

**MANYETİK NANOPARTİKÜLLER VE ÇAPRAZ
BAĞLI LİPAZ AGREGATLARI KULLANILARAK
YENİ BİR BİYOKATALİZÖR GELİŞTİRİLMESİ**

EMRE AKKUŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI
2015**

**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MANYETİK NANOPARTİKÜLLER VE ÇAPRAZ BAĞLI
LİPAZ AGREGATLARI KULLANILARAK
YENİ BİR BİYOKATALİZÖR GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Emre AKKUŞ
(201292121082)**

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sema SALGIN

**SİVAS
OCAK 2015**

EMRE AKKUŞ'un hazırladığı ve “**Manyetik Nanopartiküller ve Çapraz Bağlı Lipaz Agregatları Kullanılarak Yeni Bir Biyokatalizör Geliştirilmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Sema SALGIN**
Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Uğur SALGIN**
Cumhuriyet Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan
ÇAĞLAYAN
Cumhuriyet Üniversitesi

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından M-518 No'lu proje ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)-MPNS COST Action MP1201 tarafından 113Z170 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Bütün hakları saklıdır.
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Emre AKKUŞ, 2015

ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

05.01.2015

Emre AKKUŞ

ÖZET

MANYETİK NANOPARTİKÜLLER VE ÇAPRAZ BAĞLI LİPAZ AGREGATLARI KULLANILARAK YENİ BİR BİYOKATALİZÖR GELİŞTİRİLMESİ

EMRE AKKUŞ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sema SALGIN

2015, 72 + xvi sayfa

Enzimler nano ölçekte biyokatalizörler olup, organik sentez ve biyoteknolojik üretimler gibi birçok alanda artan uygulamaları bulunmaktadır. Enzimlerin endüstriyel uygulamalarında karşılaşılan en önemli sorunlar kısa katalitik ömürleri ve bulunduğu ortamdan geri kazanımında karşılaşılan güçlüklerdir. Enzimlerin tepkime ortamından ayrılmasını kolaylaştırmak için taşıyıcı matris üzerine tutuklamak tercih edilen bir yöntem olmasına rağmen, tutuklama yöntemlerinin her birinin; enzimin taşıyıcıdan sızması ya da tutuklanan enzimlerin aktivitesinde kayıplara sebep olması gibi bir takım sınırlamaları bulunmaktadır. Bu nedenle son yıllarda taşıyıcısız tutuklama yöntemlerinden biri olan ve enzimin çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA, Cross-Linked Enzyme Aggregates) oluşturularak elde edilen CLEA'ların enzimatik katalitik tepkimelerde kullanımı güncel bilimsel çalışma konuları arasına girmiştir. Ancak CLEA'ların tepkime ortamından santrifüj veya filtrasyon işlemleri ile ayrılması sırasında topaklaşması enzimin tekrar kullanımında ciddi bir problem yaratmaktadır.

Yukarıda belirtilen dar boğazların giderilmesi amacıyla bu yüksek lisans tez projesinde *Candida rugosa* lipaz enzimi kullanılarak manyetik CLEA üretimi amaçlanmıştır. Yüksek kararlılıkta ve manyetik alan uygulanması ile tepkime ortamından kolaylıkla ayrılabilen biyokatalizörler manyetik demir nanopartiküller

üzerine CLEA bağlanması ile üretilmiştir. Tez projesinin birinci basamağında manyetik demir oksit nanopartikül üretimi, birlikte çöktürme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Projenin ikinci basamağında üretilen manyetik nanopartiküllerin yüzeyi amino grupları bağlanarak fonksiyonel hale getirilmiştir. Üçüncü basamakta ise lipaz enziminin CLEA'ları hazırlanarak ve manyetik demir oksit nanopartikül yüzeyine bağlanmıştır. Son basamakta ise, üretilen manyetik CLEA'ların tepkime ortamından manyetik alan uygulayarak ayrılması incelenmiştir. Ayrıca CLEA ve manyetik CLEA'ların optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri, tekrar kullanılabilirliği ve aktivite kararlılıkları belirlenmiştir. CLEA'ların hidrodinamik boyut ve boyut dağılımları, zeta potansiyelleri ZetaSizer cihazında, yapısal değişimleri ise FTIR spektrometresinde, morfolojik karakterizasyonu SEM analizleri ile belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Demir nanopartikül, Manyetik ayırma, Lipaz, Çapraz bağlı enzim agregatları, Biyokatalizör

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A NOVEL BIOCATALYST USING MAGNETIC NANOPARTICLES AND CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES

EMRE AKKUŞ

Master of Science Thesis, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sema SALGIN

2015, 72 pages

Enzymes are nano scale biocatalysts and find increasing applications in many areas including organic synthesis and biotechnological production. The most important problems encountered in industrial applications of enzymes are the short catalytic lifetime of enzymes and difficulty in recovery from reaction medium. Although, the binding of enzyme on carrier matrix is a preferred method to facilitate separation of enzyme from the reaction medium, each method has disadvantages such as lost of enzyme activity and enzyme leakage from carrier. For this reason, the use of CLEA (Cross-Linked Enzyme Aggregates) which is one of the methods carrier-free enzyme immobilization and obtains from the formation of enzyme cross-linked enzyme aggregates, in enzymatic catalytic reactions has become one of the latest scientific study subjects. The clumping of CLEA during the separation of CLEA from reaction mixture by centrifugation or filtration is a serious problem for the reusability of enzyme.

In order to overcome the above mentioned drawbacks, this master thesis project focuses on the production of magnetic CLEA from *Candida rugosa* lipase enzyme. A highly stable and easily separable biocatalyst from reaction medium by applying a magnetic field was produced with the binding CLEA on the magnetic iron nanoparticles. In the first step of this project, the production of magnetic iron nanoparticles was carried out with the co-precipitation method. Surface of magnetic nanoparticles produced in the second step of the project were functionalized with

the binding to amino groups. In the third step, the CLEA of lipase enzyme was prepared and was bound to the surface of magnetic iron nanoparticles. In the last step, the separation of produced magnetic CLEA from the reaction medium by applying magnetic field was examined. In addition, the optimum pH and optimum temperature values, reusability and activity stability for CLEA and magnetic CLEA were determined. The hydrodynamic size and size distributions, and zeta potentials of CLEAs with Zetasizer equipment, the structural changes of CLEAs with FTIR spectrometer and morphology of CLEAs with SEM analysis were characterized.

Key Words: Iron nanoparticles, magnetic separation, lipase, cross-linked enzyme aggregates, biocatalyst.

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden sınırsızca yararlandığım ve bu suretle her zaman akademik gelişmeye katkıda bulunan, çalışmalarımın bir yol haritası oluşturmam ve sonuca başarılı bir şekilde ulaşmam için bana ışık tutan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sema SALGIN'a çok teşekkür ederim. Deneysel sonuçlarımın yorumlanmasında ve bazı dar boğazların aşılmasında verdiği fikirlerle çalışmalarımın destek olan hocam Prof. Dr. Uğur SALGIN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen araştırma grubumuzun üyeleri değerli arkadaşlarım; Kimya Mühendisleri Burak GÜNER, Ayşenur ÖZER, Hasan Hüseyin EKE, Serhat CEYLAN'a çok teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde çok büyük katkısı olan, benden maddi manevi desteğini esirgemeyen çok sevdiğim dedem rahmetli Hasan AKKUŞ'a, sevgili annem Hatice AKKUŞ, sevgili babam Köksal AKKUŞ'a ve çok sevgili abim Ahmet AKKUŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER DİZİNİ	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1 Amaç ve Kapsam.....	1
1.2 Önceki Çalışmalar.....	3
1.3 Çalışma ve Değerlendirme Yöntemleri.....	8
1.3.1 Nanoteknoloji ve nanopartiküller.....	8
1.3.2 Manyetik nanopartiküller.....	14
1.3.2.1 MIONP üretim yöntemleri.....	19
1.3.2.2 MIONP yüzeylerinin silanlama tepkimesi ile fonksiyonelleştirilmesi.....	23
1.3.3 Lipazlar.....	25
1.3.3.1 <i>Candida rugosa</i> lipaz enzimi.....	27
1.3.4 Taşıyıcısız enzim tutuklama yöntemi: Çapraz bağlı enzim agregatları.....	28
2. MATERYAL VE METOD	32
2.1 Materyal.....	32
2.2 Manyetik Demir Oksit Nanopartikül Üretimi: Birlikte Çöktürme Yöntemi.....	32
2.3 Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin Fonksiyonelleştirilmesi	33
2.4 CLEA ve Manyetik CLEA Üretimi.....	34
2.5 Analitik Yöntemler.....	34
2.5.1 CLEA ve manyetik CLEA aktivitesinin belirlenmesi.....	34
2.5.2 Biyokatalizörlerin en uygun işletim koşullarının belirlenmesi.....	35
2.5.3 CLEA ve manyetik CLEA saklama kararlılığı.....	36
2.5.4 Manyetik demir nanopartiküllerin hidrodinamik boyut ve zeta potansiyelinin belirlenmesi.....	36
2.5.5 FTIR spektrofotometre.....	37
2.5.6 SEM analizleri.....	37
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	38
3.1 Manyetik Demir Nanopartikülü Üretimine Mol Oranı Etkisi.....	38
3.2 Manyetik Demir Oksit Nanopartikül Yüzeyinin Fonksiyonelleştirilmesi.....	42
3.3 CLEA ve Manyetik CLEA Karakterizasyonu.....	45
3.4 CLEA'lar için En Uygun pH Değerinin Belirlenmesi.....	49

