



**TANNİK ASİT MODİFİYELİ MANYETİK NANOTANECİKLER ÜZERİNE
γ-GLUTAMİL TRANSPEPTİDAZIN KOVALENT İMMOBİLİZASYONU**

Jehad DAANA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

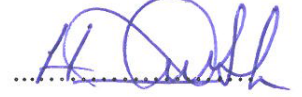
AĞUSTOS 2018

Jehad DAANA tarafından hazırlanan “TANNİK ASİT MODİFİYELİ MANYETİK NANOTANECİKLER ÜZERİNE γ -GLUTAMİL TRANSPEPTİDAZIN KOVALENT İMMOBİLİZASYONU” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan: Doç. Dr. Lokman UZUN

Kimya Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

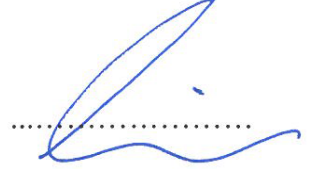
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye: Doç. Dr. Gökhan DEMİREL

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 13/08/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Jehad DAANA

13/08/2018

TANNİK ASİT MODİFİYELİ MANYETİK NANOTANECİKLER ÜZERİNE
 γ -GLUTAMİL TRANSPEPTİDAZIN KOVALENT İMMOBİLİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

Jehad DAANA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2018

ÖZET

Son yıllarda manyetik nanotaneciklerin (MNP'ler) geliştirilmesinde dikkate değer başarılar ortaya çıkarılmıştır. Enzimlerin, reaksiyonları katalizleme ve kompleks sentezlere girme kabiliyeti onları uzun zamandan beri endüstriyel ve araştırma uygulamalarının çoğunda kullanım için cazip kılmıştır. Bu çalışmada, γ -Glutamil transpeptidaz enziminin kovalent bağlanması için yüzeyi modifiye edilmiş manyetik nanotanecikler kullanılmıştır. γ -Glutamil transpeptidaz (γ -GGT; EC 2.3.2.2), glutatyon γ -glutamil grubunun bir amino grup asit veya peptide geçişini katalizleyen enzimdir. Fe_3O_4 MNP'ler iyi bilinen ortak çöktürme reaksiyonu vasıtasıyla hazırlanmıştır. Sonuç olarak bir bitkiden türetilen bir polifenol (Hidroksil gruplarca zengin) olan tannik asitin yapı yönlendirme ajanı ve aynı zamanda stabilizer olarak kullanılması ile GGT yi kovalent olarak hareketsizleştirebilmeyi sağlamak için manyetik nanotaneciklerin yüzeyi modifiye edilmiştir. Ortam pH 9,2 ye getirildikten sonra tannik asit ile modifiye edilmiş nanotaneciklerin üzerine GGT kovalent şekilde immobilize edilmiştir. MNP'ler üzerine % 92.98 enzim yüklenmiştir. Immobilize enzim, pH 8,5 ve 60 °C da maksimum katalitik aktivite göstermiştir. Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri Lineweaver–Burk grafiğine göre değerlendirilmiştir. Fe_3O_4 ve onun modifiye formlarının özellikleri, Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), UV-görünür bölge spektrometresi, taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), titreşimli numune manyetometresi ile incelenmiştir.

Bilim Kodu : 20107
Anahtar Kelimeler : İmmobilizasyon, γ -Glutamil transpeptidaz, Tannik asit, ikili çöktürme, manyetik nanotanecikler
Sayfa Adedi : 69
Danışman : Prof. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

COVALENT IMMOBILIZATION OF γ -GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE ON
TANNIC ACID MODIFIED MAGNETIC NANOPARTICLES

(M. Sc. Thesis)

Jehad DAANA

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2018

ABSTRACT

In recent years, noticeable achievements have been spent in the development of magnetic nanoparticles (MNPs). Enzymes ability to catalyze reactions and engage in complex syntheses has long made them attractive for use in a multitude of industrial, and research applications. This work presents the synthesis and uses surface modified magnetite nanoparticles for the covalent attachment of γ -Glutamyl transpeptidase enzyme. γ -Glutamyl transpeptidase (γ -GGT; EC 2.3.2.2) is an enzyme that catalyzes the transfer of the γ -glutamyl group of glutathione to an amino acid or a peptide. The activity of GGT is a critical indicator for liver function. In addition, it is used as a biochemical marker for alcohol consumption because there is a direct relationship between alcohol intake and the activity of GGT. Fe_3O_4 MNPs were prepared via well-known co-precipitation reaction. Subsequently, the surface of magnetic nanoparticles was modified by employing a plant-derived polyphenol (rich with hydroxylic groups) tannic acid as the structure-directing agent as well as the stabilize to enhance the ability to immobilize GGT covalently. GGT was covalently immobilized on tannic acid modified MNPs after exposing nanoparticles to pH 9,2. Enzyme loading was 92,98% onto the MNPs. The immobilized enzyme demonstrated maximum catalytic activity at pH 8,5 and 60 °C. The kinetic parameters of free and immobilized enzyme were evaluated according to the Lineweaver–Burk plot. The properties of Fe_3O_4 and its modified forms were examined by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), UV-vis spectrometer, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), vibrating sample magnetometry (VSM).

Science Code : 20107

Key Words : Immobilization, γ -Glutamyl transpeptidase, Tannic acid, co-precipitation, magnetic nanoparticles

Page Number : 69

Supervisor : Prof. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bütün süre boyunca değerli bilgilerini paylaşan, her türlü desteklerini esirgemeyen, saygıdeğer danışman hocam Prof.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Aynı şekilde, deneylerin planlanmasında desteklerini gösteren, deneysel verilerin analizinin yapılmasında ve sonuçların bilimsel şekilde yorumlanmasında yardımcı olan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen Dr. Eylem Turan'a şükranlarımı sunarım. Bu çalışmalarım boyunca her türlü fedakarlığı gösteren, hiç bitmeyen sevgisi ile destek veren büyük babam, ABED ALMAJİD'E, güzel annem OLA'ya gönülden şükranlarımı sunarım. Bu çalışmamı sonsuza dek aşkım, özgür Filistin'e adadım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. TANNİK ASİT	5
2.1. Yapısı	5
2.2. Uygulamalar ve Biyoaktiflik.....	6
2.3. Tannik Asit – Polidopamin Karşılaştırma.....	7
3. MANYETİK NANOTANECİKLER	9
3.1. İkili Çöktürme Yöntemi ile Manyetik Nanotaneciklerin Sentezi	11
3.2. Manyetik Nanotaneciklerin Korunması, Kararlı Hale Getirilmesi ve Fonksiyonelleştirilmesi	12
3.2.1. Manyetik nanotaneciklerin polimer ve/veya yüzey aktif madde ile kaplanması	13
4. ENZİMLER VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU	15
4.1. Enzimler	15
4.1.1. Enzim immobilizasyonu.....	17
4.1.2. Enzimlerin desteklere bağlanması.....	19
4.2. γ -Glutamil Transpeptidaz.....	22
4.2.1. Tanım ve yapısı	22

	Sayfa
4.2.2. GGT enziminin fonksiyonları	24
5. DENEYSEL KISIM	27
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
5.2. Manyetik Nanotaneciklerin Sentezi	27
5.3. Tannik Asit ile Manyetik Nanotaneciklerin Modifikasyonu	27
5.4. GGT Enziminin Tannik Asit ile Modifiye Edilen Manyetik Nanotanecikler Üzerine Kovalent Immobilizasyonu	28
5.5. GGT Aktivitesinin Analizi	29
5.6. pH ve Sıcaklığın Katalitik Aktivitesi Üzerine Etkileri	29
5.7. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	29
5.8. Depolama Kararlılığı ve Immobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği	31
5.9. Manyetik Nanotaneciklerin Karakterizasyonu	31
5.9.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)	31
5.9.2. X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS)	32
5.9.3. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)	32
5.9.4. Manyetometre	33
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	35
6.1. Tannik Asit Modifiyeli ve GGT Immobilize Edilen Manyetik Nantaneciklerin Sentezi ve Karakterizasyonu	35
6.2. Serbest ve Immobilize Enzimin Aktivite Çalışmaları	44
6.2.1. Tannik asit modifiyeli manyetik nanotaneciklere immobilize olan enzim miktarının tayini	44
6.2.2. Katalitik aktiviteye pH etkisi	45
6.2.3. Sıcaklığın katalitik aktiviteye etkisi	47
6.2.4. Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri	48
6.2.5. Serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılıkları ve kullanım sayıları	50
7. SONUÇ	53

Sayfa

KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	69



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. İmmobilizasyon metotlarının avantaj ve dezavantajları	20



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tannik asit yapısı($C_{76}H_{52}O_{46}$).....	6
Şekil 2.2. Dopaminin yapısı.....	8
Şekil 4.1. Kovalent bağlamanın, immobilize edilmiş bir enzimin belirtilen aktivitesine etkisi	21
Şekil 4.2. GGT enziminin kristal yapısı.....	25
Şekil 5.1. GGT enziminin tannik asit ile modifiye edilen manyetik nanotancikler üzerine kovalent immobilizasyonu	28
Şekil 5.2. Lineweaver- burk eğresi	30
Şekil 6.1. GGT enziminin tannik asit modifiyeli manyetik nanotanciklere kovalent immobilizasyonunun olası mekanizması.....	35
Şekil 6.2. Manyetik nanotanciklerin FT-IR spektrumu	37
Şekil 6.3. Tannik asit modifiyeli manyetik nanotanciklerin FT-IR spektrumu	38
Şekil 6.4. GGT immobilize edilmiş manyetik nanotanciklerin FT-IR spektrumu.....	39
Şekil 6.5. Manyetik nanotanciklerin XPS spektrumu	40
Şekil 6.6. Tannik asit modifiyeli manyetik nanotanciklerin XPS spektrumu	41
Şekil 6.7. (a) Manyetik, (b) Tannik asit modifiyeli manyetik, (c) GGT enzim immobilize edilmiş manyetik nanotanciklerin TEM görüntüleri	42
Şekil 6.8. Manyetik, tannik asit modifiyeli ve GGT enzim immobilize edilmiş manyetik nanotanciklerin histerezis eğrileri	43
Şekil 6.9. Serbest ve immobilize enzimin katalitik aktivitesine pH etkisi.....	46
Şekil 6.10. Serbest ve immobilize enzimin katalitik aktivitesine sıcaklık etkisi	47
Şekil 6.11. Enzim-substrat etkileşimi	48
Şekil 6.12. Serbest ve immobilize enzimin Lineweaver – Burk eğrileri	49
Şekil 6.13. Serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılıkları	50
Şekil 6.14. İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği	51

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Çaydaki tannik asit	5
Resim 5.1. ATR-FT-IR spektrofotometresi	31
Resim 5.2. X-ışınları spektrometresi	32
Resim 5.3. Geçirimli elektron mikroskobu.....	33
Resim 5.4. Manyetometre	33



SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

Da	Dalton
mL	Mililitre
°C	Derece Celcius

Kısaltmalar

Açıklamalar

ALP	Alkalın fosfataz
BPA	Bisfenol A
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOPA	Dopamin
FDA	Gıda ve İlaç Yönetimi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GA	Gallik asit
GGT	γ -glutamil transpeptidaz
GpNA	γ -para nitroanalide
GSH	Glutatyon
IONP	Demir oksit nanotanecekler
NO	Azotmonoksit
Ntn	N-sonlu nükleofil
PDOPA	Polidopamin
PEG	Polietilen glikol
p-NA	Para-nitroanilit
SPIONs	Süperparamanyetik demir oksit nanotanecekler
TA	Tannik asit
TA-PPA	Tannik asit plazma- poliallilamin

Kısaltmalar**Açıklamalar****TEM**

Geçirimli elektron mikroskobu

Tris.HCl

Tris (hidroksimetil)aminometan Hidroklorür

UV-GB

Ultraviyole Görünür Bölge Spektroskopisi

VEGF

Vasküler endotelyal gelişme faktörü

VSM

Titreşimli örnek manyetometresi

XPS

X-ışınları fotoelektron spektroskopisi



1. GİRİŞ

Nanomalzemelerin ilginç yeni ve ileri fizikokimyasal özelliklerini geliştirmek için araştırmacılar, yıllardır basit küresel parçacıklardan ziyade yapısal olarak farklı nanotaneciklerin avantajlarını araştırmaktadırlar [1]. Nanoteknoloji ve moleküler biyolojideki gelişmeler, geleneksel hastalık teşhis ve tedavisi ile ilgili noksanlıkların giderilmesi suretiyle çok fonksiyonlu nanotaneciklerin biyomedikal uygulamalara dönüşmesine yardımcı olmuştur. Son yıllarda, biyofonksiyonel nanotaneciklerin tasarım ve üretimi birçok farklı alanda yaygın ilgi uyandırmaktadır. Biyoteknolojide kataliz, biyoalgılama için araç, tıpta ilaç dağıtımı, hastalık teşhisleri için tanı kiti, hücre içi görüntüleme sistemleri olmak üzere birçok potansiyel uygulamaları sebebiyle nanomalzemeler, etrafımızdaki dünyayı kökten değiştirmeye başlamıştır [2].

Farklı alanlardaki uygulamalar nanotaneciklerin kimyasal kompozisyonu, kolloidal kararlılığı, kristal yapısı, manyetik davranışı, adsorpsiyon özellikleri, çözünürlük ve düşük toksisite gibi fiziksel, kimyasal ve farmakolojik özellikleri hakkında ayrıntılı bilgi sahibi olmayı zorunlu kılar [3]. Çeşitli kompozisyonlarda nanotanecik sentezi için birkaç uygun metot geliştirildiği halde, yukarıda anlatılan alanlarda nanotaneciklerin başarılı uygulaması, değişik şartlar altında taneciklerin kararlılığına fazlasıyla bağlıdır [4]. Bu uygulamaların çoğunda, malzemeye bağlı fakat tipik olarak 10-20nm civarında olan nanotaneciklerin boyutu kritik bir değerin altında olduğunda parçacıklar en iyi performansı gösterirler [5].

Nano-boyutlu demiroksit parçacıklar veya manyetik nanoparçacıklar, çoğunlukla doğada en kuvvetli manyetik mineral olarak bilinen 5-20 nm çapındaki manyetit (Fe_3O_4), veya maghemitten (Fe_2O_3) oluşmaktadır. Manyetik nanotanecikler yüksek mıknatıslama değerinin yanı sıra çok küçük ve dar boyut dağılımına sahip olmaları nedeniyle özellikle farmasötikler, malzeme bilimi ve biyomedikal amaçlar için yoğun şekilde dikkatleri üzerine çekmiştir [6]. Dar boyut dağılımlı, iyi tasarlanmış ilaç dağıtımlı ve doku sıvısında iyi dağılan süperparamanyetik nanotanecikler (SPION) biyomedikal uygulamalarda önemlidir. Örneğin 50 nm den daha büyük çapta polimer kaplı manyetik nanotanecikler karaciğerde veya dalakta tutulabilirken 30 nm den küçük olanlar ise hızlı şekilde hemen hemen hepsi komple vücutta dağılır. Normal olarak manyetik nanotanecikler daha çok lenf düğümlerine girerler ve yavaşça atılırlar [7].

Manyetik nanotanecikler, sentez sonrası ve yüzeylerinin işlevsel hale getirilmesinin ardından optimum manyetik zenginlik için yüksek manyetik hassasiyete sahip olmalı ve uygulanan manyetik alanın uzaklaştırılmasından sonra manyetik özelliğini kaybetmelidir (süperparamanyetik özellik). Böyle manyetik nanotanecikler geniş ve sabit bir manyetik momente sahip olurlar ve uygulanan manyetik alana hızlı cevap veren büyük bir paramanyetik atom gibi davranırlar. Bu özellikler biyomedikal uygulamaların geniş bir aralığı için süperparamanyetik nanotanecikleri oldukça cazip kılar, çünkü oda sıcaklığında topaklanma oluşum riski gözardı edilebilirdir [8].

Fe_3O_4 ve Fe_2O_3 gibi demir oksitler dahil, nanoyapılı manyetik tanecikler çok sayıda değişik kompozisyon ve fazlarda sentezlenmiştir. Son on yılda çoğu araştırmalar manyetik nanotaneciklerin sentezine üzerinedir. Özellikle son birkaç yıl süresince çoğu yayın, şekil kontrollü, oldukça kararlı ve monodispers manyetik nanotanecikler elde etmek üzere etkin yöntemler tanımlamıştır. İkili çöktürme, termal bozunma ve /veya indirgenme, misel sentezi, mikrodalga destekli hidrotermal sentez ve lazer piroliz teknikleri dahil birkaç popüler metot, tümüyle yüksek kaliteli manyetik nanotaneciklerin sentezine yöneliktir [9]. Bununla beraber, yüksek kristallinite ve nanometre skalasında küçük boyutlu monodispers manyetik nanokristallerin sentezleri için polar olmayan çözelti içinde organometalik ve koordinasyon bileşiklerinin ısı bozunması başarılı şekilde kullanılmıştır [10].

Bununla birlikte, bu metotlarla sentezlenen manyetik nanokristaller genellikle hidrofobik yüzey aktif maddeler ile kararlı hale getirilmiştir. Bununla birlikte yüksek manyetik alan sorumluluğu olan suda dağıtılabilir taneciklerin revaçta olduğu biyo bağlantılı alanlarda uygulanmalarını aşırı derecede zorlaştıran düşük manyetikliğe sahip suda dağıtılabilir taneciklerin yer aldığı düşük bir mıknaatıslanmaya sahiptirler. Bundan dolayı; kontrol edilebilir boyutlu, hızlı manyetik yanıt ve istenilen yüzey özellikli suda çözünebilir demir oksit nanokristallerinin üretimine yoğun gayret gösterilmiştir [11]. Sentez esnasında veya sonrasında çıplak manyetik nanotanecikleri bozunmaya karşı kimyasal olarak kararlı hale getirmek üzere koruma stratejileri geliştirmek çoğu uygulama için bu nedenle önemlidir. Bu stratejiler, aşılama veya yüzey aktif maddeler ya da örneğin dextran [12-13] gibi polimerler, polivinil alkol (PVP) [14], veya altın gibi inorganik metallerin, (grafit gibi) metal olmayanların veya oksit sülfatların (örneğin SiO_2) [15] birkaç atomik katmanının yerdeğiştirmesini içeren organik türlerle kaplamaktan oluşur. Bir çok durumda koruyucu kabukların sadece nanotanecikleri kararlı hale getirmekle kalmayıp aynı zamanda istenilen

uygulmaya bağlı olarak örneğin diğer nanotaneciklerle veya çeşitli ligandlarla daha fazla işlevselleştirmek için kullanılabilecek oluşu ise dikkat çekicidir.

İşlevselleştirilmiş nanotanecikler uygulamalar için katalizleme, biyoetiketleme, enzim immobilizasyonu ve biyoayırma gibi alanlarda umut vericidir. Özellikle tıpkı küçük ve manyetik olarak ayrılabilir parçacıkların yüksek dağılma, yüksek reaktivlik ve kolay ayrılmanın biraraya geldiği homojen sistemler gibi, sıvı faz katalitik reaksiyonlarında bu nanotanecikler sıklıkla kullanılmaktadır [16]. Daha önce bahsedildiği gibi fiziksel ve kimyasal olarak stabil kolloidal sistemlerin elde edilmesi için manyetik nanotaneciklerin korunması birinci derecede önemlidir. Yüzey kaplama manyetik nanotaneciklerin topaklanmadan korunmasında, özel olmayan hücre etkileşimlerini sınırlandırmak ve ilaç kinetiğini, ilaç salınımını ayarlamak ve biyoaktif moleküller veya hedef ligadlar ile daha fazla konjugasyon için işlevsellik sağlamak ve çok fonksiyonlu nanotanecikler elde etmek için büyük rol oynar [17].

Polimerik manyetik nanotanecikler, inorganik manyetik nanotaneciklerin sentetik polimerler ile kaplanması veya kapsüllenmesi ile hazırlanabilir. Bu polimerik manyetik nanotanecikler, polimerin yüksek ekstraksiyon kapasitesi ile manyetik nanotaneciklerin kolay ayrılma  zelliliğini biraraya getirir. Son zamanlarda polimerik manyetik nanotaneciklerin birçok uygulamaları ve manyetik moleküler işaretlenmiş polimerler mevcuttur [18].

Endüstriyel ve biyomedikal uygulamalar için immobilize enzimlerin    nebilir formları veya alternatif teknolojileri üzerine avantajlı imkanları sebebiyle oldukça fazla dikkat çekicidirler [19]. Enzim tutma kabiliyeti, biyokatalizörün reaksiyon ortamından kolay ayrılması, üründeki enzim kirliliğinin giderilmesi ve mikrobiyal safsızlıkların önlenmesi gibi eşsiz avantajları olan enzim immobilizasyonu ile proteinin taşınımı veya ard arda gelen proses aşamalarına kadar enzimlerin aktifliği korunur [20]. Enzimlerin katı destekler üzerinde immobilizasyonu ile enzim stabilitesini, proteoliz etkinliğini, aynı zamanda tekrar kullanım için geri kazanımı da iyileştirebilir [21]. Yüzeyi işlevselleştirilmiş manyetik nanotanecikler enzim immobilizasyonu için çok geniş spesifik yüzey alanına sahiptir. Aynı zamanda, substrat ile ürün difüzyonunun sınırlandırmasını azaltmayı sağlayabildiği ve katalitik etkinliği artırdığından dolayı enzim immobilizasyonu için ideal destekler olarak çok fazla dikkat çekmektedir [20]. Manyetik nanotanecikler üzerine enzimlerin

immobilizasyonu için bilinen kullanımı olan metodlardan biri, parçacıkların ve enzimlerin üzerinde kimyasal bölümler arasında kovalent bağlanmanın olduğu yalın veya modifiye manyetik nanotanecekler üzerine kovalent bağlanmadır. Bu metot enzim kaybı ile çok sık ilişkilendirilmiştir. Bu durum enzimin manyetik nanotaneceğe güçlü bağlanmasıyla engellenebilir [22].

Bu tez kapsamında, γ -glutamil transpeptidaz tannik asit modifiyeli manyetik nanotanecekler (Fe_3O_4 -TA) üzerinde kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesine pH'nın, sıcaklığın etkisi yanında kinetik parametreler ve tekrar kullanım sayıları incelenmiştir. Kimyasal stabiliteye sahiplik, iyi manyetik özellikler ve harici manyetik alan altında reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrıştırılabilir olması sebebiyle γ -glutamil transpeptidazın immobilizasyonu için destek malzemesi olarak tannik asit modifiyeli manyetik nanotanecekler seçilmiştir. İlk olarak ikili çöktürme metodu ile manyetik nanotanecekler sentezlenmiştir. Dopamin ve polifenoller gibi diol grupları içeren tannik asit içeren moleküller Fe_3O_4 , TiO_2 v.b ile yük aktarım kompleksleri oluşturabilirler [23]. Bu nedenle tannik asit yapısındaki fenolik hidroksil gruplar ile manyetik nanotaneceklerin yapısındaki Fe(III) arasındaki koordine bağlar sayesinde manyetik nanotanecekler tannik asit ile modifiye edilmiştir. Son olarak, tannik asitle modifiye edilmiş manyetik nanotaneceklerin yüzeyine γ -glutamil transpeptidaz enzimi kovalent olarak immobilize edilmiştir. Kovalent immobilizasyon; pH'a karşı duyarlı kovalent bağlar ile oda sıcaklığında Schiff-bazı vermek üzere tepkimeye giren kinon ve amin içeren GGT'nin oluşumu ile elde edilen karbonil gruplar tarafından yapılmıştır. Schiff baz oluşumu FTIR analizleri ile kanıtlanmıştır. Bütün nanotanecekler XPS, VSM, FTIR ve TEM ile karakterize edilmiştir. Immobilizasyon başarıyla yürütülmüş ve enzim aktivitesi immobilizasyon prosesinden sonra belirli bir pH ve sıcaklık aralığına kadar iyileştirilmiştir.

