

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER DAMGALAMA YÖNTEMİ İLE
ASETİLKOLİN ESTERAZ ENZİMİNİN (AChE)
İMMOBİLİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÖKHAN DEMİRCİ

EKİM 2013
MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER DAMGALAMA YÖNTEMİ İLE
ASETİLKOLİN ESTERAZ ENZİMİNİN (AChE)
İMMOBİLİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÖKHAN DEMİRCİ

EKİM 2013
MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

GÖKHAN DEMİRCİ tarafından hazırlanan **MOLEKÜLER DAMGALAMA YÖNTEMİ İLE ASETİLKOLİN ESTERAZ (AChE) ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU** başlıklı tezinin, 28.10.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Doç. Dr. İbrahim KULA (Jüri Başkanı)

Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Mustafa TEKE (Danışman)

Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

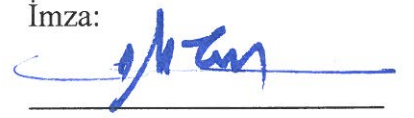
Yrd. Doç. Dr. Mahmut YILDIZTEKİN(Üye)

Köyceğiz Meslek Yüksekokulu,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

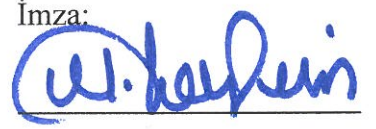
İmza:



İmza:



İmza:



ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Gül Asiye AYÇIK ✓

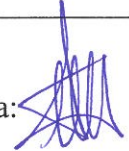
~~Doç. Dr. G. ANIK~~

Kimya Anabilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Mustafa TEKE

Danışman, Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



İmza:



Savunma Tarihi: 28.10.2013

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Gökhan DEMİRCİ

09/10/2013



ÖZET

MOLEKÜLER DAMGALAMA YÖNTEMİ İLE ASETİLKOLİN ESTERAZ (AChE) ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU

Gökhan DEMİRCİ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa TEKE

Ekim 2013, 54 Sayfa

Bu çalışmada, öncelikle asetilkolin esterase enziminin substratı olan asetilkolini dispersiyon polimerizasyon yöntemiyle moleküler damgalı polimeri üretildi. Ardından, enzim iki yöntem kullanılarak immobilize edildi. Bunlardan ilki enzimin asetilkolinin polimerden desorpsiyonu sonrası immobilizasyonu (Yöntem A), ikincisi ise enzimin asetilkolinin polimerden desorpsiyonu yapılmadan immobilizasyonu (Yöntem B) ve son olarak asetilkolinsiz polimere immobilizasyonu (Kör) gerçekleştirildi. Yöntem A ile daha iyi sonuç elde edildi.

Dispersiyon polimerizasyonu yönteminde, metakrilik asit (MAA), N,N'-dimetilenbisakrilamid (NBMA), amonyum persülfat (APS), saf su ve asetilkolin klorür (AChCl) sırasıyla; monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı, çözücü ve kalıp molekül olarak kullanıldı.

İmmobilizasyon yönteminin uygulanması öncesinde, AChCl'ün maksimum desorpsiyonunu belirlemek için en uygun pH ortamı araştırıldı. Bu amaçla, pH 2.0-10.0 arasında sitrat, asetat, fosfat ve tris-HCl tamponları kullanıldı. En iyi desorpsiyon verimine pH 2'de ulaşıldı.

Desorpsiyonu yapılmış moleküler damgalı polimere, asetilkolin esterase enziminin immobilizasyonunda, enzim derişimini optimize etmek için, 5.10^{-4} - 25.10^{-4} mg/ml aralığında enzim derişimleri kullanıldı. En uygun aktivite değeri, 5.10^{-4} mg/ml olarak bulundu. Hazırlanan polimerin morfolojik yapılarını değerlendirmek için, asetilkolin esterase immobilizasyonu öncesi ve sonrası TEM (Transmission electron microscopy) görüntüleri alındı.

İkinci bölümde immobilize enzim sisteminin optimizasyonu ve karakterizasyonun özelliklerini belirlemek amacıyla optimum sıcaklık (25-65°C), optimum pH (3-10), termal kararlılık (4-70°C), pH kararlılığı (4-9), tekrar kullanılabilirlik ve kinetik parametrelerin belirlenmesi deneyleri yapıldı.

Sonuç olarak, asetilkolin esterase enzimi, moleküler damgalanmış polimere başarıyla immobilize edildi.

Anahtar Kelimeler: İmmobilizasyon, Asetilkolin Esteraz, Moleküler Damgalanmış Polimer, Adsorpsiyon, Dispersiyon Polimerizasyonu

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF ACETYLCHOLINE ESTERASE (AChE) BY MOLECULARLY IMPRINTING METHOD

Gökhan DEMİRCİ

Mgr. Thesis

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa TEKE

October 2013, 54 pages

In this study, firstly, molecular imprinted polymer was produced by via dispersion polymerization by materials which include acetylcholine substrat of acetylcholinesterase. Then, the enzyme was immobilized onto this polymer by using two different methods. The first of these is immobilization of acetylcholinesterase onto this polymer after desorption (Method A), the second one is immobilization of acetylcholinesterase onto this polymer without desorption (Method B) and the last one is immobilization of acetylcholinesterase onto polymer which without acetylcholine (Blank). Better result was obtained with Method A.

In the dispersion polymerization method, methacrylic acid (MAA), N,N'-dimethylenebisacrilamid (NBMA), ammonium persulfate (APS), pure water and acetylcholinchloride (AChCl) were used as a monomer, crosslinker, initiator, solvent and template, respectively.

Before applying immobilization method, optimal pH environment was researched for determining maximum desorption of AChCl. For this purpose, citrate, acetate, phosphate and tris-HCl buffer in between pH 2.0-10.0 was used. The best desorption yield was found at pH 2.

We used in different enzyme concentrations which change between 5.10^{-4} - 25.10^{-4} mg/ml to molecular imprinted polymer which made desorption in immobilization of acetylcholinesterase enzyme, for finding optimal enzyme amount. The best yield was found as 5.10^{-4} mg/ml. TEM (Transmission electron microscopy) results were taken before and after immobilization of acetylcholinesterase for assessment morphological structure of polymer which prepared.

In second part, were done experiments which include optimum temperature (25-65°C), optimum pH (3-10), thermal stability (4-70°C), pH stability (4-9), reusability for characterization of immobilize enzyme system.

As result, we immobilized to acetylcholinesterase on molecularly imprinted polymer successfully.

Keywords: Immobilization, Acetylcholine Esterase, Molecularly Imprinted Polymer, Adsorption, Solid Phase Extraction

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde büyük emeği bulunan, tez konusunun hazırlanması ve araştırmaların yürütülmesinde her türlü bilgi ve deneyimleriyle bana yön veren değerli hocam Doç. Dr. Mustafa TEKE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Arş. Gör. Yasemin İSPİRLİ DOĞAÇ'a, cihaz anlamında her türlü yardımı yapan Organik Kimya ve Mikrobiyoloji Laboratuvarları'na yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen canım aileme ve özellikle bugüne kadar her zaman maddi ve manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olan abim Hakan DEMİRCİ'ye, lisans ve yüksek lisans dönemlerimde bana yoldaşlık eden arkadaşlarıma gösterdikleri sabır ve anlayıştan ötürü teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, BAP-12/119 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	1
1.2. Kaynak Özetleri	2
1.2.1. Enzim İmmobilizasyonu	2
1.2.1.1. Taşıyıcılı immobilize enzim sistemleri.....	3
1.2.1.2. Suda çözünmeyen taşıyıcıya bağlama yöntemleri.....	4
1.2.1.3. Suda Çözünen Enzim İmmobilizasyonu.....	8
1.2.2. İmmobilize enzimlerin kullanım alanları.....	8
1.2.3. Moleküler Damgalama Yöntemi.....	10
1.2.3.1. Moleküler Damgalamanın Bileşenleri.....	11
1.2.3.2. Moleküler Damgalama Prosedürleri.....	15
1.2.4. Moleküler Damgalı Polimerlerin Kullanım Alanları.....	18
1.2.4.1. Katı faz ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction:SPE).....	18
1.2.4.2. Sensörler.....	19
1.2.5. Enzimler.....	20
1.2.5.1 Enzimlerin yapısı.....	20
1.2.5.2 Enzimlerin sınıflandırılması.....	21
1.2.5.3 Enzimlerin kullanım alanları.....	21
1.2.5.4 Enzimlerin çalışması.....	22
1.2.5.5 Enzim kinetiği.....	23
1.2.5.6. Enzim inhibisyonu.....	26
1.2.5.7 Enzim aktivitesini etkileyen faktörler.....	27
1.2.5.8 Asetilkolin esterase (AChE).....	29
2.MALZEME VE YÖNTEM.....	31
2.1. Malzemeler.....	31

2.1.1. Kimyasal Maddeler.....	31
2.1.2. Cihazlar.....	31
2.2. Moleküler Damgalama Yöntemi ile Asetilkolin Esteraz Enziminin İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu.....	31
2.2.1. Moleküler Damgalı Polimer Sentezi.....	31
2.2.2. Moleküler Damgalı Polimerlerin Desorpsiyonu.....	32
2.2.3. Moleküler Damgalı Polimerlere Enzim İmmobilizasyonu.....	32
2.2.4. İmmobilize Enzim-Polimer Sistemi ve Polimerin TEM Analizi....	32
2.3. Asetilkolin Esteraz Enziminin Aktivite Tayini.....	32
2.4. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	34
2.5.Enzim Derişiminin Enzim İmmobilizasyonuna Etkisinin Belirlenmesi..	34
2.6. İmmobilize enzimin karakterizasyonu.....	35
2.6.1. <i>Optimum Sıcaklık</i>	35
2.6.2. <i>Optimum pH</i>	35
2.6.3. <i>Termal Kararlılık</i>	35
2.6.4. <i>pH Kararlılığı</i>	35
2.6.5. <i>Tekrar kullanılabilirlik</i>	36
2.6.6. <i>Kinetik parametrelerin belirlenmesi</i>	36
2.6.7. <i>Operasyonel Kararlılık</i>	36
3.BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
3.1. Farklı pH’larda tampon çözeltiler kullanılarak maksimum desorpsiyon tayini ve enzim immobilizasyonunun optimizasyonu (Yöntem A).....	37
3.2. ACh damgalı (desorpsiyonsuz) polimerlerde enzim immobilizasyonunun optimizasyonu Yöntem B).....	38
3.3. Enzim miktarının optimizasyonu.....	39
3.4. İmmobilize Enzim-Polimer Sisteminin (Yöntem A) ve asetilkolinsiz polimerin (Kör) TEM Analizleri.....	40
3.5. Karakterizasyon Çalışmaları.....	40
3.5.1. Optimum Sıcaklık.....	41
3.5.2.Optimum pH.....	41
3.5.3. Termal Kararlılık.....	42
3.5.4. pH Kararlılığı.....	43
3.5.5.Tekrar kullanılabilirlik.....	44
3.5.6. Kinetik parametrelerin belirlenmesi.....	45

3.5.7. Operasyonel Kararlılık.....	47
4.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge No.	Sayfa No.
1.1. Taşıyıcılı enzim sistemlerinde kullanılan bazı maddeler.....	4
1.2. MIP-Sensör Uygulamaları.....	19
1.3. Enzimlerin sınıflandırılması.....	21
2.1. Aktivite tayini için yöntem bileşenleri	33
2.2. Protein tayini için Bradford yöntemi miktarları.....	34
3.1.Farklı pH'larda yapılan desorpsiyondan sonra enzim immobilizasyonu.....	37
3.2. Desorpsiyon yapılmadan ACh'li ve Kör polimere enzim immobilizasyonu.....	38
3.3.Enzim optimizasyonu için kullanılan miktarlar ve aktivite sonuçları.....	39
3.4.Serbest ve immobilize enzime ait Km ve Vm değerleri.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No.	Sayfa No.
1.1.Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.....	3
1.2. Enzimlerin taşıyıcıya bağlanabileceği fonksiyonel gruplar.....	5
1.3.Molekül damgalama yönteminin şematik gösterimi.....	10
1.4.Moleküler damgalamada sıkça kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	13
1.5.Moleküler damgalamada sıkça kullanılan inisiyatörler.....	13
1.6.Boronat esterleriyle kovalent damgalama yönteminin şematik gösterimi.....	16
1.7.Hidralazin molekülünün non-kovalent damgalanmasının şematik gösterimi.....	17
1.8. Vanilin molekülünün yarı kovalent bağlanma yöntemiyle moleküler damgalanmasının şematik gösterimi.....	18
1.9. Anahtar-kilit modelinin şematik gösterimi.....	22
1.10.İndüklenmiş uyum modelinin şematik gösterimi.....	23
1.11. Substrat derişiminin tepkime hızına etkisi.....	24
1.12. AChE enziminin asetilkolinle etkileşimi.....	29
1.13. AChE enziminin X-Ray görüntüsü.....	30
3.1. Polimer (a) ve İmmobilize Enzim – Polimer (b) sistemlerinin TEM görüntüleri.....	40
3.2. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi	41
3.3. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine pH etkisi	42
3.4. İmmobilize ve serbest enzimin termal kararlılığının belirlenmesi.....	43
3.5. İmmobilize ve serbest enzimin pH kararlılığının belirlenmesi	44
3.6. Tekrar kullanılabilirlik tayini.....	45
3.7. Serbest enzimin Lineweaver-Burk diyagramı.....	46

KISALTMALAR DİZİNİ

MAA	Metakrilik Asit
NMBA	N,N' dimetilenbisakrilamid
APS	Amonyum Persülfat
ACh	Asetilkolin
AChI	Asetilkolin İyodür (AcetylCholine Iodide)
AChE	Asetilkolin Esteraz (AcetylCholine Esterase)
MIP	Moleküler Damgalı Polimer (Molecularly Imprinted Polymer)
NIP	Moleküler Damgalanmamış Polimer (Non-Imprinted Polymer)
TEM	Geçirimli elektron mikroskopu (Transmission electron microscopy)
U	Units
UV	Ultraviyole
mL	Mililitre
°C	Santigrat derece
mg	Miligram
µg	Mikrogram
M	Molarite
µL	Mikrolitre

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Asetilkolinesteraz enzimi sinaptik boşluklardaki asetilkolini asetat ve koline parçalayarak inaktive eden enzimdir. Eğer sinaptik boşluklardaki asetilkolin çok fazla inaktive edilirse sinir iletimi kesilir ve kişide Alzheimer hastalığı görülür. Asetilkolinesteraz enzimi Alzheimer tedavisinde, biyosensör olarak, inhibitörlerinin bulunmasında, tarımda kullanılan böcek ilaçlarının ve diğer maddelerin miktarının belirlenmesi, tarım ilaçlarının belirlenmesi başta olmak üzere birçok kullanım alanı olan önemli bir enzimdir. Ayrıca asetilkolinesteraz enzimi, vücutta merkezi ve periferik, kolinerjik ve adrenerjik, sinir ve kas dokusunda, eritrositlerde ve plasental dokuda bulunmaktadır. (Melanson vd. ,1985)

Enzim immobilizasyonu, suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen moleküllerin suda çözünmeyen reaktif polimer taşıyıcıya kovalent bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorblanarak, bifonksiyonel reaktifler ile çapraz bağlanarak ve polimer matrikste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketin sınırlandırılması olayına denir.

(Topçular, 2005)

Günümüzde yapılan immobilizasyon tekniklerine ek olarak yapılan araştırmalarda moleküler damgalanmış enzim immobilizasyonu yeni yeni kendine yer bulmaya başlamıştır. Bu çalışmada, moleküler damgalanmış enzim immobilizasyonu yöntemini kullanarak asetilkolinesteraz enziminin substratını dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle polimere damgalamak; daha sonra substratı ortamdaki desorbe ederek; asetilkolin esteraz enziminin de içinde bulunduğu karışıma ilave ederek ortamdaki enzimi hem ACh damgalı hem de ACh desorpsiyonlu polimere immobilize etmek amaçlandı ve kullanılacak olan parametreleri değiştirerek en uygun ortamı sağlamak ve buna bağlı olarak en uygun immobilizasyon şartlarını oluşturmak hedeflendi.

Asetilkolinesteraz enzimini dispersiyon polimerizasyon yönteminden faydalanarak substrat damgalanmış enzim immobilizasyonu yöntemiyle immobilize ederek enzimin kullanım alanına yönelik yapılacak çalışmalara model olması amaçlandı.

1.2. Kaynak Özetleri

1.2.1. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimlerin teknik kimya ve biyoteknolojide kullanılmaya başladığından beri üretimlerinin ekonomik ve kullanışlı hale getirilmesi için araştırmalar artmıştır.

Enzimlerin kaynak sorunu mikrobiyal organizmalarla çözülsün bile izolasyonu ve saflaştırılması zor olduğundan hala bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

Endüstriyel uygulamaların büyük bir kısmı sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden dolayı kullanılan serbest enzimin geri kazanımı mümkün olmamakla birlikte reaksiyon kontrolü kolaylıkla sağlanamamaktadır. Ayrıca reaksiyonu durdurabilmek için inhibitör kullanılsa bile bu seferde ortamın kirliliği artacaktır. Katalizde kullanılan serbest enzimi aktivitesi azalmadan bulunduğu ortamdan uzaklaştırmak mümkün olmadığından, yüksek maliyete neden olmaktadır. Ayrıca serbest enzimler sürekli enzim sistemlerinde kullanılamamaktadır (Telefoncu, 1997).