3.5 CLEA'lar için En Uygun Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....	51
3.6 CLEA ve manyetik CLEA üretiminde depolama stabilitesinin ölçülmesi.....	53
4. SONUÇLAR	55
KAYNAKLAR	58
EKLER	64
EK-1 <i>p</i> -Nitrofenol'ün Spektrum Taraması.....	65
EK-2 <i>p</i> -Nitrofenol için Kalibrasyon Doğrusu.....	66
EK-3 <i>p</i> -Nitrofenol için Absorptivite Değerinin Belirlenmesi ve Enzim Hidrolitik Aktivitesinin Hesaplanması.....	67
ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	Logaritmik ölçekli skalada nanomalzemelerin biyolojik örneklerle karşılaştırmalı olarak gösterimi..... 9
Şekil 1.2	ABD Ulusal Nanoteknoloji Girişim Kurumu'na göre nanoteknolojinin gelişim aşamaları..... 10
Şekil 1.3	Biyoteknoloji alanında kullanılan nanopartikül türleri..... 11
Şekil 1.4	Nanopatiküllerin boyut, morfoloji, bileşim, homojenlik ve aglomerasyon durumlarına göre sınıflandırılması..... 14
Şekil 1.5	MIONP türleri ve kullanım alanları..... 15
Şekil 1.6	Organik bileşiklerle fonksiyonelleştirilmiş MIONP formları..... 17
Şekil 1.7	Termal parçalanma ile Fe ₃ O ₄ sentezi..... 21
Şekil 1.8	MIONP'un yüzey modifikasyonu..... 23
Şekil 1.9	Silanlama tepkimesi ile MNP'lerin yüzey modifikasyonu..... 25
Şekil 1.10	MNP yüzey modifikasyonunda kullanılan silan grupları..... 25
Şekil 1.11	Açık ve kapalı kısımların da eklendiği <i>Candida rugosa</i> lipazının üç boyutlu yapısı..... 28
Şekil 1.12	Taşıyıcısız enzim tutuklama yöntemleri için farklı yaklaşımlar: a) Kristalizasyon b) Agregasyon c) Püsküterek kurutma d) Direkt..... 29
Şekil 2.1	MIONP üretim aşaması..... 33
Şekil 2.2	<i>p</i> -NPA'nın lipaz katalizli enzimatik hidroliz tepkimesi..... 35
Şekil 3.1	MIONP'ların neodimium mıknatıs ile yıkanması..... 38
Şekil 3.2	Fe ²⁺ :Fe ³⁺ farklı mol oranlarında birlikte çöktürme yöntemi ile üretilen MIONP'ların FTIR spektrumları: a) 1:2 b) 1:1 c) 1:3..... 40
Şekil 3.3	Manyetik demir oksit nanopartikül SEM görüntüsü..... 41
Şekil 3.4	Manyetik nanopartiküllerin ortalama boyut dağılımı..... 42
Şekil 3.5	Yüzeyi fonksiyonelleştirilmiş MIONP..... 43
Şekil 3.6	MIONP FTIR spektrumları: a) Orjinal b) APTS ile yüzeyi fonksiyonelleştirilmiş..... 43
Şekil 3.7	Sentezlenen CLEA'lar: a) manyetik CLEA b) CLEA..... 45
Şekil 3.8	FTIR spekturumları: a) CRL ve b) CLEA c) manyetik CLEA..... 46
Şekil 3.9	Polipeptid zinciri üzerindeki amid I ve amid II grupları..... 47
Şekil 3.10	MIONP SEM fotoğrafı..... 48
Şekil 3.11	MIONP-CLEA SEM görüntüsü..... 48
Şekil 3.12	pH ile CLEA aktivitesinin değişimi..... 49
Şekil 3.13	pH ile manyetik CLEA aktivitesinin değişimi..... 50
Şekil 3.14	Sıcaklık ile CLEA aktivitesinin değişimi..... 51
Şekil 3.15	Sıcaklık ile manyetik CLEA aktivitesinin değişimi..... 52
Şekil 3.16	CLEA aktivitesinin zamanla değişimi..... 53
Şekil 3.17	Manyetik CLEA aktivitesinin zamanla değişimi..... 54
Şekil 4.1	MIONP'ların manyetik alan altındaki hareketi..... 56
Şekil E1	<i>p</i> -Nitrofenol'ün spektrum taraması..... 65
Şekil E2	<i>p</i> -NP için kalibrasyon doğrusu..... 66

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 MNP üzerine tutuklanmış enzimler ve biyoteknolojik uygulamaları.....	8
Çizelge 1.2 MIONP türleri ve fizikokimyasal özellikleri.....	16
Çizelge 1.3 Manyetik nanopartiküllerin üretim yöntemlerinin karşılaştırılması.....	18
Çizelge 1.4 Lipazların endüstrideki bazı uygulamaları.....	12
Çizelge 3.1 MIONP'ların Z_{ort} PDI ve ZP değerleri: Mol oranı etkisi.....	38
Çizelge 3.2 Yüzeyi fonksiyonelleştirilen MIONP'ların Z_{ort} PDI ve ZP değerleri.....	44
Çizelge E1 <i>p</i> -Nitrofenol derişimlerinde ölçülen absorbans değerleri.....	66

SİMGELER DİZİNİ

a	Partikül yarıçapı, nm
A	Absorbans
b	Işığın çözelti içinde aldığı yol, cm
C	<i>p</i> -NP derişimi, μmol
D	Difüzyon katsayısı
k_B	Boltzmann sabiti, J/K
M_s	Doygunluk manyetizasyonu
V_{max}	Michealis-Menten sabiti
T	Sıcaklık, °C
t	Zaman, min
U	Enzim aktivitesi, $\mu\text{mol}_{\text{substrat}}/\text{g}_{\text{CLEA}} \text{ dakika}$
f(κa)	Henry fonksiyonu
ϵ	Ortamın dielektrik sabiti (78.5)
ζ	Zeta potansiyeli, mV
η	Ortamın viskozitesi, cP
κ	Elektriksel çift tabaka kalınlığının / Debye uzunluğunun tersi
λ	Dalga boyu, nm
μ_0	Vakum ya da manyetik sabitinin geçirgenliği
μ	Elektroforetik hareketlilik ($8.854 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$)

