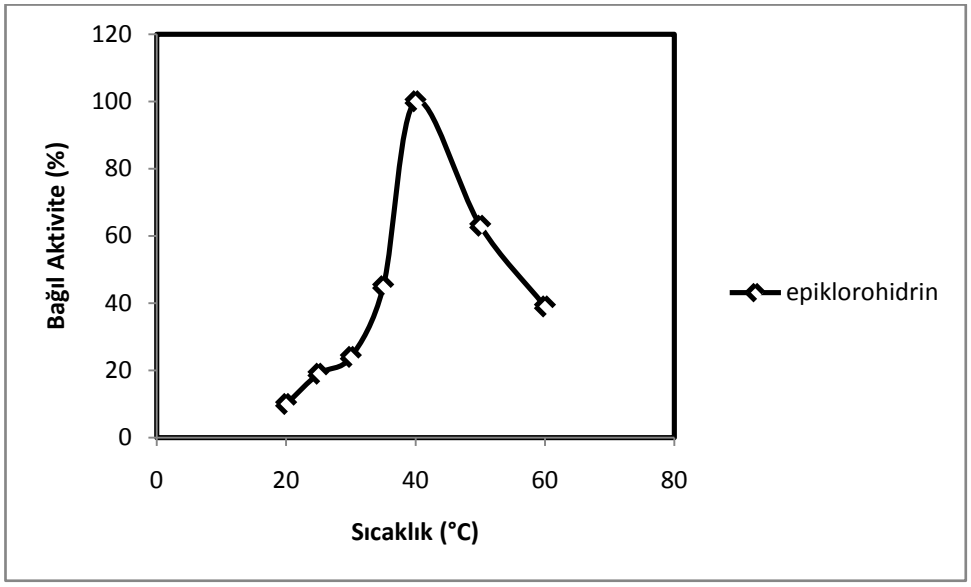
ve farklı tampon derişimlerinde (10, 25, 50, 75 ve 100 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 4.22). Şekil 4.22'de görüldüğü gibi magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen üreaz için tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.22. Manyetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden immobilize

4.1.4.3. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

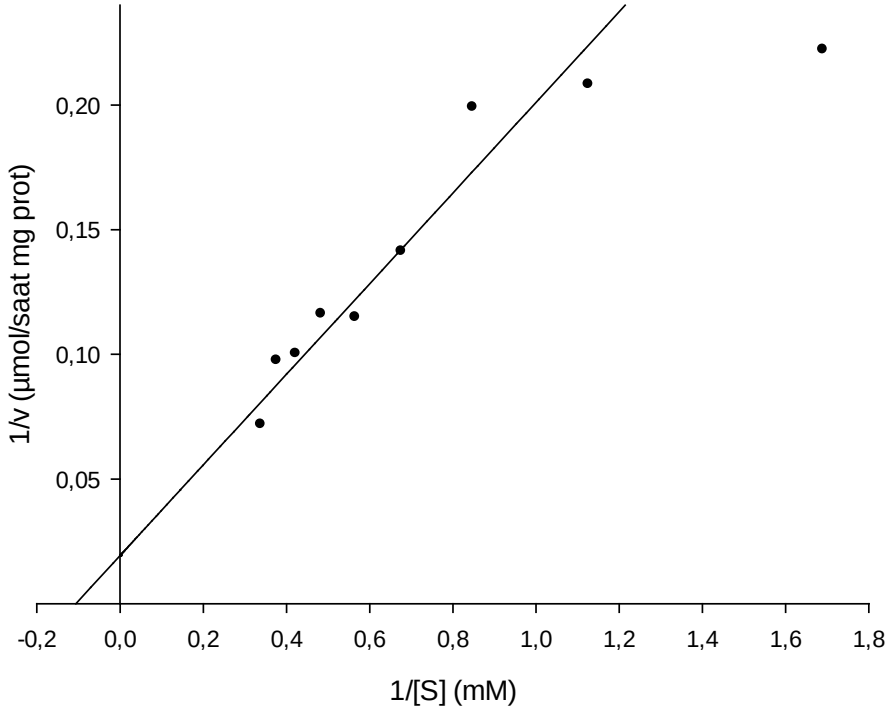
Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesinin optimum pH 7,0 ve tampon derişimi 50 mM kullanılarak farklı sıcaklıklardaki (20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60°C) aktiviteleri belirlenmiştir.



Şekil 4.23. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

4.1.4.4. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

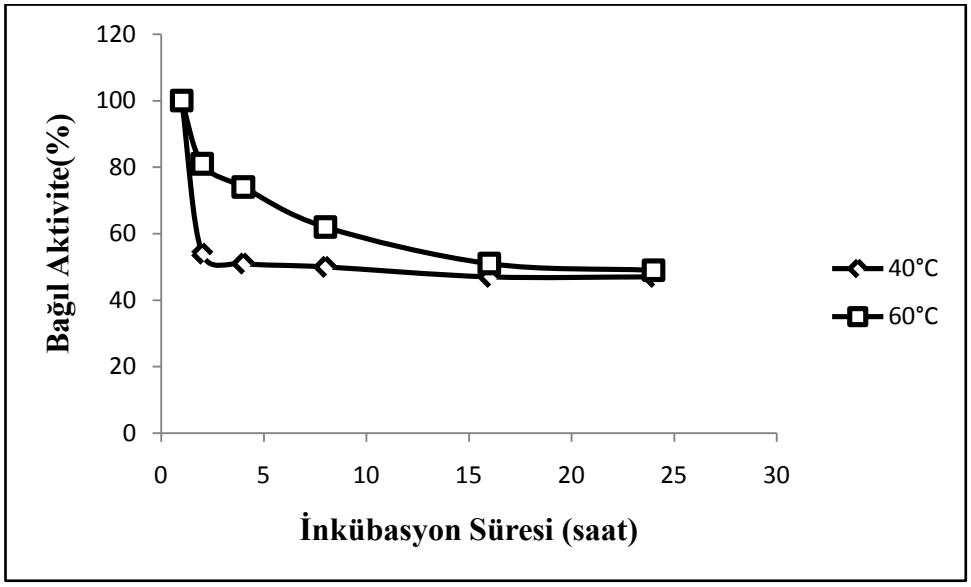
Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş (Şekil 4.24.) ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. K_m, V_{max}, K_{cat} ve K_{cat}/ K_m, değerleri sırasıyla 9,4 mM, 51,7 U/mg protein, $3{,}47x10^3$ dk^{-1}, $0{,}37x10^3$ $dk^{-1\,m}$ mM^{-1} olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.24. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazım Lineweaver-Burk grafiği

4.1.4.5. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın üç farklı sıcaklıkta (40 ve 60°C) 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 2, 4, 8, 16 ve 24 saat) kalan aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.25). 24 saat inkübasyon süresi sonunda magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın 40 ve 60 ºC'deki başlangıç aktivitelerini sırasıyla %39 ve %50 'sini koruduğu belirlenmiştir.

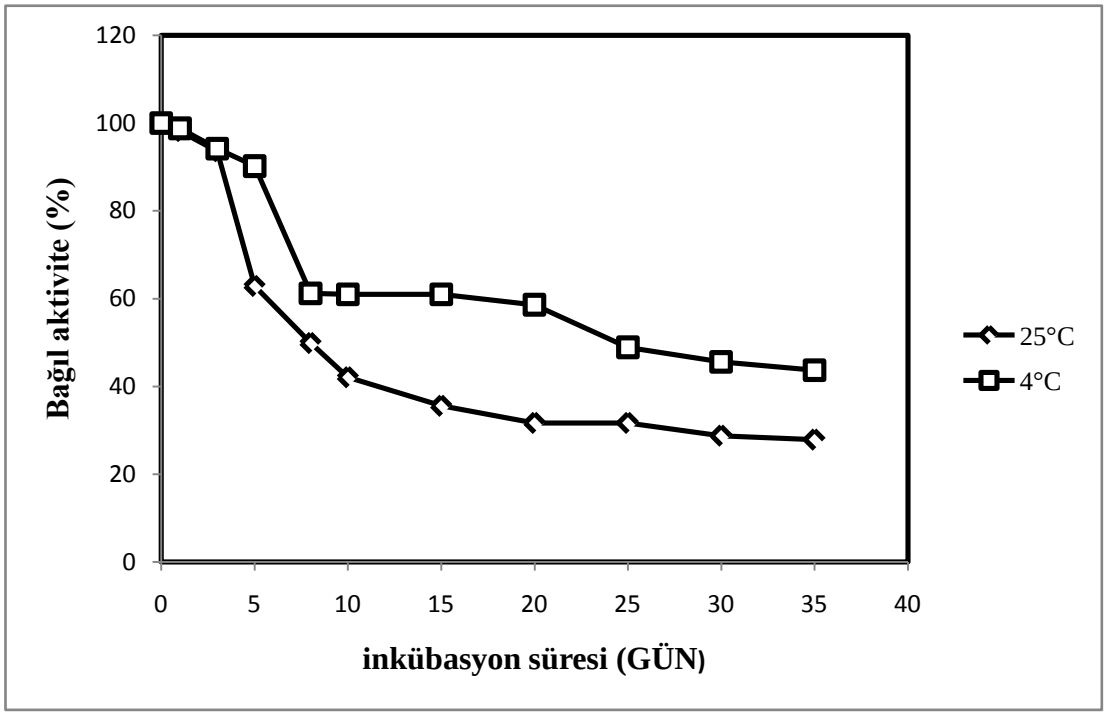


Şekil 4.25. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın bağıl aktivitesinin 40 ve 60ºC'deki inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi

4.1.4.6. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında lipaz aktivitesi ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır (Şekil 4.26). Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın 4ºC ve oda sıcaklığındaki başlangıç aktivitesinin sırasıyla %28 ve %44'sini korudukları

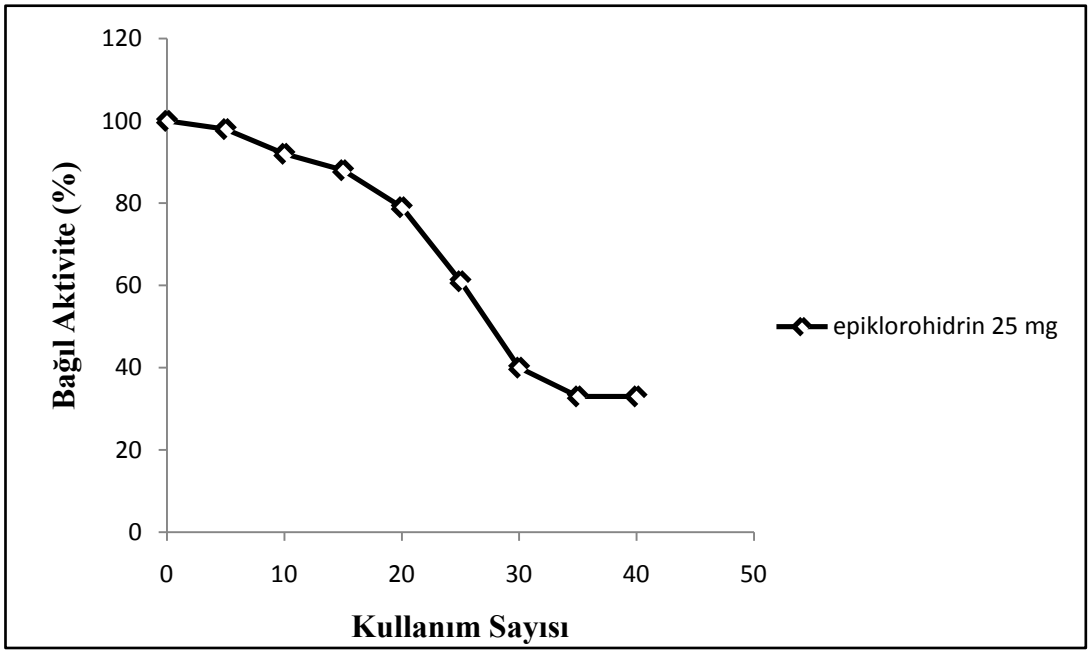
belirlenmiştir.



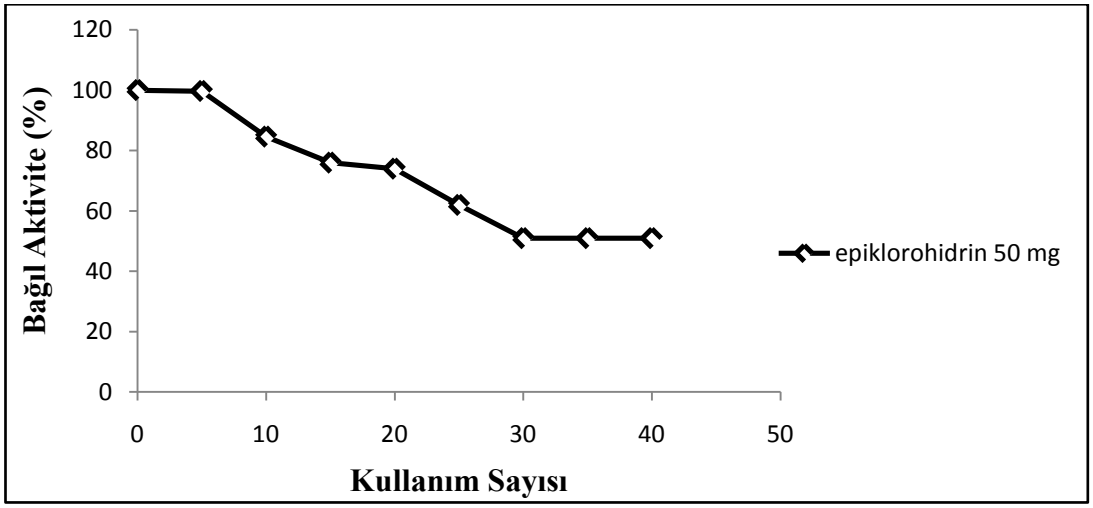
Şekil 4.26. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın bağıl aktivitesinin 4ºC ve 25ºC'deki depolama süresine bağlı olarak değişimi

4.1.4.7. Magnetik Nanopartiküllere Epiklorohidrin Ara Kolu Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazın Tekrar Kullanım Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

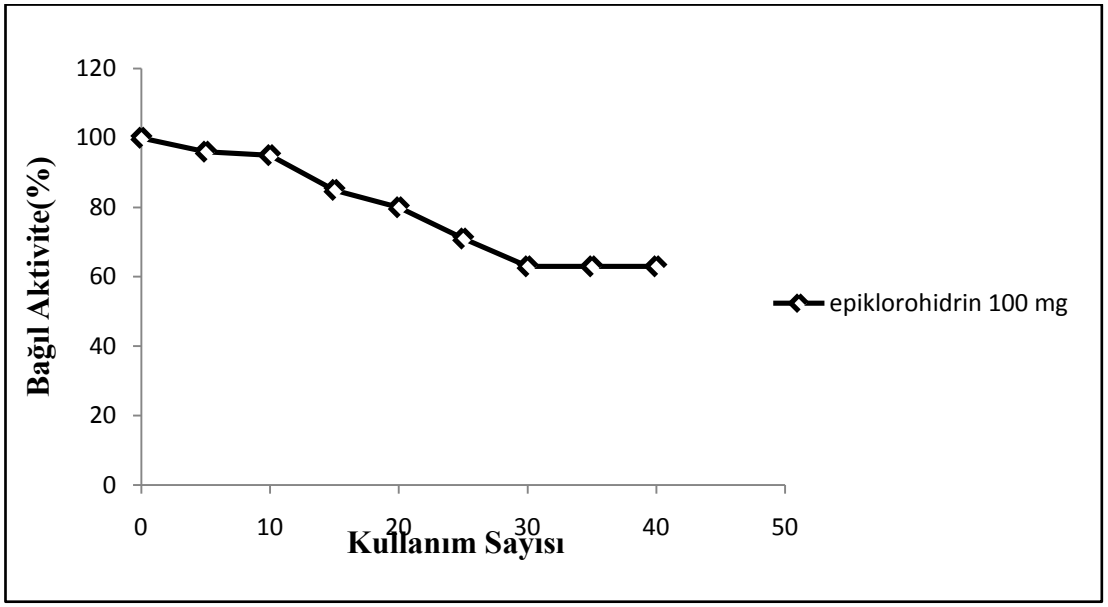
Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın tekrar kullanım kararlılığı belirlenmiştir (Şekil 4.27, 4.28, 4.29). 25, 50 ve 100 mg örnekler alınarak 20 kez kesikli reaktörde kullanımı sonunda magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın başlangıç aktivitelerini yaklaşık olarak sırasıyla %33, %51 ve %63'ini koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.27. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (25 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim



Şekil 4.28. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (50 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim

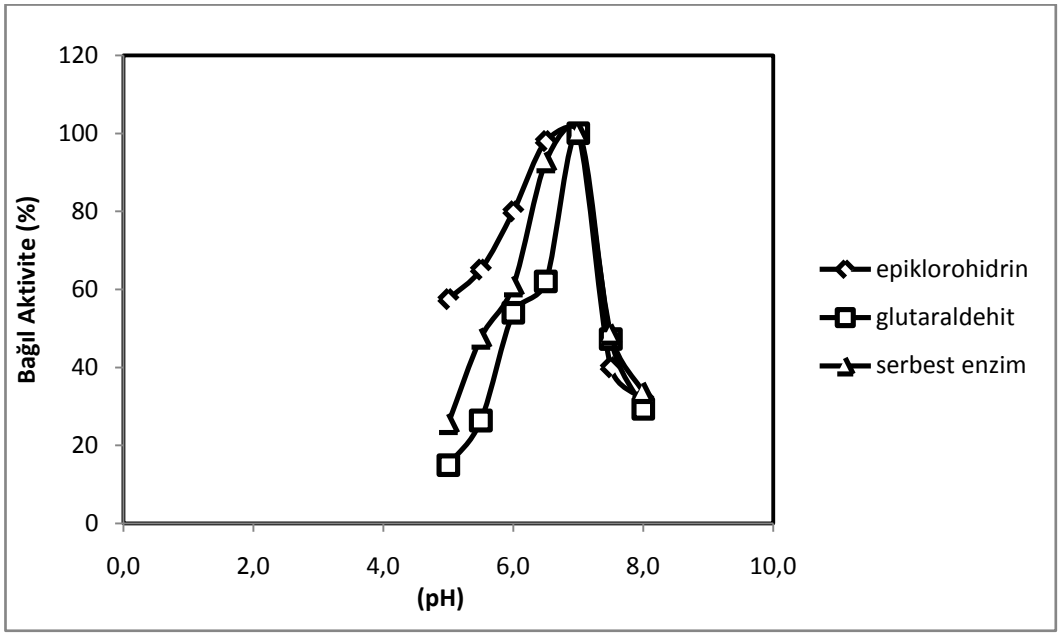


Şekil 4.29. Magnetik nanopartiküllere epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın (100 mg) bağıl aktivitesinin tekrar kullanım sayısına bağlı olarak değişim

4.1.5. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Aktivitelerinin Birlikte Gösterimleri

4.1.5.1. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

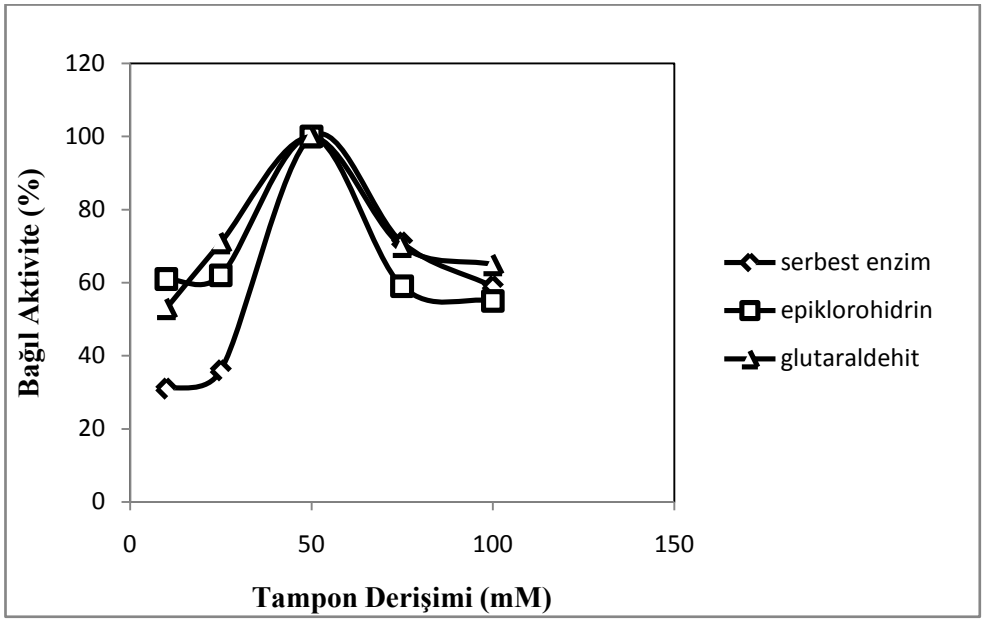
Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimleri Şekil 4.30'de birlikte gösterilmiştir. Sırasıyla pH'lar 7,0 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.30. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidirin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitelerinin pH' bağlı olarak değişimi

4.1.5.2. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Aktivitesine Tampon Derişimi İle İlgili Bulgular

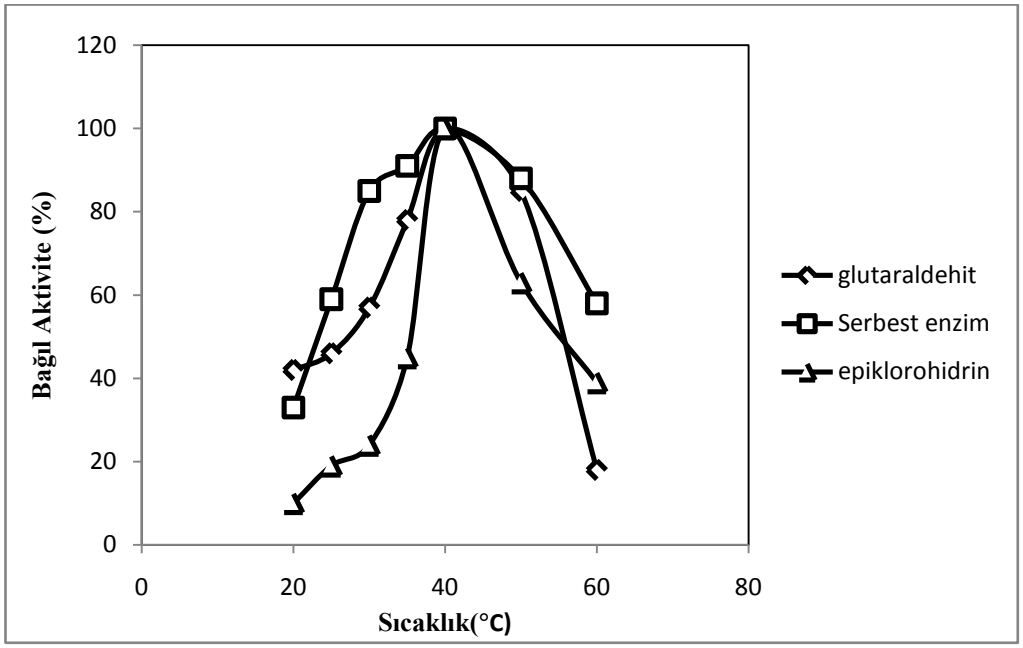
Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitelerine belirlenmiş optimum pH'larda farklı tampon derişimlerinin etkisi şekil 4.31' de gösterilmiştir. Şekil 4.31'de görüldüğü gibi serbest enzim ile magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazlar için tampon derişimleri 50 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.31. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitelerinin tampon derişimlerine bağlı değişimleri

4.1.5.3. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri Şekil 4.32'de birlikte gösterilmiştir. Şekil 4.32'den görülebileceği gibi optimum çalışma sıcaklıkları sırasıyla 40ºC olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.32. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri

4.1.5.4. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve kinetik parametreleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin K_m, V_{max}, k_{cat}, k_{cat}/K_m değerleri

	K_m (mM)	V_{max} (U/mg protein)	K_{cat} (dk^{-1})	K_{cat}/K_m ($dk^{-1}mM^{-1}$)
Serbest Enzim	0,48	420,7	$2,82x10^4$	$58,8x10^3$
İmmobilize Enzim (Glutaraldehit)	1,3	33,6	$2,25x10^3$	$1,73x10^3$
İmmobilize Enzim (Epiklorohidrin)	9,4	51,7	$3,46x10^3$	$0,37x10^3$

4.1.5.5. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların üç farklı sıcaklıkta (40 ve 60°C) 24 saat süreyle inkübe edilerek belirli aralıklarla (başlangıç, 1, 2, 4, 8 , 16 ve 24 saat) kalan aktiviteleri belirlenmiş ve Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin termal kararlılıkları

	Sıcaklık(^{0}C)	Bağıl aktivite(%)
Serbest Enzim	40	%49
	60	%47
İmmobilize Enzim (glutaraldehit)	40	%50
	60	%67
İmmobilize Enzim (epiklorohidrin)	40	%57
	60	%42

4.1.5.6. Serbest Enzim ve Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında kalan üreaz aktiviteleri ölçülmüştür. Kalan aktiviteleri Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin depolama kararlılıkları

30 günün sonunda kalan aktiviteler		
	4^0C	25^0C
Serbest Enzim	%37	%23
İmmobilize Enzim (glutaraldehit)	%50	%44
İmmobilize Enzim (epiklorohidrin)	%44	%28

4.1.5.7. Magnetik Nanopartiküllere Glutaraldehit İle Epiklorohidrin Ara Kolları Üzerinden Kovalent Olarak İmmobilize Edilen Lipazların Tekrar Kullanım Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların tekrar kullanım kararlılıkları Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıkları

	Miktar(mg)	Bağıl aktivite(%)
İmmobilize Enzim (glutaraldehit)	25	%49
	50	%61
	100	%71
İmmobilize Enzim (epiklorohidrin)	25	%33
	50	%51
	100	%63

4.2. Tartışma

Ticari enzimlere özelliklede mikrobiyal kaynaklı olan enzimelere olan ilgi pek çok alanda kullanıma sahip olmalarından dolayı gün geçtikçe artmaktadır. Son on yılda mikrobiyal kaynaklı lipazın biyokatalitik potansiyelinin anlaşılmasından sonra, bu enzim sanayide yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve toptan satış hacminde üçüncü sırada yer almıştır. Enzimlerin sanayide kullanımının yaygınlaşmasını engelleyen en önemli nedenler ise düşük dayanım, aktivite, maliyet ve seçiciliktir. Bu sebeple son yıllarda, lipazların hidrolaz ve sentez reaksiyonlarındaki katalitik özelliklerinin geliştirilmesi için bazı fiziksel ve kimyasal işlemlere tabi tutulması gündeme gelmiştir (Villeneuve ve ark., 2000).