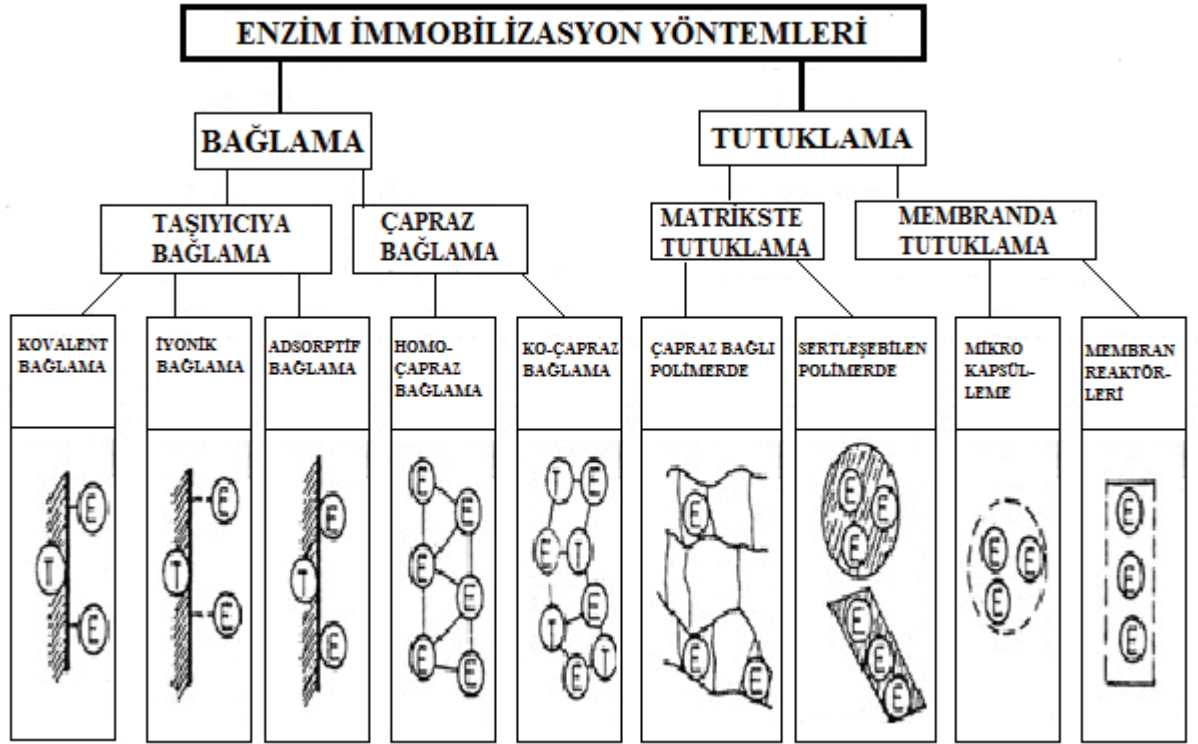
Tüm bu sorunları çözmek ve enzimleri endüstri alanında daha yaygın hale getirmek için enzim immobilizasyonu alanında büyük bir gelişim görülmektedir.

İmmobilizasyon, suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen moleküllerin, suda çözünmeyen reaktif polimer taşıyıcıya kovalent bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorblanarak bifonksiyonel reaktifler ile çapraz bağlanarak ve polimer matrikste yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketinin sınırlandırılması olayına denir.

Enzimlerin immobilize edilerek kullanılmasının avantajlarını sıralayacak olursak;

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirlenmesi gibi bir problem yaşanmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vs.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.

- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulur.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha fazla aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendini parçalaması (otoliz, kendini sindirme) olasılığı azdır.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.



Şekil 1.1: Önemli enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi (Telefoncu, 1997)

İmmobilizasyon teknikleri taşıyıcılı immobilizasyon ve taşıyıcısız immobilizasyon olarak 2 ana başlık altında karşımıza çıkmaktadır.

1.2.1.1 Taşıyıcılı İmmobilize Enzim Sistemleri

Birçok organik ve inorganik maddeler enzim immobilizasyonu için kullanılmaktadır. Ancak taşıyıcılı enzim immobilizasyonunda kullanılmak istenen maddelerde aranması gereken bazı nitelikler vardır. Bunları sıralayacak olursak;

- Hidrofilik karakter
- Suda çözünmeme

- Gözenekli yapı
- Mekanik stabilite ve uygun partikül formu
- Kimyasal ve termal stabilite
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik
- Ucuzluk
- Zehirsizlik
- Rejenere olabilme

gibi özellikler verilebilir. Taşıyıcılı enzim sistemlerinde kullanılan bazı maddeler Çizelge 1.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1: Taşıyıcılı enzim sistemlerinde kullanılan bazı maddeler

ANORGANİK	ORGANİK	SENTETİK POLİMERLER
KİL, CAM	SELÜLOZ	POLİSTİREN TÜREVLERİ
SİLİKAJEL	NİŞASTA	POLİAKRİLAMİD
BENTONİT	AGAROS	NAYLON
POMZA TAŞI	JELATİN	İYON DEĞİŞTİRİCİ REÇİNELER
AKTİF KARBON	KİTİN VE KİTOSAN	OKSİRANLAR

Biyolojik moleküllerin taşıyıcıya immobilize edilmesini temel olarak 3 ana grupta inceleyebiliriz. Bunlar ;

- Suda çözünmeyen taşıyıcıya bağlama yöntemleri
- Çapraz bağlanma yöntemleri
- Tutuklama yöntemleri

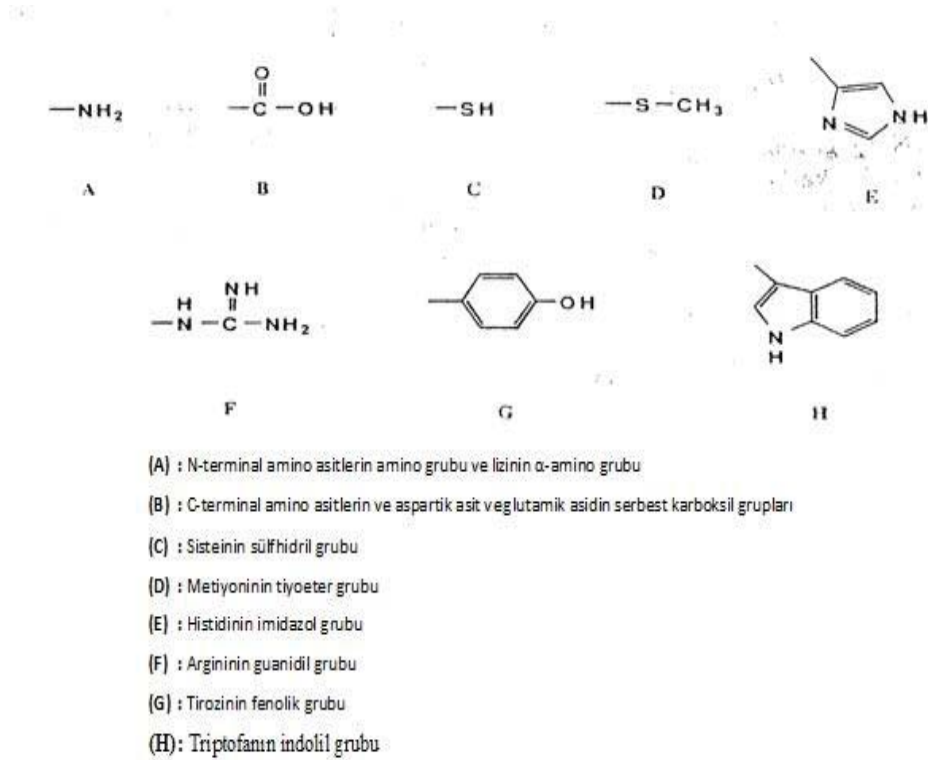
1.2.1.2. Suda Çözünmeyen Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Suda çözünmeyen immobilize polimerler kullanılacak olan biyomolekül (enzim) ile fonksiyonel monomerlerin fonksiyonel gruplar, iyonik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler veya adsorpsiyon ile bağlanmasıyla oluşurlar. Taşıyıcının yapısı ile molekül miktarı veya immobilizasyon sonrası enzim aktivitesi doğrudan bağlantılıdır. Bu nedenle taşıyıcıda taşıyıcı büyüklüğü, toplam yüzey alanı, hidrofilik

ve hidrofobik grupların oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşiminin uygun oranlarda seçilmesi çok önemlidir.

Kovalent Bağlama

Enzimleri immobilize ederken genellikle sulu ortamda ve enzimin yan grupları ile taşıyıcı arasında kovalent bağlanması tercih edilmektedir. Ancak bu işlem yapılırken dikkat edilmesi gereken en büyük özellik taşıyıcının kovalent olarak bağlanacağı enzim bölgelerinin aktif merkezde kullanılan yan gruplarla etkileşime girmemesini sağlamak ve enzimin aktif bölgesini sterik olarak etkileyecek yerlerden farklı yerlere bağlanmasıdır. Bu nedenle de enzim immobilizasyonu yaparken aktif merkezi koruyacak şekilde başka bir reaktif kullanılması gerekmektedir (yarışmalı inhibitörler gibi). Enzimlerin taşıyıcıya bağlanabileceği fonksiyonel gruplar aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 1.2.: Enzimlerin taşıyıcıya bağlanabileceği fonksiyonel gruplar (Telefoncu, 1997)

Adsorpsiyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski yöntemdir. Bu yöntem yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanması sonucunda oluşturulur. Burada olan en büyük etkileşim Van Der Waals etkileşimleridir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, kalsiyum karbonat, kül, silikajel ve bentonittir.

Bir enzimin adsorpsiyonu; pH, çözgen, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere çok bağımlıdır. Adsorpsiyon işleminin mekanizması genellikle çok karışık olup, birçok olasılıktan hangisinin gerçekleşeceğini önceden saptanması çok güçtür.

Adsorpsiyon yönteminin avantajları; enzim immobilizasyonu işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına imkan sağlamasıdır.

Yöntemin dezavantajları ise şunlardır: Her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçmekte ve ürünlerin kirlenmesine neden olmaktadır (Flor ve Hayashida, 1983).

İyonik Bağlama

İyon değiştirici özelliğı bulunan ve suda çözünmeyen maddelerin kullanıldığı yöntemdir.

Bu yöntemde ortam koşulları yumuşak olduğundan aktif merkezin etkilenmemesi gibi bir avantaj sağlarken oluşan bağın kuvvetli olmamasından dolayı da enzim kaçıışı gibi bir dezavantaj yaratmaktadır.

Biyospesifik Bağlama

Bu yöntemde; enzimlerin antikorlar ve lektinler ile birbirlerine biyospesifik olarak bağlanma özelliklerinden yararlanılmaktadır. Ancak bu proseslerin maliyetleri yüksek olmaktadır. Bu nedenle Cajanus Cajan lektin ile Seronose 4B ile kovalent bağ oluşturularak ligand elde edilmiş ve invertaz enziminin immobilizasyonu için kullanılmıştır. Ayrıca lektinler glikoenzimlerin (invertaz, glukoamilaz ve glukoz oksidaz) immobilizasyonu ve stabilizasyonunda kullanılmaktadır (Ahmad vd., 2001).

Çapraz Bağlama Yöntemleri

Birden fazla fonksiyonel grupların büyük moleküller arasında bağ yapması ile suda çözünmeyen kompleksler oluşmasına dayanan yöntemdir. Çapraz bağlama yöntemi ile başarılı bir immobilizasyon yapabilmek için önemli olan enzim ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ve pH gibi parametrelerdir. Bu yöntemde moleküller arası çapraz bağlanmanın yanı sıra molekül içi bağlanmalar da gerçekleşmektedir. (Quioco ve Richards, 1964).

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri:

- Glutaraldehit
- Klorformat
- Karbonildiimidazol
- Bioksiranlar
- P-benzokinon
- Epiklorhidrinler

Tutuklama Yöntemleri

Prensip olarak tutuklama yöntemi enzim molekülünü herhangi bir fiziksel yada kimyasal bağlanma olmadan belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz ancak enzimin substratı, inhibitörü veya oluşan ürün yapılan tutuklama işleminden sonra kolaylıkla giriş/çıkış yapabilir. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir.

Tutuklama işlemi genel olarak 2 farklı yolla ifade edilebilir:

- 1- Polimer matrikste tutuklama
- 2- Mikrokapsülleme

Polimer Matrikste Tutuklama

Yüksek oranda çapraz bağlayıcının ve polimerizasyonu oluşturan maddelerin bulunduğu ortam ile enzim çözeltisinin birleştirilmesi sonucu enzim moleküllerinin çapraz bağlanmayla oluşan polimerin iç odacıklarında tutuklanması temeline dayanan bir yöntemdir. Bunun sonucunda ise enzim moleküllerinin bu odacıklardan tekrar enzim çözeltisine geçişi engellenmektedir.

Oluşturulan polimerde enzimin bulunduğu odacıklara substratın giriş çıkışını zorlaması ve hatta enzimin yapısının fiziksel yapısının değişmesinden dolayı enzim

aktivitesinin azalması gibi problemlerin yaşanmaması için çapraz bağ yüzdesi çok iyi ayarlanmalıdır.

Mikrokapsülleme

Enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membranın iç tarafında tutuklanmasını sağlayan yöntemdir. Mikrokapsüllerin boyutu 1-100 µm arasında değişmektedir. Bu oluşturulan mikrokapsüllerin dış yüzeyi sürekli sistemlerde katı, süreksiz sistemlerde ise sıvıdır. Elde edilen mikrokapsüllerin dış cepheleri enzimin çıkışına izin vermeyecek kadar küçük ancak substrat ve ürünün çıkışına izin verecek kadar büyük olması gerekmektedir.

1.2.1.3. Suda Çözünen Enzim İmmobilizasyonu

Suda çözünmeyen yöntemler ile immobilize edilen enzimlerin aktivite ve spesifikliklerinde değişme olabilmektedir.

Enzim çözeltisini bir membran ile ürün ve substrattan ayırırsak doğal durumda kalmasını sağlamış oluruz. Bu amaçla ultrafiltrasyon (UF) veya mikrofiltrasyon (MF) membranlarından yararlanılır.

1.2.2. İmmobilize enzimlerin kullanım alanları

İmmobilize enzimlerin kullanım alanı çok geniştir. Özellikle endüstri alanında çok aşamalı proseslerde bu yöntemle başvurulmaktadır. Bir çok farklı enzime uygulanabilir olması kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Ayrıca immobilize enzimlerin serbest enzimlere oranla daha kararlı, tekrar kullanılabilirliği yüksek, ortam koşullarına (sıcaklık, pH vb. gibi) daha dayanıklı olması nedeniyle son zamanlarda popülerliğini arttırmıştır. Bu tez kapsamında yapılan yöntemle dolaylı olarak benzer birkaç enzim immobilizasyon örneği verilmiştir.

- Asetilkolin esteraz enziminin pestisit tayini için biyosensör olarak kullanıldığı çalışmada, serbest enzime göre kararlılığının yüksek ve enzimin aktivite kaybının düşük olduğu sonucuna varılmıştır (Zamfir vd., 2011).
- Asetilkolin estereaz enziminin nanoyapılı poliakrilonitril membranlarda immobilizasyon çalışmasında immobilize enzimin serbest enzime göre optimum pH ve optimum sıcaklığında pozitif değişim olduğu, pH kararlılık aralığının daha yüksek

olduğu, depo kararlılığının 30 gün sonunda immobilize enzimde %5 ve serbest enzimde %50 aktivite kaybı görülmüştür (Marinov vd., 2009).

- Asetilkolin esteraz enziminin oksidemeton metil tayininde silika sol-jel biyosensörü üzerine immobilizasyonu çalışmasında, depo kararlılığının yüksek olduğu ve 60 kullanımdan sonra bile orijinal enzim aktivitesinin %85'i kazanıldığı görülmüştür (Anitha vd., 2004).

- İnvvertaz enzimini immobilize etmeden önce ortama onun inhibitörü olan aminoalkilat manyetik partikülleriyle etkileştirildiğinde %79 aktivite gösterirken, ortama inhibitör koyulmadan yapılan damgalama işleminden sonra hiç aktivite göstermemiştir (Van Leeputen vd., 1974).

- Penisilin G a ılaz enziminde damgalama öncesinde ortama inhibitörlerinin (penisilin sülfoksit, mandelik asit, fenilglisin) eklenmesiyle saf enzime göre 10,000 kat daha fazla stabil olduğu sonucuna varılmıştır (Rosell vd., 1995).

- α -amilaz enziminde ortama inhibitör veya substrat eklenmeden önce yapılan damgalama işleminden sonra %57 aktivite kaybı görülürken, Na-siyanoborohidrid kullanıldığı zaman aktivite kaybının büyük oranda azaldığı görülmüştür (Germain vd., 1988).

- Tripsin enziminin benzamidin grubu taşıyan suda  z nen poliakrilik polimerleriyle yapılan çalışmalarda, inhibitörsüz olan çalışmalara göre daha çok kullanılabilir olduğu sonucuna varılmıştır (Brown ve Racois, 1984).

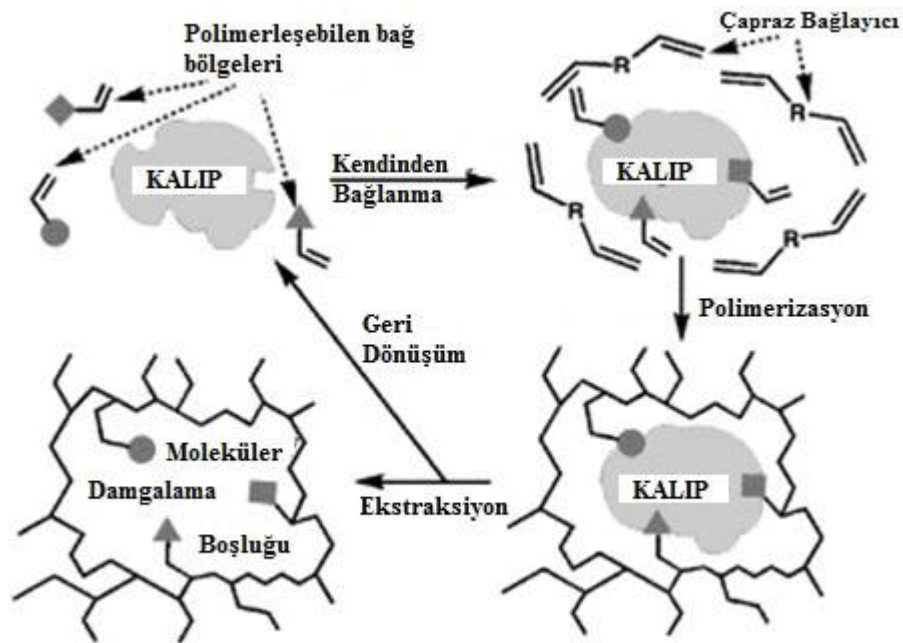
1.2.3. Moleküler Damgalama Yöntemi

Moleküler damgalı polimerler 3 adımda oluşturulmaktadır.