2. TANNİK ASİT

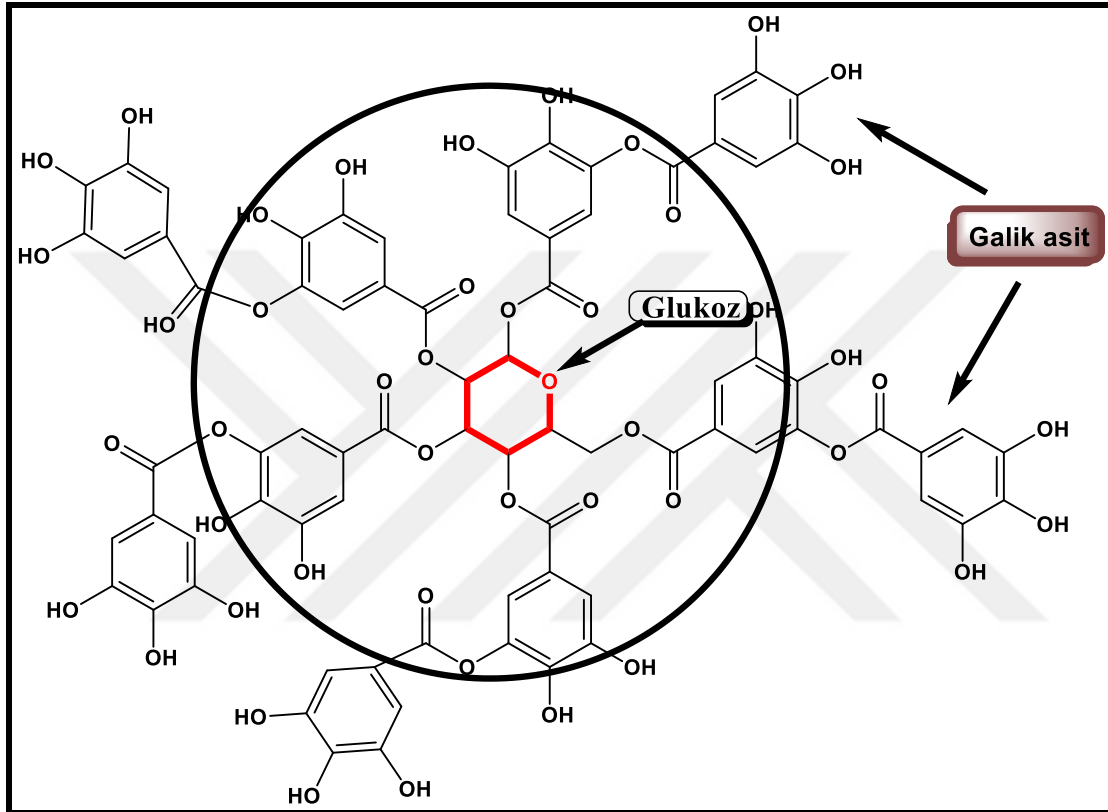
2.1. Yapısı

Bilinen bir flavonoid olan tannik asit oldukça şaşırtıcı büyüklükte bir moleküldür. Organik malzemenin bozunmasını başaran bitkiden türetilen bir polifenoldür. Flavonoidler, benzo- γ -pyrone yapısına sahip polifenolik bileşiklerin geniş bir grubunu içerirler ve bitkilerde yaygın olarak bulunur ve mikrobiyal enfeksiyona tepki olarak bitkiler tarafından sentezlenir [24]. Tannik asit (TA) doğal, zehirsiz, suda çözülebilen molekül ağırlığı 1701,20 Da civarında, ve merkezde glukoz birimine bağlı beş gallik asit ve diğer beş gallik asidin de bu beş galik aside her biri diğerine bir ester bağı ile bağlanmış hidroliz edilebilen tanninin tipik bir formudur. Bununla birlikte tannik asitin ortalama formül ağırlığı açısından temsili yapısı Şekil 2.1’ de göstermiştir. Tannik asit ayrışma derecesinin fonksiyonu olarak 7-8 aralığındaki pKa değerinden dolayı hafif asidik bazik koşullarda glukoz ve gallik aside kısmen hidroliz olur [25]. Glukoz, bazik pH da iyi bir stabilize edici ajan olma özelliğini bünyesinde barındırır fakat aynı anda da oda sıcaklığında zayıf indirgeme ajanıdır, gallik asit de bu koşullarda zayıf bir stabilizeye sahiptir. Bu üstün özellikler sayesinde, tannik asit oda sıcaklığı ve bazik şartlarda ideal, çevre dostu indirgeyici ve stabilize edici ajan olarak kullanılmaktadır [26]. Ayrıca Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından güvenli kimyasal olarak ve gıda ürünlerinde doğrudan katkı maddesi olarak kullanımı kabul edilmiştir [27].



Resim 2.1. Çaydaki tannik asit

Katekollerin kovalent ve kovalent olmayan etkileşimlerle yüzeye güçlü bir bağla bağlandığının bilindiği ve denizcilikte polifenolik protein yapıştırıcıların önde gelen bileşenleri olduğu için, bitkisel polifenollerin yüksek dihidroksifenil (katekol) ve trihidroksifenil (gallik asit, GA) içeriği yüzey modifikasyonu çerçevesinde, daha fazla ilgi çekmektedir [24].



Şekil 2.1. Tannik asit yapısı (C₇₆H₅₂O₄₆)

2.2. Uygulamalar ve Biyoaktiflik

Çok fonksiyonlu yüzey kaplamaları için doğadan esinlenme son birkaç yıl içinde trend haline gelmiştir. Amin veya tiyol gruplu biyomoleküller (enzimler, proteinler ve hücreler) bazik ortamda Schiff bazı oluşumu veya Michael katılma reaksiyonları üzerinden kinon grupları içeren tannik asit ile işlevselleştirilmiş bir yüzey üzerine kolaylıkla kovalent olarak immobilize edilebilirler [28]. Bu durum, fenolik hidroksillerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin zengin olmasından kaynaklanmaktadır. Tannik asit ile işlevselleştirilmiş yüzeyler, DNA hidrojel oluşumu için moleküler yapıştırıcı olarak, radikal temizleme, organizma ve laboratuvar sistemlerinde antioksidan [29], kaplama, dayanıklı film veya parçacık mühendisliği için koordinasyon kompleksleri ve süpermoleküllerin montajı için

kullanılabilir. Tannik asit, elektrostatik etkileşim kurma, hidrojen bağı oluşturma ve hidrofobik etkileşim yeteneğinden dolayı kolajen, jelatin, albumin gibi biyomakromoleküller ile doğrudan etkileşebilir [30]. Son zamanlarda, tannik asidin çeşitli hayvan hücrelerinde kanser önleyici kimyasal olarak kullanıldığı da gösterilmektedir [31]. Yapılan bir çalışmada, UV-GB radyasyona maruz bırakılan tüysüz farelerde oluşan cilt tümörünün ilerlemesini tannik asitin yaklaşık % 70' e kadar baskı altına aldığı belirtilmiştir [32].

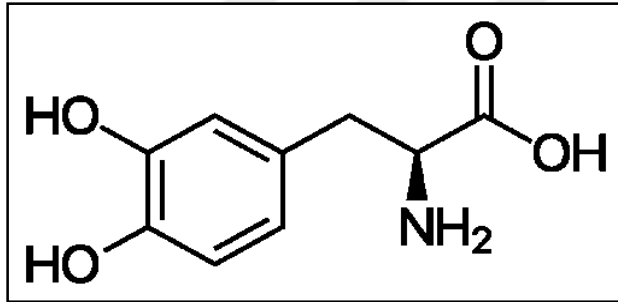
Tannik asit molekülünün yapısındaki polifenolik gruplar bazik şartlarda havanın oksijeni ile aktif kinon gruplarına kolaylıkla oksitlenebilir. Bu gruplar, bazik şartlarda kararlı bir çapraz bağlı ağ oluşumuyla biyomoleküllerin yapısındaki primer amin gruplarıyla reaksiyona girerek kovalent bağlar oluşturabilir (Michael katılması neticesinde). Hem yapı yönlendirici hem de stabilizatör olarak dikkat çeken tannik asit, manyetik nanotaneceklerin yüzeyine biyomoleküllerin kovalent immobilizasyonu için büyük kolaylık sağlayacaktır [33].

2.3. Tannik Asit – Polidopamin Karşılaştırma

Dopamin, memelilerin merkezi sinir sisteminde sinir ileticisi ve önemli bir hormondur [34]. Dopamin, (DOPA, 3,4-dihidroksifenilalanin) son zamanlarda biyomimetik nano kaplamaların substratlar üzerine sabitlenmesi için bir moleküler yapı taşı olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 2.2) [35]. Dopaminin sulu çözeltilerine daldırılmış substratlar, sıklıkla polidopamin (PDOPA) olarak tanımlanan kendiliğinden oluşan uygun kaplamaları oluşturur. En iyi PDOPA kaplama oluşumu bazik pH 'da oluşur [36]. Dopamin basit çevre şartlarında havadaki oksijen ile de polimerleşebilir. Bununla birlikte, ince ve geniş aralıklı inorganik-organik maddelerin yüzeyinde kendi kendine gerçekleşen iyi bilinen oksidatif polimerizasyonu ile yüzeye yapışan polidopamin tabakasını oluşturabilir [37]. İlginç bir biçimde tannik asit fazla miktarda katekol ile gallol fonksiyonel gruplara sahiptir ve dopamin ile yapısal benzerliğinden dolayı, tıpkı polidopamin gibi güçlü katı sıvı arayüz ve çapraz bağlanma özellikleri göstermesi beklenir [38]. Xiong ve arkadaşları, polifenolik hidroksil gruplarının kinon gruplarına oksitlenmesini ve vasküler endotelial gelişme faktörünün (VEGF) tannik asit aracılığı ile immobilizasyonunu rapor etmiştir. Çalışmada, tannik asit modifiyeli poliallilamin (TA-PAA) yapısındaki kinon fonksiyonel grupları ve VEGF yapısındaki amin grupları arasında Schiff baz oluşumu veya Michael katılma

reaksiyonları ile VEGF TA-PAA üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir [39]. Ayrıca, tannik asitle modifiye edilmiş nanotanecikler üzerinden tripsinin immobilizasyonu Atacan ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir. Sonuç olarak, tannik asitle modifiye manyetik nanotaneciklerin enzim immobilizasyonu için iyi katı bir destekler olduğunu bildirmişlerdir [40-41]. Sileika ve arkadaşları, polidopamine benzer kaplamalar oluşturmak üzere tannik asitin oksidatif polimerleşmeye eğilimini tanımlamıştır [42]. Aynı zamanda Ejima ve arkadaşları, demir iyonlarıyla koordinasyon kompleksleri kullanarak yeni bir tannik asit kaplamanın geliştirildiğini rapor etmişlerdir [43].

Polidopamin kaplı yüzeyler çok geniş aralıkta kullanım alanına sahip olmalarına rağmen, tannik asitin daha ucuz, antibakteriyel, antioksidan ve sitotoksik özelliklerinden dolayı en az polidopamin kaplı yüzeyler kadar ilgi çekmektedir. Karakteristik olarak polidopamin kaplamalarının koyu rengi bazı pratik uygulamalar için engelleyici olabilir [44]. Son zamanlarda renksiz bir PDOPA kaplama metodu önerilmiş ve kaplama masrafının kabaca dört kat azaltılması sağlanmıştır [45].



Şekil 2.2. Dopaminin yapısı

3. MANYETİK NANOTANECİKLER

Nanotanecikler nanoteknolojideki hızlı gelişmenin ilk sıralarında yer almaktadır. Üstün boyut dağılımlı özellikleri bu malzemeleri bazı araştırma alanlarında vazgeçilmez ve mükemmel yapmaktadır. Manyetik demir oksitler insanlara yüzyıllardır hizmet vermektedirler, örneğin küçük demir oksitin uygulaması olan nanotanecikler (IONP'ler) laboratuvar ortamında neredeyse yarım yüz yıldır kullanılmaktadır. Son on yılda süperparamanyetik nanotanecikler teknolojik uygulama için yoğun olarak geliştirilmiştir. Ferrit kolloidleri, manyetit (Fe_3O_4) ve maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), medikal ve farmasötik sahalarda biyouyumluluğu ve biyobozunabilirliği sebebiyle şimdiye kadar manyetik nanotaneciklerin en dikkat çeken ana örneklerindendir [46].

Manyetit (Fe_3O_4), O^{2-} iyon ve [111] yönünde sıkı istiflenmiş yüzey merkezli kübik spinel yapıya sahiptir. (Fe_3O_4) hem divalent hem de trivalent demirin her ikisini birden içermesiyle diğer tüm demir oksitlerden ayrılır. Fe_3O_4 , Fe^{2+} iyonlarının tümünün oktahedral bölgenin yarısını kapladığı ve Fe^{3+} iyonlarının kalan oktahedral ve tetrahedral sahada aynı oranda ayrıldığı yerdeki oksit iyonlarının sık kübik diziliminden oluşan ters kübik spinel yapıya sahiptir. Stokiyometrik manyetitte $\text{FeII/FeIII} = \frac{1}{2}$ ve iki değerlikli demirler kısmen veya tamamen diğer iki değerlikli iyonlarla (Co, Mn, Zn v.b) yer değiştirebilir. IONP'lerin manyetik özellikleri ile boyut ve şekil arasındaki ilişkiyi anlamak manyetizmanın veri depolama ve biyoayırma alanlarında yaygın uygulamaları için önkoşuldur. Genel olarak doygunluk manyetizasyonu sıklıkla 1 emu g^{-1} den daha küçük olduğu halde, Hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) oda sıcaklığında zayıf bir ferromanyetizmaya sahiptir. Bununla beraber 92 emu g^{-1} a erişen doygunluk manyetizasyonu ile $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ve Fe_3O_4 , oda sıcaklığında ferrimanyetizma özellik gösterir [47].

Süperparamanyetizma, yüksek yüzey alanı, büyük yüzey-hacim oranı, düşük toksisite, dış manyetik alan altında kolay ayrışma gibi özgün özellikler sebebiyle Fe_3O_4 nanotanecikler, biyomalzemelerin immobilizasyonu, biyoayırma, çevresel işlem, biyomedikal ve biyomühendislik kullanımı ve gıda analizleri gibi farklı alanlarda muhteşem potansiyele sahiptir [48]. Fe_3O_4 nanotaneciklerinin sentezi için gaz faz katı biriktirme ve elektron parlaması, taş baskı gibi fiziksel metotlar dahil birkaç üretim metodu geliştirilmiştir. Bununla birlikte bu metotlar, tanecik boyutlarının nanometre boyutunda kontrolü, sol jel sentezleri, oksidasyon metodu, kimyasal ikili çöktürme, hidrotermal reaksiyonlar, akış

enjeksiyon sentezleri ve mikrobiyal metotlar gibi yaş kimyasal hazırlama metotlarının yetersizliğinden dolayı sıkıntı yaşatmaktadır. Fakat, yaş kimyasal sentez metotlarında fiziksel metotlara kıyasla göreceli olarak daha az enerji tüketilmiştir [49].

Harici manyetik alanda manyetik malzemeler çevrelediği ortamın protonlarının o süratle manyetik alanda homojenliğe sebep olan daha yüksek bir hızda gevşemesini sağlar. Bu, sözü edilen bu taneciklerin kontrast ajan olarak teşhis amacıyla MRI'da kullanılmasını sağlar[50]. Halihazırda erken klinik denemelerde MNP çeşitliliği vardır ve bazı formülasyonlar klinik olarak medikal görüntüleme ve tıbbi uygulamalar için onaylanmıştır. Manyetik rezonans görüntülemede kontrast ajanı olarak kullanım için ticari olarak bazı manyetik nanotanecekler Lumiren® ve Gastromark® bağırsak görüntüleme için, Feridex I.V. ® ve Endorem® karaciğer ve dalak görüntüleme için uygun nanotaneceklerdir [51].

Manyetik nanotanecekler analitik biyomoleküllerin immobilizasyonu için nanoboyutlu destekler olarak elektrokimyasal biyosensörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır [52]. Özellikle bu nanotaneceklerin yüzeyi üzerinde enzimlerin immobilizasyonu, enzimler tarafından substratların algılanması ile ilgili kütle aktarım proseslerinin azaltılması ve enzimatik faaliyetlerin gelişmesini kapsayan birkaç avantaj sahiptir. Demir oksit nanotanecekler enzimlerin elektronlarla doğrudan elektrokimyasal biyosensörlerin hassasiyeti ve seçiciliğini iyileştiren çevirici ile değiştirilebildiği için elektrokimyasal cihazlar için olumlu bir mikroçevre sağlar. Böylece sülfid, fenolik bileşikler, glukoz, laktat, hidrojen peroksit için oldukça fazla sayıda elektrokimyasal biyosensörler kullanan modifiye manyetik nanotanecekler literatürde rapor edilmiştir [53].

Sulu bir ortam içinde dağılmayı şiddetle etkileyen yüksek yüzey enerjisi sebebiyle, kaplanmamış Fe_3O_4 nanotanecekler sıklıkla zayıf kararlılık ve dağılıma sahip olmakta ve kolaylıkla topaklanmaktadır. Ayrıca, Fe_3O_4 nanotanecekler oksijenin varlığında $\gamma-Fe_2O_3$ nanotaneceklerle oksitlenmek için fazlasıyla hassastır. Çözülebilir ve biyoyumlu Fe_3O_4 nanotanecekleri elde etmek için çeşitli modifikasyon yöntemlerinden istifade edilmiştir. Bu gibi bir koruma manyetik nanotaneceklerin yüzeylerinin kaplanması ile elde edilebilir. Sonuç olarak elde edilen modifiye Fe_3O_4 nanotanecekler çeşitli uygulamalar için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Doğru yüzey modifikasyonu ile Fe_3O_4 nanotaneceklerinin stabilitesi, dispersibilitesi, biyoyumluluğu iyileştirilebilir ve Fe_3O_4 nanotaneceklerinin γ -

Fe_2O_3 nanotaneciklerine oksidasyon işlemi büyük ölçüde yavaşlatılabilir [54]. Ayrıca, çeşitli biyomoleküllerin katılımına izin vermek için yüzeyin fonksiyonel hale getirilmesi manyetik nanotanecik tasarımlarının bütünleyici parçası olmuştur. Örneğin, amin bağlayıcılar bir ilaç, protein veya DNA molekülünün asit gruplarıyla konjuge olmasına yardımcı olur ve karboksilik asit bağlayıcıları, proteinlerin amin grupları ile amid bağları oluşturabilir.

3.1. İkili Çöktürme Yöntemi ile Manyetik Nanotaneciklerin Sentezi

Günümüze kadar, manyetik nanotaneciklerin üretilmesi için ortak çöktürme, termal bozunma, hidrotermal ve solvotermal sentezler, sol-jel sentezi, mikroemülsiyon, ultrason ışınlaması ve biyolojik sentez gibi çeşitli sentetik metotlar uygulanmıştır. Bu metodlar sulu ve susuz uygulama olmak üzere ikiye ayrılabilir. Sulu yaklaşım düşük maliyet ve sürdürülebilirlik bakımından ilgi çekicidir; bununla birlikte, boyut seçimi olmaksızın doğrudan suda çözünebilir monodispers manyetik nanotanecikler elde etmede geniş kapsamlı bir karşı çıkış vardır. Sulu olmayan yollar genellikle sadece polar olmayan çözücüler içinde çözünen manyetik nanotanecikler elde edilmiştir. Parçacıklar, teller ve çubukları kapsayan farklı morfolojilere sahip çeşitli manyetik nanoyapılar sentezlenmiştir [55].

Oda sıcaklığında veya yüksek sıcaklıkta inert atmosfer altında bir baz ilavesiyle sulu $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ tuz çözeltilerinden demir oksitleri (Fe_3O_4 veya $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sentezlemek için ikili çöktürme, ucuz ve elverişli bir yoldur. Bu belki de süperparamanyetik demir oksit nanotanecikler sentezlemek için en basit ve en etkili kimyasal yoldur. Manyetik nanotaneciklerin ölçüsü, şekli ve bileşimi, kullanılan tuzların türüne (örn. Klorürler, sülfatlar, nitratlar), $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ oranına, reaksiyon sıcaklığına, pH değerine ve ortamın iyonik dayanımına çok fazla bağlıdır. Ortalama çaplar genel anlamda 50 nm'nin altındadır [56]. Bu sentezle, sentetik koşullar sabitlenir sabitlenmez manyetik nanotaneciklerin kalitesi tamamen tekrarlanabilir. Manyetik nanotaneciklerin 95 emu g^{-1} yığın değerinden daha düşük olan manyetik doygunluk değerleri deneysel olarak 30-70 emu g^{-1} aralığında belirlenmiştir. Manyetik nanotanecikler çevresel koşullar altında çok kararlı değildir ve kolayca maghemite oksitlenir ya da asidik bir ortamda çözülür. Maghemite bir ferrimanyet olduğu için oksidasyon daha az bir problemdir. Bundan dolayı, maghemite dönüştürmek üzere manyetik nanotanecikler dikkatli bir oksidasyona maruz bırakılır. Bu

dönüşüm bunların asidik ortamda dağıtılmasıyla, sonra da demir (III) nitrat eklenmesiyle elde edilir. Maghemit nanotaneçikler daha sonra bazik ve asidik ortamda kimyasal olarak kararlı olarak elde edilir. Bununla birlikte, manyetik nanotaneçiklerin ilk oluşumundan sonra maghemite dönüştürülse bile, birlikte çöktürme ile Fe_3O_4 'ün sentezindeki deneysel yöntem, böylece dar bir parçacık boyut dağılımı sağlanarak parçacık büyüklüğünün kontrolüne dayanır. Bloklama sıcaklığı tanecik boyutuna bağlı olduğundan, geniş bir tanecik boyut dağılımı, geniş bir bloke edici sıcaklık aralığı ve bundan dolayı birçok uygulamalar için ideal olmayan manyetik davranışla neticelenecektir. İkili çöktürme ile hazırlanan nanotaneçikler maalesef oldukça polidispers olma eğilimi gösterirler. Çekirdeklenmenin kısa bir yoğunlaşması ve ardından yavaş kontrollü büyümenin meydana gelmesinin monodispers parçacıkların üretilmesi için çok önemli olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle monodispers demir oksit manyetik nanotaneçiklerin üretiminde bu süreçleri kontrol etmek anahtardır [57].

Manyetik nanotaneçiklerin oluşumu için olası reaksiyon mekanizması Eş. 3.1, 3.2, 3.3, 3.4'deki gibidir[58].



Reaksiyon genellikle gaz koruma sorunu ile karşı karşıya kalır. Fe_3O_4 çekirdeğinin çekirdek oluşumu çözelti pH'ı 11 den küçük olduğunda daha kolayken, Fe_3O_4 çekirdeğinin büyümesi çözelti pH'ı 11 den büyük olduğunda daha kolaydır. Reaksiyon hızlıdır, çok yüksek verimlidir ve demir kaynağının eklenmesinden sonra manyetik kristalleri hemen görülür. Reaksiyon karışımının oksijenden uzak olması elzemdir, aksi takdirde manyetik nanotaneçikler reaksiyon ortamında ferrik hidroksite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) oksitlenebilir.

3.2. Manyetik Nanotaneçiklerin Korunması, Kararlı Hale Getirilmesi ve Fonksiyonelleştirilmesi

Manyetik nanotaneçiklerin sentezinde birçok önemli gelişme olmasına rağmen, bu taneciklerin uzun süre topaklanma ya da çökelme olmadan kararlılığını sağlamak önemli

bir sorundur. Manyetik nanotaneciklerin hemen hemen her uygulaması için kararlılık önemli bir gerekliliktir. Özellikle Fe, Co ve Ni gibi saf metaller ve onların metal alaşımları havaya çok duyarlıdır. Böylece, saf metallerin veya alaşımların kullanımı için asıl zorluk bunların kararsızlıklarından ve oksidasyonlarından ötürü ortaya çıkar ve tanecikler ne kadar küçükse oksidasyona karşı duyarlılık o kadar artar. Bundan dolayı, manyetik nanotaneciklerin kimyasal kararlılığını iyileştirmek için etkin stratejiler geliştirmek gereklidir. Oksijenin manyetik nanotaneciklerin yüzeyine ulaşamaması için delinmez bir tabaka ile korunması en kolay anlaşılır yöntem gibi görünmektedir. Çoğunlukla, nanotaneciklerin kararlılığı ve korunması birbiriyle yakından bağlantılıdır. Bununla birlikte, bu boyut aralığındaki taneciklerle ilgili engellenemez olan sorun, uzunca bir süre boyunca kendi iç kararsızlığıdır. Bu gibi küçük tanecikler, nano boyutlu taneciklerin büyük yüzey alanının hacme oranı ile ilişkili olarak enerjiyi azaltmak için topaklanmalar oluşturma eğilimindedir. Üstelik, muhtemelen pH-bağımlı yüzey özellikleri ve nötral sulu ortamda kuvvetli aggregasyon sebebiyle kaplanmamış manyetik nanotanecikler kolaylıkla hazırlanamazlar. Kaplanmamış manyetik nanotanecikler hidrofiliktir; bunların yüzeyleri, genellikle manyetizma ve dağılabilirlik kaybı ile sonuçlanan ve bu gibi malzemelerin ömrünü azaltan, kullanılabilirliğini yoğun biçimde sınırlayan sulu bir ortamdan birkaç tür ile reaksiyona girmeye yatkın reaktif sulu - Fe-OH kümeleri ile tamamen kaplıdır [59].