Lipazların kullanım alanları çok geniştir. Eczacılıkta sindirimi kolaylaştırıcı ilaçların yapımında, gıda sanayisinde, ester sentezinde, ekmek yapımında, yağ modifikasyonlarında, özellikle süt ve süt ürünlerinin elde edilmesinde, tat, lezzet ve kokularının geliştirilmesinde, ayrıca atık suların arıtımında da lipazlarla yapılan çalışmalar mevcuttur.

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle enzim çalışmaları hız kazanmıştır. Araştırmacıları enzim immobilizasyonu üzerinde yoğun çalışmalara

yönlendiren etkenlerden en önemlisi, endüstriyel uygulamaların çoğunun sulu çözeltilerde gerçekleşmesinden dolayı, katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılmasının olanak dışı olmasıdır. Bu doğrultuda farklı geometrilere sahip olan doğal ve /veya sentetik kökenli destek materyalleri enzimlerin immobilizasyonu için kullanılmak üzere tasarlanmıştır (Arıca ve ark., 2000; Bayramoğlu ve ark., 2005). Desteğin fiziksel yapısı ve kimyasal kompozisyonu, tutuklanan enzimlerin mikro çevrelerini ve bunun sonucunda da biyolojik özelliklerini etkileyebilir (Chen ve ark., 2000).Lipaz immobilizasyonunda; Celite, aktil-silika, aminopropil silica, Eupergit-C250L, kitosan gibi çeşitli destek materyalleri kullanılmaktadır. Son yıllarda enzim immobilizasyonu için destek materyali olarak nano yapıların kullanımına büyük ilgi vardır (Daubresse ve ark., 1996; Caruso ve Schuler, 2000; Chen ve Su, 2001; Jia ve ark., 2003).Nano yapıların destek materyali olarak kullanıldığı bir çalışmada; nano ölçekte hazırlanan SiO_2 küreleri aldehit gruplarıyla fonksiyonel hala getirilmiş ve lipaz enzimi bu destek üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir (Bai ve ark., 2006).Bu çalışmada; *Candida Rugosa* lipazı magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilmiştir. Birlikte çöktürme metodu kullanılarak sentezlenen magnetik nanopartiküllerin boyutu 158,2 nm olarak tespit edilmiştir.Hazırlanan magnetik destek glutaraldehit ve epiklorohidrin ile fonksyionel hale getirilmiş ve enzim bağlanmıştır.

Çalışmamızda magnetik nanopartiküller 3-APTES ile aktifleştirilmiş ve yüzeyinde primer amin grupları oluşturulmuştur. Primer amin grubu içeren desteklerin glutaraldehit ile muamele edilmesi ve sonrasında enzimin immobilizasyonu çoğu araştırıcılar tarafından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Tükel ve Alptekin, 2004; Taylor ve ark., 2005; Alptekin ve ark., 2009). Destekte yapılan modifikasyonlardan sonra destekteki fonksiyonel grupların sayısı desteğe bağlanan enzim moleküllerinin miktarını etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Magnetik nanopartiküllerin 3-APTES ile aktifleştirilmesi sonucunda 1 g destekte bulunan $–NH_2$ grubu miktarının 270 μmol/g destek olup ve aktive edilen desteğin glutaraldehit ile muamelesi sonrasında primer amin grubunun %78'i glutaraldehit ile modifiye edilebilmektedir. Ayrıca destek üzerine bağlanan protein miktarının %63,7

mg prot./g olduğu belirlenmiştir. Yanjun ve ark., (2010), *Candida Rugosa* lipazını silanlanmiş magnetik nanopartiküller üzerine kovalent bağlama metoduyla glutaraldehit ara kolu yardımıyla immobilize etmişlerdir.Yapılan başka bir çalışmada da Liu ve ark., (2011), magnetik alan yardımıyla hazırlanan Fe_3O_4-kitosan destek materyali üzerine lipaz enzimini immobilize etmişler ve glutaraldehiti çapraz bağlayıcı olarak kullanmışlardır.

Arıca, (2000), epoksi grubu taşıyan destek materyallerinin laboratuar uygulamalarında ve geniş ölçekli kullanımlarda enzimin çok kolay tutuklanmasına olanak sağlayan malzemeler olduğunu, bu destek materyallerin depolama süresince kararlı olduklarını ve epoksi grubu taşıyan destek materyallerinin, ılımlı deney koşulları (pH 7,0) altında farklı protein grupları ile (amino, tiyol, fenolik) çok kararlı kovalent bağ oluşturabilmeleri nedeni ile enzim teknolojisi uygulamalarında önemli kullanım alanlarına sahip olduklarını bildirmiştir. Akkaya, (2006), poli (akrilamit-ko-akrilikasit)/polietilenimin ve poli (metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) desteklerini epiklorohidrin ile, Şahin, (2007), poli(metilmetakrilat-2-hidroksietilmetakrilat) P(MMA-HEMA) mikroboncuklarını epiklorohidrin ile aktifleştirmiştir. Axen ve ark., (1975), modifiye agaroz jeli epiklorohidrin ile aktifleştirmiş ve 0,15 mL/3 g jel süspansiyon içerisinde 310 μmol/g epoksi grubu bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında magnetik nanopartiküllerin yüzeyindeki epoksi grubu miktarı 400 μmol/g destek olarak bulunmuştur. Ayrıca destek üzerine bağlanan protein miktarının %87,5 mg prot./g olduğu belirlenmiştir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimleri Şekil 4.30'da birlikte gösterilmiştir. Sonuçlar lipazın magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilizasyonu ile maksimum aktivitenin nötral pH'da (7,0) olduğunu göstermektedir. Şahin ve ark., (2007); yaptıkları çalışmada PHEMA ve P(HEMA-MAPA) nano yapılara lipaz adsorpsiyonuna pH etkisini göstermek için farklı tampon sistemleri kullanmış ve P(HEMA-MAPA) nanoyapıların maksimum lipaz bağlama kapasitesi pH 7.0 değerinde bulunmuştur. Yanjun ve ark., (2010); yaptıkları çalışmada ise amnio-silan modifikasyonuyla Fe_3O_4 partikülleri sentezlemişler ve

immobilize ettikleri lipazlar için optimum pH' nın yine nötral pH olduğunu gözlemlemişlerdir.

Şekil 4.31'de görüldüğü gibi serbest enzim ile magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazlar için tampon derişimleri 50 mM olarak belirlenmiştir. Literatürlerde tampon derişiminin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Lin Lei ve ark., (2008); yaptıkları çalışmalarda 0,1 M 'lık fosfat tamponu, Chia-Hung ve ark., (2012); ise yaptıkları araştırmalarında 0,05 M 'lık fosfat tamponu kullanmışlardır.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri Şekil 4.32'de birlikte gösterilmiştir. Şekil 4.32'de görüldüğü gibi optimum sıcaklıklar üç enzim için de 40ºC olarak belirlenmiştir. Yang ve ark., (2008); yaptıkları çalışmalarında serbest lipaz ve manyetik kürelere immobilize ettikleri *Candida Rugosa* lipazı için optimum sıcaklığın serbest ve immobilize lipazlar için 35-40 ^{0}C arasında olduğunu saptamışlardır. Iram ve ark., (2012); araştırmalarında GAMNP üzerine lipaz immobilize etmişler ve optimum sıcaklığı serbest ve immobilize lipaz türleri için 30^{0}C olarak belirlemişlerdir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve K_m, V_{max}, k_{cat}, k_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Çizelge incelendiğinde görülebileceği gibi K_m, V_{max}, k_{cat}, k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla (0,48 mM, 420,7 U/mg prot., $2,82x10^4$ dk^{-1} , $58,8x10^3$ dk^{-1} mM^{-1}), (1,3 mM, 33,6 U/mg prot., $2,25x10^3$ dk^{-1} , $1,73x10^3$ dk^{-1} mM^{-1}), (9,7 mM, 51,7 U/mg prot., $3,46x10^3$ dk^{-1} , $0,37x10^3$ dk^{-1} mM^{-1}) olarak belirlenmiştir. Lipaz enziminin glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinde magnetik nanopartiküllere immobilizasyonu sonucu K_m değerlerinin arttığı görülmektedir (Çizelge 4.1). Glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize lipazın k_{cat}/K_m ($1,73x10^3$ dk^{-1} mM^{-1}) ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden immobilize lipazın k_{cat}/K_m ($0,37x10^3$ dk^{-1} mM^{-1}) oranlarında serbest lipazın k_{cat}/K_m ($58,8x10^3$ dk^{-1} mM^{-1}) oranına göre azalma gözlenmiştir. İmmobilize enzimlerin kinetik davranışları serbest enzime göre farklılık gösterir. İmmobilize