KISALTMALAR DİZİNİ

1D	: 1 boyutlu
2D	: 2 boyutlu
3D	: 3 boyutlu
AP-CLEA	: <i>L</i> -aminoaklaz çapraz bağlı enzim agregatları
AFTS	: <i>p</i> -aminofenil trimetoksisilan
APTS	: 3-Aminopropiltrimetoksisilan
acac	: Asetilasetonat
Asp	: Aspartat
CLE	: Çapraz bağlı enzim
CLEC	: Çapraz bağlı enzim kristali
CLEA	: Çapraz bağlı enzim agregatı
Con A	: Concanavalin A
CRL	: <i>Candida rugosa</i> lipazı
CSDE	: Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim
cup	: <i>N</i> -nitrofenilhidroksilamin
DLS	: Dinamik ışık saçılması analizi
ES	: Enzim-substrat kompleksi
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi
GA	: Gluteraldehit
Glu	: Glutamin
His	: Histidin
MPTES	: Merkaptopropiltrioksisilan
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
MNP	: Manyetik nanopartikül
MIONP	: Manyetik demir oksit nanopartikülü
NP	: Nanopartikül
PALS	: Faz analiz ışık saçılması analizi
PEG	: Polietilen glikol
PDI	: Polidispersivite indeksi
<i>p</i>-NPA	: <i>p</i> -Nitrofenilasetat
<i>p</i>-NP	: <i>p</i> -Nitrofenol
<i>p</i>-NPP	: <i>p</i> -Nitrofenilfosfat
RSM	: Cevap-yüzey yöntemi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
Ser	: Serin
TBA	: Ters-butil alkol
TEM	: Geçirgenlik elektron mikroskopisi
TEOS	: Tetraetilortosilikat
UV	: Ultraviyole
VSM	: Titreşim örnek magnetometrisi
XRD	: X-ışını kırınımı
XPS	: X-ışını fotoelektron spektroskopisi
Z_{ort}	: Ortalama hidrodinamik çap
ZP	: Zeta potansiyeli

1. GİRİŞ

1.1 Amaç ve Kapsam

Manyetik nanopartikül (MNP)'lerin biyoteknolojik uygulamaları günümüzde artan bir önem arz etmektedir. Biyomedikal, ilaç taşıyıcı sistemleri, hücre ayrılması, biyosensör ve enzimatik sentez gibi uygulama alanlarında nano boyutlu manyetik özellikli biyokonjüge materyallerin hazırlanması araştırmaların ilgi odağıdır. Biyomedikal uygulamalarda genelde manyetik demir oksit nanopartikül (Magnetic Iron Oxide Nanoparticle; MIONP)'ler biyouyumlu bir madde ile kaplanır ve sonra belirli bir bölgeye bağlanması için biyolojik veya kimyasal madde ile fonksiyonel hale getirilir.

MNP'ler, mikro akışkandan veya biyolojik süreçlerdeki akışkan ortamından harici mıknatıs ya da elektromıknatıs kullanılarak kolayca ayrılabilme avantajına sahiptir. Manyetik ayırma işlemleri biyolojik örneklerin saflaştırması, deriştirilmesi, izolasyonu ve kantitatif olarak belirlenmesinde son zamanlarda yapılan çalışmalarda başarılı bir biçimde uygulanmaktadır. Manyetik ayırma kompleks kimyasal veya biyolojik çözeltilerin santrifüjle/filtrasyonla ayrılmasının önemli bir alternatifidir.

Nanopartikül (NP)'ler birim kütlesi başına yüksek manyetizasyon, agregasyon olmadan daha uzun süre süspansiyon içinde kalma yeteneği ve çözelti içinde daha hızlı hareket etme gibi özellikleri sayesinde mikropartiküllere göre biyolojik moleküllerin saptanmasında birçok avantaja sahiptir. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan NP'lerin dar boyut dağılımına sahip olması, imünojenik ve antijenliğinin olmaması, protein adsorpsiyonuna dayanıklı yüzey modifikasyon ajanlarıyla uyumlu olması gerekmektedir [1].

Biyoteknolojik prosesler ve biyoürünler içinde oldukça önemli yeri olan enzimlerin ayırma işlemleri sırasında yüksek saflıkta geri kazanımları, yapılarının denatüre olmaması ve katalitik aktivitelerini kaybetmemeleri kullanılacakları bir sonraki proses için önemlidir. Enzimlerin biyoürün ortamından ayırma işlemleri prosesin toplam maliyetinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle ayırma-

saflaştırma işlemlerinin biyoteknolojik üretimler için özel olarak geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Enzimlerin biyoürün ortamından ayrılması endüstriyel biyoproseslerde sıkça karşılaşılan problemlerden biridir. Enzimatik biyokatalitik tepkimeler genelde serbest enzimin viskoz veya iki fazlı sistemde yer aldığı yığın çözelti içinde gerçekleşmektedir. Tepkime ortamında serbest halde bulunan enzimlerin tepkime sona erdikten sonra geri kazanımı ve geri döngüsü pek mümkün değildir. Bu nedenle biyokatalitik proseslerde üretilen birim kütle ürün başına üretim maliyeti yüksektir. Dolayısıyla enzimatik üretimler sadece yüksek fiyatlı ürünler için maliyet açısından uygun olabilir. Enzimlerin taşıyıcı bir matrise tutuklanması biyokatalizörlerin tepkime ortamından ayrılmasını nispeten kolaylaştırırsa bile enzim aktivitesinin tutuklama işleminden sonra azalması, taşıyıcıdan sızma ve substratın enzimin aktif konumlarına ulaşmasını engelleyen difüzyon sınırlamaları önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu engellerin elimine edilmesi için enzimlerin taşıyıcısız tutuklama yöntemi olarak kabul edilen çapraz bağlı agregatlarının (Cross-Linked Enzyme Aggregates; CLEA) oluşturulması ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır. Bu yöntem ile üretilen CLEA biyokatalizörlerinin tepkime ortamından santrifüj veya filtrasyon gibi basit ayırma yöntemleri ile ayrılması ekonomik maliyet açısından uygun olsada bu işlemler sırasında CLEA'nın topaklaşması enzimin aktivitesini ve tekrar kullanılabilirliğini azaltmaktadır.

Dolayısıyla önerilen bu yüksek lisans tez projesinin amacı, tepkime ortamından enzimlerin geri kazanımında karşılaşılan güçlükleri giderebilmek ve enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini arttırmak için pH, ısı kararlılığı ve aktivitesi yüksek, tepkime ortamından manyetik olarak ayrılabilen yeni bir biyokatalizör geliştirmektir. Bu amaçla; birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenen MIONP'lar ile endüstride birçok önemli uygulaması bulunan hidrolaz enzim grubundan lipaz enziminin çapraz bağlı enzim agregatları şeklinde biyokonjüge kompleksi oluşturularak tasarlanan manyetik CLEA biyokatalizörleri ile hem CLEA'ların hem de MIONP'ların sahip oldukları üstünlükler tek bir potada bir araya getirilerek, manyetik alan uygulanması ile tepkime ortamından kolaylıkla ayrılabilen, yeniden kullanımı mümkün olan, kararlılığı ve aktivitesi yüksek yeni bir biyokatalizör

formu sentezlenmiştir. Sentezlenen MIONP'lar FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrum), DLS (Dynamic Light Scattering), PALS (Phase Analysis Light Scattering) ve SEM (Scanning Electron Microscopy) analizleri ile karakterize edilmiştir. MIONP sentezine $Fe^{2+}:Fe^{3+}$ mol oranı etkisi incelenmiş, belirlenen en uygun koşullarda manyetik CLEA'lar sentezlenmiş, CLEA ve manyetik CLEA'lar FTIR, DLS, PALS ve SEM analizleri ile karakterize edilerek pH, ısı ve depolama kararlılığı açısından karşılaştırılmıştır.

1.2 Önceki Çalışmalar

Biyomedikal ilaç taşıyıcı sistemleri, hücre ayrılması, biyosensör ve enzimatik tepkime gibi uygulama alanlarında nano boyutlu manyetik biyokonjüge materyallerin hazırlanmasına artan bir ilgi bulunmaktadır. Manyetik ayırma işlemleri biyolojik örneklerin saflaştırması, değiştirilmesi, izolasyonu ve kantitatif olarak belirlenmesinde son zamanlarda yapılan çalışmalarda başarılı bir biçimde uygulanmaktadır.