Tüm koruma stratejileri çekirdek-kabuk yapıları manyetik nanotanecikler ile sonuçlanır, yani kaplanmamış manyetik nanotanecikler çekirdek olarak kullanılır ve çevreye karşı yalıtkan bir kabuk ile kaplanır. Uygulanan kaplama stratejileri kabaca iki ana gruba ayrılabilir: yüzey aktif madde ve polimerleri içeren organik kabuklarla kaplama [60-61] veya silika, [108] karbon [62], değerli metaller (Ag, Au gibi) ya da oksitler içeren inorganik bileşenler ile kaplama, nanotaneciklerin dış kabuğunun oksidasyonu ile oluşturulabilir.

3.2.1. Manyetik nanotaneciklerin polimer ve/veya yüzey aktif madde ile kaplanması

Topaklanmayı önlemek için sentez esnasında veya sonra nanotaneciklerin yüzeyini pasifleştirmek için yüzey aktif maddeler veya polimerler sıklıkla kullanılır. Genelde, elektrostatik iticilik veya sterik iticilik, nanotanecikleri dağıtmak ve onları kararlı bir kolloidal halde tutmak için kullanılabilir. Böyle sistemler için en iyi bilinen örnek 1965 yılında Papell tarafından icat edilen ferroakışkanlardır [63]. Ferroakışkanlar örneğinde manyetik taneciklerin yüzey özellikleri kolloidal kararlılığı belirleyen ana faktörlerdir.

Ferroakışkanların kararlılığını arttırmak için kullanılan başlıca önlemler, yüzey yükünün kontrolü ve özel yüzey aktif maddelerin kullanımıdır [64]. Örneğin, amonyak veya NaOH çözeltisi içinde Fe^{2+} ve Fe^{3+} 'ün ikili çöktürülmesiyle sentezlenen manyetik nanotanecekler genellikle negatif yüklüdür ve topaklanma ile sonuçlanır. Kararlı kolloidler elde etmek için, manyetik nanotanecek çökeleği (bir yüzey aktif madde ekleyerek kolloid oluşturmak üzere bir çökelti dağıtmak için) sulu tetrametilamonyum hidroksit veya sulu perklorik asit ile peptidize edilebilir [65].

Genel olarak, manyetik nanotanecekler üzerinde manyetik ve Van der Waals çekim kuvvetlerini dengelemek için, itici kuvvetler (asıl olarak sterik iticilik) meydana getiren tek veya çift tabaka oluşturmak üzere [66] yüzey aktif maddeler veya polimerler ya kimyasal olarak sabitlenebilir ya da fiziksel olarak adsorbe edilebilir. Böylece sterik iticilik ile manyetik nanotanecekler süspansiyon sürecinde kararlı hale gelir. Oleik asit, tannik asit [67], laurik asit ve alkilsülfonik asitler gibi yüzey aktif maddeler yaygın kullanılan moleküllerdir [68]. Karboksilik asitler, fosfatlar ve sülfatlar gibi fonksiyonel gruplar içeren polimerler, manyetik nanotanecek yüzeyine bağlanabilir. Kaplama için uygun polimerler poli (pirol), poli (vinilpirolidon), poli (anilin), poli (alkilsiyanoakrilatlar), poli (metiliden malonat) ve poli (laktik asit), poli (glikolik asit), poli (ϵ -kaprolakton) gibi poliesterler ve bunların kopolimerlerini kapsar [69]. İyi tanımlanmış çekirdek / kabuk nanoyapılı biyoyumlu ve süperparamanyetik Fe_3O_4 @ Polidopamin nanotanecekler süperparamanyetik nanotanecekler ile polidopaminin entegrasyonu sonucunda başarılı bir şekilde sentezlenmiştir [70]. Bugüne kadar en yaygın kabul edilmiş yaklaşım, manyetik nanotanecekleri hidrofilik polimerlerle kaplamaktır, birkaç kaplama ajanı arasında en çok beğenilenler, polietilen oksitler veya glikoller (PEG) ve nanotanecek yüzeyine kimyasal olarak veya çoklu hidrojen bağlarıyla ve manyetik nanotaneceklerin etrafında süperhidrofilik bağlar geliştirerek böylece proteinlerin yüzey birikimini önleyebilen süper hidrofilik bulut geliştiren dekstran [71] veya şeker türevleri [72] gibi karbohidratlardır. Fakat, son zamanlarda, dekstran ve türevleri (karboksimetil dekstran ve dietilaminoetil dekstran) ile kaplanmış manyetik nanotaneceklerde ani protein adsorpsiyon oluşumu gözlenmiştir [73].

Bilinen biyoyumlu polimerler ile yüzeyi modifiye manyetik nanotanecekler, manyetik alanı yönlendirilmiş ilaç hedeflemesi için ve manyetik rezonans görüntüleme için kontrast ajanları olarak yoğun şekilde incelenmiştir [74].

4. ENZİMLER VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU

4.1. Enzimler

Enzimler canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısındaki doğal biyokatalizörlerdir. Bunlar bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunurlar. Substrat spesifikliğı ve yeşil kimyası nedeniyle bu biyokatalizör, farklı alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Antik Mısırlılar, enzimatik reaksiyonlarla kolaylaştırılan fermantasyon süreçleri ile bira ve şarap üretmişlerdir [75]. Enzimler, katlanmış doğrusal amino asit zincirlerinden oluşan üç boyutlu proteinimsi moleküllerdir. Bu durumda amino asitlerin dizilimi enzimin fonksiyonel katalitik aktivitesi ile birlikte yapıyı belirler [76].

Enzimler, biyoteknolojide yaygın kullanılan oldukça yüksek etkin katalizörlerdir. Bu alandaki çoğu zorlayıcı yönler arasında, enzimleri aşırı pahalı yapan, elde etmenin ve saflaştırmanın henüz zor oluşudur. Bu yüzden, bu gibi pahalı biyokatalizörlerin endüstriyel kullanımı etkin geri kazanım prosesinin olmaması kritik noktada sıkıntıya düşürmektedir. Biyokimyacılar ve mikrobiyologlar, kimyasal sentez için enzimlerin potansiyelini uzun zamandır görmekte ve son on yıl boyunca, organik sentezlerde enzimler kullanılmaktadır. Sonuç olarak enzimler, enantio ve bölgesel seçici organik sentezlerde yaygın olan yükseltgeyicilere veya inhibitörlere gerek kalmaksızın basit veya kompleks dönüşümde kullanılabilir [77].

Bu gibi yüksek seçicilik de birkaç yan ürün ile etkin tepkime sonuçları verir. Dolayısıyla geleneksel kimya sentezine çevresel açıdan elverişli bir alternatif enzim hazırlamak, özellikle karmaşık substratlar üzerinde yüksek reaksiyon seçiciliğinin olduğu gıda ve farmasötik endüstrilerinde çok önemlidir [78]. Farklı süreçleri optimize etmek için enzimlerin seçilmesi şu anda kimya endüstrisi için bir gereklilik haline gelmektedir ve enzimatik katalizördeki son gelişmeler özel kimyasalların ve polimerlerin sentezlenmesine kadar genişlemiştir.

Enzimlerin fonksiyonları substrat ve ko-faktörlere göre oldukça özeldir, çünkü aktif veya bağlanma bölgesi genellikle doğru boyut, şekil, yük ve hidrofobik veya hidrofilik karakter gösteren uygun bir ligand veya bağlayıcı gerektirir.

Aslında proteinler, substratını mevcut birkaç molekül arasında ayırt edebilir ve sadece birkaç tanesine seçici olarak bağlanabilir [79].

Enzimlerin boyutu 62-2500 amino asit kalıntısına kadar değişebilir (4-oksaloakrobonat tautomeraz monomeri). Reaksiyon dengesinde herhangi bir değişiklik olmaksızın, enzimlerin varlığı reaksiyon hızını önemli ölçüde arttırmıştır [80]. Aslında reaksiyonda gerçekte tüketilmeden aktivasyon enerjisini düşürerek biyokimyasal reaksiyonları hızlandırabilirler [81]. Bir enzimin aktivitesi, örneğin "enzim birimi (U)", sayısal olarak, dakikada 1 μ mol substratın reaksiyonunu katalize eden enzim miktarı (1 U) olarak ifade edilir.

Enzimler ve diğer proteinler arasındaki ana farklılık, kimyasal reaksiyonları etkin ve seçici bir şekilde katalizleme kapasitesidir. Bu katalitik gücün başlangıcı, geçiş halinin kararlılığına ve ilerleyen hız ivmelenmesine bağlıdır. Bu nedenle, bunların yapılarının ve dönüşümlerinin aydınlatılması, önemli biyokimyasal bilgi sağlayabilir. Protein yapısının bilgisi aslında bir proteinin nasıl işlediğinin anlaşılması için istenilen bir gerekliliktir. Emil Fisher tarafından 1894'te önerilen anahtar-kilit ilişkisi [82], enzim-substrat ilişkisinin rijid bir görünümüdür. Koshland, 1958'de [83], substratın enzim molekülündeki kesikli ve tersinir konformasyonel değişimlere neden olabileceği bir model önermiştir. Substratın uyardığı mekanizma, sınırlı sayıda kalıntı içeren, ya da molekülün geniş bölgelerini içeren büyük hareketlere neden olan gizlilikte olabilir.

Kataliz süresince, enzim, bir araürün serisi içeren birkaç dinamik konformasyonel değişikliklere uğrayabilir. Substratlardan ürünlere giderken karşılaşılabilecek olan engel, atomların ve su moleküllerinin yüzeye zayıf bir şekilde bağlandığı ortaklaşa bir hareketi kapsar. pH, sıcaklık ve iyonik mukavemetin değiştirilmesi ile, enzimler konformasyonel değişikliklere uğrayabilir ve inaktive olabilir [84]. Sentetik substratlara karşı kararsız, kullanımı zor ve zayıf bir şekilde seçici olabilirler.

Yüksek bağlılık, pH ve sıcaklığın hafif reaksiyon koşulları altında yüksek reaksiyon oranı, düşük enerji tüketimi, suda çözünürlük, biyo-bozunurluk, az sayıda yan reaksiyon ve zehirsiz oluşu gibi inorganik katalizörlere göre avantajları vardır [85]. Sonuç olarak, enzimler endüstriyel uygulamalar için ideal katalizörler olarak kabul edilmektedir ve biyokataliz, sağlık, gıda ve farmasötik üretim, biyoenerji sürdürülebilir yakıt üretimi ve

biyoyakıt hücrelerinin üretimi; biyoarıtma; tekstil endüstrisi; ve kimyasal dönüşüm süreçleri gibi alanlarda yoğun endüstriyel ve sosyal etkiye sahip biyoteknolojinin önde gelen ve en güçlü araçlarından biri haline gelmektedir.

Son yıllarda, biyokatalizdeki ilerlemeler, organik çözücüler ve sulu ortamda enzimatik proseslerin yürütülmesine izin vermektedir. Dahası enzimler, yeşil kimya ve sürdürülebilir enerji [86] dahil en son “beyaz biyoteknoloji” eğilimlerinde önemli bir rol oynamaktadır.

4.1.1. Enzim immobilizasyonu

Zorlu işletme koşullarındaki kararsızlık, düşük raf ömrü ve geri dönüşümde zorluklar nedeniyle hala enzimlerin yaygın olarak uygulanması engellenmektedir. Herhangi bir biyokimyasal reaksiyon esnasında enzimlerin yapısal kararlılığını korumak son derece zordur. Bununla birlikte, bu enzimlerin endüstride daha geniş uygulamaları elde etmek için daha kararlı enzim sistemleri ve ekonomik süreçler gereklidir. Birçok endüstriyel süreç aşırı pH ve sıcaklık koşulları altında gerçekleşir ve enzimler için inhibitör ürünler üretir. Ayrıca, küçük miktarlarda enzimlerin kullanılmasına izin veren veya yeniden kullanımlarına imkan veren mekanizmalara da bütün maliyetleri düşürmek için ihtiyaç duyulur. Enzimi kararlı hale dönüştürerek bu engeller aşılabılır [87].

Tanım olarak, immobilizasyon enzimlerin suda çözünür hareketli halden suda çözünmeyen hareketsiz hale katalitik aktivitesinin sürdürülmesi ile sürekli tekrarlanabilir şekilde kullanılabilir bir hale dönüşmesidir. Bu, immobilize bir enzimin fiziksel olarak uzayın belirli bir bölgesinde lokalize edilmiş bir protein ve protein moleküllerinin veya parçalarının uzayda ya da birbirlerine göre hareketliliğinin sınırlı olduğuna işaret eder [88]. Bu yaklaşım, endüstriyel proseslerin düşük termal kararlılık, düşük pH kararlılığı, bir döngüden sonra katalitik aktivitenin kaybı, substratlar veya yan ürünlerle enzim inhibisyonu, ürün ayrımı sırasında enzim kaybı ve arıtma basamağındaki zorluk gibi kısıtlamalarının çoğunun üstesinden gelir [89]. İmmobilize enzim 1916'da keşfedilmiştir. İnvertaz enzim aktivitesinin, kömür veya alüminyum hidroksit gibi katı bir matris üzerine adsorbe edildiğinde aktivitesinde herhangi bir sorun olmadığı bildirilmiştir [90]. Bu durum şu anda mevcut kullanılabilir enzim immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Başlangıçta immobilizasyon teknikleri, mevcut yüzey alanlarına göre çok düşük enzim yüklemelerine sahiptir [91]. Ancak, son 20 yıl boyunca enzim immobilizasyon

teknolojisi, biyosensör, antibiyotik üretimi, ilaç metabolizması, gıda endüstrisi, biyodizel üretimi veya biyoarıtma gibi birçok uygulamalı disiplinde başarılı ilerlemelere yol açmıştır [92].

İmmobilizasyon yöntemleri, proteinlerin farklı özelliklerde amino asitlere sahip olduğu gerçeğinden faydalanır, bu sayede bu amino asitlerin yan zincirlerindeki fonksiyonel gruplar, çeşitli bağlanma türleri ve etkileşimler yoluyla bir katı desteğe immobilize edilebilirler [93]. Enzimlerin katı desteklere immobilizasyonu doğrudan geri kazanım sağlar ve hedefe ulaşmak için makul bir yaklaşımdır. Çözünmüş form ile karşılaştırıldığında, immobilize enzimler yüksek enzim substrat etkileşimi ve kolay kullanım sağlar [94]. Bu nedenle dirençli, kararlı ve etkin biyokatalitik destek platformlarının geliştirilmesi sonuca götürecek büyük bir araştırma yolu olmuştur. Farklı deneysel yöntemler kullanılarak enzimler için malzemeler araştırılmaktadır [95].

Ayrıca, nano ve hibrid teknolojisindeki son ilerlemeler, enzim immobilizasyonu için farklı ve daha uygun fiyatlı malzemelere evsahipliği yapacaktır.

Esas olarak, enzimler üç ana yolla immobilize edilir. Bunlar yaygın olarak aşağıdaki şekilde sınıflandırılır:

- Enzimin suda çözünmeyen bir matris üzerine adsorpsiyonu,
- Enzimin türetilmiş, suda çözünmeyen bir desteğe kovalent bağlanması,
- Çok fonksiyonlu reaktifler kullanılarak enzim moleküllerinin moleküller arası çapraz bağlanması,
- Suda çözünmeyen bir polimer kafes veya yarı geçirgen membran içinde enzimin tutuklanması.

Her bir immobilizasyon yöntemi, birbirleriyle kıyaslanmayı zorlaştıran çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Birçok kimyager, bağlı aktivite, depolama ve geri dönüşüm kararlılığı ve yeniden kullanım kolaylığı gibi immobilize enzimlerin performansını artırmaya çalışmıştır. Bu arada, malzemeci bilim adamları daha iyi immobilizasyonu gerçekleştirmek üzere daha etkin destekler geliştirmişlerdir. Yüzey üzerinde bir enzim hareketsizleştirildiğinde anahtar nokta, destek yüzeyi üzerindeki reaktif gruplar ile substratın dış kısmındaki kalıntılar veya enzimin aktif bölgesi arasındaki bağlanma yönteminin doğru seçilmesidir.

Enzimin katalitik olarak aktif tersiyer yapısının korunması da yine immobilize halindeki enzimin stabilitesini ve reaktivitesini en üst düzeye çıkarmada önemli bir faktördür [96]. Seçilen immobilize enzim yaklaşımı, hedef biyokatalizörleri stabilize edebilmeli ve substrat ve ürünlerin daha kolay yayılmasına izin verebilmelidir. Farklı birçok etkisizleştirme türünün aksine, enzimlerin stabilizasyonu; adsorpsiyon, polimer tutuklama, mikrokapsülleme, kimyasal yığılma, biyoyatkinlik ve kovalent eşleştirme içeren çeşitli immobilizasyon stratejileri ile başarılmıştır [97]. Bundan dolayı, immobilize biyokatalizörlerin geliştirilmesinde dikkate alınacak üç temel faktör vardır: immobilizasyon desteklerinin seçimi, şartlar ve immobilizasyon metotları.

İmmobilizasyon, enzimlerin fonksiyonel optimizasyonuna izin vermesine rağmen, bu işlem aynı zamanda katalitik aktivite üzerinde de bir etkiye sahiptir. Bir enzim, immobilizasyon ortamında çözündüğünde veya immobilizasyon işleminin bağlanma basamağında, doğal yapısı bozulabilir ve aktivitesini kaybedebilir. İmmobilizasyon, genellikle enzim ve destek arasında biyokatalizörün nihai konfigürasyonunu ve katalitik aktivitesini değiştirebilen yeni etkileşimleri teşvik eder [98].

Aynı şartlarda immobilizasyon ortamındaki iyonik mukavemet ve pH, enzimin doğal yapısının bozulmasına yol açabilir. İmmobilizasyon işleminin kendisi ile bağlantılı olan faktörler aynı zamanda enzim aktivitesinin kaybına da neden olabilir. Daha önce bahsedildiği gibi, immobilizasyon işleminin sebep olduğu enzim ve substrat arasındaki kütle aktarımındaki azalma enzim afinite ve aktivite kaybına yol açan difüzyon problemleri üretir. Üstelik, bağlanma bölgesinin ve enzimin aktif bölgesinin katalizörde çok önemli bir rol oynadığı ve immobilizasyon işlemi esnasında aktivite kaybıyla sonuçlanan bu bölgelerin bloke edilebileceği ya da bozulabileceği bilinmektedir [99-100].

4.1.2. Enzimlerin desteklere bağlanması

Fiziksel (hidrofobik ve Van der Waals etkileşimleri gibi), iyonik veya kovalent bağlanma ile desteğe bağlanması gerçekleştirilebilir. Endüstriyel şartlar altında enzimi taşıyıcılara sabitlemek için fiziksel bağlanmanın genellikle çok zayıf olduğu bilinmektedir. İyonik bağlanma genellikle mukavemetlidir ve enzimin kovalent bağlanması aynı derecede daha da mukavemetlidir [101]. Destek bağlama, özellikle de güçlü kovalent bağlanma, enzimin yüzeyden ayrışmasını önler. Fakat, bu aynı zamanda büyük bir sakınca olabilir; eğer enzim

tersinmez olarak etkisiz hale getirilirse, hem enzim hem de desteğin ikisi de kullanılamaz. İmmobilize enzimin özellikleri, hem enzimin hem de taşıyıcı malzemenin özellikleri ile yönetilir. Her ikisi arasındaki etkileşim, belirli kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikleri sağlar.

Çizelge 4.1. İmmobilizasyon metotlarının avantaj ve dezavantajları

İmmobilizasyon metodu	Avantajlar	Dezavantajlar
Desteğe bağlanma (Fiziksel adsorpsiyon)	Basit deneysel prosedür Zehirli çözücüler yok	Reaksiyon boyunca enzimlerin süzülerek ayrışması
Kovalent bağlanma	Alıkonulmuş Enzim molekülleri Organik bağlayıcıların yaygın seçimleri mümkün	Destek hazırlamada daha karmaşık prosedür Taşıyıcılar içinde enzim molekülleri hareketsiz
Tutuklanmış veya kapsül kaplı	Tutulmuş enzim molekülleri Taşıyıcıların içinde serbest hareket eden enzim molekülleri	Karmaşık deneysel prosedür Reaktif türler ve zehirli Çözücüler enzimlerin doğasını bozabilirler. Girdi ve ürünlerin azalmış Yayılma hızı.
Çapraz bağlanma	Artırılmış raf ömrü ve Operasyonel kararlılık Geri kazanımı ve yeniden Kullanımı kolay Sulu ortamda ekstraksiyon için kararlı	Enzim esnekliğinin kaybolması Reaktif ve ürünlerin azalmış yayılım hızı

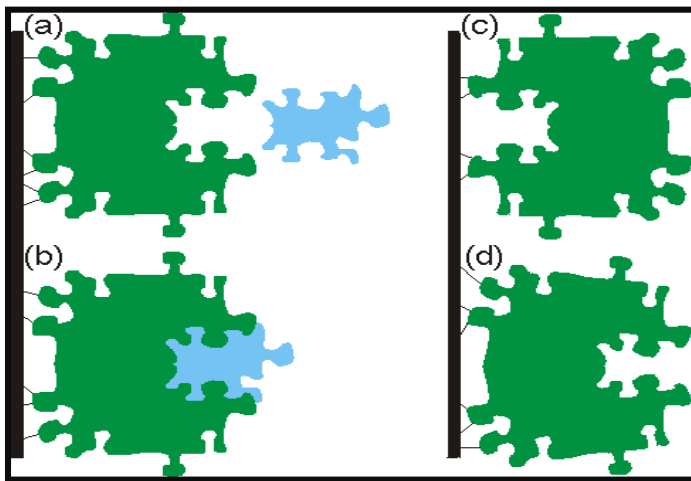
İmmobilize enzimler genel olarak daha iyi termal ve pH stabilitesi gösterir, ayrışması daha kolaydır, yeniden kullanılabilir ve pratik uygulamalar için daha uygundur. Sonuç olarak, immobilize biyokatalizörler, gıda ve farmasötik endüstrisinde yüksek tonaj işlemleri veya biyoayırıcı ya da biyosensörler gibi çok sayıda pratik uygulamada kullanılmaktadır [102]. Birçok immobilizasyon yöntemi arasında (örneğin, adsorpsiyon, tutuklama, elektrostatik etkileşim ve kovalent bağlanma), parçacıklar ve enzim üzerindeki fonksiyonel gruplar arasında kovalent bağlar oluşturarak enzimlerin katı taşıyıcılara kovalent bağlanması enzim stabilizasyonu, tekrar kullanılabilirlik ve geri kazanım için en çekici yöntem olarak görünmektedir.

Üstelik kovalent immobilizasyon normalde enzim ve destek modifikasyonu için birkaç reaksiyon adımı gerektirir. Bu teknikler enzim aktivitesini arttırmak için daha etkin olabilir. Kovalent bağlanma, tersinmez enzim immobilizasyonu için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Enzimin bağlanmasında rol alan fonksiyonel grup, genellikle lizin (ϵ -

amino grubu), sistein (tiyol grubu) ve aspartik ve glutamik asitlerin yan zincirleri (enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olmayan karboksilik grup [103], imidazol ve fenolik gruplar [104]) yoluyla bağlanmayı kapsar. Kovalent bağlanmış enzimin aktivitesi, taşıyıcı malzemenin boyutuna ve şekline, bağlantı yönteminin yapısına, taşıyıcı malzemenin bileşimine ve bağlanma esnasındaki özel koşullara bağlıdır.

Enzim immobilizasyonu daha yüksek maliyetli enzimlerin geri kazanımı ve katalitik üründen enzimlerin daha kolay ayrılması ayrıca hem depo hem de operasyonel proseslerin ikisinde de enzimlerin kararlılığının iyileştirilmesi ve tekrar kullanımı için avantajları sebebiyle araştırmanın parlayan bir alanıdır [105].

Mümkün olan en yüksek enzim aktivitesini tutmak için enzimi aktif konformasyonda desteğe bağlamaya çalışırız. İmmobilize enzimin bağlama reaksiyondan sonra mümkün olduğu kadar fazla katalitik aktiviteye sahip olması oldukça önemlidir. Bu, bir bakıma katalitik olmayan konformasyonlarda bağlanan enzim miktarının azaltılmasıyla sağlanabilir (Şekil 4.1.) Enzimin immobilizasyonu substratın, ürün veya yarışmacı bir inhibitörün doymuş konsantrasyonlarının varlığında, kovalent bağlanma esnasında aktif alanın tepkimeye girmeden kalmasını sağlar ve verimsiz konformasyonlarda bağlanmanın oluşumunu azaltır. İmmobilize enzimin aktifliği, bu molekülleri uzaklaştırmak için immobilize enzimi yıkayarak yenilenir [106].