1-) Kalıp molekül ile polimer oluşturabilecek fonksiyonel monomerler kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle ön kompleks oluşturulur.

2-) Polimerizasyon ajanları (porojen, çapraz bağlayıcı, inisiyator) sayesinde kalıp moleküle spesifik boşluklar oluşturulur.

3-) Kalıp moleküle uygun yöntemler ve çözüenler yardımıyla kalıp molekül polimerden uzaklaştırılarak kalıp moleküle spesifik bağlanma bölgelerinin olduğu polimer tamamen oluşturulmuş olur. (Bruggemann vd., 2004).



Şekil 1.3.: Moleküler damgalama yönteminin şematik gösterimi (Patel vd., 2004)

Rus bilim adamı Maxim V. Polyakov tarafından moleküler damgalı polimerlerin ilk çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada, sodyum karbonat kullanarak sodyum silikati polimerize edip ortama toluen ekledi, silika parçacıklarını kuruttuğunda silikanın üzerinde tolueni tanıyan bölgelerin oluştuğunu gördü (Polyakov, 1931).

R. Curti'nin mandelik asit ve kamhorsülfonik asit enantiyomerlerini ayırabilen silika boncuklarını kolon kromatografisinde kullanması bu alanda ki en büyük adım olarak görülmektedir (Curti vd, 1952).

Klaus Mosbach ve çalışma arkadaşları, silikada boya damgalama çalışmalarını organik silan karışımı (amino, fenil, dodesil ve glikozidil özelliklerini içeren)

kullanarak bu düşüncesini gerçeğe uyarlamıştır (Mosbach vd., 1979; Deng vd., 2000; Makote vd., 1998).

Polyakov, Curti ve Mosbach'ın yaptığı çalışmalar sayesinde moleküler damgalama yöntemi zamanla daha fazla ilgi çeken ve gelişime açık olan bir alan olarak hızla gelişmektedir.

1.2.3.1. Moleküler Damgalamanın Temel Bileşenleri

Başarılı bir moleküler damgalı polimerin dizaynı için polimerizasyon bileşenlerinin; kalıp molekül, monomer(ler), çapraz bağlayıcı, inisiyator ve uygun porojenin tespiti en önemli adımdır. Bu bileşenlerin uygun olarak seçilmesi oluşturulan polimerin kullanılabilirliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Bileşenlerin seçimi ve özellikleri aşağıda açıklanmaktadır.

Kalıp Molekül

Uygulama alanına göre kullanılacak olan kalıp moleküller, fonksiyonel monomerler ile kovalent/non-kovalent etkileşimlerle bağlanmaktadır. Polimerizasyon çeşidine göre kalıp moleküllerin polimerizasyon öncesi yada polimerizasyon sırasında monomere bağlanabilmesi büyük önem taşır. Çeşitli alanlarda çalışılabilen kalıp moleküllere örnek olarak; aminoasitler, hormonlar, karbonhidratlar, proteinler, virüsler, hücreler ve nükleik asitler verilebilir.

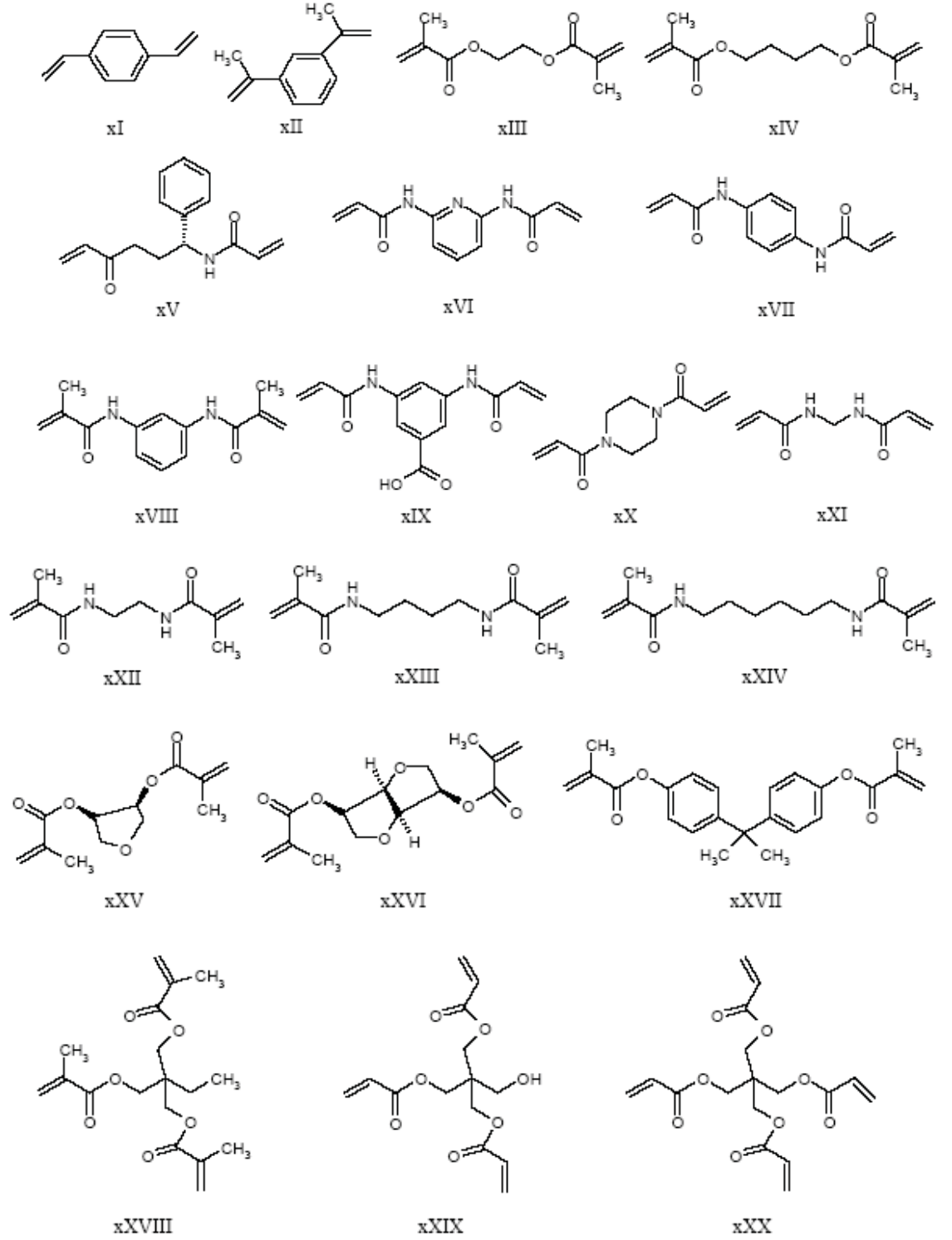
Fonksiyonel Monomerler

Monomerlerin fonksiyonel grupları sayesinde polimerin bağlanma bölgeleri belirlenir. Ancak monomerlerin kendi aralarında bağ oluşturması ihtimaline karşı monomerin aşırı ortama ilave edilerek bu sorun çözümlenmiştir. Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki güçlü etkileşim düzgün kompleks oluşumunu ve damgalamanın etkisini arttırmaktadır.

Çapraz Bağlayıcılar

Moleküler damgalı polimer oluştururken kullanılan çapraz bağlayıcıların; polimer morfolojisinin kontrol edilmesi (makroporöz, jel tip ve mikrojel formatı), bağlanma bölgelerinin kararlılığı ve polimerin mekanik kararlılığını sağlayan 3 tane özelliği bulunmaktadır. Kullanılan çapraz bağlayıcıların moleküler büyüklüğünün değişmesi oluşturulan polimerin por büyüklüğünü büyük ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle oluşturulmak istenen polimerin por büyüklüğü (mikropor, mezopor, makropor)

değiştirilebilmektedir. Moleküler damgalı polimerler oluşturulurken sıklıkla kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar aşağıda gösterilmektedir.



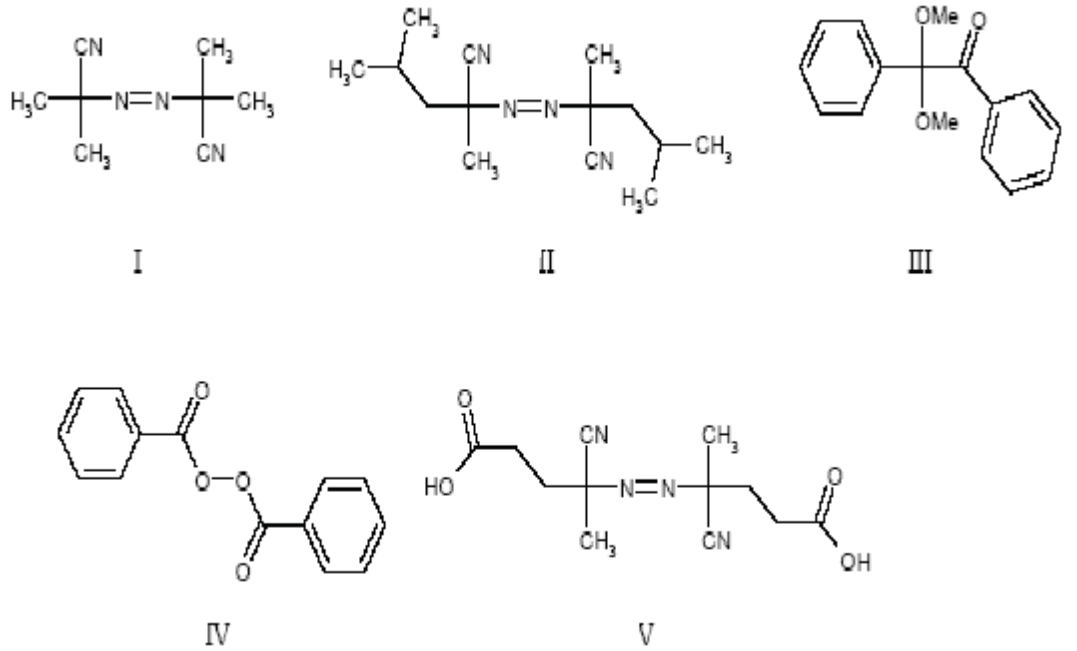
Şekil 1.4. : Moleküler damgalamada sıkça kullanılan çapraz bağlayıcılar (Okutucu, 2007)

xI): p-divinilbenzen **xII):** 1,3-diizopropenil benzen **xIII):** Etilen glikol dimetakrilat

xIV): Tetrametilen dimetakrilat **xV):** N,O-bisakrila-L-fenilalaninol **xVI):** 2,6-bisakriloamidopiridin **xVII):** 1,4-fenilen diakrilamid **xVII):** N,N'-1,3-fenilenbis(2-metil-2-propenamid) **xIX):** 3,5-bisakrilamido benzoik asit **xX):** 1,4-diakrilol piperazin **xXI):** N,N' metilen bisakrilamid **xXII):** N,N'-etilen bisakrilamid **XXIII):** N,N'-tetrametilen bismetakrilamide **xXIV):** N,N'- heksametilen bismetakrilamid **xXV):** Anhidroeritritol dimetakrilat **xXVI):** 1,4;3,6-dianhidro-Dsorbitol-2,5-dimetakrilat **XXVII):** izopropilenbis(1,4-fenilen)dimetakrilat **XXVIII):** trimetilpropan trimetakrilat **xXIX):** pentaeritritol triakrilat **xXX):** pentaeritritol tetraakrilat

İnsiyatörler

İnsiyatörler, serbest radikal polimerizasyonunu sağlayan moleküllerdir. Polimerizasyonun gerçekleştiği ortama ve kullanılan kalıp moleküle göre örneğin enzim için düşük sıcaklıkta UV-duyar insiyatörler kullanılır. Buna bağlı olarak kullanılacak kalıp molekülün termal veya UV kararlılığına uyacak insiyatörler kullanılır. Moleküler damgalı polimerlerin oluşturulmasında kullanılan bazı insiyatörler aşağıda verilmiştir.



Şekil 1.5. Moleküler damgalamada sıkça kullanılan insiyatörler (Okutucu, 2007)

I): azobisisobutironitril **II):** azobisdimetilvaleronitril **III):** dimetilasetal benzil **IV):** benzoil peroksit

V): 4,4'-azo(4-siyanovalerik asit)

Çözgen (porojen)

Çözgen; kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve inisiyatörün tek bir fazda çözünmesini sağlar. Moleküler damgalı polimerlerde ise bunlara ilaveten por oluşumunu da etkilediği için MIP terminolojisinde porojen olarak adlandırılmaktadır. Kalıp molekül ile monomer arasındaki bağın türünü de porojen belirlemektedir. Buna göre kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki hidrojen bağ oluşumu çözgenin hidrojen bağı yapabilme etkinliğine, düşük sıcaklıkta iyonik etkileşimler ve dipolar etkileşimler polar çözgenlerde oluşur. Genelde kalıp moleküle yüksek bağlanma afinitesine sahip çözgenler kullanılır. Buna örnek olarak asetonitril, kloroform, toluen, diklorometan ve tetrahydrofuran hidrojen bağına dayalı polimerlerde kullanılmaktadır (J. O'Mahony vd., 2005).

Başarılı bir moleküler damgalı polimer oluşturmak için gerekli olan faktörler şunlardır:

- 1- Monomer kalıp oranı
- 2- Fonksiyonel monomerin asidik ya da bazik karakteri
- 3- Porojen (çözgen) seçimi
- 4- Polimerizasyon koşulu
- 5- Kalıp molekülün ve polimerin konformasyonu
- 6- Çapraz bağlayıcının oranı

İdeal MIP'in taşıması gereken özellikler (Zimmerman ve Lemcoff, 2004);

Sentez Metodu

- Bir ya da birkaç kolay adımda polimer gerçekleşmesi,
- Polimerizasyon oluşumu esnasında hata oluşumunu en aza indirecek dinamik damgalanması,
- Oluşacak polimerin fonksiyonelliği.

Fiziksel Özellikler

- Yüksek stabilitede homojen damgalı bölgelerin bulunması,
- Çözünür ya da çözünmez kaliteli polimer karakterinde olması,
- Tekrar kullanılabilirliğinin iyi olması,
- Bağlanma bölgelerinin spektral yöntemler ile karakterize edilebilmesi.

Bağlanma Karakteristiği

- Olabildiğince yüksek afiniteyle kalıp molekülün bağlanabilmesi,
- Olabildiğince yüksek seçicilikte kalıp molekülün geri bağlanabilmesi,

- Hızlı bağlanma kinetiği,
- Bağlanma kinetiğinin kolaylıkla analizlenebilmesi.

1.2.3.2. Moleküler Damgalama Prosedürleri

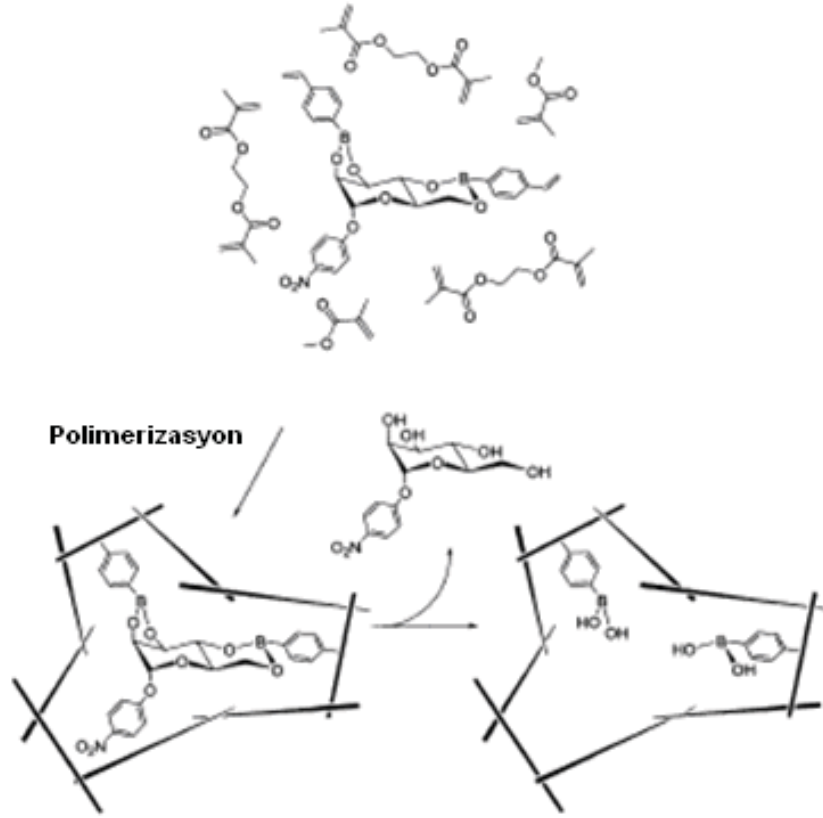
Moleküler damgalı polimer oluşturmada kullanılan kalıp moleküller ile monomer arasında; kovalent, kovalent olmayan, yarı kovalent veya metalik etkileşimler oluşmaktadır. Kullanılacak olan monomerler de bu bağlanma türüne göre değişiklik göstermektedir. Moleküler damgalı polimer oluşturmada genellikle kovalent, yarı kovalent veya kovalent olmayan damgalama stratejileri kullanılır.

Kovalent Damgalama

Kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki kimyasal reaksiyon sonucunda kovalent bağ oluşumuna dayanan damgalama yöntemidir. Bu yöntem kısaca üç basamaktan oluşur:

- 1-)Kalıp molekül ve monomerin kopolimerizasyon sonucu kovalent bağlanması
- 2-) Çapraz bağlayıcıların ve inisiyatörlerin ortama ilave edilmesi
- 3-)Kalıp molekülün hidrolitik yolla polimerden uzaklaştırılması.