Literatür araştırmalarında manyetik biyokatalizörlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar incelendiğinde, bu araştırmaları serbest enzimlerin ve enzimlerin CLEA formları oluşturularak MIONP'lara bağlandığı çalışmalar olarak iki grupta incelemek mümkündür.

i. CLEA ve manyetik CLEA sentezini içeren çalışmalar

Bhattacharya ve Pletschke (2014) çalışmalarında lignosellülozik biyokütle dönüşümü için ksilinaz enziminin CLEA ve manyetik CLEA formunu oluşturmuşlardır. Manyetik CLEA ve kalsiyum içeren manyetik CLEA'ların serbest enzime kıyasla 1.35 kat daha yüksek aktivite gösterdiğini ve sırasıyla bu aktivitelerini %80 ve %90 oranlarında korudukları, CLEA'ların 50 °C'de 136 saat inkübasyondan sonra ise aktivitelerini %50 oranında korudukları gözlenmiştir. Serbest enzime kıyasla kalsiyum içeren manyetik CLEA ile kireçle ve NH_4OH ile ön işlem görmüş şeker kamışlarından şeker salınımının sırası ile 7.4 ve 9 kat arttığını bildirmişlerdir [2].

Talekar vd. (2012), α -amilazın GA çapraz bağlayıcısı kullanılarak CLEA formunu hazırlamış ve yüzeyi amino gruplarıyla fonksiyonel hale getirilmiş manyetik demir

nanopartiküller üzerine bağlamışlardır. Başlangıçtaki α -amilaz aktivitesinin %100'ü manyetik CLEA'lar ile geri kazanılırken, CLEA ile sadece %45'i kazanılmıştır. SEM analiz sonuçları CLEA ve manyetik CLEA'nın küresel yapıda olduğunu göstermiştir. CLEA ve manyetik CLEA'larda en uygun pH değeri asidik tarafa doğru kayma eğilimi göstermiş, manyetik CLEA'nın en uygun sıcaklık değeri ise serbest enzim ve CLEA formuna kıyasla gelişme göstermiştir. CLEA ve manyetik CLEA'da enzimin V_{max} değeri değişmemesine rağmen enzimin substrat afinitesinin arttığı gözlenmiştir. Manyetik CLEA'larda ayrıca termal ve depolama stabilitesinin arttığı gözlenmiştir. Manyetik CLEA'ların 6 kez kullanılmasına rağmen başlangıç aktivitelerini % 100 koruduğu gözlenmiştir [3].

Kopp vd. (2014) yaptıkları çalışmada süperparamanyetik nanopartiküller ile etiketlenmiş biyomoleküllerin, harici bir manyetik alan kullanılarak kompleks reaksiyon karışımlarından seçici bir şekilde ayrılabilceğini gözlemlemişlerdir. Süperparamanyetik MIONP'larını amino grupları ile fonksiyonel hale getirmişler ve birlikte agregasyon yöntemi ile penisilin G-asilaz enziminin, manyetik CLEA'larını, çöktürücü ajan olarak 1,2-dimetoksietan, ters-butil alkol (TBA) ve PEG 600 kullanarak sentezlemişler, katalitik ve morfolojik özelliklerini incelemişlerdir. Manyetik CLEA ve CLEA formlarının karakteristik özelliklerini aynı koşullar altında incelemişlerdir. PEG 600 çöktürücü ajanı kullanılarak üretilen manyetik CLEA'nın aktivitesini yüksek oranda koruduğunu, TBA kullanılarak üretilen manyetik CLEA'larının ise en stabil formda olduğunu gözlemlemişlerdir. Ardışık penisilin G hidroliz reaksiyonları aynı manyetik CLEA kullanılarak 50 mL'lik reaktörlerde (3 reaksiyon döngüsü) gerçekleştirilmiş ve bu süreç sonunda enzimin aktivitesinde herhangi bir kayıp olmadan manyetik ayırma ile tepkime ortamından alındığını bildirmişlerdir. X-ışını spektroskopisi ile amino bağlı manyetik nanopartiküllerin manyetik CLEA'ların yapısı içinde homojen olarak dağıldığı belirlenmiştir [4].

Vaidya vd. (2012) yaptıkları çalışmada, *Aspergillus melleus*'dan elde edilen L-aminoaklaz enzimini polietilimin ile birlikte agregasyonunu yapmış ve enzimin CLEA (AP-CLEA) formunu elde etmişlerdir. En uygun koşullar altında AP-CLEA aktivitesini % 74.9 oranında koruduğu ve agregasyon veriminin % 81.2 olduğu

gözlenmiştir. Birlikte agregasyon ve çapraz bağlanmanın enzimin katalitik aktivitesini sıcaklık ve depolama kararlılığı açısından arttırdığını gözlemlenmiştir. AP-CLEA, doğal olmayan üç aminoasitin (fenilglisin, homofenilalanin, 2-naftilalanin) enantioselektif sentezinde kullanılmıştır. AP-CLEA'nın enantioselektifliğinin aminoasit amidlerin hidrolizi için en yüksek, *N*-asetil aminoasit hidrolizi için orta ve amino asit esterlerin hidrolizi için en az olduğu gözlenmiştir. AP-CLEA'nın, (R,S)-homofenilalanin kinetik rezolüsyon tepkimesinde ard arda 5 kullanımdan sonra aktivitesi % 92'den fazla oranında koruduğu bildirilmiştir [5].

ii. Serbest enzimin manyetik nanopartiküle bağlanmasını içeren çalışmalar

Rossi vd. (2004), Fe(OH)₂'in alkali koşullar altında H₂O₂ varlığında oksidasyonu ile sentezledikleri 20 nm boyutundaki MNP'lerin yüzeyini APTES ile modifiye ettikten sonra ve glikoz oksidaz enzimini GA ile çapraz bağlayarak glukoz duyarlı MNP'ler geliştirmişlerdir. Glukoz oksidaz enziminin NP yüzeyine bağlanmasının enzim kararlılığını arttırdığını ve +4 °C saklama koşullarında aktivitesini 3 aydan daha fazla süre koruduğunu belirlemişlerdir [6].

Mosafa vd. (2013) papain enzimini kovalent olarak (3-kloropropil) trimetoksisilan ile modifiye edilmiş silika kaplı MNP'ler üzerine bağlamışlardır. Enzim tutuklanmış NP'ler TEM, XRD, VSM ve FTIR teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Yüzey cevap yöntemi (RSM) analizleri ile MNP'ler üzerine immobilize edilmiş papain enziminin en uygun işletme koşulları T=27.3 °C, pH =7.1, papain enzim konsantrasyonu 3.3 mg/mL, ve immobilizasyon süresi 10 saat olarak belirlenmiştir. Serbest papain enzimi ile karşılaştırıldığında, immobilize papain enziminin aktivitesinin arttığı, orta pH ve sıcaklık değişimlerine karşı dirençli olduğu, depolama kararlılığı ve yeniden kullanılabilirlik özelliğinin iyi olduğunu bildirmişlerdir [7].

Cui vd. (2010), nanoboyutta sentezledikleri manyetik destek üzerine lipaz enzimini GA ile çapraz bağladıkları çalışmalarında, tutuklanmış enzimin ısıl kararlılığının ve tekrar kullanılabilirliğinin arttığını bildirmişlerdir. Lipaz enziminin MNP yükleme miktarının 43.6 mg/g olduğunu ve yükleme işleminden sonra enzim aktivitesinin

%58.2'sinin korunduğu bildirerek bu değerlerin tutuklama işlemleri için kabul edilen değerler arasında olduğunu belirtmişlerdir [8].

Ren vd. (2011), polidopamin kaplı MNP üzerine lipaz enzimini tutukladıkları çalışmalarında optimum koşullarda 429 mg/g lipaz enziminin MNP'ye yüklendiğini bildirmişlerdir. Bu koşullarda serbest enzime göre pH ve ısı kararlılığının arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca geliştirdikleri manyetik biyokatalizörün manyetik ayırma ile ortamdan kolayca ayrıldığını ve başlangıç aktivitesinin %70'ini 21 kere tekrar edilen reaksiyondan sonra koruduğunu bildirmişlerdir [9].