enzimin K_m değerindeki artış, aktif bölgeye substrat afinitesindeki azalışı ifade etmektedir. Substrat afinitesindeki bu düşüşün sebepleri, immobilizasyon sonrası substratı bağlayan enzimin konformasyonel esnekliğinin azalışına, taşıyıcının yarattığı sterik engellere ve difüzyonel dirence bağlanabilir (Sahoo ve ark., 2011). Iram ve ark., (2012); yaptıkları çalışmada serbest enzimin K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 1,45 mM ve 190 mmol/mg/min., GAMNP üzerine immobilize edilen lipazın K_m ve V_{max} değerleri 0,35 mM ve 297 mmol/mg/min. ile kıyaslamışlar ve sonuçta immobilize edilen değerlerinde bir düşüş gözlemişlerdir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın farklı sıcaklıklardaki (40 ve 60°C) ve inkübasyon süresinde kalan aktivite miktarları arasındaki ilişki incelenmiştir (Şekil 4.16 ve 4.25). Şekillerden de görülebileceği gibi 40 ve 60°C de glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize edilen lipaz 24 saat sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla %65 ve %46'sını, epiklorohidrin ara kolu üzerinden immobilize edilen lipaz ise sırasıyla %66 ve %44 oranında korumaktadır. Serbest enzimin ise 40 ve 60°C de 24 saat sonunda başlangıç aktivitesinin ancak %69 ve %48' unu koruduğu belirlenmiştir. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilize lipazların termal karalılıklarının birbirine yakın olduğu belirlenmiştir. Yang ve ark., (2008); yaptıkları çalışmalarında serbest ve magnetik küreler üzerine immobilize ettikleri lipazların 25-80 ^{0}C arasındaki termal kararlılıklarını incelemişlerdir. Serbest enzimin 150 dakikanın sonunda aktivitesini kaybettiğini, immobilize lipaz için ise 180 dakika sonunda kalan akvitesinin %60 olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin konformasyonel yapısı immobilizasyondan etkilenir. Bu konformasyonel sınırlamalardan dolayı, immobilize enzim serbest enzimden daha yüksek termal kararlılığa sahiptir. İmmobilizasyon sonrasında enzimin termal kararlılığı artabilir, azalabilir yada hiç değişmez. Genellikle kovalent bağlı, suda çözünmez enzimlerin ısıya ve denatüre edici ajanlara karşı serbest forma göre daha dayanıklı olduğu bilinmektedir.

Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazın depolama kararlılıklarını belirlemek amacıyla 4°C ve oda sıcaklığında (25°C) ağzı kapalı

şişelerde bekletilmiş ve bu enzimlerin kalan aktiviteleri 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında ölçülmüştür. Kalan aktivitelerin sırasıyla (%37, %23), (%50, %44), (%44, %28) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Sonuçlardan da anlaşılacağı gibi immobilize enzimlerin serbest enzimle karşılaştırıldığında daha iyi depolama kararlılığı gösterdiği, glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize olan lipazın epiklorohidrin ara koluna kıyasla daha iyi depolama karlılığına sahip olduğu belirlenmiştir. Chia-Hung ve ark., (2011); yaptıkları çalışmalarında kitosan-Fe_3O_4 destek materyali üzerine lipaz enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmişler ve immobilize enzimin depolama koşulları altında aktivitesini koruduğunu ama serbest lipazın gün geçtikçe aktivitesini kaybettiğini belirtmişlerdir.

Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların tekrar kullanım kararlılıkları Çizelge 4.4'de verilmiştir. 25, 50 ve 100 mg için 20 kullanımdan sonra kalan aktiviteleri başlangıç aktivitesinin yaklaşık sırasıyla (%49, %61, %71), (%33, %51, %63) olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada immobilize lipazın serbest lipaza kıyasla tekrar kullanım karalılığının daha iyi olduğu, glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize edilen lipazın tekrar kullanım kararlılığının, epiklorohidrin ara kolu üzerinden immobilize edilen lipaza göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. İmmobilize enzimlerin tekrar tekrar kullanılabilmesi enzimin endüstride kullanılması açısından önemli bir faktördür. Artan kararlılık immobilize enzimi serbest enzimden daha avantajlı hale getirmektedir (Lei ve ark., 2007). Chia-Hung ve ark., (2012); yapıkları araştırmalarda kitosan-Fe_3O_4 destek materyaline immobilize ettikleri lipazın tekrar kullanım kararlılığını incelemişler ve 5, 10, 20 kullanımdan sonra kalan aktiviteleri sırasıyla %98, %88 ve %83 olarak ölçmüşlerdir. Iram ve ark., (2012); yaptıkları çalışmalarda magnetik destek üzerine glutaraldehit arakolu yardımıyla immobilize edilen lipazın tekrar kullanım kararlılığını incelemişler ve 7 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin %65'ini koruduğunu belirtmişlerdir.

Lipaz immobilizasyonu için nano bir yapıda hazırlana destek materyalini konu alan bu çalışmanın, günümüzde oldukça popüler bir araştırma alanı olan nanobiyoteknolojiye ait bir çalışma alanı olması nedeniyle güncel literatüre katkı

sağlayacak olmasının yanı sıra, sentezlenen bu yapıların türevlendirilebilir olmasının getireceği pek çok avantajı da vardır.

Magnetik nanopartiküller üzerine enzim immobilizasyonu diğer desteklerle kıyaslandığında basit hazırlama prosedürü, düşük maliyet ve magnetik nanopartiküle bağlı enzimin kimyasal kararlılığının yüksek olması nedeniyle çeşitli avantajlar sunmaktadır. Düşük maliyet, geri kazanım ve tekrar tekrar kullanılabilmesi endüstriyel önemi olan enzimlerin immobilizasyonu için önemlidir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Lipaz enziminin Fe_3O_4 magnetiknanopartiküllerine farklı ara kollar üzerinden kovalent olarak immobilizasyonunuhedefleyen bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Magnetiknanopartiküllerin FT-IR spektrumları alınarak fonksiyonel grupların varlığı araştırılmış, XRD kullanılarak yapı analizi yapılmıştır. Sentezlenen maddenin büyük ölçüde Fe_3O_4'den oluştuğu ancak diğer bazı demir oksit türlerini de kısmen içerdiği tespit edilmiştir. SEM mikroskobu kullanılarak nano yapıların boyut analizi yapılmış ve ortalama boyutun 158,2 nm olduğu bulunmuştur.
2. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların maksimum aktivite gösterdikleri pH 7,0 olarak belirlenmiştir.
3. Serbest enzim ile magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazlar için tampon derişimleri 50mM olarak belirlenmiştir.
4. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların optimum sıcaklıkları 40ºC olarak belirlenmiştir.
5. Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipazların aktivitesi belirlenen optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş K_m, V_{max}, k_{cat}, k_{cat}/K_m değerleri serbest enzim için sırasıyla 0,48 mM, 420,7 U/mg prot., $2,82x10^4$ dk^{-1} , $58,8x10^3$ dk^{-1} mM^{-1} ,glutaraldehit ara kolu için 1,3 mM, 33,6 U/mg prot., $2,25x10^3$ dk^{-1} , $1,73x10^3$ dk^{-1} mM^{-1}, epiklorohidrin ara kolu için 9,7 mM, 51,7 U/mg prot., $3,46x10^3$ dk^{-1} , $0,37x10^3$ $dk^{-1}mM^{-1}$

6.Serbest enzim ve magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ile epiklorohidrin ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilize edilen lipaz farklı sıcaklıklarda (40ve 60°C) inkübe edilmiş ve 24 saat sonundaki kalan aktiviteleri serbest enzim için sırasıyla (%69 ve %48), glutaraldehit ara kolu için (%65 ve %46) ve epiklorohidrin ara kolu için (%66 ve %44) olarak belirlenmiştir.