Bu yöntemin avantajları; kalıp molekül ile monomerlerin kovalent bağ ile bağlanmasından dolayı diğer ortam şartlarına (pH, sıcaklık, aşırı porojen miktarı) daha dayanıklı olmasıdır. Ancak sınırlı sayıda kovalent bağ oluşturabilecek maddeler (ester, asetal/ketal, schiff bazı, metal koordinasyon) olduğundan bu uygulamanın kullanım alanını sınırlandırmaktadır. Kovalent damgalamaya örnek olarak boronat esterleriyle karbohidratların damgalanması verilebilir. Boronat esterleriyle genellikle karbohidratların damgalanmasının nedeni karbohidratların sahip olduğu iki yada daha fazla cis-diol formlarının olmasından dolayıdır (Gao vd., 2001; Piletsky vd.,1996; Wang vd., 1999; Kanekiyo vd., 2000; Bossi vd., 2001; Wulff vd., 1982).

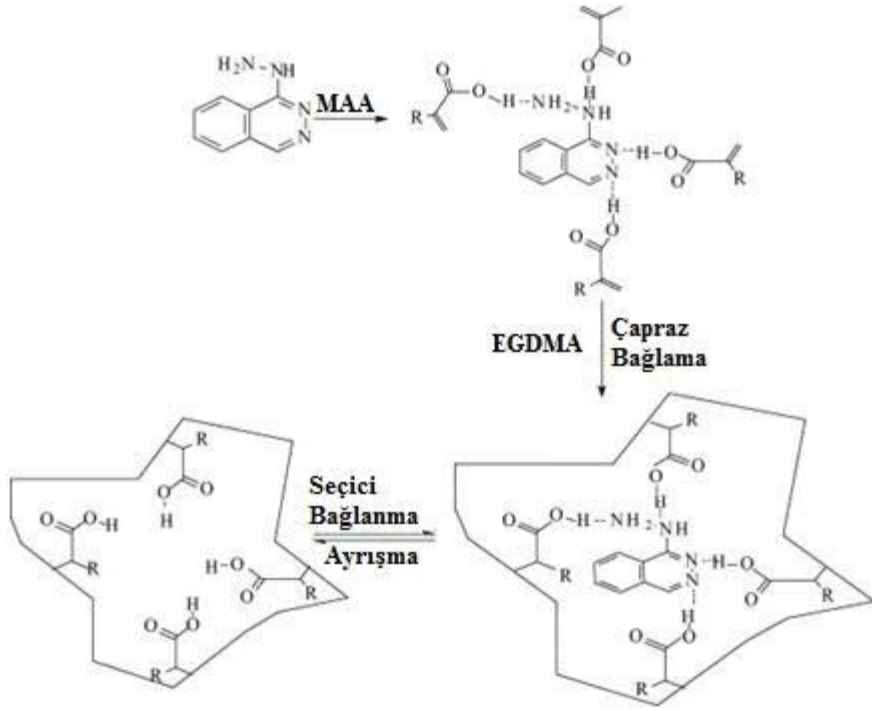


Şekil 1.6. Boronat esterleriyle kovalent damgalama yönteminin şematik gösterimi (Okutucu, 2007)

Non-kovalent Damgalama

Bu yöntemde kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler polimerizasyon ortamında non-kovalent etkileşimlerle bir araya gelmektedir. Kalıp molekülün basit bir yıkımayla uzaklaştırıldığı polimerde spesifik boşluklar oluşmaktadır. Bu yöntemde yapılan ilk çalışmalar Mosbach (1996) tarafından gerçekleştirilmesiyle farklı bileşiklerin silika parçacıkların üzerinde damgalanabildiğini ortaya çıkarmıştır.

İlk işlem olarak monomer-kalıp molekül konjugatlarının oluşmasına gerek olmaması, kalıp molekülün basit bir yıkama işleminden sonra ortamdaki ayrılması ve hızlı bir şekilde geri bağlanması bu yöntemin avantajlarıdır. Ancak polimer oluştururken monomerlerin aşırı kullanılması (maksimum spesifik boşlukların oluşması için) en büyük dezavantajdır. Non-kovalent moleküler damgalama tekniğine örnek olarak kemilüminesans sensöründe hidrolazın moleküler damgalı polimer enjekte edilerek hidrolazının tayini örnek verilebilir (Yan vd., 2006).

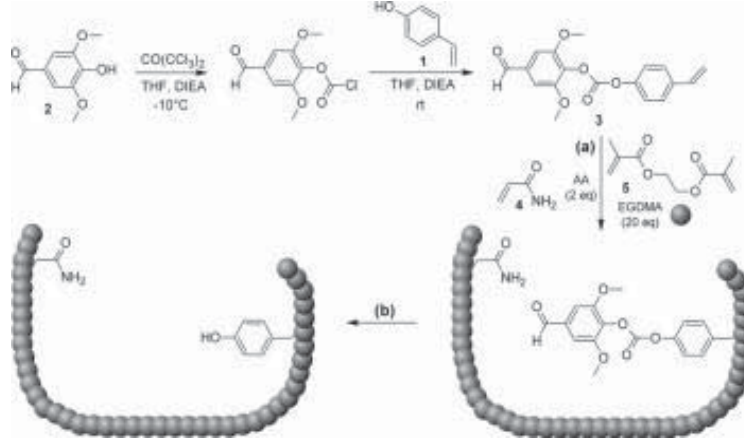


Şekil 1.7. Hidralazin molekülünün non-kovalent moleküler damgalanmasının şematik gösterimi
(Yan vd., 2006)

Yarı Kovalent Bağlama

Kovalent ve kovalent olmayan yöntemlerin ortak olarak kullanılması esasına dayanır. Monomer ile kısmi kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler kurabilen kalıp molekül arasında polimerizasyon oluşur. Daha sonra kalıp molekül ortamdan hidroliz ile ayrılır. Kalıp moleküle spesifik boşlukların oluşturulduğu polimere kalıp molekülün tekrardan geri bağlanması kovalent olmayan etkileşimlerle sağlanır.

Yarı kovalent bağlamanın kullanım alanlarını geliştirmek için kalıp molekülle birlikte ortamdan uzaklaşabilen fonksiyonel grup içeren moleküller kullanılabilir. Bu gruplara örnek olarak kullanılan ilk bileşik karbonat esterinin karbonil grubudur. Karbonil grubuyla kullanılan kalıp moleküllere kolesterol, üre, üretan örnek olarak gösterilebilir (Lubke vd., 1998). Ayrıca karbonil gruplarına bağlı olan halojenür grupları içeren vanilin gibi bileşiklerde yarı kovalent damgalama yönteminde kullanılabilir (Puzio vd., 2013).



Şekil 1.8. Vanilin molekülünün yarı kovalent bağlanma yöntemiyle moleküler damgalanmasının şematik gösterimi (Puzio vd., 2013)

1.2.4. Moleküler Damgalı Polimerlerin Kullanım Alanları

1.2.4.1. Katı faz ekstraksiyonu

MIP'in son zamanlarda en yaygın kullanılan alanlarının başında katı faz ekstraksiyonu gelmektedir. Biyolojik örnekler, çevresel örnekler, bitki ve gıda örneklerinin elde edilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Caro vd., 2006; Caro vd., 2004; Chapius vd., 2004; Chassaing vd., 2004; Bruggemann vd., 2004; Tamayo vd., 2003).

Moleküler damgalı katı faz ekstraksiyonun bir çok avantajları vardır. Bunların başında sadece istenilen örneğin seçimli olarak ayrılması ve istenmeyen maddelerin ortamdan uzaklaştırılması gelmektedir.

1.2.4.2. Sensörler

Sensörler diagnostik, çevre ve gıda analizlerinde biyolojik moleküllerin kullanılması sonucu hedef molekülün tespit edilmesi için kullanılan sistemlerdir. Ancak bu biyolojik moleküllerin pH, sıcaklık ve organik çözümlere karşı dayanıksız olması bu sistemlerin kullanılmasını kısıtlamaktadır. Fakat kullanılacak polimerizasyon yöntemi değiştirilerek (örneğin UV polimerizasyon) bu konuya kısmi olarak çözüm getirilebilmektedir (Matsui vd., 2005; Yano ve Karube., 1999).

Çizelge 1.2. : MIP-Sensör Uygulamaları (Okutucu, 2007)

Ölçüm sistemi	Analit	Lineer Ölçüm Aralığı
Fluorimetrik	Triazin	0,01-100mM
	Sialik Asit	0,5–10µM
	Dansil-L-Fenilalanin	0–30µg/ml
	Piren	0–40µg/l
	Camp	0,1–100µM
	N-asetiltryptonamid	Kalitatif
Kondüktometrik	Atrazin	0,01–0,5mg/l
	Sialik Asit	1–50µm
	Morfin	Kalitatif
	L-Fenilalanin	0,05–0,4mM
Spektrofotometrik	Kloromfenikol	1–1000µg/ml
	Testesteron	0,10–1,25mM
Potansiyometrik	Fenilalanin anilid	33–3300µg/ml
Kapasitans	Fenilalanin anilid	Kalitatif
Amperometrik	Morfin	0,1–10µg/ml
SAW	o-Ksilen	Kalitatif
Luminesans	PMP	0,125-150mg/l
pH	Glukoz	0-25mM
SPR	Teofilin	0,4-6mg/ml

Ayrıca;

-Çevre analizlerinde; metil paratyon pestisitinin duyarlı olarak tespit edilmesinde (Li vd., 2012)

-İlaç tasarımında; hepatit B'nin tespit edilmesi için ilaç üretimi (Cunliffe vd., 2005)

-Biyoanalitik uygulamalarda; kandaki hemogloblin miktarının belirlenmesi (Verheyen vd., 2011)

-Kimyasal sensörler olarakta; ürik asit tayini için biyosensör tasarımı (Chena vd., 2010)

konularında moleküler damgalanmış polimerler kullanılmıştır.

1.2.5. Enzimler

Enzimler en basit tanımla, katalitik aktivite gösteren genellikle proteinlerden oluşan ve biyokatalizör gibi çalışan yüksek molekül ağırlıklı (15.000 – birkaç milyon dalton) yapılardır. Özgül oldukları kimyasal reaksiyonları seçici olarak katalizler ve reaksiyon hızlarını artırır. Genellikle bütün biyokimyasal tepkimeler enzimler tarafından katalizlenir. Bu reaksiyonlar, tüm canlı organizmaların metabolizmasının temelini oluştururken antik çağlardan bu yana özellikle gıda üretiminde (şarap, peynir, bira, ekmek vb.) yaygın olarak kullanılmaktadır (Beilen ve Li, 2002).

1.2.5.1 Enzimlerin yapısı

Enzimler, kimi zaman basit protein yapılarının birleşmesi ile oluşabildiklerinin yanı sıra bazı enzimler, aktivite gösterebilmek için protein yapıda olmayan gruplara ihtiyaç duyarlar. Enzimin yapısında olan ve protein yapıda olmayan bu gruplara prostetik gruplar adı verilir. Bu gruplar, Mn, Mg, Zn, Fe gibi metallerden oluşan kofaktörler ya da karmaşık organik moleküller olan NAD, FAD, CoA gibi koenzimler olabilirler. Protein olmayan grup içeren enzim holoenzim, enzimin yapısındaki protein yapısında olan gruba ise apoenzim denir. Enzimlerin apoenzim kısımları büyük protein moleküllerinden oluşmuştur. Apoenzimin protein yapısı her enzimde farklı olduğu için enzime özelliğini ve özgüllüğünü bu kısım sağlar. Ancak genellikle apoenzimin katalitik etki gösterebilmesi için koenzimle ya da kofaktörle birleşmesi gerekir (Hirs, 1983). Bazı durumlarda RNA moleküllerinin de katalitik

fonksiyon sergiledikleri görülmekle birlikte hücrel faaliyetler çoğunlukla protein katalizörler tarafından düzenlenir. Katalitik özelliklere sahip olan RNA katalizörleri, ribozimler ya da RNA enzimleri olarak isimlendirilir.

1.2.5.2 Enzimlerin sınıflandırılması

Bilinen 3000'den fazla enzim bulunur. Enzimler, katalizledikleri tepkime adının (alkol dehidrojenaz) yada substratın (peroksidaz) sonuna –az (-ase) eki getirilerek adlandırılırlar. Enzimler genellikle özgül oldukları substrat ve katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılırlar. Enzimlerin temel grupları ve fonksiyonları aşağıda gösterilmiştir. Ancak, Uluslararası Biyokimya Derneği (International Union of Biochemistry-IUB) tarafından enzimlerin sınıflandırılmasına yönelik yeni bir sistem geliştirilmiştir. UIB tarafından geliştirilen bu sisteme göre her enzimin, dört haneli bir kod numarası vardır. İlk hane, katalizlediği tepkimenin hangi sınıftan olduğunu, ikinci hane etkili olduğu kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncü numara akseptörü, dördüncü numara da enzimin aldığı sıra numarasını belirtir.

Çizelge 1.3. Enzimlerin sınıflandırılması

1.Oksidoredüktazlar
2.Transferazlar
3.Hidrolazlar
4.Liyazlar
5.İzomerazlar
6.Ligazlar

1.2.5.3 Enzimlerin kullanım alanları

Kullanım alanlarına göre enzimler üç farklı grupta toplanabilirler.

Endüstriyel enzimler: Endüstride üretime yönelik çeşitli tepkimelerin katalizlenmesinde kullanılan ve saflık derecesi düşük olan enzimlerdir.

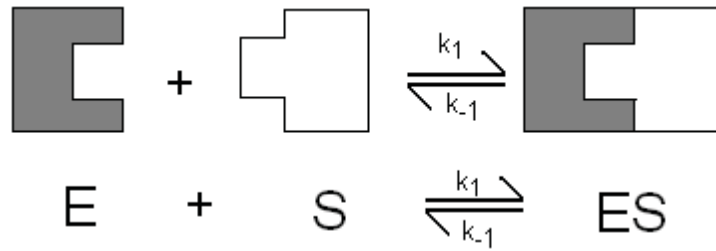
Bu gruba giren başlıca enzimler renin, proteazlar, papain, amilazlar, selülaz, katalaz vb.'dir.

Analitık enzimler: Bilimsel araştırma ve tanı kitlerinde kullanılan ve saflık dereceleri endüstriyel enzimlerden daha yüksek olan enzimlerdir. Bu gruba giren başlıca enzimler hekzokinaz, alkoldehidrojenaz, glukozoksidaz, kolestroloksidaz vb. dir.

Klinik enzimler: Çeşitli fizyolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan ve saflık dereceleri yüksek olan enzimlerdir. Özellikle parenteral yoldan alınan enzimlerde yabancı aktivite hiç istenmeyen bir durumdur. Bu amaçla kullanılan başlıca enzimler şunlardır; proteazlar, lipazlar, asparaginaz vb. dir.

1.2.5.4 Enzimlerin çalışması

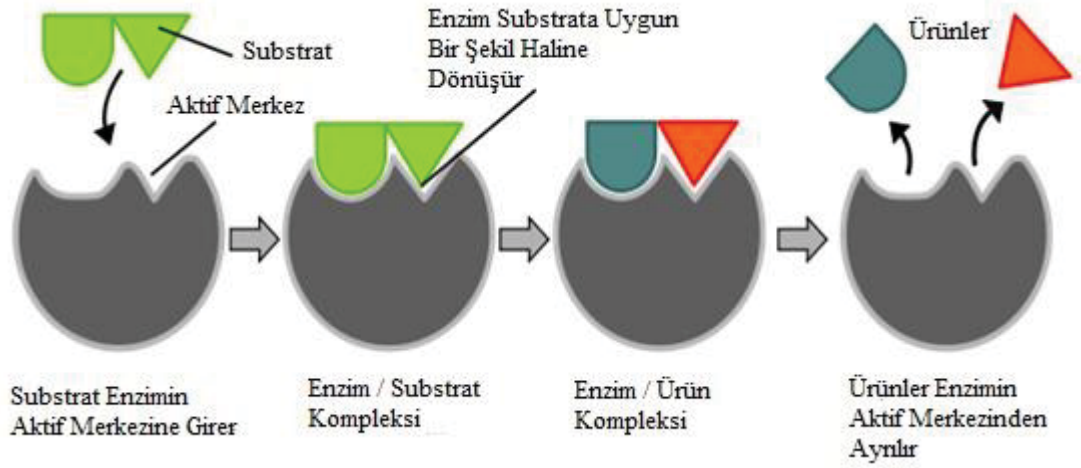
Enzimler, substrata bağlanıp, ardından enzim-substrat yapısı oluşturarak tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürür. Enzim kullanımı tepkimenin denge sabitini etkilemez. Ancak aktivasyon enerjisinde, tepkime aynı sıcaklıkta yürütülmesine rağmen önemli şekilde düşme gözlenir. Enzimler özgül oldukları substrat ile etkileşerek enzim-substrat yapısını oluştururlar. Enzimle substrat ilişkisinin moleküler yönü henüz tam olarak anlaşılamamakla birlikte bu etkileşimden zayıf bağların sorumlu olduğu bilinmektedir. Birçok durumda, Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları enzim-substrat yapısının oluşturulmasını sağlar. Substrat, enzime aktif bölge olarak bilinen özgül bölgelerden bağlanır. Substrat molekülü kendinden daha büyük olan enzim molekülünün aktif bölgesine tam uyacak şekildedir. Bu nedenle enzim-substrat ilişkisi anahtar-kilit modeli ile tanımlanmaktadır.



Şekil 1.9. Anahtar-kilit modelinin şematik gösterimi.

Birden fazla substrat içeren enzim katalizli tepkimelerde, yakınlık etkisi denilen şekilde substrat moleküllerini reaktif bölgelerinden bir araya getirerek, kendi aktif bölgelerine bağlar. Bu durumda, doğru pozisyon ve açının oluşturulabilmesi ile yönlendirmenin doğru yapılacak ve tepkime hızı artırılabilir.