Lee vd. (2008), çalışmalarında ters misel yöntemi ile ürettikleri manyetik demir nanopartiküllerin üzerini tetraetilortosilikat (TEOS) ile muamele ederek silika kapladıktan sonra yüzey üzerine lipaz ve kimotripsini GA ile çapraz bağlayarak tutuklamış ve sonuçta kararlılığı ve aktivitesi yüksek, yeniden kullanımı mümkün biyokatalizörler elde etmişlerdir [10].

Ying vd. (2012), süperparamanyetik NP yüzeyini glukonik asit ile modifiye ettikten sonra yüzey üzerine lipaz enzimini karbodiimid çapraz bağlayıcısı kullanarak tutuklamışlardır. MNP yüzeyinde glukonik asit varlığını FTIR spektroskopisi ile analizlemişlerdir. Tutuklanmış lipazların sıcaklık ve pH inaktivasyonuna karşı serbest enzime kıyasla daha dirençli olduğunu ve bu yüzden reaksiyon pH ve sıcaklık aralığının genişlediğini bildirmişlerdir. Ayrıca tutuklanmış lipazların tekrar kullanımda yüksek aktivite gösterdiklerini ve manyetik ayırma için uygun olacağını bildirmişlerdir [11].

Park vd. (2011), birlikte çöktürme ve $Fe(OH)_2$ 'nin oksidasyonu yöntemleri ile üç farklı boyutta (5, 26 ve 51 nm) MNP sentezlemişlerdir. Glukoz oksidaz enzimini APTES ile modifiye ettikleri yüzey üzerine GA ile bağlamışlardır. TEM analizlerinden MNP'lerin küresel yapıda olduğunu ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) analizlerinden yüzey modifikasyonlarının ve enzim bağlanmasının başarısını gözlemlemişlerdir. Geri döngü kararlılık çalışmalarında 10 döngüden sonra, 51 nm ve 26 nm boyutundaki glukoz oksidaz bağlı MNP'lerde aktivitenin %20 oranında kaybolduğunu, 5 nm boyutundaki partiküllerde ise aktivitenin %96 oranında kaybolduğunu bildirmişlerdir [12].

Kanimozhi ve Perinbam (2013) süperparamanyetik NP'leri (Fe_3O_4) birlikte çöktürme yöntemiyle hazırlamış ve yüzeylerini işlevselleştirmek amacıyla APTES ile silanizasyon işlemi gerçekleştirmişlerdir. *Pseudomonas floresans* LP1'den saflaştırılmış lipaz, bağlayıcı madde olarak GA ile fonksiyonelleştirilen magnetit yüzeyine immobilize edilmiştir. NP'lerin karakterizasyonları TEM, SEM, XRD, VSM ve FTIR ile yapılmıştır. Magnetitlerin boyutları 10-30 nm olarak ölçülmüştür. İmmobilize MNP'lerin M_s değerinin 17.074 emu/g iken MNP'lerin M_s değerlerinin 28.34 emu/g olduğu tespit edilmiştir. İmmobilize lipaz enziminin 50 °C'den başlayıp 70 °C'ye artan sıcaklıklarda daha yüksek aktivite verdiği gözlenmiştir. Enzim aktivitesinin %75'inin 15 gün boyunca 4 kez yapılan tekrarlanabilirlik ölçümlerinde korunduğu gözlenmiştir [13].

Sulek vd. (2010) birlikte çöktürme yöntemi ile ürettikleri MIONP yüzeyine silika bağlayarak fonksiyonel hale getirmişler ve kolesterol oksidaz tutuklanmasını arttırmak için GA ile yüzey aktivasyonunu takiben tekrar orgonasilan ile kaplamışlardır. Enzim ise daha sonra kovalent olarak yüzeye bağlanmıştır. Manyetik silika nanokompozitlerin yapısal ve manyetik özellikleri; sırası ile TEM ve VSM ile belirlenmiştir. Serbest enzime kıyasla tutuklanmış enzimin aktivitesinin %50'sinin korunduğu bildirilmiştir [14].

Çizelge 1.1'de çeşitli enzimlerin farklı manyetik partiküller üzerine tutuklanması ve uygulamalarını içeren literatür çalışmaları özetlenmiştir [15].

Çizelge 1.1 MNP üzerine tutuklanmış enzimler ve biyoteknolojik uygulamaları

Enzim	Nanopartikül türü	Uygulaması
Lipaz	Fe ₃ O ₄ nanopartikül	<i>p</i> -Nitrofenilfosfat (<i>p</i> -NPP)'ın hidrolizi
Kolesterol oksidaz	Fe ₃ O ₄ nanopartikül	Serumdaki toplam kolesterol analizi
Haloalkan dehalojenaz	Silika kaplı demir oksit	Dehalojenaz dizini içeren füzyon proteinlerinin üretimi
Lakkaz	Kitosan manyetik nanopartikül	Çevresel kirleticilerin biyolojik yoldan iyileştirilmesi
α -Amilaz	Selüloz kaplı manyetik nanopartikül	Nişasta bozunması
Keratinaz	Fe ₃ O ₄ nanopartikül	Keratin sentezi
β -Galoksidaz	Concanavalin A (Con A) kaplı ZnO nanopartikül	Laktöz hidrolizi

Yukarıda verilen literatür çalışmalarından manyetik partiküllerin taşıyıcı sistem olarak enzim tutuklama işlemlerinde başarılı sonuçlar verdiği anlaşılmaktadır. Yapılan çalışmalarda herhangi bir enzimin CLEA formu oluşturmaksızın enzimler MNP yüzeyine tutuklanarak manyetik biyokatalizörler geliştirilmiştir. MNP-CLEA formundaki biyokatalizörü şeklinde literatürde yayımlanan sadece bir çalışmaya rastlanmıştır. Talekar vd. (2012) ilk defa amilaz enziminin çapraz bağlı agregat formunu MIONP üzerine bağlayarak enziminin manyetik biyokatalizörünü geliştirmişlerdir. Amilazın lizin içeriği düşük olduğu için enzimin mekanik olarak daha kararlı olması için ortama lizin eklemişlerdir. Hazırladıkları manyetik CLEA'ların tekrar kullanılabilirliğinin ve ısıl kararlılığının yüksek olduğunu, aktivitesini uzun süre koruduğunu, CLEA ve manyetik CLEA için Michealis-Menten sabiti V_{max} değerinin değişmediğini bildirmişlerdir [3].