Şekil 4.1. Kovalent bağlamanın, immobilize edilmiş bir enzimin belirtilen aktivitesine etkisi

(a) Değiştirilmemiş aktif bölgesi immobilize enzim (E). ve substrat molekülünü (S) (b) 'de gösterildiği gibi kabul etmeye hazır, (c) Aktif bölgenin erişilememesi nedeniyle verimsiz biçim enzim bağı (d) Aktif alanın bozulması aktif olmayan immobilize bir enzim üretir. Verimsiz biçimler en iyi şekilde, büyük alanın aktif alan içine veya yakınına tersinir olarak büyük moleküllerin kullanılmasıyla önlenir. Bozulma, bağlanma işlemi sırasında aktif bölgede bulunabilen moleküllerin kullanılmasıyla veya enzimin en fazla enerjik olarak stabil (yani doğal) formuna bağlanmayı teşvik eden kenetlenme için serbestçe tersinir bir yöntemin kullanılmasıyla önlenir. Hem (c) hem de (d) enzim ile destek arasındaki dolgu grupların kullanılmasıyla, enzimi yerdeğiştirme suretiyle yüzeyin sterik etkisinden uzaklaştırarak azaltılabilir.

4.2. γ -Glutamil Transpeptidaz

4.2.1. Tanım ve yapısı

Serum veya plazmada enzim gamma glutamil transferazın (GGT) aktivitesi, hassas fakat çok özel olmayan karaciğer fonksiyon testi şeklinde klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılır. Otomatikleştirilmiş analizörler kullanarak GGT'nin ölçümü çabuk, ucuz ve hatasızdır. Fakat, testin uygulanması karaciğer hastalığında GGT anormalliklerinin patofizyolojik esasını derinlemesine anlamaktan ziyade esasen çoğunlukla kuramsal kanıta ve klinik özelliklerinin değerlendirilmesine dayanır. Karaciğer birden çok fonksiyonu yerine getirdiği için, tek bir laboratuvar testi veya bir seri test bile her klinik durumda karaciğer hasarının komple tahminini sağlamak için yeterli değildir [107].

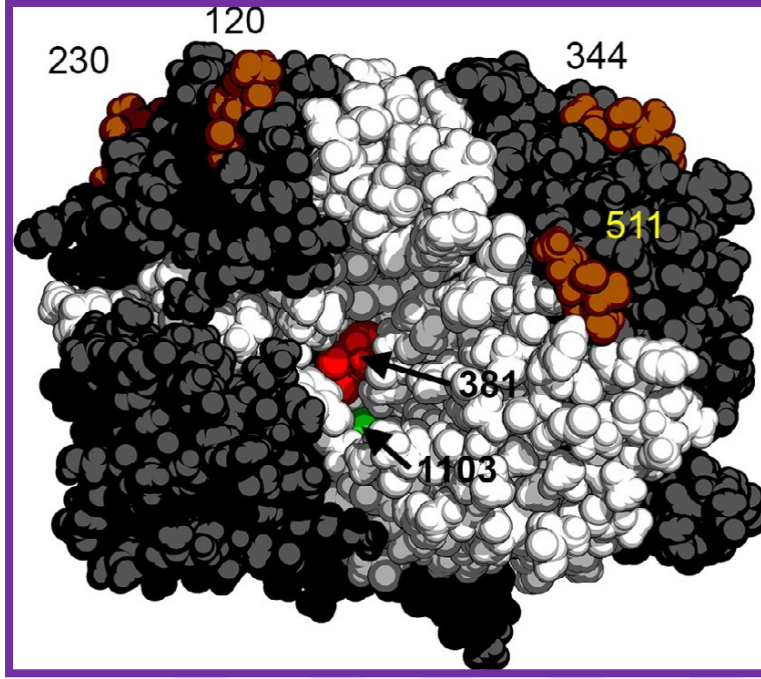
Kuşkulu veya kronik karaciğer hastalığı olan hastaları değerlendirmek ve aynı zamanda hastalık belirtisi göstermeyen bireyleri de izlemek için geniş bir test serisi kullanılır. 2010 yılında alkolik karaciğer hastalığına bağlı 493.300 ölüm ve 14.544.000 maluliyetle geçen yaşam yılı (DALY) ile o yıl tüm ölümlerin % 0,9 ve DALY'nin de % 0,6 sının sebebi olarak dünyada büyük bir külfet olmuştur.[108] Karaciğer hastalıkları alkol hastalıkları ve ölümcül alkol sendromu yanında en yüksek alkole bağlı hastalık kesrine sahip olup, alkol tüketimi karaciğer sirozunun hastalık yüküne % 50 sine katkı sağlar. Glutamiltransferaz (γ -GTP) ve aminotransferaz, alkol tüketimi ve alkolik karaciğer hastalığının biyobelirteci olarak bilinmektedir [109].

Gama-glutamil transpeptidaz (GGT, gamma-glutamil transferaz) N-terminal nükleofil (Ntn) hidrolaz üst soyuna ait olup, glutatyonun γ -glutamil kısmının bir amino asite, kısa bir peptide veya su molekülüne transferini katalizler [110]. Bununla birlikte, herhangi bir özel alıcı olmadığında serbest bırakılan c-glutamil grubu, su molekülüne aktarılabilir böylece hidrofilik faaliyet gösterir. Mikrobiyal GGT'ler, farmasötik, gıda ve medikal sektörlerde kullanımı olan γ -glutamil bileşiklerinin sentezinde önemli bir uygulamaya sahiptir [111]. GGT, normal hücre içi GSH konsantrasyonunun idamesi için önemli bir enzimdir. Olgunlaşmış GGT enzimi, γ -glutamil döngüsünde antioksidan glutatyon molekülünün hücresel seviyelerini düzenleyerek anahtar rol oynar, dolayısıyla hücresel redoks homeostazının (iç dengesinin) sürdürülmesinde kritik bir enzimdir. Ayrıca, bu enzim karaciğer hastalığının ve kanserin bir tümör göstergesi olarak kullanılır [112]. Fizyolojik fonksiyonunun dışında, GGT enzimleri farmasötik uygulamalar için büyük bir potansiyel olan γ -glutamil türevlerinin sentezleri için kullanılabilir [113]. Bir heterodimer proteini olan GGT, karaciğer fonksiyon bozukluğu ve yüksek alkol alımının bir göstergesi olarak yaygın şekilde kullanıla gelmiştir. Böbrek, seminal veziküller (sperm keseleri), pankreas, karaciğer, dalak, kalp ve beyin dahil olmak üzere çeşitli dokuların zarlarında mevcuttur ve amino asitin γ -glutamil döngüsü vasıtasıyla taşınmasında işlev gördüğü düşünülmektedir. Tümörlerdeki GGT, komple hücre zarı üzerinden tanımlanır ve tümörlere kanda ve doku içi gözenekler arasındaki sıvıda indirgenmiş ve oksitlenmiş glutatiyondan ilave sistein ve sistin erişimini sağlar. Sistein, oksidatif stres altındaki hücrelerde glutatyon sentezi için hız sınırlayıcıdır. Glutatyon (GSH, γ -L-glutamil-L-sisteinilglisin), tüm memeli dokularında 1-10 mM konsantrasyonlarda mevcut bulunan bir tri-peptittir. Bu, hücrelerde en bol bulunan antioksidan moleküllerdir ve redoks sinyalleme, ve / veya metabolitlerin detoksifikasyonu, hücre çoğalmasının düzenlenmesi, apoptoz (organizma hücrelerinin ölümü) ve fibrin oluşumu gibi birkaç önemli hücresel fonksiyonlara dahil olurlar. GSH ayrıca nitrit oksit (NO) ve sistein depolama ve taşınmasının; kükürt özümlemesi, hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasının anahtar belirleyicisidir [114]. GSH, genel peptidazlar tarafından hidrolize edilemez, çünkü geleneksel a-karboksil grubundan ziyade glutamatın c-karboksil grubuna doğru ve sistein arasındaki glutamat ve sisteini bağlayan olağandışı bir peptit bağı içerir.

4.2.2. GGT enziminin fonksiyonları

Bakterilerde [115] ve bitkilerde hatta solucandan insanlara kadar değişen, hayvanlar aleminin üyelerinde de bulunan gamma glutamil transferazlar yaygın şekilde dağılmıştır. Hücreli organizmalarda GGT bir hücre yüzeyi glikoproteinidir. Hücre içinde, aktif bölgesi, hücre dışı boşluk zarına bakan, tek bir N-uçlu transmembran domain ile bağlanır. Hücre dışı boşlukla karşı karşıya kalan hücrenin aktif bölgeleri ile bir tek N-uçlu zar bölgesinden geçmek suretiyle tutunur. Katalitik aktivitenin tümü proteinin hücre dışı bölgesindedir. Normalde, GGT düşük seviyelerde bulunur fakat, karaciğer yaralandığında GGT seviyesi artabilir. İnsan GGT'si 569 amino asit propeptid olarak sentezlenir [116]. Propeptid, enzimatik olarak hareketsizdir fakat, otoklav ile iki alt bölüme aktive edilir. Otoklavlama, GGT'nin sonuç benzeşmesi olmayan aynı otoklavlama ve kinetik mekanizmalı enzim grubu olan N-uçlu nükleofilik (Ntn) hidrolaz ailesinin dahili bir nükleofilik treonin (Thr-381)'e bağımlıdır [117].

Glikanlar olgunlaşmış ve enzimatik olarak aktif olan heterodimerden uzaklaştırıldığında, enzim aktivitesini devam ettirmesine rağmen; N-bağlantılı glikozilasyon, doğru katlanma, otoklavlama ve insan GGT'sinin aktivasyonu için gereklidir. İnsan GGT'sinin Kristal yapısı yakın zamanlarda çözülmüştür. Yapı, olan N-uçlu nükleofilik hidrolazlarında bulunan ortak bir eleman olan düzgün istiflenmiş α - β - β - α çekirdek yapılı bir heterodimer sergilemiştir. Enzimin bir yüzey temsili, büyük alt birimin küçük alt birim etrafına sarıldığını ortaya çıkarmaktadır (Şekil 4.2). İnsan GGT'si yedi adet N-bağlantılı glikozilasyon bölgesine sahiptir. Kristal yapı yedi bölgenin tümünün proteinin dış yüzeyinde yer aldığını göstermiştir (Şekil 4.2). İlave çalışmalar, insan GGT'si üzerinde bölgeye özgü ve dokuya özgü glikoz kompozisyonlu desenler göstermiştir. İnsan GGT'sinin kristal yapısı, substrat bağlantısını yarığın en derin bölümündeki katalitik nükleofil (Thr-381) ile tanımlamıştır. İnsan GGT'sindeki nispeten açık aktif bölge, çoğu prokaryotik GGT'lerde bulunan daha kısıtlı erişimden farklılık gösterir. Ayrıca, katalitik kalıntı Thr-381'in yan zinciri için, substrat bağlanması sırasında yan zincirin hareket ettiğini öne süren iki farklı konformasyon gözlemlendiği öne sürülmüştür [118].



Şekil 4.2. GGT enziminin kristal yapısı

İnsan GGT'sinin Van der Waals yüzeyi, aktif alan yarık kısmı görüntüleyiciye doğru dönüktür. Büyük alt birim (koyu gri) ve küçük alt birim (beyaz), küçük alt birim yarığının en derin bölümünde katalitik Thr-381 (kırmızı) ile gösterilmektedir. Bu yöneleinde yedi potansiyel glikozilasyon bölgesinin dördü, 511, 120, 230 ve 344 numaralı asparajinler ve bu bölgelerin her birinde kristal yapısında tanımlanmış olan temel N-asetil glukozamin kalıntısı koyu turuncu Van der Waals küreleri şeklinde temsil edilir. Küçük alt-birim yarığı içinde bir anyon-bağlanma bölgesi (yeşil) 1103 ile etiketlenmiştir. Bu şekil West, Chen, ve arkadaşları. (2013). © Amerikan Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Derneği 'nde orijinal olarak yayınlanmıştır.

Daha önce değinildiği gibi, GGT için en bol bulunan substrat glutatiyondur ve glutatiyon ile ilgili fizyolojik rolleri kapsamlı olarak araştırılmıştır. Canlı organizmada yapılan testlerde bulunan diğer bazı bileşikler, antitümör ajanı cisplatin ve lökotrienler gibi ksenobiyotiklerin glutatiyon konjugatları dahil olmak üzere gerekli gama-glutamil yapısına sahiptir ve GGT onların metabolizmalarına katılır [119]. GGT hakkında ilk gözlemlerden biri, aktivitesinin, böbrekler ve safra sistemi gibi bir taşıma fonksiyonu olan dokularda en fazla oluşuydu. Bu, GGT'nin bir "gama-glutamil döngüsü" oluşturan bir dizi reaksiyon yoluyla amino asitlerin taşınmasında önemli bir rol oynadığı önerisine yol açmıştır [120].

Amino asit taşınımı belki de GGTnin önemli bir fonksiyonu değildir, çünkü GGT bozukluğu olan insanlar veya hayvanlar aminoasitlerin genelleştirilmiş bir rahatsızlığını hissetmezler, fakat aminoasit sisteminin kullanılabilirliği için GGT'nin önemli olduğu açıktır. Bununla birlikte, hücre dışı sıvılardaki glutatyon vasıtasıyla çevrim işlevinin anahtar kısmını oluşturan GGT, hücre zarında kendi yapıtaşı GGT'ye sahip hücreler tarafından tutulan aminoasitlere parçalanabilir çünkü aminoasitler çok yakınında serbest bırakılır ve glutatyon sentezi için kullanılır.

GGT'nin olağan işlevinin kanıtı, bazıları şartlı ve bazıları doğrudan olan birçok kaynaktan gelmektedir. GGT ve glutatyon arasındaki ilişki, hücresel düzeyde yoğun olarak araştırılmıştır, alkol ve glutatyon arasındaki özgün etkileşimler ve GGT'nin aşırı alkol tüketimine verdiği yanıt emareleri Bölüm 4.2.1' de detaylı şekilde ele alınmıştır.

GGT genellikle karaciğerden bağırsaklara safra taşıyan safra kanallarının, örneğin tümörler veya taşlar tarafından engellendiğinde kanda ilk yükselen karaciğer enzimidir. Bu onu safra kanalı sorunlarının tespit edilmesi için en hassas karaciğer enzim testi yapar. Ancak, GGT testi çok özel değildir ve karaciğer hasarının çeşitli nedenleri arasında özelleştirme yapmak için kullanışlı değildir, çünkü karaciğer kanseri ve viral hepatit, hatta akut koroner sendrom gibi diğer hepatik olmayan durumlar gibi birçok karaciğer hastalıkları ile yükselebilir. Bu nedenle, GGT testi kendi başına rutin kullanım için önerilmez. Bununla birlikte, diğer testlerle bağlantılı ve karaciğerde bulunan diğer bir enzim olan bazik fosfataz (ALP) seviyesinin yüksek olması belirlemede yararlı olabilir. Hem GGT hem de ALP karaciğer hastalıklarında artmaktadır, fakat kemik dokusunu etkileyen hastalıklar ile sadece ALP artmaktadır. Bu nedenle, yüksek ALP sonucunun karaciğer veya kemik hastalığından dolayı olup olmadığının belirlenmesine yardımcı olmak amacıyla yükseltilmiş bir ALP'yi izlemek için GGT kullanılabilir [121].

5. DENEYSEL KISIM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Manyetik nanotaneciklerin sentezi için kullanılan demir(II) klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, % 99,99) ve demir(III) klorür hekzahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\geq$ % 99,0) Aldrich firmasının ürünleridir. Sentezlenen manyetik nanotaneciklerin modifikasyonunda kullanılan tannik asit (TA, % 99,999) ve sodyum hidroksit (NaOH , % 99,99), mutlak etanol (susuz, $\geq$ % 99,5) ve aseton (HPLC saflığında, $\geq$ 99,9) Aldrich firmasından temin edildi. Kullanılan γ - glutamil transpeptidaz (EC 2.3.2.2, GGT) enzimi 114.1 ± 2.4 U/mg katalitik aktivitededir L- γ -glutamil p-nitroanilid (% 99,0) Sigma firmasında satın alındı. İmmobilizasyon çalışmaları Trizma.HCl (Tris.HCl pH= 8,5) tampon çözeltisinde gerçekleştirildi. Kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıktadır. Ayrıca çalışmaların her aşamasında deiyonize su kullanıldı.

5.2. Manyetik Nanotaneciklerin Sentezi

Manyetik nanotanecikler, demir (II) ve demir (III) tuzlarının bazik ortamda ikili çöktürme yöntemiyle sentezlendi. Bunun için öncelikle, Fe^{2+} : Fe^{3+} çözeltileri 1:2 mol oranında $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'ın 25 mL ultra saf su içinde çözülmesiyle hazırlandı. Nanotanecikler, 50 °C' da 1 mL/dakika akış hızındaki $\text{N}_2(\text{g})$ atmosferinde 1,5 M NaOH çözeltisinin bir büretten damla damla çözeltiye eklenmesiyle sentezlendi. Çözeltinin 800 rpm'lik hızla karıştırılması sonucunda siyah renkli manyetik nanotaneciklerin hemen oluştuğu gözlemlendi. Hazırlanan manyetik nanotanecikler mutlak etanol ve ultra saf su ile yıkandıktan sonra etanolde yeniden dağıtıldılar. Yıkama işlemi boyunca manyetik nanotanecikler sürekli bir manyetik alan uygulanarak toplandı ve 50 °C lik vakum etüvünde 24 saat kurutuldu.

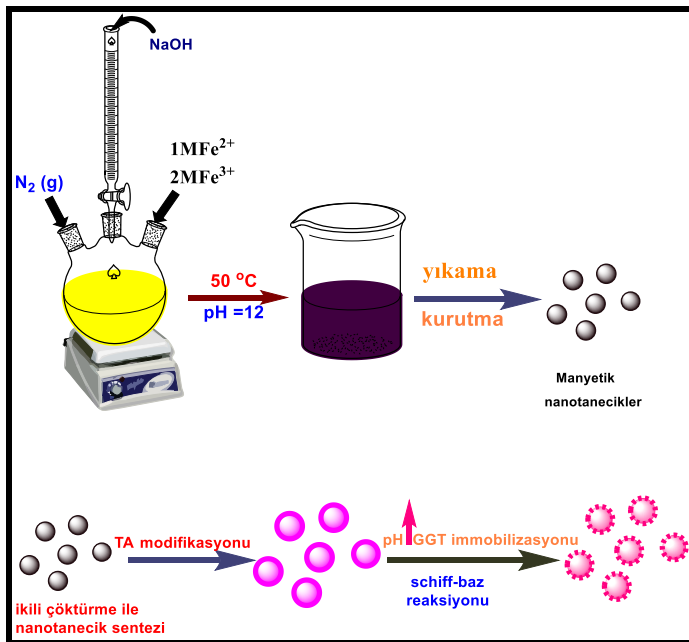
5.3. Tannik Asit ile Manyetik Nanotaneciklerin Modifikasyonu

Bazik ortamda ikili çöktürme metodu ile sentezlenen manyetik nanotanecikler (0,604 g) 60 mL deiyonize su içinde ultrasonik titreşime tabi tutularak homojenize edildi. Ardından 200 rpm' de N_2 atmosferi altında 40 °C' da 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Sonra tannik asitin 0,7502 g'ı 30 mL deiyonize su içinde çözüldü. Hazırlanan tannik asit çözeltisi

manyetik nanotanecekler üzerine damla damla ilave edildi. Elde edilen karışım 200 rpm’ de 40 °C’da 2 saat karıştırıldı. Tannik asitle modifiye edilen manyetik nanotanecekler manyetik dekantasyon yoluyla toplandı. Elde edilen tannik asit modifiyeli manyetik nanotanecekler deiyonize su ve ardından etanol ile yıkandı ve manyetik alan uygulanarak toplandı. 60 °C vakum etüvünde 18 saat kurutuldu.

5.4. GGT Enziminin Tannik Asit ile Modifiye Edilen Manyetik Nanotanecekler Üzerine Kovalent Immobilizasyonu

Tannik asitle modifiye edilen manyetik nanotanecekler (0,604 g) ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-TA}$) 4 mL sodyum hidroksit çözeltisi (0,1 M, pH 9,2) içinde polifenollerin pH’a bağlı oksidasyon reaksiyonu ile yüzeylerinde kinon grupları elde etmek üzere 200 rpm’de 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı ve manyetik alan uygulanarak toplandı. 20 mM, pH 8,0 Tris-HCl tampon çözeltisinde hazırlanan 10 mg/mL derişimli γ -Glutamil transpeptidaz çözeltisine, baz ile muamele edilmiş modifiye manyetik nanotanecekler eklendi. Çözelti 200 rpm’de +4 °C’ da 3 saat boyunca karıştırılarak inkübe edildi. Bir mıknatıs yardımıyla manyetik nanotanecekler toplandı ve bağlanmadan kalan veya fiziksel adsorbe olan enzimi uzaklaştırmak için tampon çözelti ile birkaç defa yıkandı. İmmobilize γ -Glutamil transpeptidaz enzimi ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-TA-GGT}$) +4 °C’da kullanılabilecek kadar depolandı.



Şekil 5.1. GGT enziminin tannik asit ile modifiye edilen manyetik nanotanecekler üzerine kovalent immobilizasyonu

5.5. GGT Aktivitesinin Analizi

γ -Glutamil transpeptidaz (GGT) enzim aktivitesi 37 °C 'da Szasz [122] metoduna göre belirlendi. Standart analiz metodunda 4 mM γ -glutamil p-nitroanilit, 40 mM glisilglisin, ve 185 mM Tris-HCl, pH 8,5 olacak şekilde bir karışım hazırlandı. Karışım 37 °C'de su banyosu içinde 30 dakika boyunca inkübe edildi. Bir birim GGT'nin aktivitesi, inceleme şartları altında dakikada 1 μ mol p-NA üretmek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanır. γ -Glutamil p-nitroanilit kromojenik substrat olarak ve glisilglisinin yerine poliglisin alıcı olarak kullanıldı. Serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleri, hidroliz sonrası sarı renkli p-nitroanilin (pNA) veren ve 405 nm dalga boyunda Shimadzu UV-2401PC spektrofotometre ile izlenebilen kromojenik substrat L- γ -glutamil p-nitroanilit kullanılarak analiz edildi.

5.6. pH ve Sıcaklığın Katalitik Aktivitesi Üzerine Etkileri

Serbest ve immobilize edilmiş GGT'nin aktivitesine pH'ın etkisi, daha evvel sözü edilen standart aktivite analiz prosedürü kullanılarak 37 °C'da 4 ila 10 arasında değişen pH'a sahip farklı Tris-HCl tamponları (0,1 M) içinde gerçekleştirildi. Ayrıca serbest ve immobilize enzimler üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için serbest GGT ve GGT-konjuge TA-Fe₃O₄ manyetik nanotanciklerin ilave edilmesi ile incelendi. Farklı sıcaklıklarda 1 dakika ve 10 dakikalık inkübasyondan sonra GGT aktiviteleri belirlendi (25 -70 °C aralığında). Her ikisi için reaksiyon karışımı 4 mM γ -glutamil p-nitroanilit ve 0,1 mM poliglisin içermiş ve geriye kalan için aktivite ölçüldü.

5.7. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

En basit ve en yaygın uygulanan enzim kinetiği değerlendirmesi Michaelis-Menten (MM) modelidir. Bu yaklaşım, enzim (E) katalizi türüne özgü olup birinci derece reaksiyon olarak değerlendirilir ki burada, $[S] \gg K_m$ ve $[E]$ küçük olduğu tipik koşullar altında bir enzim-substrat (ES) kompleksi oluşumu vasıtasıyla substrat (S)'in geri dönüşümsüz olarak ürüne (P) dönüştürüldüğü birinci mertebeden reaksiyon olarak ele alınır. MM modelinin reaksiyonları aşağıdaki şekilde yazılabilir:



Burada k_1 ($M^{-1} s^{-1}$) ve k_{-1} (s^{-1}) ler ara kademe ES için ayrı ayrı bağlanma ve ayrılma hızları ve k_2 (s^{-1}) de enzim dönüşüm sayısıdır. SI birimleri parantez içinde gösterilmiştir. MM oluşumunun standart bir basitleştirme varsayımı (Briggs–Haldane koşulu veya kararlı hal yaklaşımı), ürün oluşum ölçeğinde $d[ES]/dt = 0$ A ile $[ES]$ ‘nin çok yavaş değişmesidir. Böylece MM formülünün genel tanımı aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (5.2)$$

K_m : (MM sabiti) enzim ve substratın birbirleri için afiniteyi tanımlar. V_{max} enzimin substrat ile doyurulduğunda reaksiyonun ne kadar hızlı yürüdüğünü anlatır, yani bu enzimin katalitik etkinliğinin bir ölçümüdür.