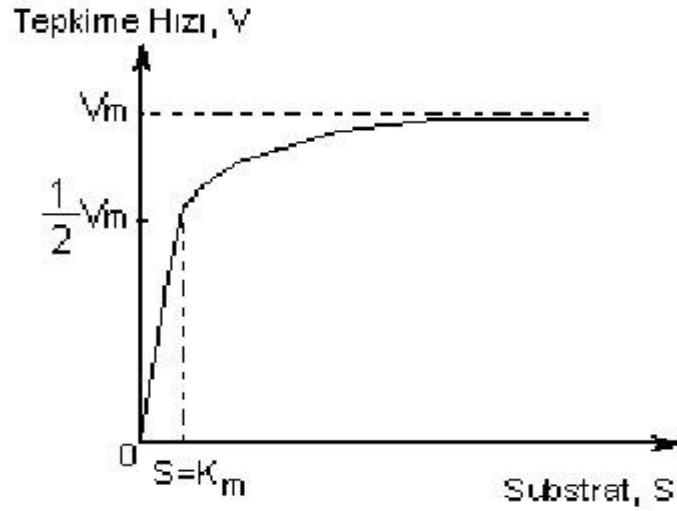
Günümüzde enzim-substrat etkileşimi için tercih edilen model, indüklenmiş uyum modelidir. Bu modelde, ilk olarak enzim ile substrat arasında zayıf etkileşimler oluşur ancak bu etkileşim enzim ile substrat arasında güçlü bağlanmanın sağlanması için enzimin konformasyonunu değiştirmesini sağlar. İndüklenmiş uyum mekanizmasının avantajı güçlü enzim-substrat bağlarının etkisinin düzenlenmesidir. Substratın iki tane bağlanma mekanizması vardır. Birincisi, güçlü substrat bağlanmalarına sahip üniform bağlanma; ikincisi ise güçlü geçiş durumunu düzenleyecek diferansiyel bağlanma. Üniforma bağlanmanın artması enzimin yüzey ve geçiş evresinin afinitesini artırır, diferansiyel bağlanma ise geçiş evresinin afinitesini artırır (Savir ve Tlutsy, 2007).



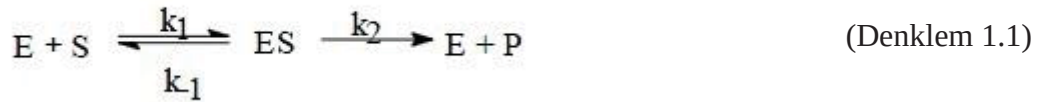
Şekil-10 İndüklenmiş uyum modelinin şematik gösterimi (Koshland, 1958)

1.2.5.5 Enzim kinetiği

Tek substratlı enzim katalizli tepkimeler için ilk matematiksel modelleme, 1902 yılında V.C.R. Henri tarafından, ardından da 1913 yılında L. Michealis ve M.L. Menten tarafından geliştirilmiştir. Bu nedenle bu enzim kinetiği modeli Michealis-Menten kinetiği ya da doyumluk kinetiği olarak adlandırılır. Bir enzim molekülünde, substratın bağlanabileceği sabit sayıda aktif bölge bulunur. Yüksek substrat derişiminde tüm aktif bölgeler substrat ya da enzim molekülleri tarafından doldurulurlar. Michealis-Menten kinetiği, tersinir enzim-substrat yapısının oluşumu ve dağılması basamaklarını içeren basit tepkime şemaları ile elde edilir.



Şekil 1.11. Substrat derişiminin tepkime hızına etkisi



Eşitlik yazılırken, ES yapısının oluşumunun, dağılmasından daha hızlı olduğu ve ikinci tepkimenin ters tepkimesinin ihmal edilebilir olduğu varsayılmıştır. Tersinir ikinci tepkime varsayımı, sadece tepkimenin başında, ürün oluşumunun ihmal edilebilir olduğu durumlarda geçerlidir. Temelde iki farklı yaklaşım ile enzim katalizli tepkimelerin hız tanımları için kullanılabilir. Bunlar; hızlı denge yaklaşımı ve yatışkan durum modelidir. Michealis-Menten yaklaşımı hızlı denge varsayımını benimsemiştir. Enzim ve substrat arasında enzim substrat yapısını oluşturmak için çok çabuk gerçekleşen bir dengenin olduğu görüşünü temel alır.

Denge sabiti, K_m ;

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (\text{Denklem 1.2.})$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{(k_{-1}/k_1) + [S]} \quad (\text{Denklem 1.3.})$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Denklem 1.4.})$$

Enzim-substrat yapısının dağılma sabiti, K_m

$$K_m = (k_{-1}/k_1) \quad (\text{Denklem 1.5.})$$

denkliği ile gösterilebilir.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]} = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Denklem 1.6.})$$

Bu durumda V_m , en yüksek ileri tepkime hızıdır. V_m ancak daha fazla enzim eklenmesi ile değişebilir, substrat eklenmesi V_m 'i etkilemez. K_m Michealis-Menten sabiti olarak adlandırılır. K_m değerinin düşük olması, enzimin substrat özgülüğünün yüksek olduğunun göstergesidir. K_m maksimum tepkime hızının yarısını veren substrat derişimine karşılık gelir.

Enzimatik tepkimelerin kinetik parametrelerinin bulunmasında, genellikle başlangıç tepkime hızı kullanılır. Kesikli bir reaktöre belli derişimlerde substrat $[S_0]$ ve enzim $[E_0]$ yüklenir. Ürün ya da substrat derişimi zamana karşılık grafiğe geçirilir. Bu eğrinin başlangıç eğimi yani tepkime hızı belirlenir. Tepkime hızı, reaktöre eklenen $[E_0]$ ve $[S_0]$ değerlerine bağlıdır. Bunlar olduğu gibi grafiğe geçirilir. Ancak bu grafik ile kinetik parametrelerinin kesin olarak tespit edilmesi mümkün değildir. Bu nedenle, tepkimenin başında kısa sürede enzimin deaktivasyona uğramadığı varsayılarak üç farklı doğrusallaştırma yöntemi kullanılır.

Bunlar;

1. Lineweaver-Burk Grafiği
2. Eadie-Hofstee Grafiği
3. Hanes-Woolf Grafiğidir.

1. Lineweaver-Burk Grafiği :

Eşitlik izgiselleştirildiğinde,

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (\text{Denklem 1.7.})$$

eşitliği elde edilir. izilecek $1/V$ ' ye karşı $1/[S]$ izgisel grafiğinin eğimi K_m / V_m değerini, -y eksenini kesen nokta ise $1/V_m$ değerini verir. Yöntem yaygın olarak kullanılmasına ve V_m değerinin saptanmasında iyi sonuç vermesine rağmen K_m değeri için yeterli kesinlikte sonuç veremez. Verilerin çarpmaya göre tersi alındığı için deneysel hataların etkisini büyük lde artırır. Sonuç olarak yöntemin çok sayıda veriyle ve yüksek substrat derişimlerinde kullanılması önerilmektedir.

2. Eadie - Hofstee Grafiği : Bu yöntemde,

$$v = V_m - K_m \frac{V}{[S]} \quad (\text{Denklem 1.8.})$$

şeklinde düzenlenir. Grafik, V 'ye karşılık $V/[S]$ olacak şekilde çizilir. Grafiğin eğimi K_m değerini, -y eksenini kesen nokta ise, V_m değerini verir. Bu yöntem, eşitliğin her iki tarafında da hız ifadesi (V) bulundurduğu için hata getirebilir.

3. Hanes – Woolf Grafiği: Bu yöntemde , Eşitlik,

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_m} + \frac{1}{V_m} [S] \quad (\text{Denklem 1.9.})$$

şeklinde düzenlenir. $[S] / V$ ' ye karşı $[S]$ grafiğinin eğimi $1/V_m$ değerini, -y eksenini kestiği nokta ise K_m / V_m değerini verir. Hanes- Woolf yöntemi; V_m değerinin yüksek kesinlikle bulunmasını sağlar (Haldane, 1957)

1.2.5.6. Enzim inhibisyonu

Enzim inhibitörleri, enzim molekülüne bağlanarak, enzim aktivitesini engelleyen bileşiklerdir. Tersinir ya da tersinmez olarak çalışabilirler. Kurşun, kadmiyum, civa vb. ağır metaller tersinmez inhibitörler sınıfına girerler. Bu inhibitörler, enzime

bağlanır, enzim - inhibitör yapısını oluşturarak enzim aktivitesini düşürürler. Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) ve sitrat gibi bazı bileşikler kullanılarak tersinir inhibisyon gerçekleştirilebilir. Tersinir inhibitörler, bağlanmadan sonra enzimden çok kolay ayrılabilirler. Tersinir enzim inhibisyonunun, yarışmalı, yarışmasız ve yarı-yarışmalı olmak üzere üç tipi vardır.

- *Yarışmalı inhibisyon:* Substrat ile benzer yapıda olan inhibitör bileşiğinin enzimin aktif bölgeleri için substrat ile yarıştığı inhibisyon tipidir. Bu tür inhibisyonun temel etkisi, K_m 'in artışıyla dolayısıyla tepkime hızının da düşüşüne neden olmasıdır. Yarışmalı inhibisyon tipi, ortama yüksek derişimde substrat eklenerek önlenabilir.
- *Yarışmasız inhibisyon:* Yarışmasız inhibitörler, substrata benzer bileşikler değildir. Bu tür inhibitörlerin enzimin aktif bölgesine değil, diğer bölgelerine bağlanırlar. Böylece enzimin substrata karşı olan affinitesini düşürürler. Bu inhibisyon tipinde tepkime hızı düşer. İnhibisyonu önlemek için enzimin inhibitöre bağlanmasını engelleyecek reaktiflerin ortama eklenmesi gereklidir. Tepkime ortamında enzim-substrat-inhibitör yapısının oluşması ile V_m 'in düşüşü ile K_m 'in artışı gözlenir.
- *Yarı-yarışmalı inhibisyon:* Bu inhibitör tipi sadece enzim-substrat yapısına bağlanır. Enzim molekülüne karşı affinite göstermez. Yarı-yarışmacı inhibitör tipinin V_m ve K_m değerlerini düşürme özelliği vardır.

1.2.5.7 Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Sıcaklık etkisi : Tüm kimyasal tepkimelerde sıcaklığın artışı tepkime hızının artışı da beraberinde getirir. Enzim katalizli tepkimelerin hızı, belli bir sıcaklık sınırına kadar sıcaklıkla beraber artış gösterir. Bu noktaya kadar tepkime veren moleküller arasındaki çarpışma hızı kinetik enerjilerindeki artış nedeniyle yükselir. Böylece gerekli aktivasyon enerjisi seviyesini geçen moleküllerin sayısı artar. Dolayısıyla enzimatik tepkimenin hızı da belli bir sıcaklık değerine kadar artar ve sonunda bir maksimum değere ulaşır. Enzim katalizli tepkimelerin hızı da diğer kimyasal tepkimelerde olduğu gibi Arrhenius eşitliğine uygun olarak değişim gösterir.

$$K(T) = A. \exp (-E_a / RT)$$

(Denklem 1.10.)

Bahsedilen sıcaklık değerinin üzerinde enzimin üç boyutlu yapısının bozulması (denatürasyon) nedeniyle enzim aktivitesi düşer. Enzim aktivitesinin sıcaklığın artışı ile düşmesine “termal denatürasyon” denilmektedir. Sıcaklıktaki değişimler nedeniyle tepkimenin sadece hızı değişmekle kalmaz, V_m ve K_m değerleri de değişim gösterir.

pH etkisi: Ortam pH'sı enzim aktivitesi üzerinde etkili olan bir başka faktördür. Birçok enzim aktif bölgesinde iyonik gruplar içerir. Ortam pH'sındaki değişiklikler bu aktif bölgelerin iyonik formunda da değişikliğe sebep olurlar. Bu durum ise enzim aktivitesinde değişime yol açar, böylece tepkime hızı da değişir. Enzimin en fazla aktivite gösterdiği pH değerine optimum pH denir. Optimum pH dışındaki değerlerde enzimin üç boyutlu yapısında oluşacak değişimler nedeniyle aktivite düşüş gösterecektir. Bu nedenle her enzim ile belli bir pH aralığında çalışılır.

Enzim derişimi: Michealis-Menten kinetiğine göre, yeterli substrat derişiminin olduğu tepkime ortamında, enzim derişimin artışı, tepkime hızını da artırır. Ancak yüksek enzim derişimlerine çıkıldığında görülecek olan substrat kısıtlaması nedeniyle tepkime hızı artışı bir süre sonra yavaşlar ve sabit bir değere yaklaşır.

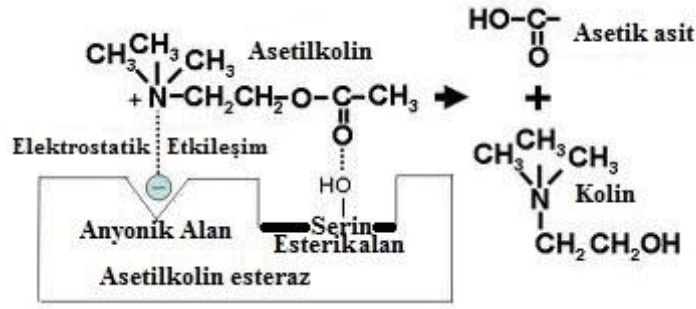
Substrat derişimi: Enzim derişiminin sabit olduğu tepkime ortamında, substrat derişiminin artması tepkime hızını da artırır. Enzimatik tepkime hızındaki artış belli bir süre sonra ise durur ve bundan sonra substrat derişiminde artış olsa bile tepkime hızı durur. En son ulaşılan bu değer maksimum hız (V_m) olarak da adlandırılır.

Ürün derişimi: Enzim katalizli biyolojik tepkimeler genellikle birbirini takip eden, zincirleme tepkimelerdir. Bir enzimin ürünü diğer enzimin substratı olmakta ve zincirleme tepkimeler sonucu son ürün oluşmaktadır. Ortamdaki ürün derişiminin artmasıyla ürün enzim molekülüne bağlanmakta ve enzimi inhibe etmekte ya da aktivitesini azaltmaktadır. Böylelikle enzimatik tepkime ile oluşan ürünler enzimlerin aktivitesini kontrol etmektedirler.

Süre: Tepkime süresi de enzim aktivitesini etkiler. Tepkimenin yürütüldüğü ortam koşullarında zamanla enzim yapısında bozulma oluşmaya başlar. Bu yapısal bozulma dolayısıyla enzim aktivite kaybına uğrar.

1.2.5.8 Asetilkolin estera (AChE)

Asetilkolin estera enzimi (E.C. 3.1.1.7), vücutta merkezi ve periferel, kolinerjik ve adrenerjik, sinir ve kas dokusunda, eritrositlerde ve plasental dokuda bulunmaktadır. Asetilkolin estera enzimi sinaptik boşluklarda ki asetilkolini asetat ve koline parçalayarak inaktive eden enzimdir. Enzim reaksiyonu Şekil 1.12’de gösterilmektedir.

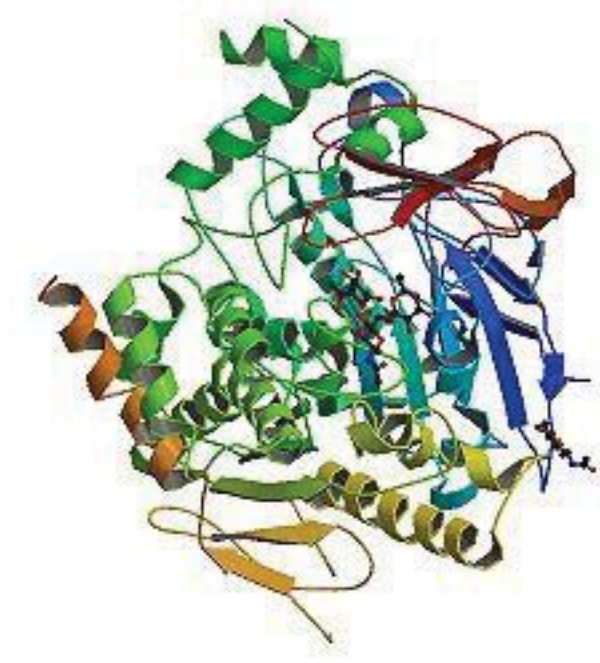


Şekil 1.12 AChE enziminin asetilkolinle etkileşimi

Eğer sinaptik boşluklardaki asetilkolin çok fazla inaktive edilirse sinir iletimi kesilir ve kişide Alzheimer hastalığı görülür (Melanson vd., 1985).

Yaygın olarak kullanılan böcek ilaçları içerisinde organofosfatlar ve karbamatlar başta gelir. Organofosfatlı insektisitler özellikle sinir sisteminde asetilkolin estera üzerinde etkilerini gösterirler. Asetilkolin sinir impulslarının sinapslardan geçişini kolaylaştıran bir nörotransmitter maddedir. Asetilkolin estera böceklerdeki merkezi sinir sisteminin kolinerjik sinapsisinde nörotransmitter olan asetilkolini hidrolizler. Asetilkolin, Asetilkolin estera (AChE) enzimi tarafından kolin ve asetik asite dönüştürülür. Organofosfatlar ve karbamatlar ACh’in analoğu olarak çalışırlar (benzer yapısal formüle sahiptirler ve böylece reseptör ile aynı yerlerden bağ yapabilirler). AChE’ in aktif bölgesine bağlanırlar. Fakat asetilkolin hidroliz olmasına rağmen, insektisitler, enzim-substrat kompleksi olarak sabit kalırlar. Bu insektisidler asetilkolinesteraz inhibisyonuyla sinir impulslarının transmiyonunu

bloke eder ve asetilkolin reseptörlerinin uyuşmasına neden olurlar. Sinapsislerdeki asetilkolinin artan konsantrasyonundaki bu sonuçlar ve daha fazla uyarılmış merkezi sinir sistemi ölüme yol açabilir (Melanson vd., 1985).



Şekil 1.13. AChE enziminin X-Ray görüntüsü (RCSB Protein Data Bank)

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Malzemeler

2.1.1. Kimyasal Maddeler

Yapılan bu çalışmada, Asetilkolin esteraz, asetilkolin klorür, asetiltiyokolin iyodür, amonyum persülfat, metakrilik asit, N,N'-dimetilenbisakrilamid, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit), Coomassie Brilliant Mavisi G-250, sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit monohidrat, sodyum asetat trihidrat, sodyum fosfat mono bazik hidrat, sodyum fosfat dibazik hidrat, asetik asit, hidroklorik asit, tris(hidroksimetil) aminometan (Sigma-Aldrich, USA) tarafından temin edildi.

2.1.2. Cihazlar

Nüve SL350 marka mekanik karıştırıcı, Nüve BM402 marka su banyosu, Shimadzu UV-1601 marka UV-VIS spektrofotometresi, Hanna Instruments HI-8314 membran pHmetresi, Şimşek Labortechnik ARE ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, Hettich 1200R marka soğutmalı eppendorf santrifüj, Jeol Jem 2100F HRTEM cihazı.