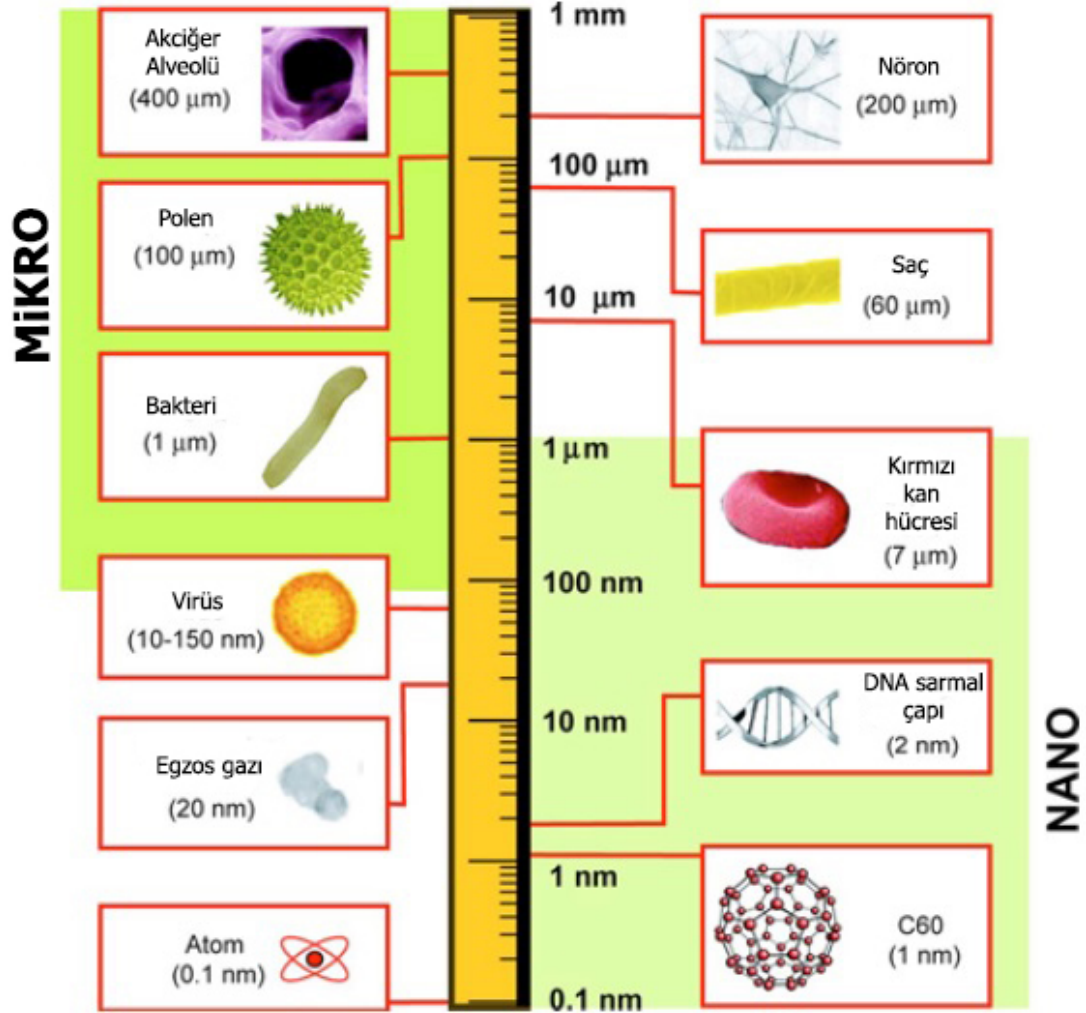
1.3 Çalışma ve Değerlendirme Yöntemleri

1.3.1 Nanoteknoloji ve nanopartiküller

Nanoteknoloji, boyut ve şekli nano boyutta tasarlanmış malzeme ve cihazların uygulaması ve sentezi olarak tanımlanabilir. Benzersiz kimyasal, fiziksel, elektriksel ve mekaniksel özellikler madde nano yapıldığında ortaya çıkmaktadır. Nanoteknoloji molekül ve atomların en küçük yapı birimlerini kontrol etmeyi hedeflemektedir. Dolayısıyla kolloid kimyası, fizik, biyoloji, tıp, eczacılık ve mühendislik bilimlerini içeren disiplinler arası bir alandır. NP'ler inorganik veya

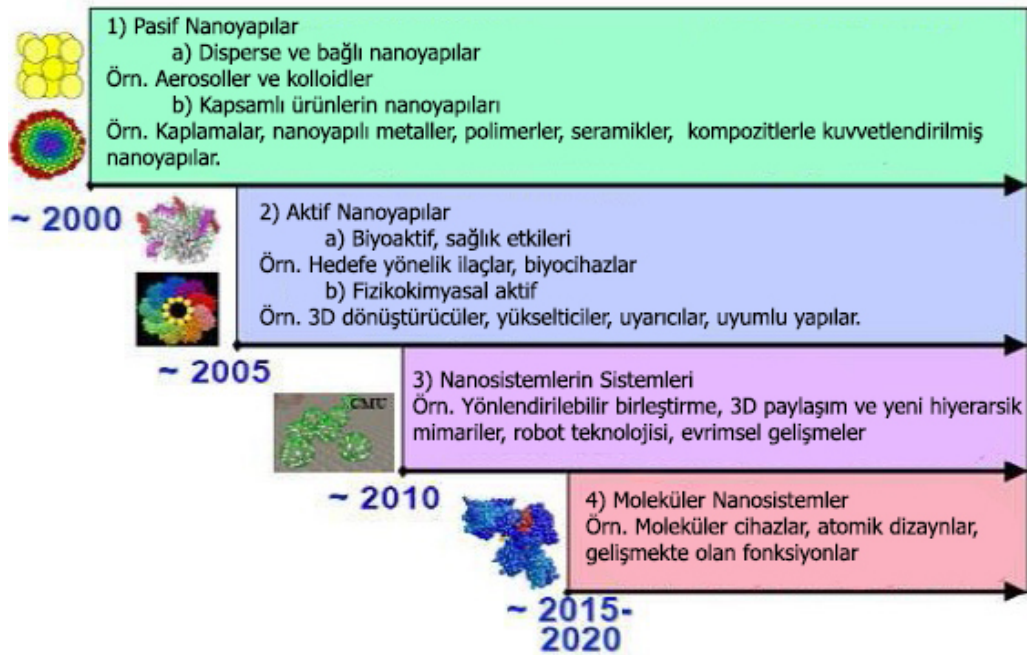
organik yapılu katı partiküllerdir. Nanoteknoloji terimi onlarca yıldır elektronik, fizik ve mühendislik alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat biyomedikal, biyoproses ve ilaç alanındaki uygulamaları henüz tamamen keşfedilmiş değildir.

NP'lerin boyutu hakkında kesin bir tanımlama bulunmamaktadır. 1 μm 'den küçük mikron altı partiküller, malzeme biliminde 100 nm'nin altındaki partiküller veya ilaçlarda 500 nm'nin altındaki partiküller nanopartikül olarak kabul edilmektedir. Nanopartiküllerin boyutları virüs, DNA ve proteinlerle karşılaştırılırken mikro partiküllerin boyutları hücre, organel büyük fizyolojik yapılar ile karşılaştırılabilir (Şekil 1.1) [16, 17].



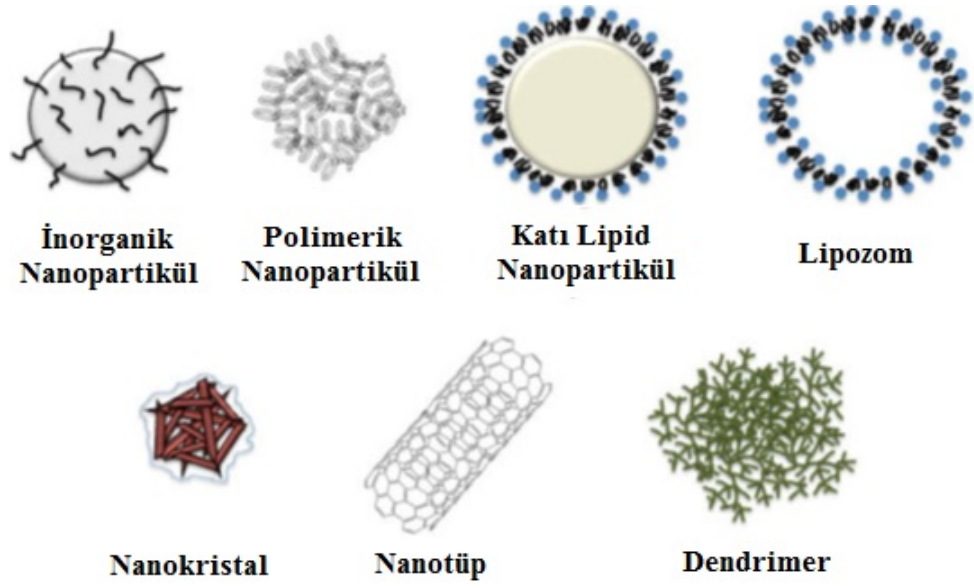
Şekil 1.1 Logaritmik ölçekli skalada nanomalzemelerin biyolojik örneklerle karşılaştırmalı olarak gösterimi [16].

ABD Ulusal Nanoteknoloji Girişim Kurumu nanoteknolojinin gelişiminde dört aşama tarif etmiştir (Şekil 1.2). Birinci aşama 2000’li yıllar; malzemelerin sadece bir görev için tasarlandığı pasif nanoyapı dönemi, ikinci aşama 2005’li yıllar; malzemenin birçok görev için tasarlandığı aktif nanoyapı (sensör, ilaç salım sistemleri) dönemi, üçüncü aşama 2010’lu yıllar; birbiriyle etkileşen binlerce bileşenden oluşan nanosistem dönemi ve dördüncü aşama 2015-2020’li yıllar nanosistemlerin memeli hücrelerine integre edileceği moleküler nanosistem dönemidir [18].