Lineweaver-Burk eşitliği

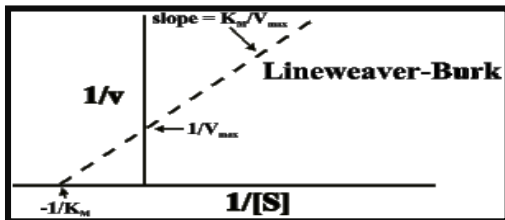
$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

MM tanımından

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]} \quad (5.3)$$

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5.4)$$

$$\frac{1}{v} \text{ VS } \frac{1}{[S]} \quad (5.5)$$



Şekil 5.2. Lineweaver- burk eğresi

Serbest ve immobilize enzim için görünen K_m ve V_{max} değerleri γ -glutamil p-nitroanilit için farklı derişimlerde (1-10 mM) γ -glutamil p-nitroanilit substratı ve 405 nm'de, 37 °C'da pH 8,5'de p-NA üretimi için hazırlanarak Lineweaver Burk grafiğinden belirlendi.

5.8. Depolama Kararlılığı ve Immobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize ve serbest GGT'nin depolama kararlılığı, +4 °C 'da 0,1 M Tris-HCl tampon çözeltilerinde (pH 8,5) depolanan örneklerin kalıntı aktivitesinin ölçülmesiyle belirlendi. Numuneler 35 gün boyunca saklandı ve 7 günlük aralıklarla standard prosedür ile aktiviteleri belirlendi.

İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirliğini belirlemek üzere, oda sıcaklığında 0,1 M Tris-HCl tampon çözeltisi içinde (pH 8,2) 8 defa tekrarlayan döngülerle immobilize enzimin aktivitesi standard prosedür ile belirlendi. Herbir ardışık döngü için, Fe_3O_4 -TA-GGT, manyetik ayırma ile reaksiyon ortamından uzaklaştırılmıştır ve tekrarlayan her test için 0,1 M Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8,5) ile 3–4 kez durulandı.

5.9. Manyetik Nanotaneciklerin Karakterizasyonu

5.9.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

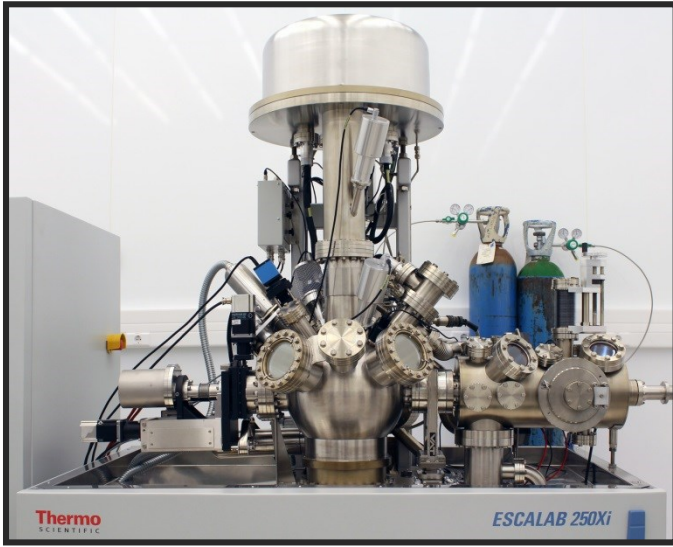
Nanotaneciklerin ATR-FT-IR spektrumları, Thermo Nicolet 6700 marka spektrometre kullanılarak elde edildi. 2 cm^{-1} çözünürlük ve 128 tarama ile spektrumlar alındı.



Resim 5.1. ATR-FT-IR spektrofotometresi

5.9.2. X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS)

Nanotaneciklerin kimyasal analizi SPECS ESCA marka Mg/Al çift anotlu XPS sistemi ile monokromatik Al K α uyarılması kullanılarak yapıldı. Nanotaneciklerin yüzey taraması 160 eV geçiş enerjisi ile 15 kV ve 10 mA'lık akımla gerçekleştirildi. Örnek yüzey alanı 5x5 mm² olarak tutuldu. Elementlerin bağlanma enerjileri 285 eV' daki C-C1s fotoelektronları referans alınarak belirlendi.



Resim 5.2. X-ışınları spektrometresi

5.9.3. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

TEM görüntüleri için JEOL JEM 2100F STEM sistemi kullanıldı. Öncelikle 10 mL etanolde dağıtılan nanotanecikler karbon film ile kaplı bakır grid üzerinde biriktirildi ve çözücü olarak kullanılan etanol grid üzerinden oda sıcaklığında buharlaştırıldıktan sonra alan emisyon tabancalı (FEG), 80-200 kV aralığında hızlandırıcı voltaj altında çalışan TEM ile nanotanecikler karakterize edildi.



Resim 5.3. Geçirimli elektron mikroskobu

5.9.4. Manyetometre

Nanotaniciklerin manyetik ölçümleri 25 °C’ da 7T manyetik alan uygulanarak süperiletken kuantum girişim manyetometresi (Cryogenic Limited PPMS sistem) kullanılarak gerçekleştirildi.

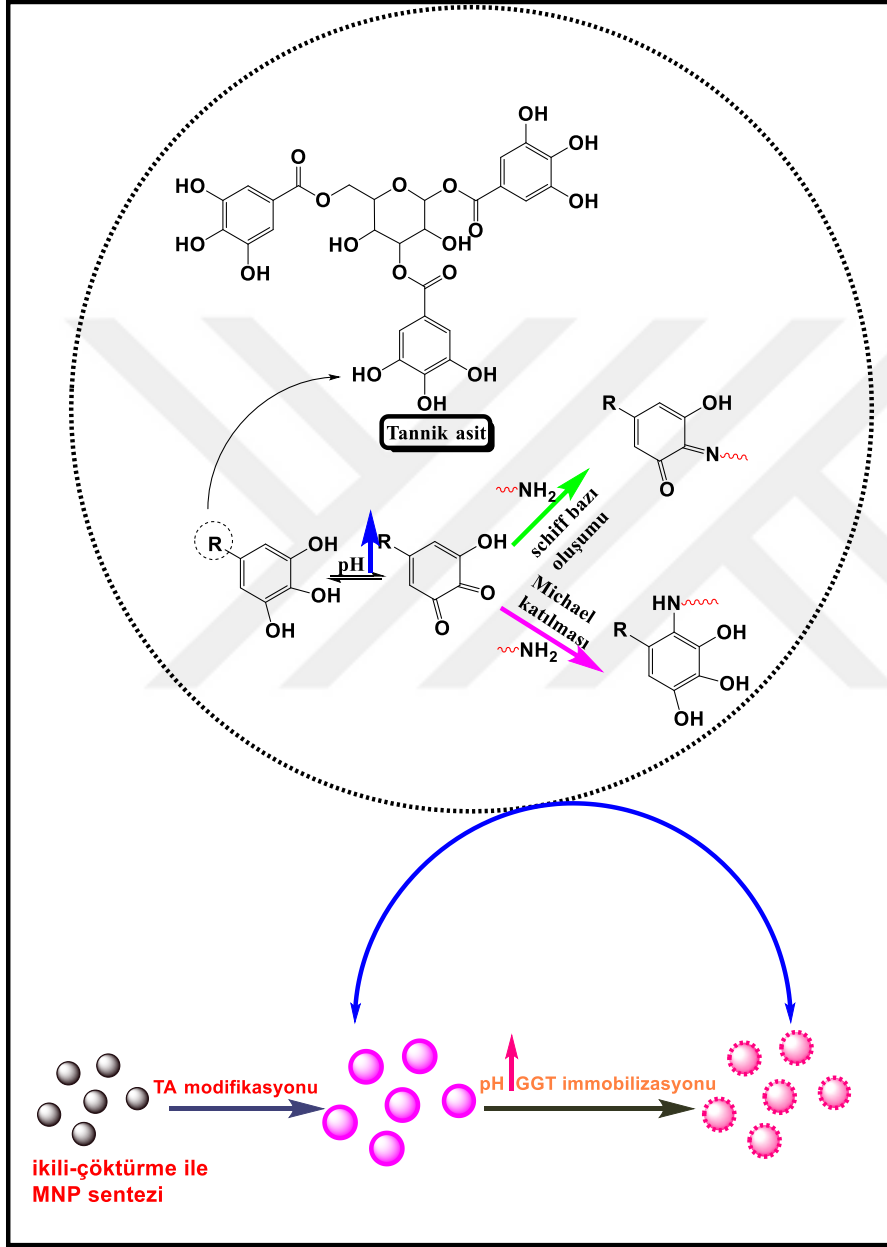


Resim 5.4. Manyetometre



6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

6.1. Tannik Asit Modifiyeli ve GGT Immobilize Edilen Manyetik Nanotaneciklerin Sentezi ve Karakterizasyonu



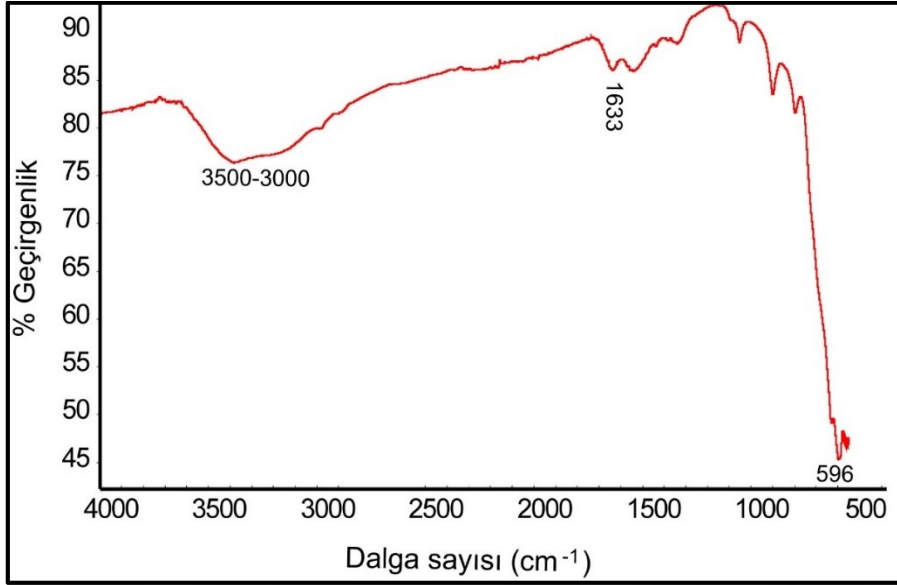
Şekil 6.1. GGT enziminin tannik asit modifiyeli manyetik nanotaneciklere kovalent immobilizasyonunun olası mekanizması

Şekil 6.1’de GGT enziminin tannik asit modifiyeli manyetik nanotaneciklerin yüzeyine kovalent immobilizasyonu için önerilen olası mekanizma gösterilmektedir. Tannik asit ile alkali ortamda ikili çöktürme yöntemi ile sentezlenen manyetik nanotanecikler arasındaki

bağın veya etkileşimin doğası şu şekilde açıklanabilir: Dopamin ve polifenoller gibi katekol grupları içeren moleküller, Fe_3O_4 , TiO_2 gibi nanotaneciklerle yük transfer kompleksleri oluşturabilirler. Bu nedenle, manyetik nanotaneciklerin yüzeyindeki Fe (III) ile tannik asit yapısındaki fenolik hidroksil grupları arasında oluşan koordine kovalent bağlar sayesinde manyetik nanotanecikler tannik asit ile kolaylıkla işlevselleştirilirler [123]. Ayrıca enzimi elektrostatik etkileşim, fiziksel ve kovalent immobilizasyon gibi birçok yöntemle bir malzeme yüzeyine immobilize etmek mümkündür. Tannik asit modifiyeli manyetik nanotaneciklere GGT enziminin immobilizasyonu fiziksel ve kovalent olmak üzere iki yolla olabilir.

Genellikle fiziksel immobilizasyon, enzimin hidrolizi veya birkaç enzim molekülü arasındaki moleküller arası etkileşim gibi birçok yan reaksiyonlar ile enzim ve destek yüzeyi arasında gelişigüzel bağlanma reaksiyonları ile sonuçlanabilir. Bu yan reaksiyonlar sıklıkla konformasyon değişimine, biyoaktivite kaybına, aktif bölgenin bozulması ve verimin düşmesine sebep olur [124]. Kovalent immobilizasyon ise, tannik asit modifiyeli manyetik nanotanecik ile GGT enziminin yapısındaki amin grupları arasında Schiff bazı ve Michael katılma reaksiyonları neticesinde oluşan kovalent bağlarla gerçekleşir. Kovalent immobilizasyon, oda sıcaklığında tannik asidin polifenolik gruplarının oksidasyonu sonucunda oluşan aktif kinon grupları ile GGT enziminin yapısındaki amin grupları arasında oluşan kovalent bağlarla gerçekleşir. pH-duyarlı kovalent bağları olan Schiff-bazı ürününün ya da Michael-tipi katılma reaksiyonu sonucunda oluşan immobilize enzim, GGT'nin stabilitesini ve aktivitesi artırdığı ve kullanılması gereken GGT miktarını azalttığı için GGT aktif bir şekilde kovalent immobilize olur [125].

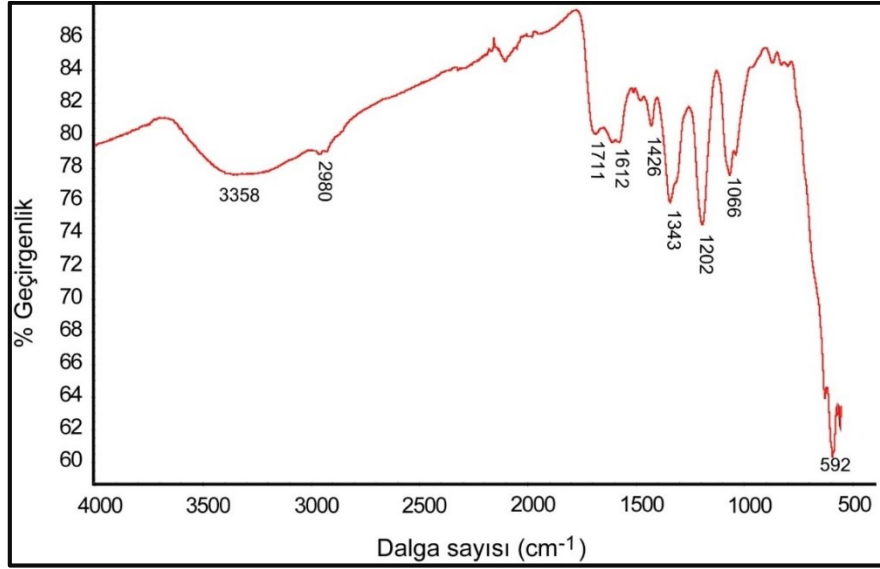
Demir (II) ve demir (III) tuzlarının bazik ortamda ikili çöktürülmesi ile sentezlenen manyetik nanotaneciklerin yapısal karakterizasyonu ATR-FT-IR spektrofotometresi ile gerçekleştirildi. Elde edilen FT-IR spektrumu Şekil 6.2'de gösterildi.



Şekil 6.2. Manyetik nanotaneceklerin FT-IR spektrumu

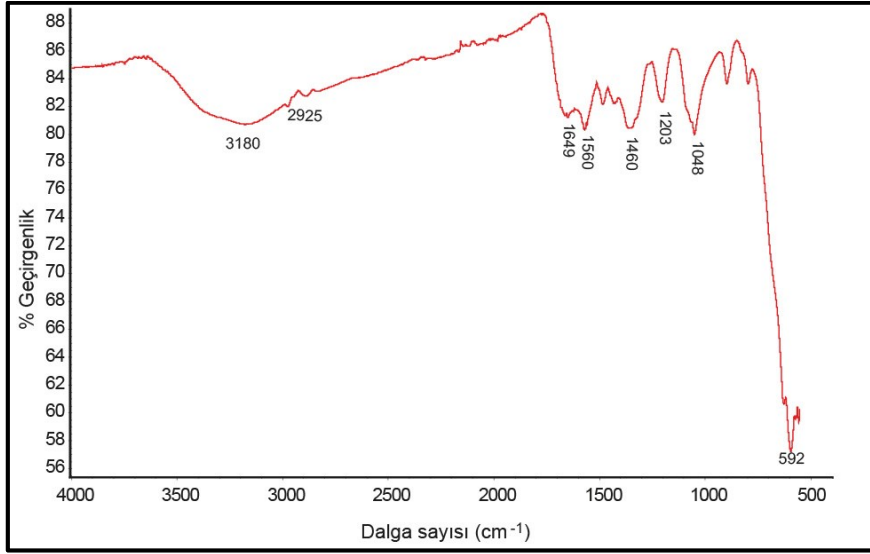
Bazık ortamda ikili çöktürme yöntemi ile sentezlenen manyetik nanotaneceklerin FTIR spektrumu incelendiğinde (Şekil 6.2), yaklaşık 596 cm^{-1} civarında ortaya çıkan güçlü absorpsiyon bandı Fe-O gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [126-124]. 1633 cm^{-1} 'deki bandın ise, demir oksit nanotanecekler tarafından adsorblanan suyun titreşimlerinden ortaya çıktığı düşünülmektedir [127]. $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ civarında ortaya çıkan geniş band ise nanotaneceklerin yüzeyinde bulunan hidroksil gruplarındaki hidrojen bağına ait gerilme titreşimine atfedilebilir [128].

Bu tez çalışması kapsamında, GGT enziminin nanotaneceklerle kovalent immobilizasyonu için, manyetik nanotanecekler bir kinon grubu oluşturmak üzere tannik asit ile modifiye edildi. Kinon grubunun nanotanecek yüzeyindeki varlığını incelemek üzere tannik asit modifiyeli manyetik nanotanecekler ATR-FT-IR spektrofotometresi ile analiz edildi. Elde edilen FT-IR spektrumu Şekil 6.3' de verildi.



Şekil 6.3. Tannik asit modifiyeli manyetik nanotaneceklerin FT-IR spektrumu

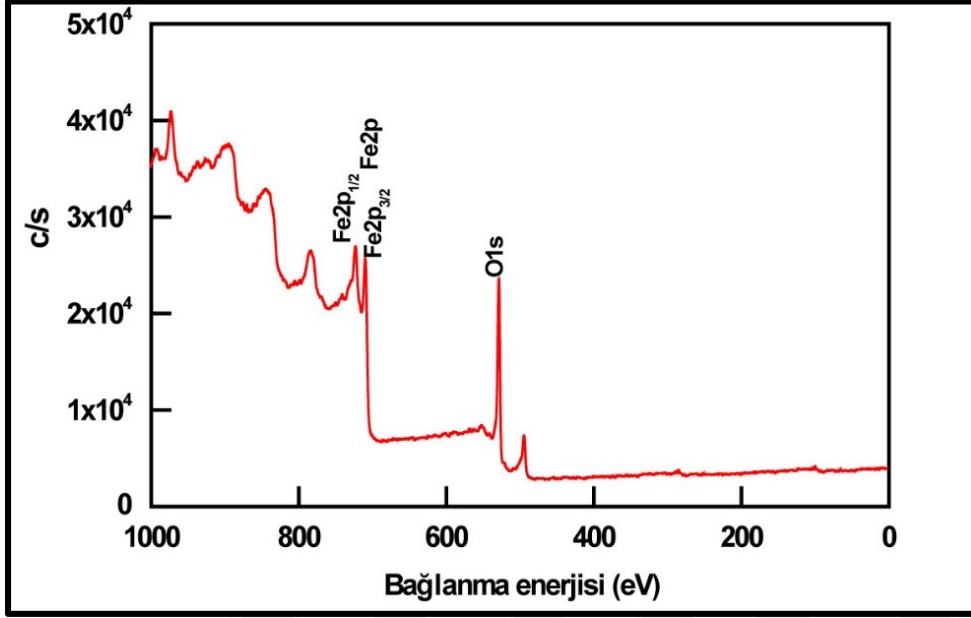
Şekil 6.3’de verilen spektrumun orta bölgesindeki ($1700\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) sinyallerin, tannik asit modifikasyonu nedeniyle manyetik nanotaneceklerin yüzeyindeki organik içerik ile ilgilidir [129]. 1600 ile 1400 cm^{-1} arasındaki absorpsiyon bandları aromatic -C=C- bağları ile ilgilidir. 1343 ve 1202 cm^{-1} ’de ortaya çıkan bandlar fenol gruplarına aittir [130]. Aromatik C-H bozunma titreşimleriyle ilişkili olan band 1066 cm^{-1} ’de gözlemlenmiştir [131]. 1711 ve 1612 cm^{-1} adsorpsiyon bandlarının sırasıyla C=O gerilme, ve aromatik C=C gerilme titreşimleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Manyetik nanotaneceklerin tanik asit ile fonksiyonelleştirildikten sonra 2980 cm^{-1} ’de ortaya çıkan belirgin band C-H gerilme titreşimlerine atfedilebilir [132]. 3358 cm^{-1} merkezli geniş ve kuvvetli band ile 3500 ve 3000 cm^{-1} civarında gözlenen güçlü bir absorpsiyon bandı hidroksil grupları (OH) gerilme titreşimlerinden dolayıdır ve OH arasında çok çeşitli hidrojen bağlanmasının yaygın çeşitliliğinden kaynaklanır [133].



Şekil 6.4. GGT immobilize edilmiş manyetik nanotaneciklerin FT-IR spektrumu

GGT immobilizasyonu sonrası yapılan yapısal karakterizasyon neticesinde elde edilen FT-IR spektrumu Şekil 6.4'de gösterildi. İmmobilize enzimin spektrumundaki değişiklikler tannik asit modifiyeli manyetik nanotaneciklerin FT-IR spektrumuna göre 1000 ila 1700 cm^{-1} aralığında gözlemlenmektedir. Özellikle, 1649 cm^{-1} 'de (C=N) 'yle alakalı bir bandın varlığı imino gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır ve Schiff bazlarının oluşumunu doğrular niteliktedir [134]. 3180 ve 2925 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandları primer amino grubuna atfedilebilir. 1560 cm^{-1} 'de keskin banda, peptidin amid I bant gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Çünkü tannik molekülleri içindeki -OH gruplarının hepsi tannik ve GGT enzimi arasındaki kompleksleşme veya kovalent bağ oluşum reaksiyonlarına katılmazlar. İmmobilizasyon ya da kompleksleşme reaksiyonlarına katılan fenolik gruplar, tannik asit modifiyeli manyetik nanotaneciklere ait spektrumda 1700-1000 cm^{-1} bölgesinde yer almaktadır. 3600–3100 cm^{-1} bölgesindeki geniş bantlar sadece GGT enzimi ile reaksiyona girmez, aynı zamanda tannik asit modifiyeli manyetik nanotanecikler serbest hidroksil gruplarına ait olurlar [135]. Hatta, manyetik nanotaneciklere ait Fe-O bandını spektrumun sağına doğru kaydırıldığını, böylece daha küçük titreşim frekansı değerlerinin varlığını da fark edebiliriz. Ayrıca, Şekil 6.4' deki bandların keskinliği, GGT enziminin tannik asit modifiye edilmiş manyetik nanotaneciklerin yüzeyine yüklenmesinden sonra, amino asitlerle zengin enzimden gelen amin gruplarının tannik asit yapısındaki kinon grupları arasında, birçok Schiff bazları oluşturulduğunu ve enzimin başarılı bir şekilde immobilizasyonunu göstermektedir.

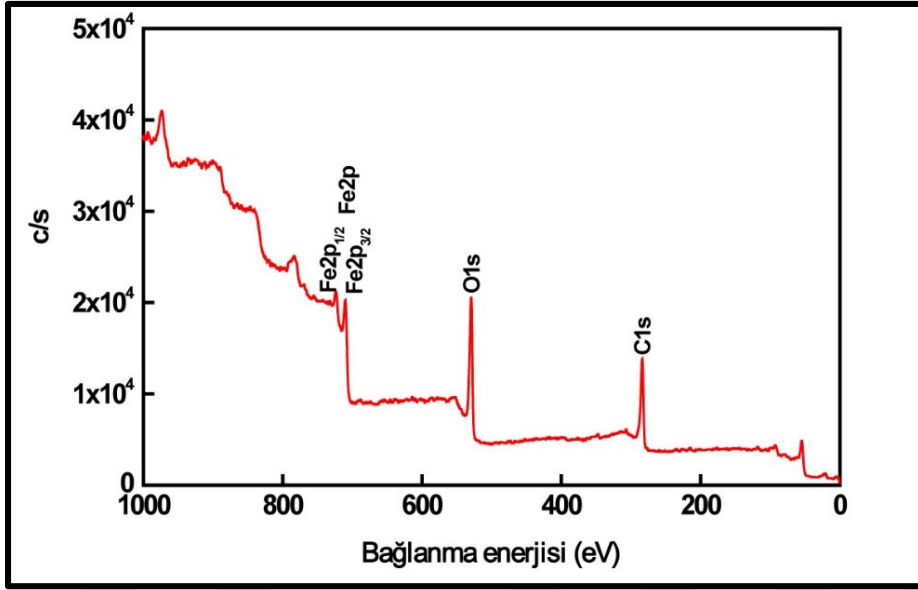
ATR-FT-IR spektroskopisi ile yapılan yapısal karakterizasyonun ardından hazırlanan manyetik nanotaneceklerin kimyasal karakterizasyonları XPS ile gerçekleştirildi. Elde edilen XPS spektrumu Şekil 6.5’ de gösterildi.