2.2. Moleküler Damgalama Yöntemi ile Asetilkolin Esteraz Enziminin İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu

2.2.1. Moleküler Damgalı Polimer Sentezi

Dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak, monomer olarak metakrilik asit (MAA), çapraz bağlayıcı olarak N,N'-dimetilenbisakrilamid (NBMA), başlatıcı olarak amonyum persülfat (APS), çözücü olarak saf su ve kalıp molekül olarak asetilkolin klorür (AChCl) kullanıldı.

Polimerizasyon deneyleri 90°C sıcaklıkta ve oksijensiz ortamda toplam polimerizasyon hacmi 50 ml ve polimerizasyon süresi 2 saat olacak şekilde ACh'li

ve ACh'siz olarak sentezlendi. Polimerizasyon sonrası süzgeç kağıdıyla süzülerek etüvde 1 gün boyunca kurumak amacıyla bekletildi ve kuru ağırlıkları tartıldı.

2.2.2. Moleküler Damgalı Polimerlerin Desorpsiyonu

Polimerizasyon sonrası kurutulan polimerler 100'er mg olacak şekilde ayrılıp sitrat tamponu (pH 2 ve pH 3), asetat tamponu (pH 4 ve pH 5), fosfat tamponu (pH 6, pH 7 ve pH 8) Tris-HCl tamponu (pH 9 ve pH 10) ile desorpsiyonu gerçekleştirildi.

2.2.3. Moleküler Damgalı Polimerlere Enzim İmmobilizasyonu

ACh (Asetilkolin) desorpsiyonu gerçekleştirilen polimerlere(Yöntem A), desorpsiyon gerçekleşmeyen polimerlere (Yöntem B) ve kontrol amacıyla ACh'siz polimerlere (kör) asetilkolin estera z enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla pH 8 fosfat tamponunda enzim (0,0155 unit) ilave edildi ve mekanik karıştırıcıda 1 saat boyunca inkübe edildi.

2.2.4. İmmobilize Enzim-Polimer Sistemi ve Polimerin TEM Analizi

Asetilkolinsiz polimerin (Kör) ve Yöntem A ile elde edilmiş olan immobilize enzim-polimer sisteminin görüntüsü Jeol Jem 2100F HRTEM cihazı ile görüntülendi.

2.3. Asetilkolin Esteraz Enziminin Aktivite Tayin Yöntemi

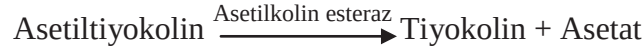
Moleküler damgalı polimer ile enzim inkübe edildikten sonra eppendorf santrifüj cihazında santrifüjlendi. Daha sonra pH 8 tamponuyla 2 kere yıkandı. Daha sonra süpernatant ve yıkama sularında Ellman metodu kullanılarak aktivite tayini yapıldı.

Ellman metodunda kullanılan maddelerin miktarlarını kendi enzimimize uygun olarak modifiye ederek aktivite ölçüldü. Buna göre asetilkolin estera z enzimi 50 mM fosfat tamponunda (pH 8) çözüldü. 39,6 mg ditiyobisnitrobenzoik asit (DTNB) 10 ml fosfat tamponunda (pH 7) çözüldü ve 15 mg sodyum bikarbonat eklendi ve 2 mM'a seyreltilti. Asetiltiyokolin iyodür, kullanılacak miktarda 0,1 mM olarak ayarlandı.

Çizelge 2.1’de verilen miktarlarda kör ve örnek çözeltiler hazırlandı. Karışımlar 1 dakika boyunca inkübasyondan hemen sonra 412 nm’de (Shimadzu UV-1601 spektrofotometre) aktivite ölçümü yapıldı.

Çizelge 2.1. Aktivite tayini için yöntem bileşenleri

KÖR	ÖRNEK
550 µL pH 8 tamponu	540 µL pH 8 tamponu
150 µL 2 mM DTNB	150 µL 2 mM DTNB
50 µL 0,1 mM AChI	50 µL 0,1 mM AChI
	10 µL AChE



Aktivite hesapları denklem 2.1’de verilen eşitlikle belirlendi.

$$\text{Aktivite (U)} = \frac{\Delta \text{Absorbans}}{1,36 \times 10^4} \quad (\text{Denklem 2.1})$$

1U asetilkolin esterase enzim aktivitesi, pH 8 fosfat tamponu ve 25⁰C’de 1 dakikada 1µmol asetiltiyokolini, tiyokolin ve asetata parçalayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.4. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Bradford reaktifini hazırlamak için 20 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, %95'lik 50 ml etanolde çözüldü, üzerine 55 ml %88'lik fosforik asit ilave edilerek destile su ile 1 lt ye tamamlanıp filtre edildi.

Çizelge 2.2. Protein tayini için Bradford yöntemi miktarları

Standart	Kör	Örnek	
	0,05 ml		Destile su
0,05 ml (0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20 mM BSA)			Standart çözeltisi
		0,05 ml	Örnek çözeltisi
1 ml	1 ml	1 ml	Bradford reaktifi

Süpernatant ve yıkama sularında Bradford yöntemi ile protein tayini yapılarak immobilize enzimin protein miktarı belirlendi. Bradford reaktifi hazırlanıp Çizelge 2.2'de gösterilen miktarlarda alınarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten hemen sonra 595 nm'de (Shimadzu UV-1601 spektrofotometre) süpernatant ve yıkama sularında protein miktarları belirlendi.

2.5. Enzim Derişiminin Enzim İmmobilizasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

Deneyde kullanılacak en uygun enzim miktarını belirlemek amacıyla 28×10^{-4} , 16×10^{-4} , 15×10^{-4} , 10.3×10^{-4} , 6.8×10^{-4} mg enzim olacak şekilde alınarak aynı miktarda damgalanmış polimerler (100 mg) ve 1000 ml pH 8 tamponu (fosfat

tamponu) eklenerek marka mekanik karıştırıcıda (Nüve SL-350) 150 rpm’de 1 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra farklı enzim miktarlarıyla inkübe edilen polimerler oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan bu polimerde kısım 2.3’de verilen yöntemle enzim aktivite tayinleri yapıldı.

2.6. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

2.6.1. Optimum Sıcaklık

Serbest ve immobilize asetilkolin esteraz aktivitelerinin sıcaklığa bağımlılığını belirlemek amacıyla 20-65 °C sıcaklık aralığında (20, 25, 30,35, 40, 45, 50, 55, 60, 65°C) çalışıldı ve her iki formun optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

2.6.2. Optimum pH

pH’ın serbest ve immobilize enzim aktivitelerine etkisini incelemek için inkübasyon tamponunun pH’sı pH 3 ve pH 10 arasında değiştirilerek standart koşullarda aktiviteleri ölçülmüştür. İnkübasyon karışımlarının içerdiği tampon türü ve pH değerleri: sitrat tamponu (pH 3-3.5), asetat tamponu (pH 4, 4.5, 5, 5.5), fosfat tamponu (pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5) ve Tris/HCl (pH 9, 9.5, 10) olacak şekilde seçildi.

2.6.3. Termal Kararlılık

İmmobilize enzimin termal kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla farklı sıcaklıklarda (4, 20, 30, 37, 40, 45, 50, 60, 65, 70 °C) 1 saat bekletildikten sonra kısım 2.3’de verilen tayin yöntemiyle tayini yapıldı.

2.6.4. pH Kararlılığı

İmmobilize enzimin pH kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla 100’er mg polimer farklı pH’larda asetat tamponu (pH 4, 5), fosfat tamponu (pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8) ve

Tris/HCl (pH 9) 1 saat bekletildikten sonra kısım 2.3’de verilen tayin yöntemiyle tayini yapıldı.

2.6.5. Tekrar kullanılabilirlik

Endüstriyel uygulamalarda kullanılması açısından tekrar kullanılabilirlik önemli bir parametredir. Bu nedenle 100’er mg immobilize enzim aktivitesi %50’nin altına düşene kadar tekrar tekrar standart aktivite metoduyla ölçümleri yapıldı.

2.6.6. Kinetik parametrelerin belirlenmesi

Kinetik parametrelerin belirlenmesi amacıyla farklı substrat (asetilkolin) konsantrasyonlarında (0.020, 0.025, 0.028, 0.033, 0.040, 0.050, 0.066, 0.10, 0.20, 0.50) çözeltiler hazırlandı. 100 mg immobilize enzim ve serbest enzimle (0,0155 Unit) inkübasyondan sonra aktivite ölçümleri yapıldı.

2.6.7. Operasyonel Kararlılık

Enzimlerin operasyonel kararlılığı, immobilize sistemlerin endüstriyel uygulamalarında önemli bir parametredir. Operasyon zamanı ile enzim aktivitesindeki azalma arasındaki ilişki belirlenerek biyokatalizörün yarı ömrü ($t_{1/2}$) hesaplanır. Tekrar kullanılabilirlik deneylerinden elde edilen veriler ile denklem 2.2’de verilen denklem kullanılarak immobilize enzimin yarılanma ömrü hesaplandı.

$$\text{Yarılanma ömrü (dk)} = (2,303/t) \times (\log A_0/A) \quad (\text{Denklem 2.2.})$$

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Farklı pH'larda tampon çözeltiler kullanılarak maksimum desorpsiyon tayini ve enzim immobilizasyonunun optimizasyonu (Yöntem A)

Maksimum desorpsiyonu belirlemek amacıyla aşağıda ki Çizelge 3.1'de yer alan farklı tamponlarda desorpsiyon işlemi gerçekleştirildi ve Ellman metoduyla enzim aktiviteleri hesaplandı. Daha sonra aynı polimerin immobilizasyon sonununda süpernatant ve yıkama sularında protein tayini yapılarak immobilize olan enzimin spesifik aktivitesi hesaplandı. Sonuçlara göre pH 2'de en iyi desorpsiyonun gerçekleştiği görüldü. Bunun nedeni pH 2'de ortamda bulunan yoğun H^+ iyonlarından dolayı asetilkolin ile monomer arasındaki iyonik etkileşimin daha fazla bozulduğu ve asetilkolinin polimerden uzaklaştığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 3.1. Farklı pH'larda yapılan desorpsiyondan sonra enzim immobilizasyonu

Desorpsiyon Aracı	İmmobilize olmayan toplam protein ($\times 10^{-4}$ mg)	Aktivite ($\times 10^{-7}$ U)	İmmobilize olan Toplam Protein ($\times 10^{-4}$ mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein $\times 10^{-3}$)
Serbest Enzim	0	21	25,3	0,830
ACh'siz (Kör)	10,65	5,3	14,65	0,362
pH 2	12,25	27	13,05	2,069
pH 3	9,35	25	15,95	1,567
pH 4	8,7	9,5	16,6	0,572
pH 5	9,7	0,00147	15,6	0,0000942
pH 6	11,6	0,00147	13,7	0,0000942
pH 7	12,1	3,5	13,2	0,265
pH 8	11,6	8,1	13,7	0,591
pH 9	15,1	6,4	10,2	0,627
pH 10	12,5	8,1	12,8	0,633

Yapılan ilk denemeler sonucunda elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliğini denemek amacıyla farklı olan tüm farklı tamponlarda yapılan desorpsiyon sonrası spesifik aktivite ölçümleri tekrar edildi ve bulguların tutarlılığı tartışıldı.

3.2. ACh damgalı (desorpsiyonsuz) polimerlerde enzim immobilizasyonunun optimizasyonu (Yöntem B)

Desorpsiyon işleminin immobilizasyona etkisini belirlemek amacıyla aynı polimerizasyon koşullarında hazırlanan polimerler yine aynı işlemlerden geçirilerek immobilizasyon yapıldı ve daha sonra aktivite ve protein tayini yapılarak spesifik aktiviteleri hesaplandı. Daha sonra yapılan deneylerin doğruluğunu belirlemek amacıyla tekrarlandı ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki çizelgede verildi.

Çizelge 3.2. Desorpsiyon yapılmadan ACh’li ve Kör polimere enzim immobilizasyonu

	Protein Miktarı ($\times 10^{-4}$ mg)	İmmobilize Olan Protein ($\times 10^{-4}$ mg)	Aktivite ($\times 10^{-7}$ U)	Spesifik Aktivite ($\times 10^{-3}$ U/mg)
Serbest Enzim	20	-	17	0,85
ACh’li	20	13,4	11	0,82
Kör	20	12,6	13	1,03

Yapılan desorpsiyonlu ve desorpsiyonsuz moleküler damgalı polimer immobilizasyonundan; ACh’li ve ACh’siz elde edilen sonuçlara göre moleküler damgalı ve desorpsiyonlu olan polimerlerin spesifik aktivitelerin desorpsiyonsuz ve ACh’siz olan yönteme göre daha etkili olduğu görülmüştür. Bunun nedeni ise kalıp molekül olarak kullanılan ACh’nin polimerin içine gömüldüğü ve pH 2 tamponunda oluşturulan polimerden uzaklaşmış olduğunu, kalıp moleküle spesifik boşlukların ve dolayısıyla enzime spesifik bağlanma bölgelerinin oluşmasının immobilizasyonda önemli rol oynadığından dolayı daha yüksek spesifik aktivite görülmektedir.

3.3. Enzim Miktarının Optimizasyonu

Yöntemimizde kullanılacak enzimin en uygun miktarın belirlenmesi için farklı miktarlarda enzim kullanılarak aşağıdaki çizelgede verilen sonuçlar elde edildi. Elde edilen sonuçlara göre en uygun enzim miktarı $6,8 \times 10^{-4}$ mg olarak belirlendi.

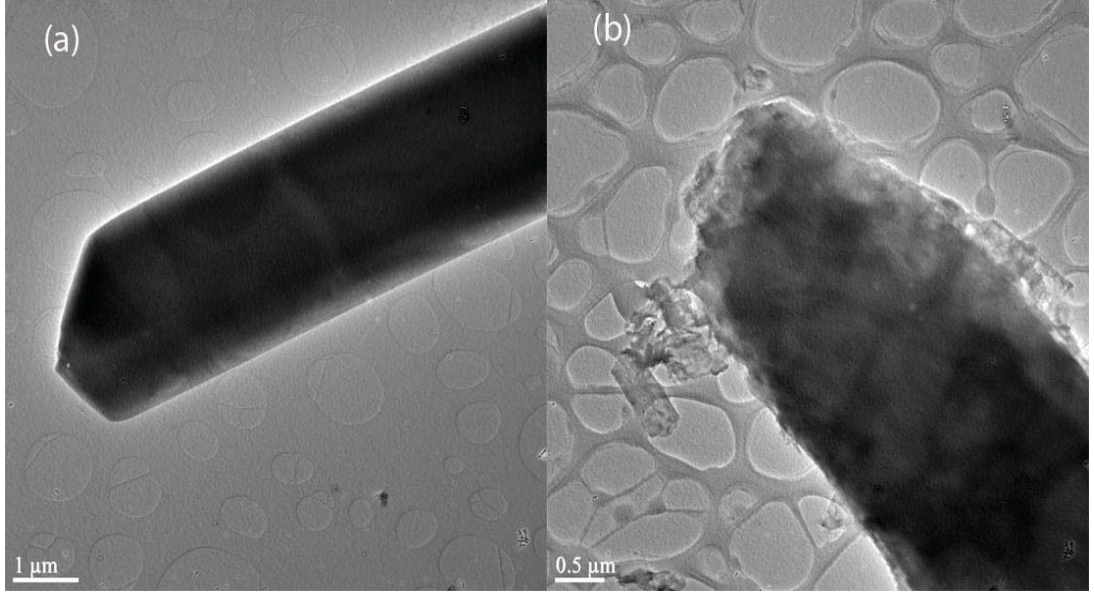
$6,8 \times 10^{-4}$ mg enzim miktarıyla immobilize edilen enzim çözeltisinde bulunan aktif olan enzimlerin oluşturulan polimerdeki spesifik boşluklara tamamen immobilize

olduğunu ortaya koymaktadır. Sonraki yapılan karakterizasyon denemelerinde kullanılmak üzere bu enzim miktarı kullanıldı.

Çizelge 3.3. Enzim optimizasyonu için kullanılan miktarlar ve aktivite sonuçları

Ortama ilave edilen enzim miktarı ($\times 10^{-4}$ mg)	Serbest Enzim Aktivite ($\times 10^{-7}$ U)	Serbest Enzim Spesifik Aktivite ($\times 10^{-3}$ U/mg)	İmmobilize Olan Protein ($\times 10^{-4}$ mg)	İmmobilize Enzim Aktivite ($\times 10^{-7}$ U)	İmmobilize Enzim Spesifik Aktivite ($\times 10^{-3}$ U/mg)
6,8	2,9	0,43	6,8	12,1	1,8
10,3	7,4	0,72	10,3	14	1,36
15	17	1,13	12,3	17	1,4
16	9,2	0,575	16	18,4	1,15
28	21	0,830	13,05	27	2,1

3.4. İmmobilize Enzim-Polimer Sisteminin (Yöntem A) ve asetilkolinsiz polimerin (Kör) TEM Analizleri



Şekil-3.1. Polimer (a) ve İmmobilize Enzim – Polimer (b) sistemlerinin TEM görüntüleri

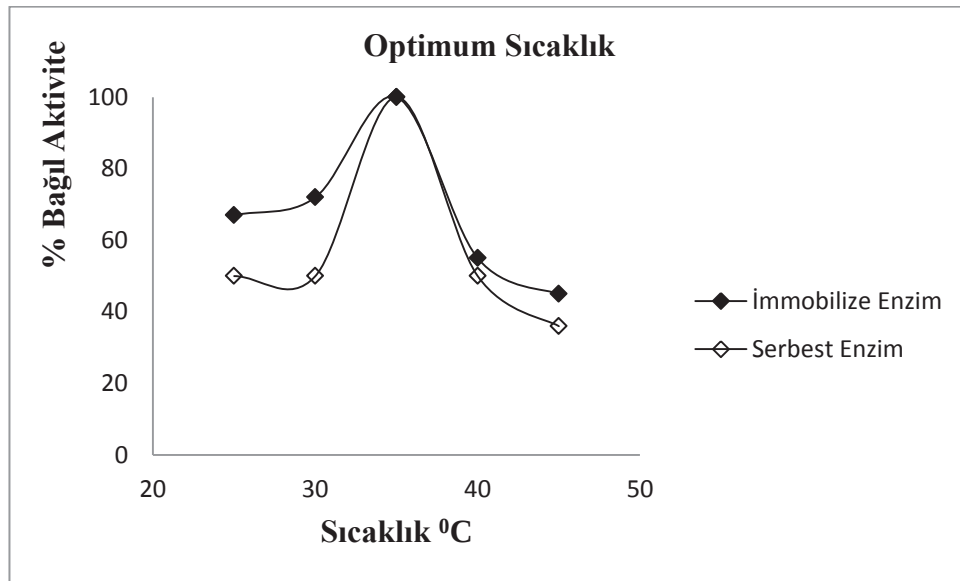
Şekil 3.1’de elde edilen polimer ve immobilize enzim bulunduran polimerin geçirgenlik elektron mikroskobu görüntüleri bulunmaktadır. Şekil-3.1.(a)’da görülebileceği gibi elde edilen polimerler kristal yapıda, çubuk şeklinde ve keskin hatlara sahiptir. Şekil-3.1.(b)’de enzim immobilize edilen polimerlere ait görüntülerde çubuksu yapının korunduğu fakat bu sistemlerde keskin hatların yerine enzimlerin yüzeyde entegre olmasıyla birikmeler gözlemlenmektedir.