Şekil 1.2 ABD Ulusal Nanoteknoloji Girişim Kurumu’na göre nanoteknolojinin gelişim aşamaları.

Kullanım alanları, fiziksel ve kimyasal yapıları göz önüne alındığında biyoteknoloji alanında kullanılan NP’leri Şekil 1.3’de verildiği gibi sınıflandırmak mümkündür [19].



Şekil 1.3 Biyoteknoloji alanında kullanılan nanopartikül türleri.

İnorganik NP: Seramik NP'ler tipik olarak silika veya alüminyum oksit gibi inorganik bileşiklerden oluşur. Bununla birlikte, NP çekirdeği sadece bu iki malzeme ile sınırlı değildir. Farklı metaller, metal oksitler ve metal sülfürler boyut, değişen şekil ve gözeneklilik ile sayısız üretimde kullanılabilirler. İnorganik NP'ler sıcaklık ve pH açısından geniş aralıklar içinde nispeten istikrarlıdır, ancak biodegradasyon ve yavaş çözünme eksikliği, özellikle uzun vadeli uygulamalar için güvenlik sorularını gündeme getirmektedir.

Polimerik NP: Çoğu polimerik NP'ler, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumludur. Bu nano materyaller, kontrollü ilaç salımı için tercih edilen bir uygulamadır. Polimerik NP'ler terapötik ajanların geniş bir aralıkta dağılımı, tutulması ve farmakokinetik kontrolü için uygundur. Kimyasal dönüşümler ile yüzey modifikasyonu için iyi bir potansiyel sağlar. İhtiyaç duyulan NP formülasyonları jelatinler, kitosan, polilaktik asit, poliglikolik asit vb.'dir. Ayrıca polimer bazlı kaplamalar biyolojik dağılım özelliklerini değiştirmek ve geliştirmek için diğer NP türlerine uygulanabilir. Biyolojik açıdan inert polimer polietilen glikol (PEG), NP yüzeyinin üzerine kovalent olarak bağlanabilmektedir. Bu polimerik kaplama beyin, bağırsak ve böbrek gibi organların ilacın kandaki artan miktarı ile sonuçlanan bağışıklığı azaltmak ve retiküloendotelial sistem tarafından nanopartiküllerin fagositozunu sınırlamak için düşünülmektedir.

Katı lipid NP: Katı lipid NP'ler lipid bazlı mikrondan küçük kolloidal taşıyıcılardır. İlk olarak lipozom ve emülsiyonlar için farmasötik kullanımda bir alternatif olarak 1990'lı yılların başlarında tasarlanmıştır. Genel olarak, katı lipid NP'ler, nispeten tek tabakalı fosfolipidler ile çevrili, oda ve vücut sıcaklığında katı olan sert çekirdekli hidrofobik lipidlerden dolayı biyolojik sistemlerde lipozomlardan daha stabildirler. Biyobozunum kolaylıklarından ötürü polimer ya da seramik nano partiküllerden daha az toksiktirler.

Lipozomlar: Lipozomlar, bir fosfolipid membran ile sarılmış olan iki eş katmanlı veziküllerdirler. Lipozomlar genellikle bir tek tabakalı lipidlerin oluşturduğu miseller ile ilgilidir. Amfifilik lipozomların doğası, yüzey modifikasyonlarının kolaylığı ve iyi biyouyumluluk profili olanağına sahip olmaları sebebiyle protein ve peptidlerin, dögüsel yarı ömrünü arttırmak için cazip bir çözüm yoludur.

Nanokristaller: Nanokristaller, ince bir yüzey aktif maddeyle kaplanan kristalin formunda ilaç ile çevrelenmiş moleküllerin agregatlarıdır. Nanokristaller, kimya mühendisliğinde biyolojik görüntüleme için kuantum noktaları araştırmalarında, bu araştırmalardan daha az olmak üzere de ilaç salınımı için nano ilaç sistemlerinde uygulamaları bulunmaktadır. Nanokristaller hidrofobik bileşiklerden hazırlanır ve ince bir hidrofilik tabakayla kaplanır. Nanokristallerin biyolojik reaksiyonları hidrofilik kaplamanın kimyasal yapısına bağılıdır.

Nanotüpler: Nanotüpler, atomların tüpler şeklinde, kendiliğinden tabakalar halinde düzenlenmesiyle meydana gelirler. Bileşimleri organik veya inorganik yapılı olabilir ayrıca tek veya çok duvarlı olarak üretilebilirler. Nanotüplerin en bilinen türü çözünen fulleren türevi olan C60'tır. Nanotüpler geniş iç hacme sahiptir ve dış yüzeyleri kolayca işlevselleştirilebilirler. Potansiyel ilaç uygulamaları için umut verici olmalarının yanında üretilen bazı bileşiklerinin insan sağlığı açısından zararı bilinmemektedir ve toksisite raporları çelişkilidir [19].

Dendrimerler: Dendrimerler aşırı dallanmış ağaca benzer yapılardır. Çekirdek, dallar ve yüzeyden oluşan üç farklı bölge içerirler. Çekirdekleri merkez kısmını oluşturur, dallar iç boşluk ve küresel grupları oluşturarak çekirdek kısmından yayılırlar. Dallar ihtiyaca göre değiştirilebilir ya da modifiye edilebilir.

Dendrimerler düşük sitotoksiteye ve yüksek biyogeçirgenliğe sahip biyouyumlu bileşiklerin üretiminde kullanılırlar. Çekirdek ve dallar arasındaki boşluklara ilaç veya biyoaktif ürünler yerleştirilirler [18].

NP'ler boyut, morfoloji, bileşim, homojenlik ve aglomerasyon özelliklerine göre sınıflandırılırlar (Şekil 1.4).

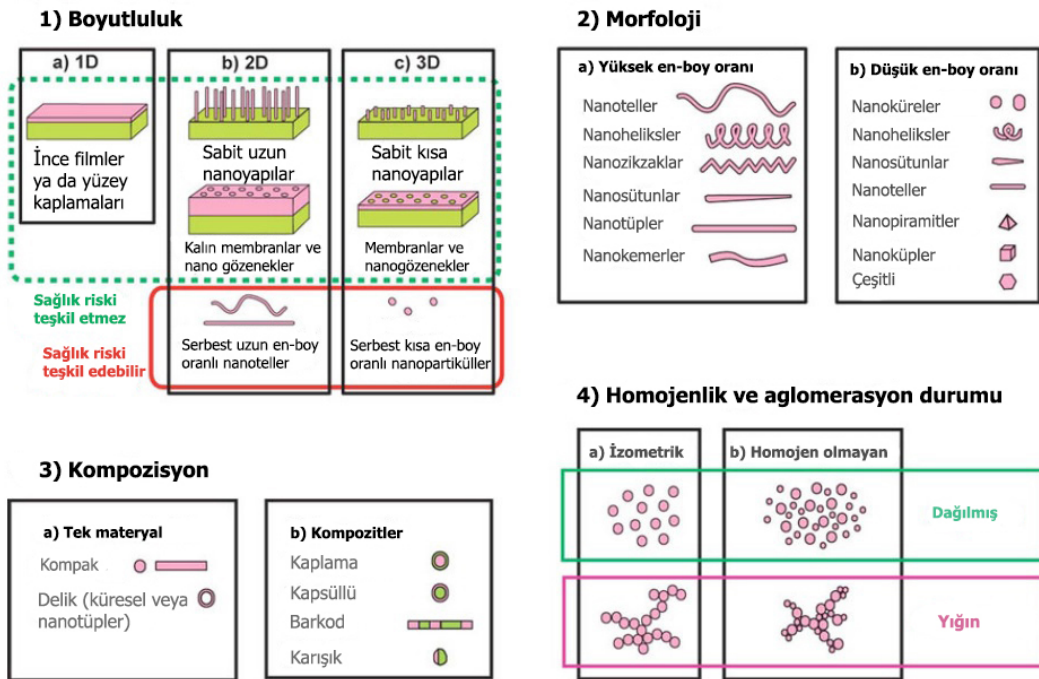
Boyut; bu sınıflandırma genel olarak en-boy oranına göre yapılmaktadır. Buna göre 1D (1 boyutlu), 2D (2 boyutlu) ve 3D (3 boyutlu) nanomateriyeller bulunmaktadır.