Şekil 6.5. Manyetik nanotaneceklerin XPS spektrumu

Bazık ortamda ikili çöktürme yöntemiyle sentezlenen manyetik nanotaneceklerin XPS spektrumu incelendiğinde (Şekil 6.4), 710, 720 ve 530 eV bağlanma enerjilerinde gözlenen güçlü pikler Fe2p_{3/2}, Fe2p_{1/2}, and O1s elemetlerine ait piklerdir. Bu piklerin varlığı manyetik nanotaneceklerin oluştuğuna dair en somut kanıt olarak gösterilebilir [128].

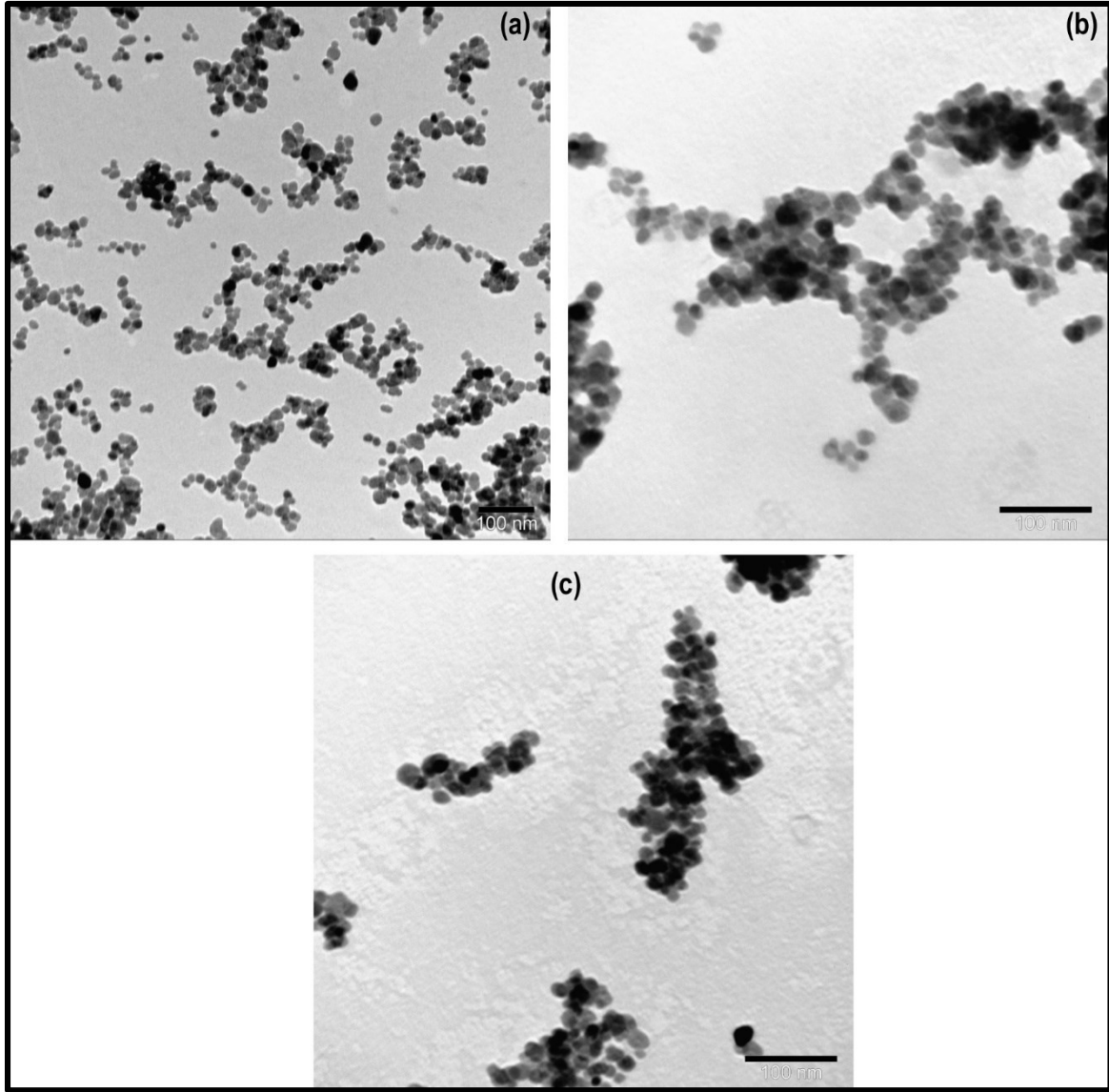
Ikili çöktürme yöntemiyle sentezlendikten sonra tannik asit ile modifiye edilen manyetik nanotanecekler XPS ile karakterize edildiler ve elde edilen XPS spektrumu Şekil 6.6’ da verildi.



Şekil 6.6. Tannik asit modifiyeli manyetik nanotaneceklerin XPS spektrumu

Şekil 6.6’ da görüldüğü üzere, manyetik nanotaneceklerin $\text{Fe}2p_{3/2}$, $\text{Fe}2p_{1/2}$, ve $\text{O}1s$ elementlerinin piklerinin yanısıra 285 eV bağlanma enerjisinde ortaya çıkan yeni pik tannik asit yapısındaki karbonil gruplarındaki $\text{C}1s$ elementinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca $\text{O}1s$ pikinin manyetik nanotanecekler göre 532 eV bağlanma enerjisinde gözlenmesi nanotaneceklerin katekol gruplarıyla modifiye edildiğinin bir kanıtıdır. Bütün bu sonuçlar manyetik nanotaneceklerin tannik asit ile başarılı bir şekilde işlevselleştirildiğini göstermektedir.

Bazık ortamda ikili çöktürme yöntemi ile siyah renkli manyetik nanotanecekler elde edildikten sonra morfolojileri ve büyüklükleri TEM analizi ile belirlendi. Şekil 6.7’de elde edilen TEM görüntüleri gösterilmektedir.

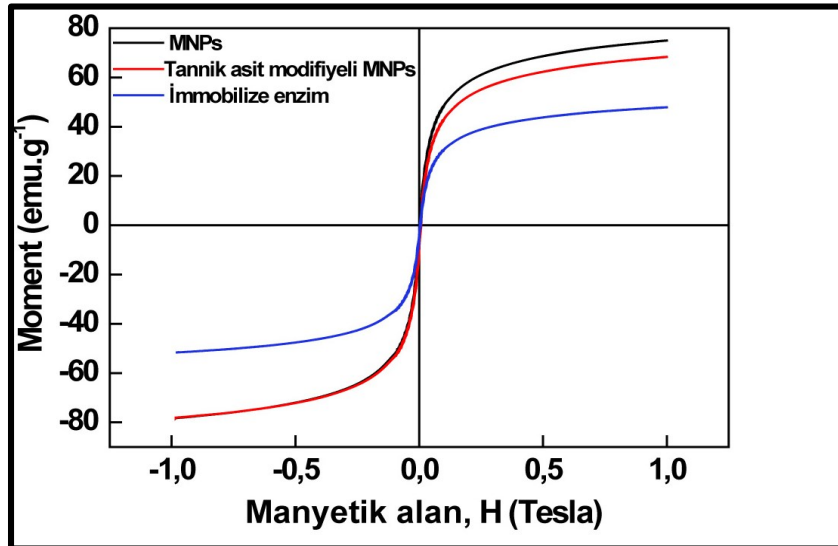


Şekil 6.7. (a) Manyetik, (b) Tannik asit modifiyeli manyetik, (c) GGT enzim immobilize edilmiş manyetik nanotaneceklerin TEM görüntüleri

Manyetik nanotanecekler için TEM görüntüsü incelendiğinde, süperparamanyetik özelliklerinden dolayı nanotaneceklerin birarada bulunduğu ancak çok yoğun bir aglomerasyonun olmadığı sonucuna ulaşıldı. Ayrıca nanotaneceklerin boyutlarının tekdüze olduğu ve ortalama nanotanecek çapının 14 nm olduğu belirlendi. Tannik asit ile modifiye edilen manyetik nanotaneceklerin TEM görüntüsü incelendiğinde ise, manyetik nanotaneceklerle çok benzer oldukları ortalama çaplarında fazla bir değişiklik olmadığı ve hafif bir aglomerasyon varlığı saptandı. Ayrıca ortalama nanotanecek çapı 16 nm olarak hesaplandı. Ayrıca manyetik nanotanecekler ile tannik asit modifiyeli nanotaneceklerin ortalama çaplarının yaklaşık aynı olması, küçük organik moleküllerin nanotanecek boyutunda büyük değişikliklere yol açmamasından kaynaklanmaktadır. Süperparamanyetik

özelliklere sahip manyetik nanotaneceklerin aglomerasyonunun neredeyse hiç olmaması nanotanecek sentezinde karıştırma hızının ortalama 900 rpm olmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü karıştırma hızı arttıkça nanotaneceklerin kümelenme davranışı gösterme eğilimlerinde düşüş olmaktadır [136]. Nanotanecek çapı immobilizasyon için oldukça önemlidir. Yüksek çap hacim oranına sahip nanotanecekler daha büyük yüzey alanına dolayısıyla daha fazla enzim bağlama kapasitesine sahip olmaktadır. Bu durum substrat ve ürün difüzyonu için daha az kısıtlamaya sebebiyet vermektedir. Bu tez çalışması kapsamında, GGT enzimi immobilize edilmiş manyetik nanotaneceklerin TEM görüntüsü incelendiğinde (Şekil 6.7.c), nanotaneceklerin immobilizasyon neticesinden daha fazla aglomerasyona uğradığı ve ortalama nanotanecek çapının 18 nm olduğu gözlemlendi. Bu sonuç, enzimin tannik asit modifiyeli nanotaneceklerle başarılı bir şekilde immobilize edilmesinin bir sonucu olarak düşünülebilir. Aglomerasyonun artması ise protein yapısındaki enzimin birden fazla nanotaneceğe immobilize olması ve protein-protein etkileşimlerinden kaynaklanıyor olabilir.

Hazırlanan bütün manyetik nanotaneceklerin manyetik özellikleri oda sıcaklığında VSM ölçümleri ile incelendi. Elde edilen manyetizasyon eğrileri Şekil 6.8’de gösterildi.



Şekil 6.8. Manyetik, tannik asit modifiyeli ve GGT enzim immobilize edilmiş manyetik nanotaneceklerin histerezis eğrileri

Şekil 6.8, hazırlanan bütün manyetik nanotaneceklerin histerezis eğrilerini göstermektedir. Bütün nanotaneceklerin manyetik alan içerisinde (manyetik alan uygulandığında) histerezis göstermediği açıkça görülmektedir. Bu durum, hem manyetik nanotaneceklerin hem de

tannik asit ve enzim ile biyofonksiyonelleştirilmiş olan nanotaneciklerin oda sıcaklığında süperparamanyetik karakterde olmalarının bir sonucudur. Ayrıca, sulu çözelti içindeki manyetik nanotanecikler ve tannik asit modifiyeli nanotanecikler siyah renkli bir süspansiyon iken, enzim immobilize edilmiş manyetik nanotanecikler koyu kahverengi bir süspansiyondur ve bir dış manyetik alan altında çözeltiden kolaylıkla geri alınabilirler. Dış manyetik alan kaldırıldıktan sonra hafif sallanma ile manyetik nanotanecikler yeniden dağıtılırlar. Mıknatıslanma eğrilerine ve ayırma-yeniden dağıtma işlemine dayanarak, hazırlanan nanotaneciklerin süperparamanyetik özelliklere sahip olduğu sonucuna varılabilir. Bu manyetik özellikler biyomedikal ve biyomühendislik alanlarının uygulamalarında kritik öneme sahiptir. Oda sıcaklığında manyetik, tannik asit modifiyeli manyetik ve GGT immobilize edilmiş manyetik nanotaneciklerin doygunluk mıknatıslanma değerleri sırasıyla 74,96, 66,34 ve 47,89 emu g⁻¹ olarak belirlendi. Manyetik nanotaneciklerin tannik asit ile işlevselleştirilmesi ve enzim immobilizasyonu neticesinde doygunluk mıknatıslanma değerlerinin azalması yüzeyin işlevsellik kazanmasına ve dolayısıyla manyetik karakterinin azalmasına atfedilebilir. Özellikle immobilizasyondan sonra büyük ölçüdeki düşüş tannik asit modifiyeli nanotaneciklerin yüzeyine enzimin çok büyük oranda immobilize olmasından kaynaklanıyor olabilir.

6.2. Serbest ve Immobilize Enzimin Aktivite Çalışmaları

6.2.1. Tannik asit modifiyeli manyetik nanotaneciklere immobilize olan enzim miktarının tayini

İmmobilizasyon verimliliği, ayrı ayrı orjinal enzim çözeltisinde protein içeriğinin direkt olarak ölçülmesi ve immobilizasyondan sonra kalan süzüntüden belirlendi. Bu amaçla, manyetik nanotaneciklerin yüzeyine kovalent immobilize edilen GGT miktarı, 595 nm'de Roti-Quant Protein Test Reaktifi Konsantresi kullanılarak bir kolorimetrik yöntemle analiz edildi [137]. Burada, sığır serum albümin (BSA) protein standardı olarak kullanıldı. Manyetik nanotaneciklere immobilize enzimin miktarı Eşitlik 6.1 kullanılarak hesaplandı.

$$\varphi(mg_{enzim}/g_{destek}) = \frac{(C_1 - C_2) \cdot V_{Numune}}{W_{destek}} \quad (6.1)$$

Burada,

ϕ enzim miktarını,

C_i ve C_s ise sırasıyla mg mL^{-1} olarak ayrı ayrı başlangıç enzim derişimini ve immobilizasyon sonrasındaki enzimi derişimini,

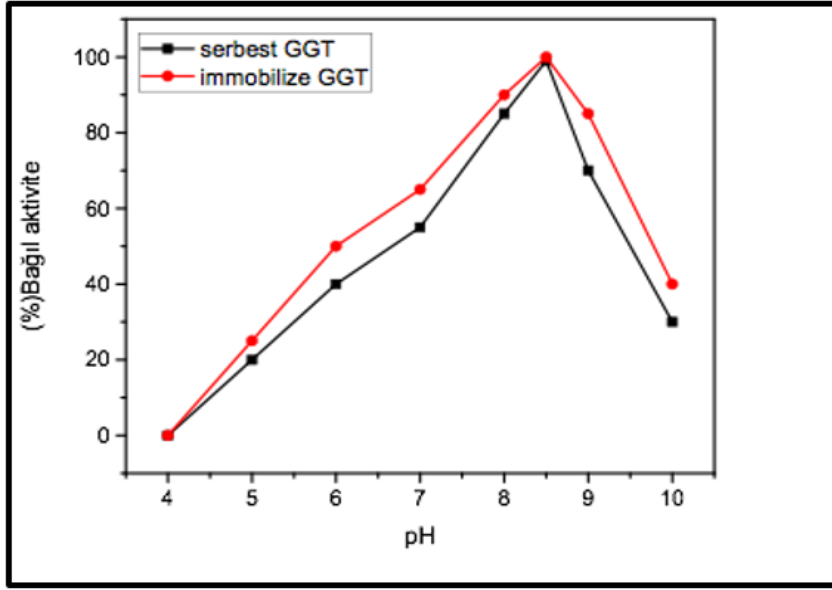
V çözelti hacmini (mL),

W mevcut çalışmada immobilizasyon için kullanılan manyetik nanotaneciklerin kütlesini göstermektedir.

Eşitlik 6.1 kullanılarak, manyetik nanotaneciklere immobilize olan enzim miktarının % 92,98 olduğu belirlendi. Bu sonuca dayanarak, tannik asit modifiyeli nanotaneciklerin yüzeyine kolaylıkla bağlanmış kovalent bağlarla enzimin immobilize olduğunu söylemek mümkündür. Ayrıca immobilizasyon ile enzim moleküllerinin birbirinden etkilenmesini önleyecek bir kararlılık kazandığını söyleyebiliriz. Enzimlerin maksimum kararlılığı için, enzim ve destek yüzeyi arasında kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerin oluşumunun birbirinin tamamlayıcısı niteliğinde olması gerekmektedir. Ancak immobilizasyon yönteminin maliyeti, destek malzemesinin difüzyonel özellikleri, yeterli substratla etkileşebilmek için immobilize enzimin aktif bölgelerine difüzyonun sterik engelin olmaması gibi faktörler de enzimlerin kararlılığını etkilemektedirler.

6.2.2. Katalitik aktiviteye pH etkisi

Enzim immobilizasyon çalışmalarında, pH sadece amino asit gruplarının özelliklerini değil, çözünmeyen destek malzemesinin çözelti kimyasını da etkileyen önemli bir faktördür. Protein destek etkileşimi ve bir proteinin yüzey özellikleri, pH' dan güçlü bir biçimde etkilenir. Tampon çözelti pH'sının serbest ve immobilize GGT üzerinde etkileri incelenerek Şekil 6.9'da gösterildi.



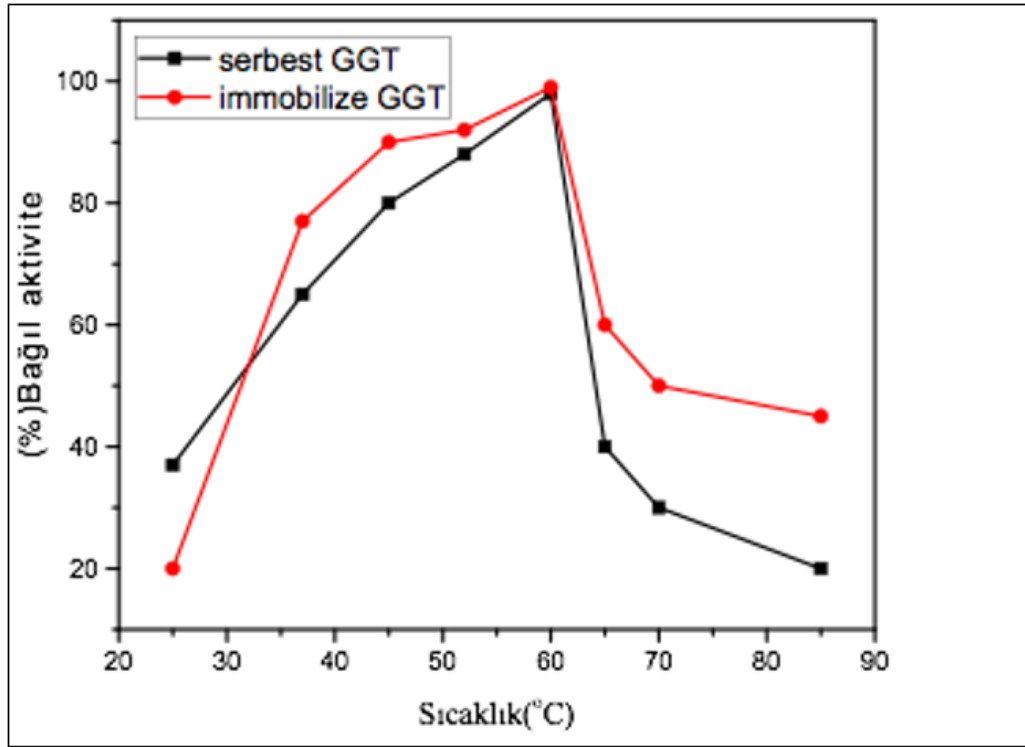
Şekil 6.9. Serbest ve immobilize enzimin katalitik aktivitesine pH etkisi

İmmobilize enzimin, pH 6,0-8,5 aralığında iyileştirilmiş bir enzim aktivitesi sağladığı Şekil 6.9' dan belirlendi. Serbest ve immobilize GGT'nin aktivitesi, pH 8,5'e ulaşıldığında dereceli olarak arttığı gözlemlendi. Hem serbest hem de immobilize enzim, aşağı yukarı benzer profilleri hafif değişikliklerle göstermektedir. Serbest ve immobilize enzimin optimum pH değerleri sırasıyla 8 ve 8,5 olarak bulundu. Bununla birlikte, immobilize enzimin pH 7-8,5 aralığında maksimum aktivite gösterdiği sonucuna ulaşıldı. İmmobilize GGT'nin optimum pH değerinin, serbest GGT'ye kıyasla 0,5 pH birimi bazık tarafa kaydığı gözlemlendi. Genel olarak, immobilize enzimin optimum pH değeri, desteğin anyonik veya katyonik doğasına bağlı olarak, serbest enziminkine kıyasla 2 pH birimine kadar kayabilir. Amino gruplarla taşıyıcıya bağlanan pozitif yüklü enzim grubu sayısının, immobilizasyondan sonra azalması nedeniyle bu sonuç beklenen bir durumdur. Böylece enzimin karakteri daha fazla polianyonik hale gelmektedir. Genel olarak, GGT'nin optimum pH değerleri pH 8,0 – 9,0 aralığındadır [138]. pH değerindeki bir değişiklik yapı bozulması nedeniyle optimum pH değerini geçtikten sonra serbest GGT'nin aktivitesinin hızla azalmasına yol açmaktadır. Bu bozulma, GGT enziminin immobilizasyonu ile önemli ölçüde azaltılabilir. GGT molekülünün uç amino gruplarına sahip olduğu ve bazı GGT molekülü amino gruplarının manyetik nanopartiküllerin yüzeyindeki tannik asitin karboksil grupları ile reaksiyona girebileceği varsayılabilir. Serbest GGT aktivitesine kıyasla immobilize GGT'nin enzimatik aktivitesindeki iyileşme, hem GGT'nin otolizinin en aza indirilmesi / ortadan kaldırılması hem de yüksek yüzey alanlı ve tutuklanmış manyetik nanotaneceklerin yüzeyine immobilize edilmiş GGT'nin stabilize edilmesine ve GGT

enziminin aktif bölgelerine substratın daha rahat erişebilmesi ile sonuçlanmış olmasına atfedilebilir. GGT aktivitesinin bu stabilizasyonu, büyük olasılıkla, sadece otolizi değil aynı zamanda GGT doğal yapısının bozulmasını da önleyen GGT ve tannik asit moleküllerinin manyetik nanotanecik yüzeyindeki çoklu nokta bağlantılarının sonucudur [139].

6.2.3. Sıcaklığın katalitik aktiviteye etkisi

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi, optimum çalışma koşullarını belirlemek için pH'nın etkisi ile birlikte son derece önemlidir. Bundan dolayı, enzim stabilizasyonunu araştırmak için serbest ve immobilize GGT'nin 25 ile 70 °C arasında değişen sıcaklıklardaki bağıl aktiviteyi incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.10'da gösterildi.



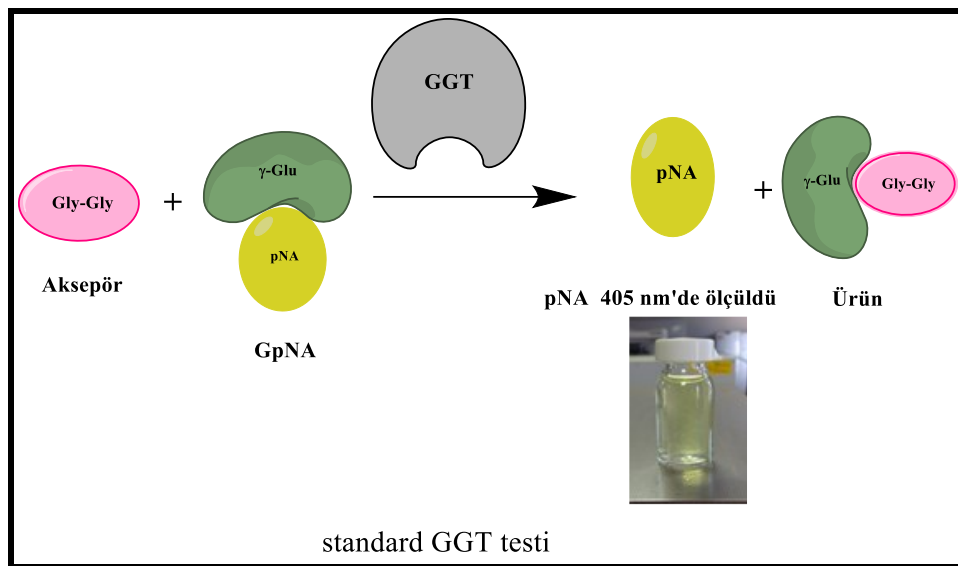
Şekil 6.10. Serbest ve immobilize enzim katalitik aktivitesine sıcaklık etkisi

Enzim katalizli reaksiyonlarda, optimum sıcaklığın üstünde, enzim yapısının denature olması nedeniyle enzim aktivitesi azalır. Hem serbest hem de immobilize GGT için optimum sıcaklık değeri yaklaşık 60 °C olarak belirlendi. (Maksimum aktivite her iki enzim formu için 60 °C'de gözlemlendi (Şekil 6.10). Bu sıcaklığın üzerinde, enzim aktivitelerinin, enzim yapısının bozulması nedeniyle büyük ölçüde azaldığı gözlemlendi.