7. İmmobilize enzimlerin serbest enzimle karşılaştırıldığında daha iyi depolama kararlılığı gösterdiği, glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize olan lipazın epiklorohidrin ara koluna kıyasla daha iyi depolama karlılığına sahip olduğu belirlenmiştir.
8. Yapılan çalışmada glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden immobilize edilen lipazların tekrar kullanım kararlılıklarının birbirine yakın olduğu saptanmıştır.

5.2. Öneriler

1. Tıp, gıda ve endüstriyel alanlarda geniş uygulamaları olan lipaz enziminin farklı magnetiknanopartiküllereimmobilizasyonu araştırılabilir.
2. Endüstriyel önemi olan enzimlerin magnetiknanopartiküllereimmobilizasyonu incelenebilir.
3. Daha etkin ve daha ekonomik kullanılabilmesi için daha farklı koşullar araştırılabilir.

KAYNAKLAR

AEHLE, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, USA

ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S.S., YILDIRIM, D., ve ALAGÖZ, D., 2009. Characterization and Properties of Catalase Immobilized onto Controlled Pore Glass and Its Application in Batch and Plug-Flow Type Reactors. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58:124-131.,

ALPTEKİN, Ö., 2009. Katalazın Eupergit, Florisil ve Cam Desteklere Kovalent Olarak İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. Ç.Ü. Doktora Tezi, Adana, 219s.

ARICA, M.Y., 2000. Immobilization Of Polyphenoloxidase On Carboxymethylcellulose Hydrogel Beads: Preparation and Characterization. Polym. Int., 49: 775-81.

ARICA, M.Y., 2000. Epoxy-derived pHEMA Membrane for Use Bioactive Macromolecules Immobilization: Covalently Bound Urease in a Continuous Model System. Journal of Applied Polymer Science, 77(9):2000-2008.

AXEN, R., DREVIN, H., CARLSSON, J., 1975. Preparation of Modified Agarose Gels Containing Thiol Groups. Acta Chemica Scandinavica B, 29:471-474

BAI, Y.X., LI, Y.F., YANG, Y., YI, L.X., 2006., Covalent İmmobilization Of Triacylglycerol Lipase Onto Functionalized Nanoscale SiO_2 Microspheres, Process Biochem., 41, 770-777.

BAYRAMOĞLU, G., KAYA, B., ARICA, M.Y., 2005. Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase Onto Spacer-Arm Attached (GMA-HEMA-EGDMA) Microspheres, Food Chem., 92: 261-268.

BICKERSTAFF, G.F., 1997. Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press, Totowa, New Jersey, 449p.

BRENA, B., RYDEN, L., PORATH, J., 1994. Immobilization of β-galactosidase on Metal-chelated-substituted Gels. Biotechnology and Applied Biochemistry, 19:217-231.

BUCHHOLZ, K., KASCHE, V., AND BORNSCHEUER, U.T., 2005. Bipcatalysts and Enzyme Technology, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, USA.

BUGG, T., 1996. An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Science, Great Britain.

CAO, L., 2005. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kgaa, Weinheim, 580p.

CARUSO, F., SCHULER, C., 2000. Enzyme Multilayers on Colloid Particles: Assembly, Stability, and Enzymatic Activity, Langmuir 16, 9595–9603.

CHAPLIN, M.F., AND BUCKE, C., 1990. Enzyme Technology, Cambridge University Press, Cambridge.

CHANG, F., CHANG, S., YEN, Y., 1997. Optimum immobilization of Candida rugosa lipase on Celite by RSM, Applied Clay Science, 67-73.

CHEN, J., CHIU, S., 2000. Poly(N-isopropylacrylamide-co-Nacryloxysuccinimide-co-2-hydroxyethyl methacrylate) Composite Hydrogel Membrane for Urease Immobilization to Enhance Urea Hydrolysis Rate by Temperature Swing. Enzyme and Microbial Technology, 26:359-367.

CHEN, J.P., SU, D.R., 2001. Latex Particles with Thermo-Flocculation and Magnetic Properties for Immobilization of -Chymotrypsin, Biotechnol. Progr., 17, 369–375.

CHIA-HUNG, K., YUNG-CHUAN, L., CHIEH-MING, J., JIANN-HWA, C., CHENG, C., CHWEN-JEN, S., 2012. Optimum Conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe3O4 nanoparticles, Carbohydrate Polymers, 2538–2545.

CHIBATA, I., TOSA, T., MORİ, T., WATANABE, T., AND SAKATA, N., 1978. Immobilized Tannin-a Novel Adsorbent for Protein and Metal Ion, Enzyme Microbial Technology, 8, 130-136.

CHO, S.W., and RHEE, J.S., 1993. Immobilization of Lipase for Effective Interestification of Fats and Oils in Organic Solvents. Biotechnology and Bioengineering, 41:204-210.

CREMONESI, P., ANGIURO, L.D, 1983. Kinetic and Thermal Characteristics of Enzyme-Graft Copolymers. Biotechnology and Bioengineering, 25(3):735-744.

DAUBRESSE, C., GRANDFILS, C., JEROME, R., TEYSSIE, P., 1996. Enzyme immobilization in reactive nanoparticles produced by inverse microemulsion polymerization, Coll.&Polym. Sci., 274, 482–489.

FUENTES I.E, VISERAS C.A., UBIALI D., TERRENI M., ALCANTARA A.R., 2001. J of Mol. Cat. B: Enzymatic, 11, 657-663.

IRAM, M., ISHFAQ, A., GUO, C., LİU, H., 2013. A Surfactant Coated Lipase İmmobilized İn Magnetic Nanoparticles For Multicycle Ethyl İsovalerate Enzymatic Production, Biochemical Engineering Journal, 73: 72-79.

IVANOV, A., MANFRED, P., 1997. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 303-309.

JIA, H., ZHU, G., WANG, P., 2003. Catalytic Behaviour of Enzymes Attached to Nanoparticles: The Effect of Particle Mobility. Biotechnology and Bioengineering, 84:406–414.

JUNGBAE, K., JAY,W., GRATEA, PING,W., 2006. Chem. Eng. Sci., 61, 1017 – 1026.

KHARRAT, N., BEN ALİ, Y., MARZOUK, S., GARGOURİ, Y., 2011. Immobilization of Rhizopus oryzae lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme, Process Biochemistry, 1083-1089.

KEHA, E.E., VE KÜFREVİOGLU, Ö., 2004. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.

KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S. and SCOUTEN, W.H., 1983. Immobilized Enzymes in Solid Phase Biochemistry (W. H., SCOUTEN). Chemical Analysis, John Wiley and Sons, New York, 253–392 p.

KILIÇ, E., KÖSEOĞLU, F., YILMAZ, H., 1998. Enstrümental Analiz İlkeleri (D. A., SKOOG editör). Bilim Yayıncılık, Ankara. 850s.

KIM, M., HAM, H., PARK, H., 2006. Immobilization of Mucor javanicus lipase on effectively functionalized silica nanoparticles, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 39, 62-68.

KLIBANOV, A.M., 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents, Nature, 409, 241–246.

KUROIWA, T., NOGUCHI, Y., NAKAJİMA, M., SATO, S., MUKATAKA, S., 2008. Production of Chitosan Oligosaccharides Using Chitosanase İmmobilized on Amylase-coated Magnetic Nanoparticles. Process Biochemistry, 43: 62-69.

LEI, L., BAİ, Y., LI, Y., YANG, Y., XİA, C., 2008. Study On İmmobilization Of Lipase Onto Magnetic Microspheres With Epoxy Groups. Journal Of Magnetism And Magnetic Materials, 321: 252-258.

LEI, Z., BI, S., HU, B., YANG, H., 2007. Combined Magnetic and Chemical Covalent Immobilization of Pectinase on Composites Membranes Improves Stability and Activity. Food Chemistry, 889-896.

LİU, Y., JİA, S., WU, Q., RAN, J., ZHANG, W., WU, S., 2011. Studies Of Fe_3O_4-chitosan Nanoparticles Prepared By co-Precipitation Under The Magnetic Field For Lipase İmmobilization. Catalysis Communications, 12:717-720.

LOWRY, O.H., ROSENBRAUGH, N., FARR, L., and RANDALL, R., 1951. Protein Measurement with Theophilin-Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 183:265–275.

LUISI, P.L. and MAGID, L.J., 1986. Solubilization of Enzymes and Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar Solutions. Critical Reviews in Biochemistry, 20(4):409–474.

MESSING, R.A., 1976. Adsorption and Inorganic Bridge Formations. Methods in Enzymology, 44:148-169.

NELSON, J.M., and GRIFFEN, E.G., 1916. Adsorption of Invertase. Journal of the American Chemical Society, 38:1109–1115.

ÖZTÜRK, N., 2006. Hidrofobik Nanoyapılarda *Candida Rugosa* Lipaz İmmobilizasyonu. A.D.Ü. Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 116s.