3.5. KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

Yöntem A ve Yöntem B’nin immobilizasyon sonrası spesifik aktivite sonuçlarına göre en uygun yöntemin A yöntemi olduğu sonucuna varıldı. Enzim optimizasyonu yapılarak en uygun enzim miktarının $6,8 \times 10^{-4}$ mg olduğu belirlendi. Daha sonra yöntem A ve $6,8 \times 10^{-4}$ mg enzim kullanılarak immobilize enzimin karakterizasyon çalışmalarına geçildi.

3.5.1. Optimum Sıcaklık

İmmobilize enzim preparatlarının optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla elde edilen 100'er mg ACh desorpsiyonlu immobilize enzimle belirlenen (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65°C) sıcaklıklarda 1 saat inkübasyondan sonra aktivite tayini yapıldı. Şekil 3.1'de görüleceği üzere immobilize enzim ve serbest enzimle aynı optimum sıcaklıkta kalarak değişmediği görüldü (35°C). Şahin ve arkadaşlarına (2005) göre; Asetilkolin esterase enziminin aljinat ve K-karragen polimeriyle yapılan immobilizasyon çalışmasında, serbest asetilkolin esterase enziminin ve immobilize asetilkolin esterase enziminin optimum sıcaklığı 30°C olarak bulunmuş ve sonuçlarının aynı çıkmasının nedeni olarak enzimlerin küçük bir alanda fiziksel olarak bağlanmalarından kaynaklandığını öngörmüşlerdir (Şahin vd., 2005). Şekil 3.1'de görüldüğü gibi 35°C'nin altında immobilize enzimin aktivitesi serbest enzime kıyasla daha fazla olması bu sıcaklıklarda uzun süreli çalışmalar için avantajlı olduğunu göstermektedir.

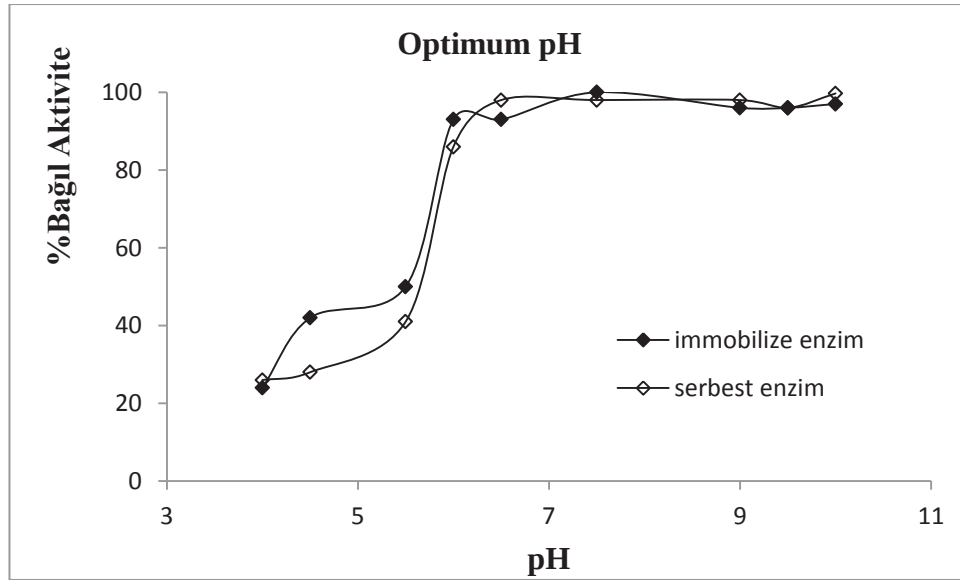


Şekil 3.2. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

3.5.2. Optimum pH

Optimum pH sulu çözeltilerdeki enzimler için önemli parametrelerden biridir. Bu amaçla 0,1 mM substrat farklı asetat tamponu 50mM (pH 4, 4.5, 5, 5.5), fosfat

tamponu 50mM (pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5) ve Tris/HCl tamponu 50mM (pH 9, 9.5, 10) tamponlarda 100'er mg immobilize enzimle inkübe edildikten sonra aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre serbest enzimin optimum pH miktarı 7,5 olarak belirlendi. Daha yüksek pH'larda immobilize enzimle serbest enzim arasında fark görülmedi. pH 6 ile pH 10 aralığındaki pH'larda çalışma olanağı sağlandı. Nguyen ve arkadaşlarının (1997) asetilkolin esteraz enziminin sudaki ve biyolojik sıvılardaki enzim inhibitörlerinin tespiti için mikro titrasyon plakaları üzerine immobilizasyonu çalışmasında optimum pH 7,2 ile 8,2 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. (Nguyen vd., 1997). pH 4.5 ve 5.5 arasında immobilize enzimin aktivitesinin serbest enzime kıyasla fazla bulunması, immobilizasyondan dolayı enzimin düşük pH'larda daha stabil kalabildiğini göstermektedir.

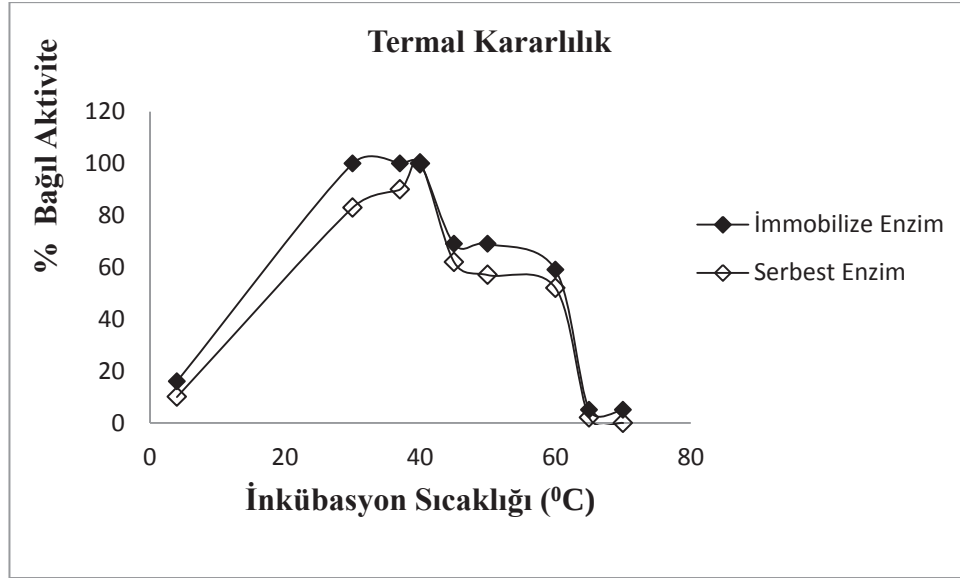


Şekil 3.3. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine pH etkisi

3.5.3. Termal Kararlılık

İmmobilize enzimin termal kararlılığını belirlemek amacıyla 100'er mg alarak farklı (4, 30, 37, 40, 45, 50, 60, 65, 70°C) sıcaklıklardaki su banyolarında 1'er saat inkübe ettikten sonra aktivite ölçümleri yapıldı. İmmobilize enzimin aktivitesi 60°C'de %59 ve serbest enzimin aktivitesinin %52 olduğu görüldü. Şahin ve arkadaşlarına (2005) göre; Asetilkolin esteraz enziminin aljinat ve K-karragen bileşikleriyle yapılan immobilizasyon çalışmasında; asetilkolin esteraz enziminin termal kararlılığı

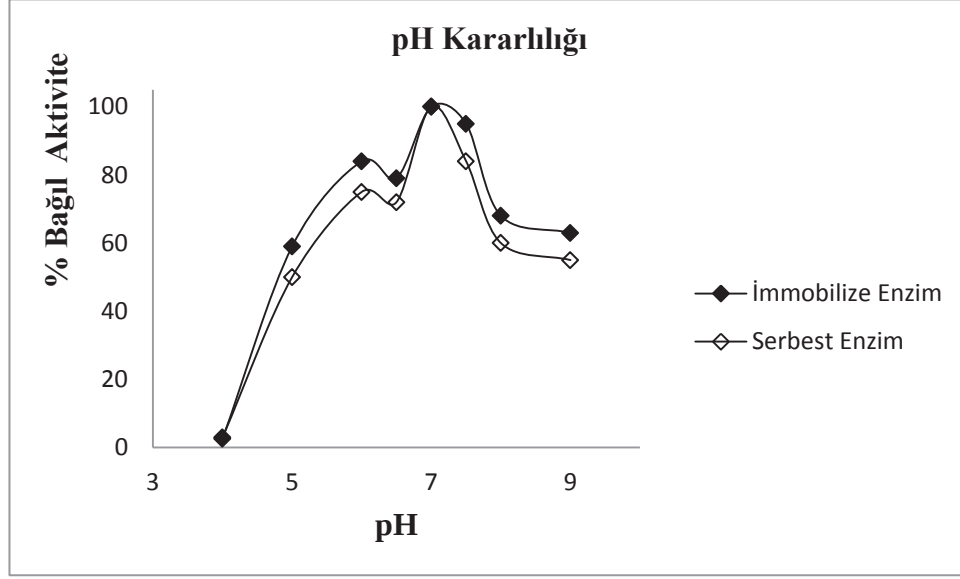
40°C’de immobilize enzim aktivitesi %49 ve serbest enzimin aktivitesi %45 olarak bulundu ve immobilize enzimin serbest enzime göre kararlılığının daha geç bozulduğu görülmüştür. Bunun nedenini ise immobilizasyon yönteminin muhtemelen enzimin kuarterner yapısını koruduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Şahin vd., 2005). Genel olarak immobilize enzimler immobilizasyon tipine bağlı olarak kararlılıklarını az yada çok korumaktadır.



Şekil 3.4. İmmobilize ve serbest enzimin termal kararlılığının belirlenmesi

3.5.4.pH Kararlılığı

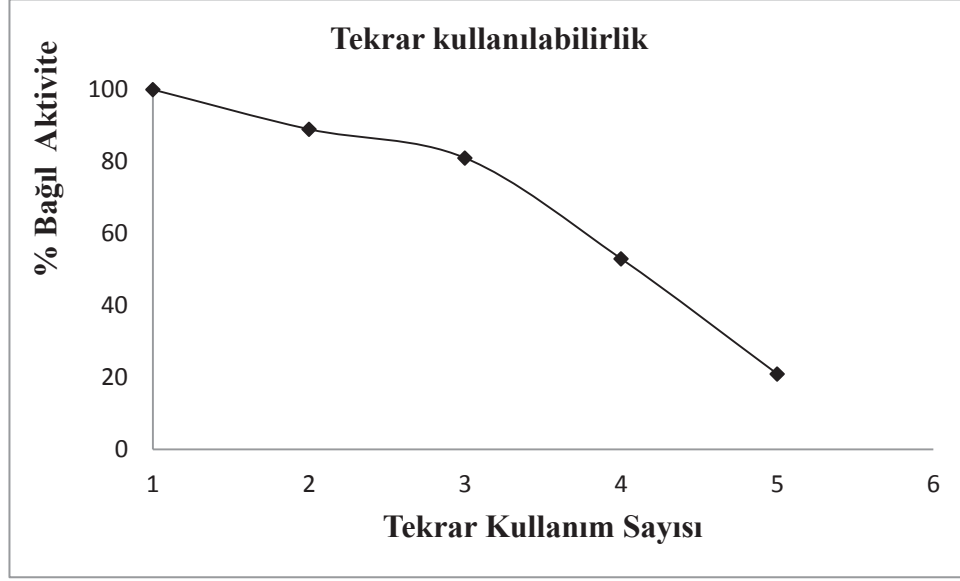
pH kararlılığını belirlemek amacıyla 100’er mg immobilize enzim preparatı farklı tamponlarda asetat tamponu (pH 4, 5), fosfat tamponu (pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8) ve Tris/HCl tamponu (pH 9) 1 saat inkübasyondan sonra 0,1 mM substrat (asetiltiyokolin) ile aktivite tayini yapıldı. Sonuçlara göre immobilize enzimin ve serbest enzimin pH kararlılığı asidik ve bazik koşullarda zayıf olduğu görüldü. Marinov ve arkadaşlarının (2009) yaptığı nano yapıli poliakrilonitril membranlarında asetilkolin esterase immobilizasyonu çalışmasında, immobilize enzimin düşük ve yüksek pH koşullarında serbest enzime göre daha kararlı olduğu gözlenmiştir (Marinov vd., 2009). Bu çalışmada ise immobilize enzimin azda olsa serbest enzime kıyasla daha kararlı olduğu görüldü.



Şekil 3.5. İmmobilize ve serbest enzimin pH kararlılığının belirlenmesi

3.5.5. Tekrar kullanılabilirlik

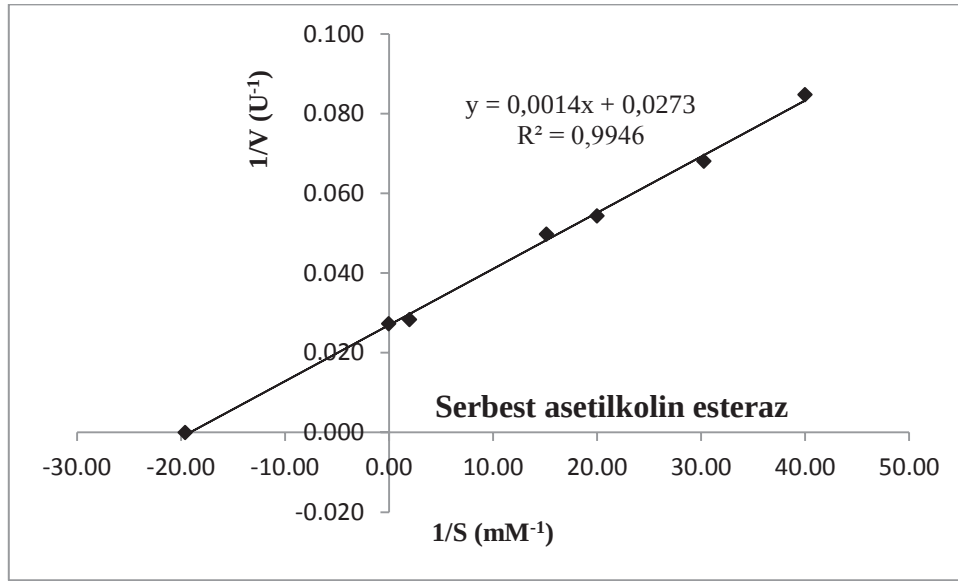
İmmobilize enzimlerin tekrarlanabilirlik özelliği onların kullanılabilirliği açısından önemli bir parametredir. Bu çalışmada immobilize asetilkolin esterase enziminin tayini 5 tekrarla belirlendi. 4 tekrardan sonra aktivite %21'e kadar düştü. Stoilova ve arkadaşlarının sitiren-maleik anhidrit kopolimerlerinden fonksiyonlu elektrospun keçeleri ile asetilkolin esterase enziminin immobilizasyonu çalışmasında 10 kere tekrarından sonra aktivitesinde %65 azalma görüldüğü belirtilmektedir. Bu aktivite kaybının nedeni ise muhtemelen destek materyalden enzimin her tekrarda azalmasından kaynaklandığı öngörülmektedir (Stoilova vd., 2010).



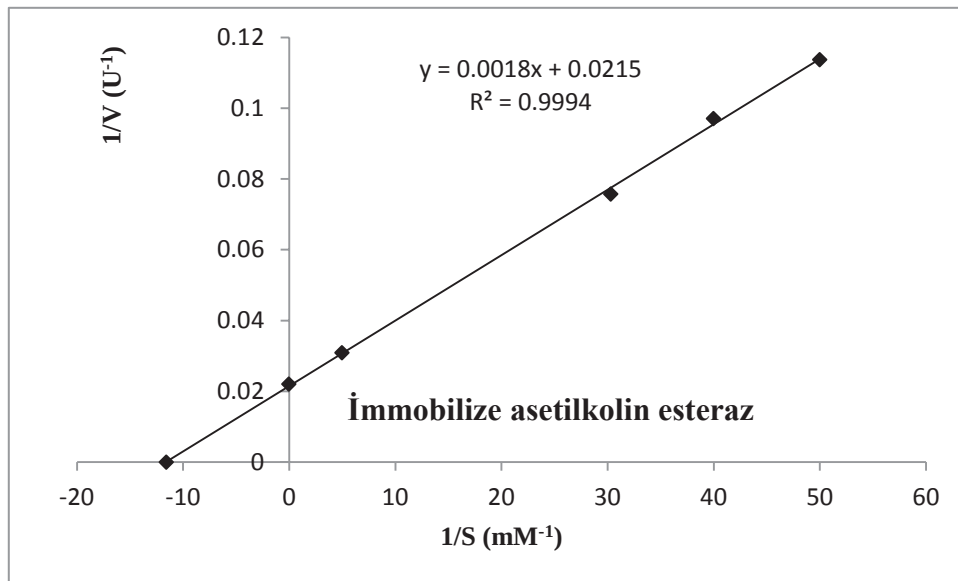
Şekil 3.6. Tekrar kullanılabilirlik

3.5.6. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Kinetik parametrelerin (K_m , V_m) belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda (0.020, 0.025, 0.028, 0.033, 0.040, 0.050, 0.066, 0.10, 0.20, 0.50) substrat çözeltileri hazırlandı. 100 mg immobilize enzim ve serbest enzimle inkübasyondan sonra aktivite ölçümleri yapıldı ve elde edilen sonuçlar Lineweaver-Burk diagramında yerine koyulup K_m ve V_m değerleri hesaplandı.