60-85 °C sıcaklık aralığında, immobilize GGT, serbest enzimden daha yüksek bir termal stabiliteye sahip olmasından dolayı daha yüksek bir aktivite sergilediği sonucuna ulaşıldı. Çünkü immobilizasyon, enzim bağlanması için daha sert bir harici omurga sağlar. Böylece, etkileşimlerin bozulmasında veya enzimlerin sekonder / tersiyer yapılarının açılmasında yüksek sıcaklık veya aşırı pH'nın etkisi en aza indirgenir [140]. Bakteri kökenli GGT'nin optimum sıcaklıkları tipik olarak 55-70 °C aralığındadır ve yapılan tüm çalışmalarda GGT, toprakta yüksek sıcaklıklara dayanabilen ve yetiştirilebilen *Bacillus licheniformis* gibi bakterilerden elde edildiği için bu sonuç beklendi. Hayvandan elde edilen GGT biraz daha düşük optimum sıcaklığa sahipken, immobilize GGT'nin daha yüksek stabilitesi, azalmış otolizden kaynaklanabilir. Çünkü nanotaneçiklerin yüzeyindeki enzim moleküllerinin fonksiyonel grupları, birbirleriyle büyük ölçüde kısıtlanmış bir temasa sahiptir [141].

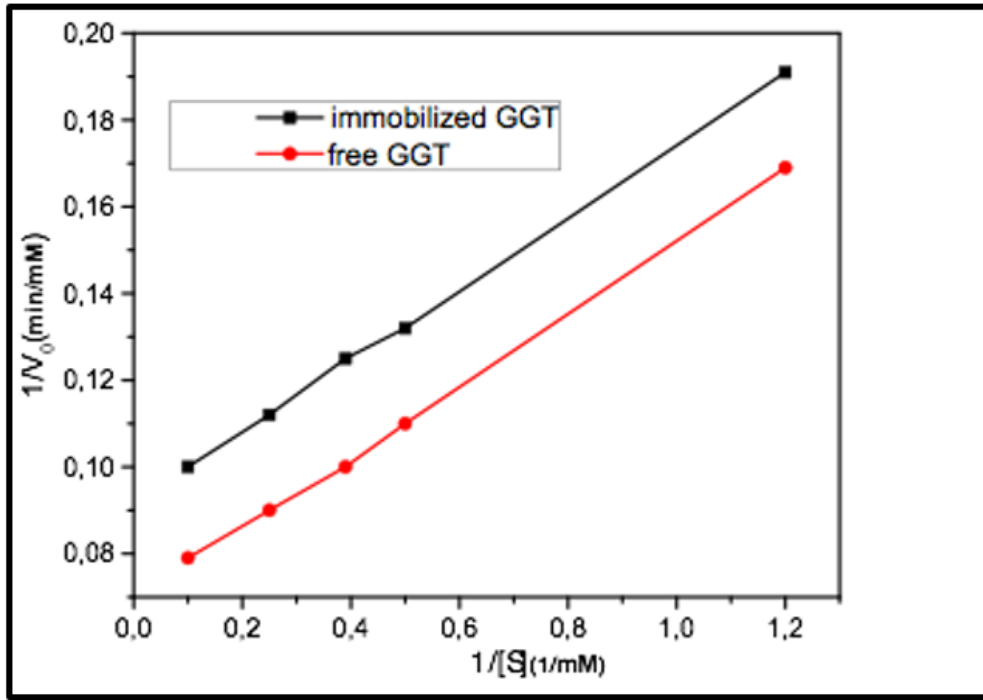
6.2.4. Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri

İmmobilize enzimin kinetik davranışı, serbest enziminkinden önemli ölçüde farklı olabilir. İmmobilize enzimin özellikleri immobilizasyon yöntemine göre farklılıklar gösterebilir. Ayrıca, aynı immobilizasyon yöntemi, farklı enzimler üzerinde önemli ölçüde farklı etkilere sahip olabilir. Bu değişiklikler, immobilizasyon yöntemi sebebiyle veya immobilizasyon desteğinin varlığı ve doğası gereği enzimde konformasyonel değişikliklere sebep olmaktadır.



Şekil 6.11. Enzim-substrat etkileşimi

Substrat derişiminin serbest ve immobilize enzimlere etkisi, Michaelis-Menten ve Lineweaver – Burk eşitlikleri kullanılarak incelendi. Bunun için, L- γ -glutamil p-nitroanilitin Tris-HCl (pH 8,5) tampon çözeltisinde hazırlanan farklı derişimlerdeki substrat çözeltisinin (0,5-10 mM) serbest ve immobilize enzim ile etkileşimleri araştırıldı (Şekil 6.11). Serbest ve immobilize enzimlerin K_M ve V_{max} değerleri, Şekil 6.12’de gösterilen Lineweaver – Burk grafiğı kullanılarak hesaplandı.



Şekil 6.12. Serbest ve immobilize enzimin Lineweaver – Burk eğrileri

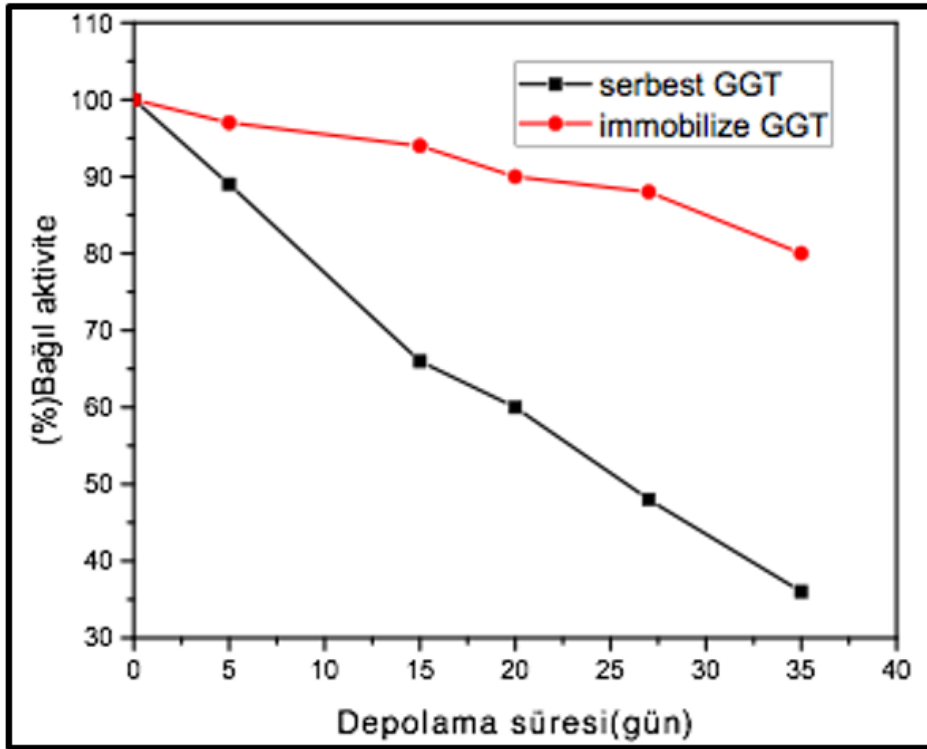
Serbest enzimin K_M değeri 1,19 mM iken, immobilize enzimin K_M değeri 0,902 mM olarak Şekil 6.12’de verilen Lineweaver – Burk eğrilerinden belirlendi. K_M değerleri arasındaki bu fark, immobilize enzimin substrat için serbest enzimden daha yüksek bir biyolojik etkinliğe sahip olduğunu gösterir. Enzim nanotaneciğe bağlandığı zaman, daha iyi bir konformasyonda bulunabilmek için kendini yeniden düzenlemesi nedeniyle substrat afinitesinin artmasında etkili olmuş olabilir.

Bu nedenle, enzimin aktif bölgeleri, serbest enziminkinden daha müsait olabilir ve böylece immobilize enzimin K_M değerinin serbest enzimin K_M değerine oranla yaklaşık % 75 azaldığını söylemek mümkündür. Düşük K_M güçlü enzim-substrat bağlanmasını gösterdiğinden, substrat immobilize enzimin aktif bölgesine bağlandığında, geçiş kompleksi daha karalı olmaktadır. Ayrıca, serbest ve immobilize enzimin V_{max} değerleri

sırasıyla 14,43 mM ve 10,91 mM olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre, immobilize enzimin V_{max} değerinin düştüğüne dikkat çekebiliriz. Bununla birlikte, V_{max} 'taki bu azalma, tannik asitle modifiye edilmiş manyetik nanotaneçiklere kovalent immobilize olan enzimlerin aktivitelerini kaybettiğine işaret edebilir. Bu aktivite kaybı, katalitik olmayan konformasyonel bozulmalardan veya aktif bölge bozunmasından kaynaklanmış olabilir.

6.2.5. Serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılıkları ve kullanım sayıları

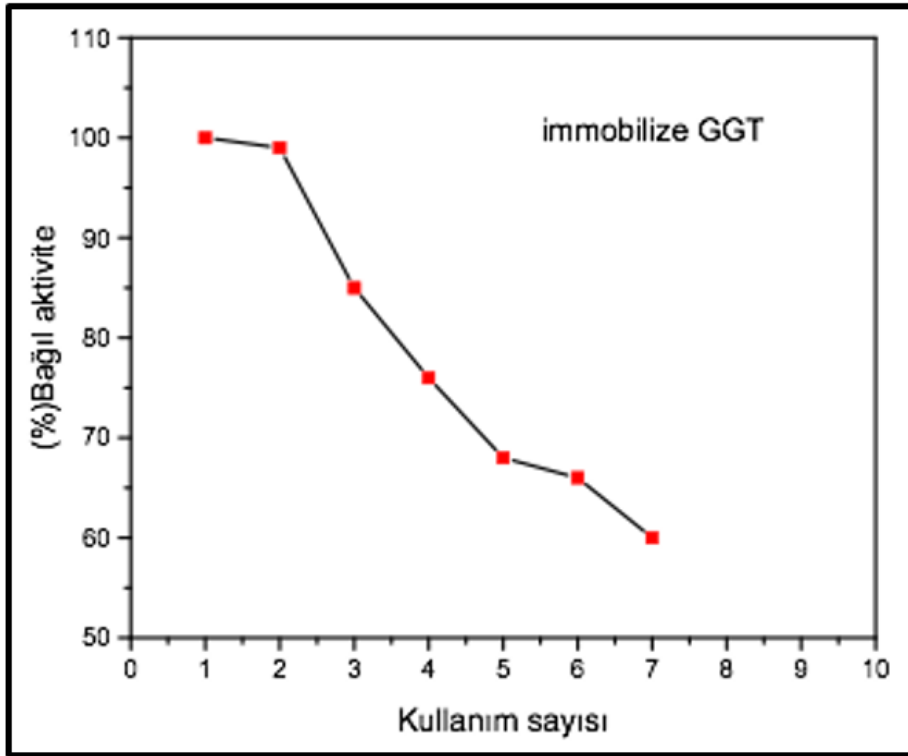
Enzimler, her ne kadar kararsız yapılar olsalar da, ticari olarak yararlıdırlar. Enzim immobilizasyonu ile bu istenmeyen özelliğin üstesinden gelinebilir. Immobilizasyon yöntemini seçerken, depolama kararlılığı ve immobilize enzimin çoklu kullanımı büyük önem taşımaktadır. Serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılıkları 35 gün boyunca +4 °C' da depolanarak incelendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.13' de gösterildi.



Şekil 6.13. Serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılıkları

Serbest enzim 35 günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 65' ini kaybettiği, immobilize enzimin, aynı zaman aralığında ilk aktivitesinin % 20'sini kaybettiği Şekil 6.13' de açıkça görülmektedir. Bu durum, immobilizasyonun GGT enziminin stabilitesini artırmasının ve aktifliğinin daha uzun süre kalmasının sonucudur.

İmmobilize enzimin kullanım sayısı enzimin kararlılığı açısından oldukça önemlidir. Bu sebeple immobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği ve dolayısıyla operasyonel kararlılığı araştırıldı. Bunun için, immobilize enzimin substratla etkileşim prosedürü ardarda uygulandı ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.14’ de verildi.



Şekil 6.14. İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği

Şekil 6.14 incelendiğinde, immobilize enzimin 7 tekrarlı kullanımdan sonra ilk aktivitesinin %60'ını koruduğu belirlendi. Bu durum, GGT enziminin immobilizasyonunun, enzim kararlılığını sürdürmesinden ve enzimin yeniden kullanılabilirliğini geliştirmesinden kaynaklanmaktadır.



7. SONUÇ

Manyetik nanotanecikler üzerine enzim immobilizasyonu, çözelti ortamındaki serbest enzimleri iyileştirmek için kolay bir yol sağlar. Dahası, destek üzerinde daha yüksek miktarda enzimin immobilizasyonuna izin verebilen desteğin yüksek yüzey alanına sahip nanoyapılar olması nedeniyle immobilize enzimler daha çok substrat ile etkileşime girerek ürün oluşturlar [142]. Kovalent immobilizasyon, enzimin yüzeyden ayrılmasını azaltır.¹⁴³ Ayrıca, bağlanma verimliliğini arttıran, kütle transfer direncini azaltan, kirlenmeyi azaltan ve enzimleri hızla ayıran ve maliyetleri azaltan oldukça spesifik bir yüzey sağlayan süperparamanyetik nanotanecikler üretilebilir. Bir süperparamanyetik nanotanecik sürekli manyetik özelliklere sahip değildir; ancak ihtiyaç olduğunda dış manyetik alan tarafından manyetize edilebilir ki yüksek değerli bir ürünün saflaştırma işleminde çok yararlı olacaktır.

İmmobilizasyon yöntemleri, bağlanma noktası enzimin aktif bölgesinde olduğunda enzim aktivitesini etkileyebilir. GGT gibi yüksek molekül ağırlıklı enzimler için, uygun bir boşluk doldurucunun sokulması, enzimi daha fazla esnekliğe muhatap kılar. Bu, dolgu olmadan immobilize enzime kıyasla sterik engellenmenin azalması sebebiyle enzimin aktivitesini önemli ölçüde artırabilir. Bu çalışmada, kovalent bağlı enzim miktarının başlangıç çözeltisindeki miktarının yaklaşık % 93'ü olduğu bulundu. Kovalent bağlanma prosesi, özel fonksiyonel gruplar ile oransal olarak düzenlenebilir. Ayrıca, toksik kimyasallar kullanılmadan düşük maliyetli ve verimli immobilizasyon, manyetik nanotanecik üzerine kaplanan tannik asitin pH artışı ile oksitlenmesiyle gerçekleştirildi. Tannik asit yapısındaki polifenollerin (katekol gruplarının) artan pH ile oksitlenmesiyle kinon grupları oluşur. Kinonlar, iki karbonil grubu içeren bir siklik organik bileşik grubudur. Kinon grupları içeren tannik asit ile ve yüksek miktarda amin grubu içeren enzim, pH duyarlı kovalent bağlarla Schiff-bazı ürünü vermek üzere oda sıcaklığında reaksiyona girebilir [144]. Schiff-bazları oluşturan bağların hidrolizini önlemek için çalışma koşulu olarak çözelti pH'ı 6'ın üzerinde seçilmelidir.

Özetle, bu tez kapsamında manyetik nanotanecikler kolay ve ucuz bir metod olan alkali ortamda demir tuzlarının ikili çöktürülmesiyle elde edildi ve GGT enziminin kovalent immobilizasyonu için tannik asit ile modifiye edildi. Elde edilen manyetik nanotaneciklerin süperparamanyetik özellikte oldukları gözlemlendi. Manyetik

nanotaneciklerin tannik asit ile işlevselleştirilmesi ve enzim immobilizasyonu neticesinde yüzeylerinin işlevsellik kazanmasından manyetik özelliklerinin azaldığı belirlendi. Manyetik nanotaneciklerin TEM görüntülerinden küresel geometride oldukları ve 14 nm aralığında yarıçapları olduğu sonucuna ulaşıldı. Aynı şekilde tannik asit modifiyeli ve enzim immobilize edilmiş manyetik nanotaneciklerin yarıçaplarının sırasıyla 16 ve 18 nm olduğu belirlendi. Ayrıca enzim immobilizasyonu sonucunda manyetik nanotaneciklerin kümelenme davranışları gösterdikleri belirlendi. GGT enziminin tannik asit modifiyeli manyetik nanotaneciklere kovalent immobilize olduğu ve immobilize olan enzim miktarının % 92,98 olduğu belirlendi. Yapılan aktivite çalışmaları sonucunda, immobilize enzimin katalitik aktivitesinin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin 60 °C ve 8,5 olduğu belirlendi. Michaelis-Menten eşitliği kullanılarak serbest ve immobilize enzimin K_M değerleri sırasıyla 1,19 ve 0,902 Mm olarak hesaplandı. K_M değerleri arasındaki bu fark, immobilize enzimin substrat için serbest enzimden daha yüksek bir biyolojik etkinliğe sahip olduğunu gösterir. Enzim nanotaneciğe bağlandığı zaman, daha iyi bir konformasyonda bulunabilmek için kendini yeniden düzenlemesi nedeniyle substrat afinitesinin artmasında etkili olmuş olabilir. Ayrıca serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılıkları 35 gün boyunca +4 °C' da depolanarak incelendi. Serbest enzim 35 günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 65' ini kaybettiği, immobilize enzimin, aynı zaman aralığında ilk aktivitesinin % 20'sini kaybettiği. Immobilize enzimin 7 tekrarlı kullanımdan sonra ilk aktivitesinin % 60' ını koruduğu belirlendi.

Sonuç olarak, hazırlanan GGT modifiyeli manyetik nanotanecikler gerek immobilizasyon yöntemi, gerek immobilize enzimin geniş bir sıcaklık aralığındaki ve yüksek pH' lardaki kararlılığı ve gerekse depolama stabilitesi ve tekrar tekrar kullanılabilirliği açısından biyokatalizörler için yeni ufuklar açmaktadır [145].

Nanotaneciklerin immobilize enzimlerin etkinliğini arttırdığı bilinmektedir [146]. Bunun yanı sıra, tüm nanotanecik-enzim konjugatları enzimatik aktivite artışı göstermemekle birlikte, enzimlerin nanotaneciklere kontrollü biyokonjugasyona sahip olmalarına da bağlıdır [147]. Ayrıca, beş büyük fizikokimyasal mekanizma nanotanecik-enzim konjugatları üzerinde gelişmiş enzimatik aktiviteye katkı sağlar: daha yüksek enzim yoğunluğu; substratın nanotanecik yüzeyine çekilmesi ve nanotanecik-enzim biyo-konjugatının hareketine bağlı olarak gelen substratın gelişmiş kütle transferi; nanotanecik morfolojisi; daha etkin immobilize enzimlerin eldesini sağlayan nanotanecik yüzey

kimyası; ve artmış enzim-substrat etkileşimleri için uygun enzim oryantasyonu. Bu mekanizmalar, nanotaneciklere immobilize enzimlerin aktivitesinin daha iyi anlaşılmasını sağlar ve yeni nanotanecik-enzim konjugat sistemlerinin tasarımını optimize etmek için uygulanabilir [148]. Diğer immobilizasyon destekleri ve yöntemlerinde olduğu gibi, manyetik nanodesteklerin yüzeyine immobilizasyon, substrat afinitesini artırır ve enzimi geniş aralıktaki sıcaklık ve pH çok çeşitli değişikliklere karşı stabilize eder.

Benzer şekilde, enzimatik aktivite depolamada bir süre boyunca stabil kalır. Kovalent immobilize enzimler, aynı zamanda, destekten ayrılarak enzim kaybının azaltılmasından dolayı daha uzun süre kullanım döngülerine sahiptir. Ayrıca enzim nanotaneciğe bağlandığı zaman, daha iyi bir konformasyonun benimsenmesi için kendini yeniden düzenlemektedir. Bu nedenle, enzimin aktif bölgeleri substrata karşı, serbest bir enziminden daha müsait olabilir böylece enzimin aktif bölgelerinin substrat afinitesi artış gösterir. Öte yandan, manyetik nanotaneciklere immobilizasyonun avantajlarına rağmen, bazı dezavantajları da vardır: Birincisi, nanotanecikler aralarındaki güçlü manyetik etkileşimler nedeniyle kümelenebilirler; ikincisi, manyetik nanotanecikler, hava ile oksitlenebilir, bu da büyük ölçekli işlemlerde istenmeyen bir durum olabilir [149]. Bu tez çalışmasında, tannik asit modifiyeli manyetik nanotaneciklere immobilize enzimin termal olarak kararlı ve depolamada stabil kaldığı gözlemlendi; bu yaklaşımın, pahalı enzimlerin ekonomik olarak uygun hale gelebileceğini ve böylece GGT kullanılan kataliz için yeni biyoteknolojik ufuklar açtığını düşündürmektedir.

Enzim bazlı biyosensörler, bir enzim elemanının ve analitlerin seçici olarak saptanması için sinyal işleme ile ilişkili bir dedektör veya çeviricinin birleştirilmesinin bir sonucudur. Sadelikleri, yüksek özgüllükleri, düşük maliyetleri ve düşük ölçeklenebilirliklerinden ötürü, enzim bazlı biyosensörler hızlı, hassas ve sürekli bir kullanım sağlar [150]. Sonuç olarak, enzim immobilizasyonunda süperparamanyetik nanotaneciklerin kullanımı diğer nanotaneciklerin (silika, altın, gümüş vb) veya diğer manyetik olmayan mikrokürelerin kullanımına karşı üstünlüğe sahiptirler. Çünkü manyetik nanotanecikler bir dış manyetik alan yardımıyla hızlı ve kolay bir şekilde çözelti ortamından uzaklaştırılabilir, yıkanabilir, uzun zaman alan ve birkaç defa yapmayı gerektiren ultrasantrifüj ayırma yapmaksızın birçok defa kullanılabilir. Bunun yanı sıra, manyetik nanotanecikler mikro ölçekli taneciklere kıyasla daha geniş yüzey alanına sahip olduklarından dolayı, pahalı olan enzimlerin daha düşük miktarlarda kullanılmasına olanak sağlayarak maliyeti düşürmeye

yardımcı olur. Ayrıca tannik asit ile modifiye edilen manyetik nanotaneceklerin yüzeylerine kovalent immobilizasyon için herhangi bir ara bağlayıcının kullanılmaması özellikle zaman ve maliyetten tasarruf edilmesini sağlayarak immobilizasyon yöntemine ayrıca üstünlük kazandırdığı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Purbia, R. and Paria, S. (2015). Yolk/shell nanoparticles: classifications, synthesis, properties, and applications. *Nanoscale*, 7(47), 19789-19873.
2. Xie, L., Jiang, R., Zhu, F., Liu, H. and Ouyang, G. (2014). Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(2), 377-399.
3. Tartaj, P., Morales, M. P., Gonzalez-Carreno, T., Veintemillas-Verdaguer, S. and Serna, C. J. (2005). Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 290, 28-34.
4. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. and Kim, W. S. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(2), 493-501.
5. Lu, A. H., Salabas, E. E. and Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222-1244.
6. Sun, C., Lee, J. S. and Zhang, M. (2008). Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 60(11), 1252-1265.
7. Lam, U. T., Mammucari, R., Suzuki, K. and Foster, N. R. (2008). Processing of iron oxide nanoparticles by supercritical fluids. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 47(3), 599-614.
8. Lu, A. H., Salabas, E. E. and Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222-1244.
9. Akbarzadeh, A., Samiei, M. and Davaran, S. (2012). Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 144.
10. Liu, J., Sun, Z., Deng, Y., Zou, Y., Li, C., Guo, X., Xiong, L. and Zhao, D. (2009). Highly Water-Dispersible Biocompatible Magnetite Particles with Low Cytotoxicity Stabilized by Citrate Groups. *Angewandte Chemie*, 121(32), 5989-5993.
11. Xu, C., Xu, K., Gu, H., Zhong, X., Guo, Z., Zheng, R. and Xu, B. (2004). Nitrilotriacetic acid-modified magnetic nanoparticles as a general agent to bind histidine-tagged proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 126(11), 3392-3393.
12. Bulte, J. W., Hoekstra, Y., Kamman, R. L., Magin, R. L., Webb, A. G., Briggs, R. W. And De Leij, L. (1992). Specific MR imaging of human lymphocytes by monoclonal antibody-guided dextran-magnetite particles. *Magnetic Resonance in Medicine*, 25(1), 148-157.