ÖZTÜRK, T., 2009. Lipaz Enziminin Polivinil Alkol (PVA) Üzerine İmmobilizasyonu ve Bazı Organik Çözgenlerde Kullanım Olanaklarının Araştırılması. E.Ü. Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 113s.

PAPAZOGLOU, E.S., PARTHASARATHY, A., 2007. Bionanotechnology. Morgan & Claypool, pp. 1-10, Colorado.

PANZAVOLTA F., SORO S., D'AMATO R., PALOCCI C.,CERNIA E., RUSSO M. V., 2005. Acetylenic polymers as new immobilization matrices for lipolytic enzymes, J of Mol. Cat. B: Enzymatic, 3267-3276.

PORATH, J., 1992. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. Protein Expression and Purification, 3:263-281.

RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S., and DESHPANDE, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(3):597-635.

REGEN, S.L., SINGH, M., and SAMEUL, N.K., 1984. Functionalized Polymeric Liposomes, Efficient Immobilization of α-Chymotrypsin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 119:646–651.

SALATA OV, 2004, Applications of nanoparticles in biology and medicine, Journal of Nanobiotechnology , 2:3.

SAHOO, B., KUMAR SAHU, S., and PRAMANIK, P., 2011. A Novel Method for The Immobilization of Urease on Phosphonate Grafted Iron Oxide Nanoparticle. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 69:95–102.

ŞAHİN, 2007. Poli(Metil Metakrilat-2-Hidroksietil Metakrilat) Mikroboncuklarına Kovalent Bağlanma ile Glukoz İzomerazın İmmobilizasyonu. G.Ü. Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 95s.

TAYLOR, R., FOURNIER, S.M., SIMONS, B.L., KAPLAN, H., and HEFFORD, M.A., 2005. Covalent Protein Immobilization on Glass Surfaces: Application to Alkaline Phosphatase. Journal of Biotechnology, 118:265–269.

TELEFONCU A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

TELEFONCU, A., 1997. Enzimoloji. Yüksek Lisans Yazokulu. 21–27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye, 446s.

TÜKEL, S.S., ve ALPTEKİN, Ö., 2004. Immobilization and Kinetics of Catalase onto Magnesium Silicate, Process Biochemistry, 39(12): 2149-2155.

WANG, S.S., 1993. Chemistry of Protein Congution and Cross Linking. CRC Press, Boca Raton. USA.

WEETHALL, H.H., 1976. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. Methods of Enzymology, 44:134-148.

WİSEMAN A.(Editor), 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, TJ Pres Ltd., Cornwall, UK, 465-466.

WONG, C.H., AND WHİTESİDES, G.M., 1994. Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, Pergamon, Great Britain.

WOODWARD, J., 1985. Immobilized Enzymes: Adsorption and Covalent Coupling, Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach, IRL, Oxford, UK, pp: 3-17.

WORSFOLD, P.J., 1995. Classification and Chemical Characteristics of Immobilized Enzymes, *Pure& Appl. Chem*, 67(4), 597-600.

VALENZUELAA, R., FUENTESA, M.C., PARRAA, C., BAEZAB, J., DURANC, N., SHARMAD, S.K., KNOBELD, M., FREERB, J., 2009. Influence of Stirring Velocity on The Synthesis of Magnetite Nanoparticles (Fe_3O_4) by The Co-Precipitation Method. Journal of Alloys and Compounds, 488: 227-231.

VİLLENEUVE, P., MUDERHWA, JM., GRAİLLE, J., HAAS, MJ., 2000. Customizing Lipases For Biocatalysis: A Survey Of Chemical, Physical And Molecular Biological Approaches. J. Mol. B. Enzyme, 9:113-148.

YANG, Y., BAİ, Y., Lİ, Y., LİN, L., CUİ, Y., XİA, C., 2008. Characterization Of Synthesis Of Amino-Silane Modified Superparamagnetic Fe_3O_4 Nanoparticles
And Biochemistry, 43: 1179-1185.

YANJUN, C., YANG, Y., LİU, X., LEİ, L., ZHOU, L., PAN, F., 2010. Facile Application For Lipase İmmobilization. Journal Of Biotechnology, 150: 171-174.

YILDIRIM, D., 2010. Mucor Miehei ve Pseudomonas SP Lipazlarının Aktifleştirilmiş Florisil Desteğe Glutaraldehit ve Polisüksinimid Üzerinden Ayrı Ayrı İmmobilizasyonu ve İmmobilize Lipazın Esterleşme

Reaksiyonlarında Kullanımı. Ç.Ü. Doktora Tezi, Adana, 1999.

ZABORSKY, O.,1973. Adsorption İmmobilized Enzyme. Ed. by Weast, R. C., CRC Press, 13: 75-78 .

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Manisa'da doğdu. İlköğrenimini 1995 yılında Manisa Milli Egemenlik İlköğretim Okulu'nda, Orta öğrenimini 2002 yılında Akhisar Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nde tamamladı. 2006 yılında kazandığı Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2010 yılında mezun oldu. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalında Yüksek Lisansa başladı.

EKLER

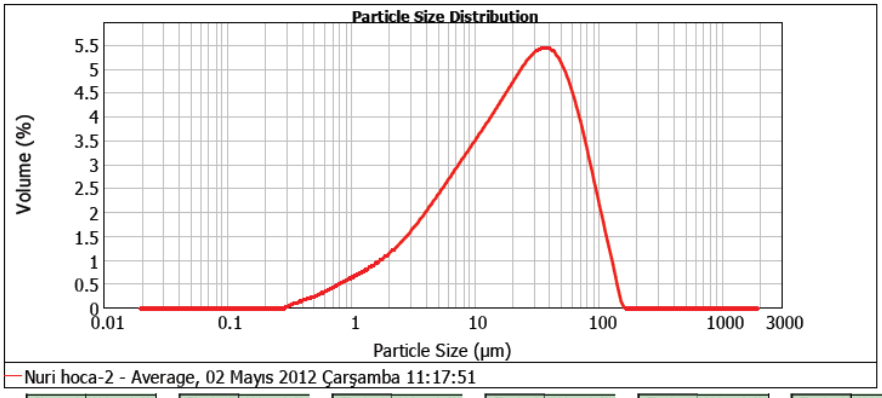
EK 1

MASTERSIZER 2000

Result Analysis Report

Sample Name: Nuri hoca-2 - Average	**SOP Name:**	**Measured:** 02 Mayıs 2012 Çarşamba 11:17:51	
Sample Source & type:	**Measured by:** casper	**Analysed:** 02 Mayıs 2012 Çarşamba 11:17:53	
Sample bulk lot ref:	**Result Source:** Averaged		
Particle Name: Iron III Oxide 0.03	**Accessory Name:** Hydro 2000MU (A)	**Analysis model:** General purpose	**Sensitivity:** Normal
Particle RI: 2.420	**Absorption:** 0.03	**Size range:** 0.020 to 2000.000 um	**Obscuration:** 7.67 %
Dispersant Name: Water	**Dispersant RI:** 1.330	**Weighted Residual:** 0.885 %	**Result Emulation:** Off
Concentration: 0.0065 %Vol	**Span :** 3.218	**Uniformity:** 0.999	**Result units:** Volume
Specific Surface Area: 0.843 m²/g	**Surface Weighted Mean D[3,2]:** 7.113 um	**Vol. Weighted Mean D[4,3]:** 30.262 um	

d(0.1): 3.052 um **d(0.5):** 21.284 um **d(0.9):** 71.538 um



Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.65	11.482	3.46	120.226	0.89	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	0.73	13.183	3.67	138.038	0.23	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	0.82	15.136	3.89	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	0.92	17.378	4.12	181.970	0.00	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	1.04	19.953	4.34	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	1.17	22.909	4.56	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	1.31	26.303	4.74	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.01	2.884	1.47	30.200	4.86	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.08	3.311	1.65	34.674	4.90	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.12	3.802	1.83	39.811	4.84	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.17	4.365	2.03	45.709	4.65	478.630	0.00	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.23	5.012	2.23	52.481	4.34	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.29	5.754	2.44	60.256	3.90	630.957	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.36	6.607	2.64	69.183	3.36	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.43	7.586	2.85	79.433	2.75	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.50	8.710	3.05	91.201	2.13	954.993	0.00	10000.000	
0.091	0.00	0.955	0.58	10.000	3.25	104.713	1.49	1096.478	0.00		
0.105		1.096		11.482		120.226		1258.925			

Operator notes:

Malvern Instruments Ltd.
Malvern, UK
Tel := +[44] (0) 1684-892456 Fax +[44] (0) 1684-892789