Şekil 3.7. Serbest enzimin Lineweaver-Burk diyagramı



Şekil 3.7. İmmobilize asetilkolin esteraz enziminin Lineweaver-Burk diyagramı

Çizelge 3.4. Serbest ve immobilize enzimin Km ve Vm değerleri

	Km (mM⁻¹)	Vm (U⁻¹)
Serbest Asetilkolin Esteraz	0,051	36,63
İmmobilize Asetilkolin Esteraz	0,087	45,66

Elde edilen sonuçlara göre serbest asetilkolin esteraz ile immobilize asetilkolin esterazın Km değerlerinde fazla bir değişiklik görülmedi. Bu sonuca göre enzimin immobilizasyon sırasında aktif merkezden bağlanmadığından dolayı immobilize enzimin substrata ilgisinde bir değişiklik olmadığı öngörüldü. İmmobilize enzimin Vm değerinde ise artış gözlemlendi. Şahin ve arkadaşlarına (2005) göre; Asetilkolin esteraz enziminin aljinat ve K-karragen polimerinde yapılan immobilizasyon çalışmasında; serbest enzimin Km değeri 6.35 mM, Vm değeri 50 mM min⁻¹ ve immobilize enzimin Km değeri 12.7 mM, Vm değeri ise 52.9 mM min⁻¹ olarak bulunmuştur. Bunun nedeni olarak immobilizasyonun enzim moleküllerinde bazı konformasyonel değişikliklere neden olduğu, immobilize enzim ortamının serbest enzim ortamında farklı olması ve son olarak enzimin immobilize olduğu yer ile çözelti ortamında ki substrat konsantrasyonun farkından kaynaklandığı öngörülmüştür (Şahin vd., 2005).

Sonuç olarak, genel olarak enzimlerin immobilizasyon sırasında immobilizasyon tipine bağlı olarak substratına olan ilgisinin azaldığı bilinmekte olup bu çalışmada da benzer sonuç elde edildi.

3.5.7. Operasyonel Kararlılık

Aşağıda yazılan denkleme göre immobilize edilen enzimin yarılanma ömrü hesaplandı ve immobilize enzimin yarılanma ömrü 8,94/dk olarak bulundu.

$$\text{Yarılanma ömrü (dk)} = (2,303/t) \times (\log A_0/A) \quad (\text{Denklem 3.1.})$$

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Moleküler damgalama yöntemi günümüzde birçok uygulamada kullanılmaktadır. Asetilkolinesteraz enzimi Alzheimer tedavisinde, biyosensör olarak, inhibitörlerinin bulunmasında, tarımda kullanılan böcek ilaçlarının ve diğer maddelerin miktarının belirlenmesi, tarım ilaçlarının belirlenmesi başta olmak üzere birçok kullanım alanı olan önemli bir enzimdir. Moleküler damgalama yöntemi asetilkolin esteraz enziminin immobilizasyonunda kullanılan bir yöntemdir. Moleküler damgalanmış asetilkolin esteraz enzim sistemi katı faz ekstraksiyonlarında, biyosensörlerde, saflaştırma işlemlerinde ve HPLC kolonlarında spesifik olarak ayırma ve tanıma amacıyla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, öncelikle asetilkolin esteraz enziminin substratı olan asetilkolini dispersiyon polimerizasyon yöntemiyle moleküler damgalı polimeri üretildi. Ardından, enzim iki yöntem kullanılarak immobilize edildi. Bunlardan ilki enzimin asetilkolinin polimerden desorpsiyonu sonrası immobilizasyonu (Yöntem A), ikincisi ise enzimin asetilkolinin polimerden desorpsiyonu yapılmadan immobilizasyonu (Yöntem B) ve son olarak asetilkolinsiz polimere (Kör) immobilizasyonu (kör) gerçekleştirildi. Yöntem A'da asetilkolin esteraz enziminin tamamı başarılı bir şekilde asetilkolin damgalı polimere spesifik ve seçici olarak immobilize edildi.

$6,8 \times 10^{-4}$ mg enzim miktarıyla immobilize edilen enzim çözeltisinde bulunan aktif olan enzimlerin, oluşturulan polimerdeki spesifik boşluklara tamamen immobilize olduğu görüldü. Sonraki yapılan karakterizasyon denemelerinde kullanılmak üzere bu enzim miktarı kullanıldı.

Serbest enzim ile immobilize enzimin karakterizasyonu çalışmalarında; optimum sıcaklık, optimum pH, termal kararlılık ve pH kararlılıkları yönüyle çok büyük bir farkının olmadığı görüldü. Sonuçlara göre; serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklığı 35°C , optimum pH 7.5 olarak belirlendi. Immobilize enzim için pH 6 ile pH 10 aralığındaki pH'larda çalışma olanağı sağlandı. pH kararlılığında ise immobilize enzimin azda olsa serbest enzime kıyasla daha kararlı olduğu görüldü. Tekrar kullanılabilirlik deneylerine göre yapılan yöntemin sürekli sistemlere uygulanabilirliğinin düşük olduğu görülmektedir. Bunun nedeni ise asetilkolin esteraz enziminin moleküler damgalı polimerde substratın bıraktığı boşluğa iyonik etkileşimler ile bağlandığı için ortamdan kolayca uzaklaştığından dolayı olduğu

öngörülmektedir. Kinetik parametrelerin (K_m , V_m) tayininde ise immobilize enzimin serbest enzime göre K_m değerinin fazla değişmediği ancak V_m değerinin arttığı görüldü. Bunun nedeni olarak immobilize enzimin konformasyonun değiştiği ve substratla etkileşiminin arttığı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında yapılan yöntemin uygulanabilirliği ve elde edilen moleküler damgalı polimerin duyarlılığının yüksek olması nedeniyle asetilkolin esteraz enziminin saflaştırma işlemlerinde spesifik olarak ayırma ve katı faz ekstraksiyonunda katı faz olarak farklı moleküllere uyarlanarak HPLC kolonlarında kullanılabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, S., Anwar, A. ve Saleemuddin M., 2001, Immobilization and stabilization of invertase on Cajanus Cajan lectin support, *Biosource Tech.*, 79:121-127
- Anitha, K., Mohan, S.V. ve Reddy, S.J., 2004, Development of acetylcholinesterase silica sol-gel immobilized biosensor—an application towards oxydemeton methyl detection, *Biosen. and Bioelect.*, 20:848-856
- Beilen, J.B. ve Li, Z., 2002. Enzyme Technology: an Overview. Current Opinion of Biotech., 13:338-334.
- Bossi, A., Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Righetti, P.G., Turner, A.P.F., 2001, Surface-grafted molecularly imprinted polymers for protein recognition, *Anal. Chem.*, 73: 5281-5286.
- Brown, E. ve Racois. A., 1984, Immobilization of trypsin previously protected by a synthetic water-soluble macromolecular inhibitor, *Makromol. Chem.*, 182:1605-1616
- Bruggemann, O., Visnjeviski, A., Burch, R. ve Patel, P., 2004, Selective extraction of antioxidants with molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta*, 504: 81-88.
- Caro, E., Marce, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G. ve Sherrington, D.C. 2006, Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples, *Trends. Anal.Chem.*, 25: 143-154.
- Caro, E., Marce, R.M., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C. ve Borrull, F., 2004, Molecularly imprinted solid-phase extraction of naphthalene sulfonates from water, *J. Chromatogr. A.*, 1047: 175-180.
- Caro, E., Marce, R.M., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C. ve Borrull, F., 2003, Kesiksiz solid-phase extraction with molecularly imprinted polymers to selectively extract substituted 4-chlorophenols and 4-nitrophenol from water, *J. Chromatogr. A.*, 995: 233-238.
- Caro, E., Masque', N., Marce', R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G. ve Sherrington, D.C., 2002, Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective off-line solid phase extraction of 4-nitrophenol from water samples, *J. Chromatogr. A.*, 963:169-178.
- Chapius, F., Pichon, V., Lanza, F., Sellergren, B. ve Hennion, M.C., 2004, Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers: Application to the extraction of triazines from complex matrices *J. Chromatogr. B.*, 804: 93-101.
- Chassaing, C., Stokes, J., Venn, R.F., Lanza, F., Sellergren, B., Holmberg, A., Berggren, C., 2004, Molecularly imprinted polymers for the determination of a pharmaceutical development compound in plasma using 96-well MISPE technology, *J. Chromatogr B.*, 804:71-81.

- Chena, P.Y., Vittal, R., Niena, P.C., Lioub, G.K. ve Ho, K.C., 2011, A novel molecularly imprinted polymer thin film as biosensor for uric acid, *Talanta*, 80:1145–1151
- Cunliffe, D., Kirby A. ve Alexander, C., Molecularly imprinted drug delivery systems, 2005, *Adv. Drug Del. Rev.*, 57:1836– 1853
- Curti, R., Colombo, U, 1952, Chromatography of stereoisomers with ‘tailor made’ compounds,. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 3961–3961.
- Deng, G., Markowitz, M.A., Kust, P.R., Gaber, B.P., 2000, Control of surface expression of functional groups on silica particles, *Mater. Sci. Eng. C*, 11: 165–172.
- Flor, P.Q. ve Hayashida, S., 1983. *Biotech. Bioeng.*, 25: 1923-1924
- Gao, S.H. Wang, W. Wang, B.H., 2001, Building fluorescent sensors for carbohydrates using template-directed polymerizations, *Bioorganic Chem.*, 29: 308–320.
- Germain, P. ve Crichton, R.R., 1988, Characterization of a chemically modified-amylase immobilized on porous silica, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 41:297–315
- Haldane, J.B.S., 1957, Graphical Methods In Enzyme Chemistry, *Nature*, 179:832
- Hirs, C.H.W., 1983. Methods in Enzymology, *Academic Press*, Vol:91.
- Jr. Koshland, D. E., 1958, Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 44:98-104
- Kanekiyo, Y., Sano, M., Iguchi, R., Shinkai, S., 2000, Novel nucleotideresponsive hydrogels designed from copolymers of boronic acid and cationic units and their applications as a QCM resonator system to nucleotide sensing, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 38: 1302–1310.
- Li, H., Wang, Z., Wu, B., Liu, X., Xue, Z. ve Lu, X., 2012, Rapid and sensitive detection of methyl-parathion pesticide with an electropolymerized, molecularly imprinted polymer capacitive sensor, *Electrochimica Acta*, 62:319–326
- Lubke, M., Whitcombe, M.J. ve Vulfson, E.N., 1998, A novel approach to the molecular imprinting of polychlorinated aromatic compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, 20: 13342–13348.
- Makote, R., Collinson, M.M., 1998, Dopamine recognition in templated silicate films. *Chem. Commun*, 425–426.
- Marinov, I., Gabrovska, K., Velichkova, J. ve Godjevargova, T., 2009, Immobilization of acetylcholinesterase on nanostructure polyacrylonitrile membranes, *Int. J. Bio. Macromol.*, 44:338–345
- Matsui, J., Akamatsu, K., Hara, N., Miyoshi, D., Nawafune, H., Tamaki, K. ve Sugimoto, N., 2005, SPR sensor chip for detection of small molecules using molecularly imprinted polymer with embedded gold nanoparticles, *Anal. Chem.*, 77: 4282-4285.

- Melanson, S.W., Chang-Hyon, Y., Pezzementi, M.L. ve Pezzementi, L., 1985, Comparative Biochemistry and Physiology, *Comp. Phar.*, 81:87-96
- Molinelli, A., OcMahony, J., Smyth, M.R., Jakusch, M. ve Mizaikoff, B., 2005, Analyzing the mechanisms of selectivity in biomimetic self-assemblies via IR and NMR spectroscopy of prepolymerization solutions and molecular dynamics simulations, *Anal. Chem.*, 77: 5196–5204.
- Mosbach, K., Ramson, O., 1996, The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, *Biotechnol.*, 14: 163–170.
- Nguyen, V.K., Ehret-Sabatier, L., Goeldner, M., Boudier, C., Jamet, G., Warter, J.M. ve Poindron, P., 1997, Stabilization of dry immobilized acetylcholinesterase on microtitration plates for calorimetric determination of its inhibitors in water and biological fluids, *Enz. and Microbial Tech.*, 20:18-23
- O'Mahony, J., Molinelli, A., Nolan, K., Smyth, M.R., Mizaikoff, B., 2005, Anatomy of a successful imprint: Analysing the recognition mechanisms of a molecularly imprinted polymer for quercetin, *Biosens. Bioelectron.*, 21: 1383-1392.
- Okutucu, B., 2007, Serotonin'e spesifik moleküler damgalı polimerlerin hazırlanması ve karakterizasyonu, *Ege Üni. Fen Bil. Ens.*, (Doktora Tezi)
- Patel, A., Fouce, S. Ve Steinke, J.H.G., 2004, Novel stereoselective molecularly imprinted polymers via ring-opening metathesis polymerisation, *Anal. Chim. Acta*, 504:53-62
- Piletsky, S.A. Piletskaya, K., Piletskaya, E.V., Yano, K., Kugimiya, A., Elgersma, A.V., Levi, R., Kahlow, U., Takeuchi, T., Karube, I., Panasyuk, T.I., Elskaya, A.V. 1996, A biomimetic receptor system for sialic acid based on molecular imprinting, *Anal. Lett.*, 29: 157–170.
- Piletsky, S.A., Turner, A.P.F., 2002, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers, *Electroanal.*, 14: 317-323.
- Polyakov M.V., 1931, Adsorption properties and structure of silica gel, *Zhur. Fiz.Khim.*, 2: 799–805
- Puzio, K., Delepee, R., Vidal, R. ve Agrofoglio A.L., 2013, Combination of computational methods, adsorption isotherms and selectivity tests for the conception of a mixed non-covalent–semi-covalent molecularly imprinted polymer of vanillin, *Anal. Chim. Acta*, 790:47-55
- Quiococho, F.A. ve Richards, F.M., 1964. Intermolecular Cross Linking of a Protein in the Crystalline State: Carboxypeptidase-A, *Proc Natl Acad. Sci.*, 52:833-839.
- Ramström, L. Andersson, I. ve Mosbach, K., 1993, Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting, *J. Org. Chem.*, 58: 7562–7564.
- Rosell, C.M., Fernandez-Lafuente, R. ve Guizan, J.M., 1995, Modification of enzyme properties by the use of inhibitors during their stabilization by multipoint covalent attachment. *Biocatal. Biotransform.*, 12:67–76

- Savir, Y. ve Tlusty, T., 2007, Conformational Proofreading: The Impact of Conformational Changes on the Specificity of Molecular Recognition, *PLoS One*, 5:468
- Stoilova, O., Ignatova, M., Manolova, N., Godjevargova, T., Mita D.G. ve Rashkov, I., 2010, Functionalized electrospun mats from styrene–maleic anhydride copolymers for immobilization of acetylcholinesterase, *Euro. Poly. J.*, 46:1966–1974
- Şahin, F., Demirel G. ve Tümtürk H., 2005, A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase, *Int. J. Bio. Macromol.*, 37 :148–153
- Tamayo, F.G., Casillas, J.L. ve Martin-Esteban, A., 2003, Highly selective fenuron-imprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation polymerisation and its application to the clean-up of fenuron in plant samples, *Anal. Chim. Acta*, 482: 165-173.
- Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji. Lisanüstü Yaz okulu, Aydın, Türkiye.
- Topçular, C., 2005, İmmobilize enzim sistemleri, Beytepe, Ankara
- Van Leeputen, E. ve Horisberger, M., 1974, Immobilization of enzymes on magnetic particles. *Biotechnol. Bioeng.*, 16:385–396
- Verheyen, E., Schillemans, J. P., Van Wijk, M., Demeniex, M.A., Hennink, W.E. ve Van Nostrum, C.F., 2011, Challenges for the effective molecular imprinting of proteins, *Biomaterials*, 32:3008-3020
- Wulff, G., 1982, Selective binding to polymers via covalent bonds the construction of chiral cavities as specific receptor- sites, *Pure Appl. Chem*, 54: 2093–2102.
- Yan, X., Zhou, H., Zhang, Z., He, D. ve He, C., 2006, Determination of hydralazine with flow injection chemiluminescence sensor using molecularly imprinted polymer as recognition element, *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 41:694-700
- Yano, K. ve Karube, I., 1999, Molecularly imprinted polymers for biosensor applications, *Trend. Anal. Chem.*, 18:199-204.
- Zamfir, L.G., Rotariu, L. ve Bala, C., 2011, A novel, sensitive, reusable and low potential acetylcholinesterase biosensor for chlorpyrifos based on 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate/multiwalled carbon nanotubes gel, *Biosen. and Bioelect.*, 26:3692–3695
- Zimmerman, S.C. ve Lemcoff, N.G., 2004, Synthetic hosts via molecular imprinting are universal synthetic antibodies realistically possible, *Chem. Commun.*, 5–14.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad :Gökhan DEMİRCİ
Uyruk :T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi :ÜSKÜDAR 20/01/1988
Medeni Hali :Bekar
Telefon :0 555 761 25 02
E-posta :luapy_2004@hotmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Ümraniye Atakent Lisesi	2005
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2011

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/Görev
2007	Antalya	Tezgahtar
2007-2011	Muğla	Şef Garson
2011-2012	Muğla	Şef Garson

Yabancı Dil(ler)

İngilizce	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma			X
Konuşma			X
Anlama			X
Okuma			X

Hobiler

- 1- Futbol
- 2- Play Station
- 3- Aşçılık ve yemek pişirme