13. Berry, C. C., Wells, S., Charles, S. and Curtis, A. S. (2003). Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24(25), 4551-4557.
14. Liu, T. Y., Hu, S. H., Liu, K. H., Liu, D. M. and Chen, S. Y. (2008). Study on controlled drug permeation of magnetic-sensitive ferrogels: effect of Fe₃O₄ and PVA. *Journal of Controlled Release*, 126(3), 228-236.
15. Jeong, J., Ha, T. H., Chung, B. H. (2006). Enhanced reusability of hexa-arginine-tagged esterase immobilized on gold-coated magnetic nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 569(1-2), 203-209.
16. Min, Y., Akbulut, M., Kristiansen, K., Golan, Y. and Israelachvili, J. (2010). The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly. In *Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals*, 38-49.
17. Sun, C., Lee, J. S. and Zhang, M. (2008). Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1252-1265.
18. Xu, F., Geiger, J. H., Baker, G. L. and Bruening, M. L. (2011). Polymer brush-modified magnetic nanoparticles for His-tagged protein purification. *Langmuir*, 27(6), 3106-3112.
19. Khan, A. A. and Alzohairy, M. A. (2010). Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. *Research Journal of Biological Sciences*, 5(8), 565-575.
20. Polizzi, K. M., Bommarius, A. S., Broering, J. M. and Chaparro-Riggers, J. F. (2007). Stability of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(2), 220-225.
21. Ansari, S. A. and Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 512-523.
22. Atacan, K., Çakıroğlu, B. and Özacar, M. (2017). Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 148-155.
23. Magro, M., Bonaiuto, E., Baratella, D., de Almeida Roger, J., Jakubec, P., Corraducci, V. and Vianello, F. (2016). Electrocatalytic nanostructured ferric tannates: characterization and application of a polyphenol nanosensor. *Chemical physics and physical chemistry*, 17(20), 3196-3203.
24. Dixon, R. A., Dey, P. M. and Lamb, C. J. (1983). Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 55(1), 69.
25. Sivaraman, S. K., Elango, I., Kumar, S. and Santhanam, V. (2009). A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. *Current Science*, 97(7), 1055-1059.

26. Ahmad, T. (2014). Reviewing the tannic acid mediated synthesis of metal nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*, 11, 18-39.
27. Sahiner, N. and Sengel, S. B. (2016). Tannic acid decorated poly (methacrylic acid) micro and nanoparticles with controllable tannic acid release and antioxidant properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 508, 30-38.
28. Xiong, K., Qi, P., Yang, Y., Li, X., Qiu, H., Li, X. and Huang, N. (2016). Facile immobilization of vascular endothelial growth factor on a tannic acid-functionalized plasma-polymerized allylamine coating rich in quinone groups. *RSC Advances*, 6(21), 17188-17195.
29. Cook, N. C., Samman, S. (1996). Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66-76.
30. Sahiner, N., Sagbas, S., Aktas, N. and Silan, C. (2016). Inherently antioxidant and antimicrobial tannic acid release from poly (tannic acid) nanoparticles with controllable degradability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142, 334-343.
31. Nepka, C. H., Asproдини, E. and Kouretas, D. (1999). Tannins, xenobiotic metabolism and cancer chemoprevention in experimental animals. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 24(2), 183-189.
32. Gali-Muhtasib, H. U., Yamout, S. Z. and Sidani, M. M. (2000). Tannins protect against skin tumor promotion induced by ultraviolet-B radiation in hairless mice. *Nutrition and Cancer*, 37(1), 73-77.
33. Lee, H., Dellatore, S. M., Miller, W. M. and Messersmith, P. B. (2007). Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*, 318(5849), 426-430.
34. Beaulieu, J. M. and Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182-217.
35. Zürcher, S., Wäckerlin, D., Bethuel, Y., Malisova, B., Textor, M., Tosatti, S. and Gademann, K. (2006). Biomimetic surface modifications based on the cyanobacterial iron chelator anachelin. *Journal of the American Chemical Society*, 128(4), 1064-1065.
36. Ball, V., Del Frari, D., Toniazzo, V. and Ruch, D. (2012). Kinetics of polydopamine film deposition as a function of pH and dopamine concentration: Insights in the polydopamine deposition mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, 386(1), 366-372.
37. Waite, J. H. (2008). Surface chemistry: mussel power. *Nature Materials*, 7(1), 8.
38. Haslam, E. (1989). *Plant polyphenols: vegetable tannins revisited*. Sheffield: CUP Archive, 50-59.

39. Xiong, K., Qi, P., Yang, Y., Li, X., Qiu, H., Li, X. Beaulieu, J. and Huang, N. (2016). Facile immobilization of vascular endothelial growth factor on a tannic acid-functionalized plasma-polymerized allylamine coating rich in quinone groups. *Royal society of chemistry Advances*, 6(21), 17188-17195.
40. Atacan, K., Çakıroğlu, B. and Özacar, M. (2017). Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 148-155.
41. Atacan, K. and Özacar, M. (2015). Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 227-236.
42. Hegab, H. M., ElMekawy, A., Barclay, T. G., Micheltore, A., Zou, L., Saint, C. P. and Ginic-Markovic, M. (2016). Single-Step Assembly of Multifunctional Poly (tannic acid)-Graphene Oxide Coating To Reduce Biofouling of Forward Osmosis Membranes. *American Chemical Society, Applied Materials and Interfaces*, 8(27), 17519-17528.
43. Ejima, H., Richardson, J. J., Liang, K., Best, J. P., van Koeven, M. P., Such, G., K. Shinoda, Y. and Caruso, F. (2013). One-step assembly of coordination complexes for versatile film and particle engineering. *Science*, 341(6142), 154-157.
44. Sileika, T. S., Barrett, D. G., Zhang, R., Lau, K. H. A. and Messersmith, P. B. (2013). Colorless multifunctional coatings inspired by polyphenols found in tea, chocolate, and wine. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(41), 10766-10770.
45. Kohri, M., Kohma, H., Shinoda, Y., Yamauchi, M., Yagai, S., Kojima, T. Zhang, M. and Kishikawa, K. (2013). A colorless functional polydopamine thin layer as a basis for polymer capsules. *Polymer Chemistry*, 4(9), 2696-2702.
46. Durán, J. D. G., Arias, J. L., Gallardo, V. and Delgado, A. V. (2008). Magnetic colloids as drug vehicles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2948-2983.
47. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. and Kim, W. S. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(2), 023501.
48. Cornell, R. M., Schwertmann, U. (2003). *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. Darmstadt: John Wiley and Sons.
49. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L. and Muller, R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews*, 108(6), 2064-2110.
50. Sun, C., Lee, J. S. and Zhang, M. (2008). Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1252-1265.

51. Kumar, C. S. and Mohammad, F. (2011). Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(9), 789-808.
52. Huang, J., Han, B., Yue, W. and Yan, H. (2007). Magnetic polymer microspheres with polymer brushes and the immobilization of protein on the brushes. *Journal of Materials Chemistry*, 17(36), 3812-3818.
53. Rawal, R., Chawla, S. and Pundir, C. S. (2012). An electrochemical sulfite biosensor based on gold coated magnetic nanoparticles modified gold electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 31(1), 144-150.
54. Xu, J. K., Zhang, F. F., Sun, J. J., Sheng, J., Wang, F. and Sun, M. (2014). Bio and nanomaterials based on Fe₃O₄. *Molecules*, 19(12), 21506-21528.
55. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. and Kim, W. S. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(2), 359-379.
56. Viota, J. L., González-Caballero, F., Duran, J. D. G. and Delgado, A. V. (2007). Study of the colloidal stability of concentrated bimodal magnetic fluids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 309(1), 135-139.
57. Lee, J., Isobe, T. and Senna, M. (1996). Magnetic properties of ultrafine magnetite particles and their slurries prepared via in-situ precipitation. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 109, 121-127.
58. Mascolo, M. C., Pei, Y. and Ring, T. A. (2013). Room temperature co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different bases. *Materials*, 6(12), 5549-5567.
59. Salabaş, E. L., Rumplecker, A., Kleitz, F., Radu, F. and Schüth, F. (2006). Exchange anisotropy in nanocasted Co₃O₄ nanowires. *Nano Letters*, 6(12), 2977-2981.
60. Euliss, L. E., Grancharov, S. G., O'Brien, S., Deming, T. J., Stucky, G. D., Murray, C. B. and Held, G. A. (2003). Cooperative assembly of magnetic nanoparticles and block copolypeptides in aqueous media. *Nano Letters*, 3(11), 1489-1493.
61. Kobayashi, Y., Horie, M., Konno, M., Rodríguez-González, B. and Liz-Marzán, L. M. (2003). Preparation and properties of silica-coated cobalt nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(30), 7420-7425.
62. Lu, A. H., Li, W. C., Matoussevitch, N., Spliethoff, B., Bönnemann, H. and Schüth, F. (2005). Highly stable carbon-protected cobalt nanoparticles and graphite shells. *Chemical Communications*, 1, 98-100.
63. Jang, J. T., Nah, H., Lee, J. H., Moon, S. H., Kim, M. G. and Cheon, J. (2009). Critical enhancements of MRI contrast and hyperthermic effects by dopant-controlled magnetic nanoparticles. *Angewandte Chemie*, 121(7), 1260-1264.

64. Wooding, A., Kilner, M. and Lambrick, D. B. (1992). "Stripped" magnetic particles. Applications of the double surfactant layer principle in the preparation of water-based magnetic fluids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 149(1), 98-104.
65. Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in basic and acidic media. *The Institute of Electrical and Electronics Engineers Transactions on Magnetics*, 17(2), 1247-1248.
66. Sousa, M. H., Tourinho, F. A., Depeyrot, J., da Silva, G. J. and Lara, M. C. F. (2001). New electric double-layered magnetic fluids based on copper, nickel, and zinc ferrite nanostructures. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(6), 1168-1175.
67. Altun, S., Çakıroğlu, B., Özacar, M. and Özacar, M. (2015). A facile and effective immobilization of glucose oxidase on tannic acid modified CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 963-970.
68. Sahoo, Y., Pizem, H., Fried, T., Golodnitsky, D., Burstein, L., Sukenik, C. N. and Markovich, G. (2001). Alkyl phosphonate/phosphate coating on magnetite nanoparticles: a comparison with fatty acids. *Langmuir*, 17(25), 7907-7911.
69. Barratt, G. (2003). Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(1), 21-37.
70. Si, J. and Yang, H. (2011). Preparation and characterization of bio-compatible Fe₃O₄@ Polydopamine spheres with core/shell nanostructure. *Materials Chemistry and Physics*, 128(3), 519-524.
71. Colombo, M., Carregal-Romero, S., Casula, M. F., Gutiérrez, L., Morales, M. P., Böhm, I. B. and Parak, W. J. (2012). Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 41(11), 4306-4334.
72. Lartigue, L., Innocenti, C., Kalaivani, T., Awwad, A., Sanchez Duque, M. D. M., Guari, Y., Fried, T., and Arosio, P. (2011). Water-dispersible sugar-coated iron oxide nanoparticles. An evaluation of their relaxometric and magnetic hyperthermia properties. *Journal of the American Chemical Society*, 133(27), 10459-10472.
73. Weidner, A., Gräfe, C., Von der Lühe, M., Remmer, H., Clement, J. H., Eberbeck, D. and Dutz, S. (2015). Preparation of core-shell hybrid materials by producing a protein corona around magnetic nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 10(1), 282.
74. Thünemann, A. F., Schütt, D., Kaufner, L., Pison, U. and Möhwald, H. (2006). Maghemite nanoparticles protectively coated with poly (ethylene imine) and poly (ethylene oxide)-b block-poly (glutamic acid). *Langmuir*, 22(5), 2351-2357.
75. Ansari, S. A. and Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 512-523.
76. Anfinsen, C. B. (1972). The formation and stabilization of protein structure. *Biochemical Journal*, 128(4), 737.

77. Koeller, K. M. and Wong, C. H. (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature*, 409(6817), 232.
78. Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. and Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(6817), 258.
79. Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59(1), 1-41.
80. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. and Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-220.
81. Benkovic, S. J. and Hammes-Schiffer, S. (2003). A perspective on enzyme catalysis. *Science*, 301(5637), 1196-1202.
82. Yang, Y. and Gong, X. (2018). A new probability method to understand protein-protein interface formation mechanism at amino acid level. *Journal of Theoretical Biology*, 436, 18-25.
83. Koshland Jr, D. E. and Neet, K. E. (1968). The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 37(1), 359-411.
84. Buchachenko, A. L. and Kuznetsov, D. A. (2008). Magnetic field affects enzymatic ATP synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 130(39), 12868-12869.
85. Hwang, E. T. and Gu, M. B. (2013). Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Engineering in Life Sciences*, 13(1), 49-61.
86. Illanes, A., Cauwerhff, A., Wilson, L. and Castro, G. R. (2012). Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, 115, 48-57.
87. Iyer, P. V., Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10), 1019-1032.
88. Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409(6817), 241.
89. DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A. J. and Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6437-6474.
90. Ahmad, R. and Sardar, M. (2015). Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 4(2), 1.
91. Nisha, S., Karthick, A. S. and Gobi, N. (2012). A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chemical Science Review and Letters*, 1(3), 148-155.
92. Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349(8-9), 1289-1307.

93. Kukreja, S., Priya, S., Bhondekar, S., Verma, N., Jain, S., Golchha, A. and Agrawal, M. (2017). Underlining some important aspects behind the role of enzyme immobilization in pharmaceutical technology. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(4), 1197.
94. Zhou, Z. and Hartmann, M. (2013). Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3894-3912.
95. Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. and Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology*, 6(4), 185-205.
96. Norouzian, D. (2003). Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology. *Iranian Journal of Biotechnology*, 1(4), 197-206.
97. Khan, A. A. and Alzohairy, M. A. (2010). Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. *Research Journal of Biological Sciences*, 5(8), 565-575.
98. Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. and Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 353(16), 2885-2904.
99. Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349(8-9), 1289-1307.
100. Balcão, V. M., Paiva, A. L. and Malcata, F. X. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(6), 392-416.
101. Veum, L. and Hanefeld, U. (2006). Carrier enabled catalytic reaction cascades. *Chemical Communications*, 8, 825-831.
102. Katchalski-Katzir, E. and Kraemer, D. M. (2000). Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1-3), 157-176.
103. Soleimani, M., Khani, A. and Najafzadeh, K. (2012). α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1-2), 1-5.
104. Öztürk, B. (2001). *Immobilization of lipase from Candida rugosa on hydrophobic and hydrophilic supports*. Master's thesis, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir.
105. Bryjak, J., Liesiene, J. and Kolarz, B. N. (2008). Application and properties of butyl acrylate/pentaerythrite triacrylate copolymers and cellulose-based Granocel as carriers for trypsin immobilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61(1), 66-74.
106. Gardossi, L., Poulsen, P. B., Ballesteros, A., Hult, K., Švedas, V. K., Vasić-Rački, Đ. and Halling, P. J. (2010). Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. *Trends in Biotechnology*, 28(4), 171-180.

107. Thapa, B. R. and Walia, A. (2007). Liver function tests and their interpretation. *The Indian Journal of Pediatrics*, 74(7), 663-671.
108. Rehm, J., Samokhvalov, A. V. and Shield, K. D. (2013). Global burden of alcoholic liver diseases. *Journal of Hepatology*, 59(1), 160-168.
109. World Health Organization. (2015). *Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Third who report on neglected tropical diseases*. Cenevre: World Health Organization, 56-66.
110. Brannigan, J. A., Dodson, G., Duggleby, H. J., Moody, P. C., Smith, J. L., Tomchick, D. R. and Murzin, A. G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*, 378(6555), 416.
111. Suzuki, H., Yamada, C. and Kato, K. (2007). γ -Glutamyl compounds and their enzymatic production using bacterial γ -glutamyltranspeptidase. *Amino Acids*, 32(3), 333-340.
112. Suzuki, H., Hashimoto, W. and Kumagai, H. (1999). Glutathione metabolism in *Escherichia coli* 1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6(3), 175-184.
113. Suzuki, H., Yamada, C. and Kato, K. (2007). γ -Glutamyl compounds and their enzymatic production using bacterial γ -glutamyltranspeptidase. *Amino Acids*, 32(3), 333-340.
114. Foyer, C. H. and Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866-1875.
115. Sakai, H., Sakabe, N., Sasaki, K., Hashimoto, W., Suzuki, H., Tachi, H. Kato, K. and Sakabe, K. (1996). A preliminary description of the crystal structure of γ -glutamyltranspeptidase from *E. coli* K-12. *The Journal of Biochemistry*, 120(1), 26-28.
116. Rajpert-De Meyts, E., Heisterkamp, N. and Groffen, J. (1988). Cloning and nucleotide sequence of human gamma-glutamyl transpeptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(23), 8840-8844.
117. Hanigan, M. H. (2014). Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance. *Advances in Cancer Research*, 122, 103-141.
118. Grinberg, I., West, D. V., Torres, M., Gou, G., Stein, D. M., Wu, L. and Spanier, J. E. (2013). Perovskite oxides for visible-light-absorbing ferroelectric and photovoltaic materials. *Nature*, 503(7477), 509.
119. Martin, M. N. and Slovin, J. P. (2000). Purified γ -Glutamyl Transpeptidases from Tomato Exhibit High Affinity for Glutathione and GlutathioneS-Conjugates. *Plant Physiology*, 122(4), 1417-1426.

120. Dominici, S., Valentini, M., Maellaro, E., Del Bello, B., Paolicchi, A., Lorenzini, E. and Pompella, A. (1999). Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: the role of γ -glutamyl transpeptidase-dependent H₂O₂ production and S-thiolation. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5-6), 623-635.
121. Dufour, D. R., Lott, J. A., Nolte, F. S., Gretch, D. R., Koff, R. S. and Seeff, L. B. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clinical Chemistry*, 46(12), 2027-2049.
122. Szasz, G. (1976). Reaction-rate method for gamma-glutamyltransferase activity in serum. *Clinical Chemistry*, 22(12), 2051-2055.
123. Magro, M., Bonaiuto, E., Baratella, D., de Almeida Roger, J., Jakubec, P., Corraducci, V. and Vianello, F. (2016). Electrocatalytic nanostructured ferric tannates: characterization and application of a polyphenol nanosensor. *Chemical physics and physical chemistry*, 17(20), 3196-3203.
124. Shin, Y. M., Lee, Y. B., Kim, S. J., Kang, J. K., Park, J. C., Jang, W. and Shin, H. (2012). Mussel-inspired immobilization of vascular endothelial growth factor (VEGF) for enhanced endothelialization of vascular grafts. *Biomacromolecules*, 13(7), 2020-2028.
125. Yang, Z., Wu, J., Wang, X., Wang, J. and Huang, N. (2012). Inspired Chemistry for a Simple but Highly Effective Immobilization of Vascular Endothelial Growth Factor on Gallic Acid-functionalized Plasma Polymerized Film. *Plasma Processes and Polymers*, 9(7), 718-725.
126. Waldron, R. D. (1955). Infrared spectra of ferrites. *Physical Review*, 99(6), 1727.
127. Rajh, T., Chen, L. X., Lukas, K., Liu, T., Thurnauer, M. C. and Tiede, D. M. (2002). Surface restructuring of nanoparticles: an efficient route for ligand– metal oxide crosstalk. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(41), 10543-10552.
128. Cornell, R. M. and Schwertmann, U. (2003). *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. Valparaíso: John Wiley and Sons.
129. Atacan, K., Çakıroğlu, B. and Özacar, M. (2017). Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 148-155.
130. Garro, J. M., Fechtal, M. and Riedl, B. (1996). Gallic acid as a model of tannins in condensation with formaldehyde. *Thermochimica Acta*, 274, 149-163.
131. Araujo, P. Z., Morando, P. J. and Blesa, M. A. (2005). Interaction of catechol and gallic acid with titanium dioxide in aqueous suspensions. 1. Equilibrium studies. *Langmuir*, 21(8), 3470-3474.
132. Holopainen, T., Alvila, L., Rainio, J. and Pakkanen, T. T. (1998). IR spectroscopy as a quantitative and predictive analysis method of phenol–formaldehyde resol resins. *Journal of Applied Polymer Science*, 69(11), 2175-2185.

133. Pantoja-Castro, M. A. and González-Rodríguez, H. (2011). Study by infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis of tannins and tannic acid. *Revista Latinoamericana de Química*, 39(3), 107-112.
134. David, S. T. and Priyadharsini, J. P. (2015). Schiff base ligand its complexes and their FT-IR spectroscopy Studies. *International Journal on Applied Bioengineering*, 9(1), 3524-3539.
135. Özacar, M., Şengil, İ. A. and Türkmenler, H. (2008). Equilibrium and kinetic data, and adsorption mechanism for adsorption of lead onto valonia tannin resin. *Chemical Engineering Journal*, 143(1-3), 32-42.
136. Mahdavi, M., Ahmad, M. B., Haron, M. J., Namvar, F., Nadi, B., Rahman, M. Z. A. and Amin, J. (2013). Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Molecules*, 18(7), 7533-7548.
137. Šulek, F., Drofenik, M., Habulin, M. and Knez, Ž. (2010). Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 322(2), 179-185.
138. Juang, T. Y., Kan, S. J., Chen, Y. Y., Tsai, Y. L., Lin, M. G. and Lin, L. L. (2014). Surface-functionalized hyperbranched poly (amido acid) magnetic nanocarriers for covalent immobilization of a bacterial γ -glutamyltranspeptidase. *Molecules*, 19(4), 4997-5012.
139. Lin, Z., Xiao, Y., Wang, L., Yin, Y., Zheng, J., Yang, H. and Chen, G. (2014). Facile synthesis of enzyme–inorganic hybrid nanoflowers and their application as an immobilized trypsin reactor for highly efficient protein digestion. *Royal society of chemistry Advances*, 4(27), 13888-13891.
140. DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A. J. and Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6437-6474.
141. Huang, C. L., Cheng, W. C., Yang, J. C., Chi, M. C., Chen, J. H., Lin, H. P. and Lin, L. L. (2010). Preparation of carboxylated magnetic particles for the efficient immobilization of C-terminally lysine-tagged *Bacillus stearothermophilus* aminopeptidase II. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(7), 717-725.
142. Hu, B., Pan, J., Yu, H. L., Liu, J. W., and Xu, J. H. (2009). Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate. *Process Biochemistry*, 44(9), 1019-1024.
143. Zhu, Y. T., Ren, X. Y., Liu, Y. M., Wei, Y., Qing, L. S. and Liao, X. (2014). Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: characterization and application for enzymatic inhibition assays. *Materials Science and Engineering*, 38(2), 278-285.

144. Krogsgaard, M., Andersen, A. and Birkedal, H. (2014). Gels and threads: mussel-inspired one-pot route to advanced responsive materials. *Chemical Communications*, 50(87), 13278-13281.
145. Xiong, K., Qi, P., Yang, Y., Li, X., Qiu, H., Li, X. and Huang, N. (2016). Facile immobilization of vascular endothelial growth factor on a tannic acid-functionalized plasma-polymerized allylamine coating rich in quinone groups. *Royal society of chemistry Advances*, 6(21), 17188-17195.
146. Ansari, S. A. and Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 512-523.
147. Medintz, I. (2006). Universal tools for biomolecular attachment to surfaces. *Nature Materials*, 5(11), 842.
148. Ding, S., Cargill, A. A., Medintz, I. L. and Claussen, J. C. (2015). Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation. *Current Opinion in Biotechnology*, 34, 242-250.
149. Ghasemi, S., Heidary, M., Faramarzi, M. A. and Habibi, Z. (2014). Immobilization of lipase on Fe₃O₄/ZnO core/shell magnetic nanoparticles and catalysis of Michael-type addition to chalcone derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 100, 121-128.
150. Cipolatti, E. P., Silva, M. J. A., Klein, M., Feddern, V., Feltes, M. M. C., Oliveira, J. V. and de Oliveira, D. (2014). Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 99, 56-67.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : JEHAD, Daana
 Uyuğu : Filistin
 Doğum Tarihi ve yeri : 06.08.1993, Hebron
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (551) 112 91 72
 e-mail : jdaanat@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya	Devam ediyor
Lisans	Hebron Universty	2015
Lise	Al-Husayin High School	2011

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
-	-	-

Yabancı Dil

İngilizce, İbranca, Türkçe

Yayınlar

Jehad, D., Turan, E. and Tümtürk, H. (2018). *Covalent immobilization of γ -glutamyl transpeptidase on tannic acid modified magnetic nanoparticles*. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 12),78, Ankara University, Ankara.

Hobiler

Şiir, Spor, Seyahat etmek.



GAZİ GELECEKTİR..