Mastersizer 2000 Ver. 5.60
Serial Number : MAL1062387

File name: atomika deneme
Record Number: 378
02.05.2012 14:57:38

Ek 1. Magnetik nanopartiküllerin boyut analizi

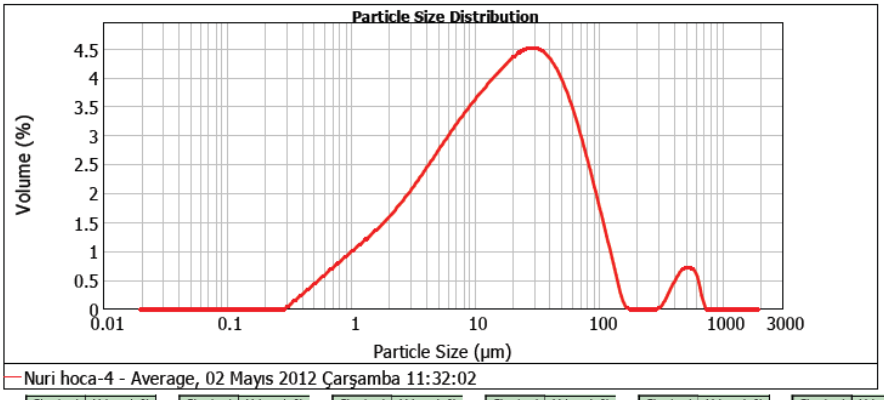
EK 2

MASTERSIZER 2000

Result Analysis Report

Sample Name: Nuri hoca-4 - Average	**SOP Name:**	**Measured:** 02 Mayıs 2012 Çarşamba 11:32:02	
Sample Source & type:	**Measured by:** casper	**Analysed:** 02 Mayıs 2012 Çarşamba 11:32:03	
Sample bulk lot ref:	**Result Source:** Averaged		
Particle Name: Iron III Oxide 0.03	**Accessory Name:** Hydro 2000MU (A)	**Analysis model:** General purpose	**Sensitivity:** Normal
Particle RI: 2.420	**Absorption:** 0.03	**Size range:** 0.020 to 2000.000 um	**Obscuration:** 6.24 %
Dispersant Name: Water	**Dispersant RI:** 1.330	**Weighted Residual:** 1.610 %	**Result Emulation:** Off
Concentration: 0.0038 %Vol	**Span :** 4.280	**Uniformity:** 1.87	**Result units:** Volume
Specific Surface Area: 1.13 m²/g	**Surface Weighted Mean D[3,2]:** 5.332 um	**Vol. Weighted Mean D[4,3]:** 37.935 um	

d(0.1): 2.052 um **d(0.5):** 16.728 um **d(0.9):** 73.645 um



Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	1.01	11.482	3.47	120.226	0.76	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	1.11	13.183	3.61	138.038	0.29	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	1.21	15.136	3.74	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	1.32	17.378	3.85	181.970	0.00	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	1.45	19.953	3.96	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	1.58	22.909	4.03	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	1.72	26.303	4.07	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.01	2.884	1.88	30.200	4.06	316.228	0.12	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.11	3.311	2.04	34.674	3.98	363.078	0.35	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.21	3.802	2.21	39.811	3.83	416.869	0.55	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.31	4.365	2.38	45.709	3.62	478.630	0.63	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.41	5.012	2.55	52.481	3.34	549.541	0.61	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.51	5.754	2.72	60.256	2.99	630.957	0.22	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.61	6.607	2.88	69.183	2.60	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.71	7.586	3.04	79.433	2.16	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.81	8.710	3.19	91.201	1.71	954.993	0.00	10000.000	
0.091	0.00	0.955	0.91	10.000	3.34	104.713	1.24	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096		11.482		120.226		1258.925	0.00		

Operator notes:

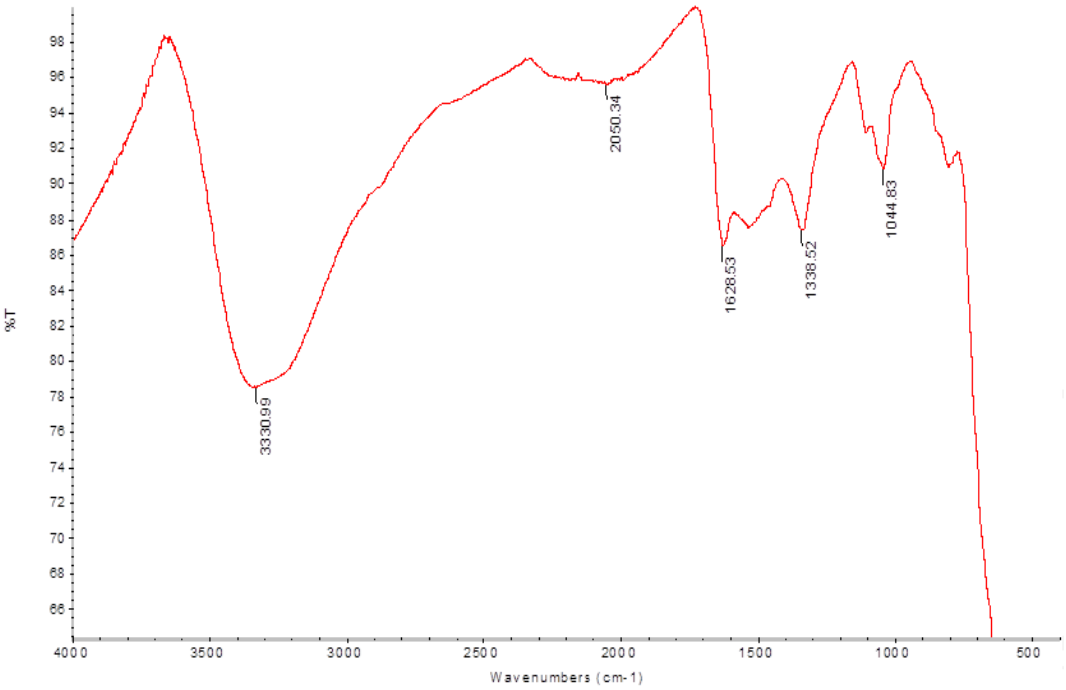
Malvern Instruments Ltd.
Malvern, UK
Tel := +[44] (0) 1684-892456 Fax +[44] (0) 1684-892789

Mastersizer 2000 Ver. 5.60
Serial Number : MAL1062387

File name: atomika deneme
Record Number: 388
02.05.2012 14:57:51

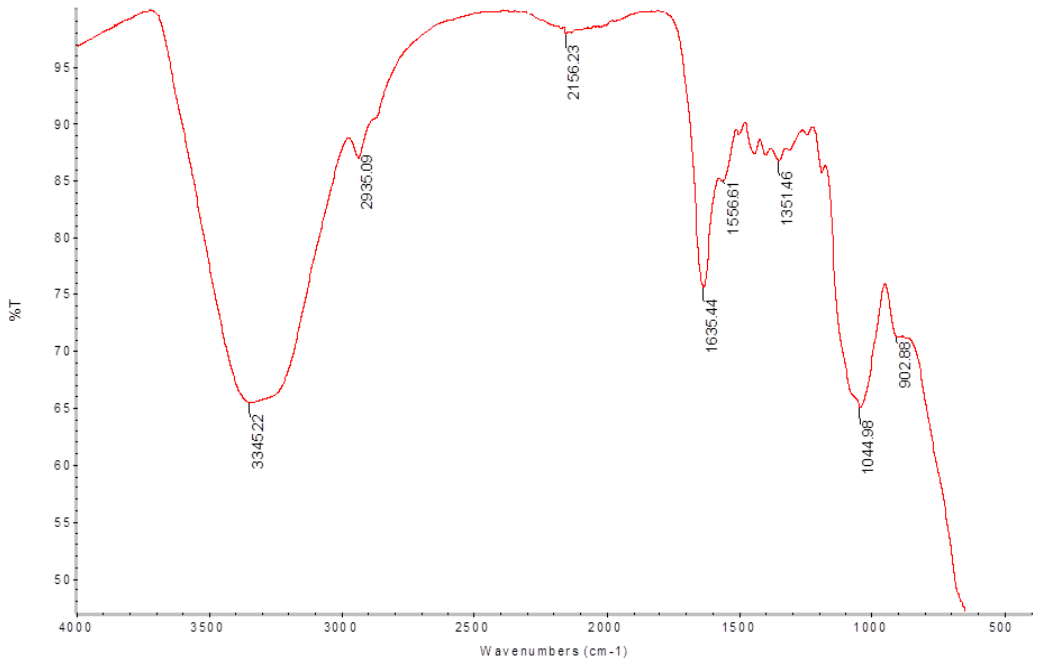
Ek 2. Magnetik nanopartiküllerin boyut analizi

EK 3



Ek 3. Magnetik nanopartiküllere epiklorhidrin ara kolu bağlı örneğin FT-IR spektrumu

EK 4



Ek 4. Magnetik nanopartiküllere glutaraldehit ara kolu bağlı örneğin FT-IR spektrumu

EK 5



Ek 5. SEM mikroskobu