- **1D nanomateriyaller,** nanometre ölçeğinde bir boyuta sahip olan malzemelerdir. Genellikle ince filmler veya yüzey kaplamalarında, bilgisayar yongalarının devrelerinde, gözlüklerin sert kaplama ve yansıma önleyicilerinde bulunmaktadır. İnce filmler on yıllardır, elektronik, kimya ve mühendislikte, çeşitli alanlarda geliştirilip kullanılmaktadır.
- **2D nanomateriyaller,** nanometre ölçeğinde 2 boyuta sahiptirler. Bu yapılar substrata sıkıca bağlı 2D nano yapıları filmleri ya da küçük partiküllerin ayrılma ve filtrasyonu için nano gözenekli filmleri içerirler. Nano ölçek aralığındaki büyüklüklere sahip olan büyük bir en-boy oranına sahip serbest partiküller, aynı zamanda 2D nanomateriyaller olarak kabul edilir. Asbest, 2D nanopartiküllere örnek olarak verilebilir.
- **3D nanomateriyaller,** her üç boyutta da büyüklükleri nanometre ölçeğinde olan materyaller, 3D nanomateriyaller olarak kabul edilir. Atomik ölçekte oluşturulan gözeneklilik, kolloidler ve çeşitli morfolojilerde üretilen serbest nanopartiküller 3D nanomateriyellere örnek olarak verilebilir.

Nanopartikül morfolojisi; bu sınıflandırma genel olarak göz önüne alınması gereken morfolojik özellikler, yüzey düzgünlüğü, küresellik ve en-boy oranıdır. Varolan genel bir sınıflandırma da, yüksek ve düşük en-boy oranına sahip partiküller arasındadır. Yüksek en-boy oranına sahip NP'ler, helisler, zikzaklar, kemerler gibi çeşitli şekillere sahip nanotüp ve nanotelleri içerir. Küçük en-boy oranına sahip morfolojiler, küresel, oval, kübik, prizma, sarmal ya da sütun yapılarını içerir.

Nanopartikül bileşimi, bileşimlerine göre NP'ler tek bileşenli bir malzemeden ya da bir kaç malzemenin kompoziti şeklinde olabilir. Saf tek bileşimli materyaller, çeşitli yöntemlerle günümüzde kolayca sentezlenebilirlerken, doğada bulunan NP'ler ise çeşitli bileşimlerde materyallerin aglomerasyonlarından oluşmaktadır.

Nanopartikül homojenliği ve aglomerasyonu; NP'ler kimyası ve elektromanyetik özelliklerine göre disperse aerosol, süspansiyonlar/kolloidler veya aglomere halde bulunabilir. Örneğin MNP'ler, yüzeyi manyetik olmayan bir materyalle kaplanmadıkça yığın durumu oluşturarak kümelenme eğilimindedirler. Bir aglomerasyon durumunda, NP'ler aglomerat boyutuna bağlı olarak, daha büyük partiküller gibi davranabilirler. Bu nedenle, yeni maddeler için çevre ve sağlık açısından kurallara karar verilirken nanopartikül aglomerasyonunun, boyut-yüzey reaktivitesinin şekil ve boyutu ile birlikte göz önüne alınması gerektiği açıktır [16].

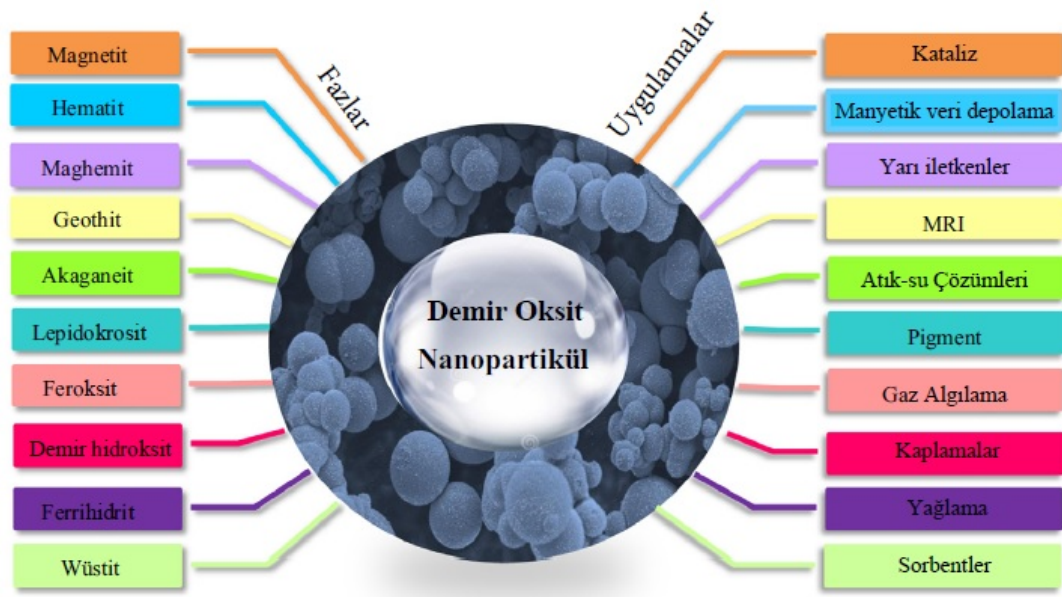


Şekil 1.4 NP'lerin boyut, morfoloji, bileşim, homojenlik ve aglomerasyon durumlarına göre sınıflandırılması.

1.3.2 Manyetik nanopartiküller

Boyutları nanometre ile mikrometre arasında değişen manyetik partiküllerin biyoteknolojik ve medikal amaçlı kullanımı giderek artmaktadır (Şekil 1.5). Medikal uygulamalar için MNP'lerin en önemli özelliği toksik olmaması,

biyouygunluk, enjekte edilebilir olması, hedef doku veya organda yüksek seviyede birikimidir. Demir veya demir oksit gibi manyetik partiküller, MNP'lerin hazırlanması için temel bileşendir. MNP'ler, yüksek manyetik akı yoğunluğu tarafından çekilirler ve bu özellikleri hedefe yönelik ilaç taşınım sistemlerinin tasarımında, biyomolekülleri saflaştırma ve ayırma işlemlerinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda MNP'ler, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) kontrast ajanı taşıyıcısı olarak ve kanser termoterapisinde (hipertermia) ısıtma ortamı olarak kullanım potansiyellerinden dolayı oldukça dikkat çekmektedir [20].



Şekil 1.5 MIONP türleri ve kullanım alanları [21].

Bilimsel çalışmalarda, MNP'ler yüksek katalizör yükleme kapasitesi, yüksek dispersiyon özelliği, yüksek kararlılık, geri döngüye uygun olması ve yüksek yüzey alanı özelliklerinden dolayı alternatif katalizör destek yapılar için geniş bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Manyetik ayırma ile sıvı faz reaksiyon ortamından katalizörün geri kazanımı filtrasyon ve santrifüj işlemlerine göre daha kolaydır ve sürenin azaltılması açısından oldukça uygundur. Ek olarak partikülün manyetik özellikleri aşırı asidik veya korozif şartlar hariç birçok kimyasal ortamı tolere etmek için yeterli kararlılıktadır. Manyetik özellikte biyokatalizör üretiminde genelde biyokatalizörler MNP yüzeyi üzerine tutuklanırlar, bu şekilde substratın katalizörün aktif konumlara ulaşması kolaylıkla sağlanabilir. Destek materyalinin boyutuna bağlı olarak tutuklanmış katalizörlerin katalitik aktivitesini karşılaştırma

çalışmaları, nano ölçekteki destek katıların yüksek bölgeseçimliliği ve ürün verimi gösterdiğini kanıtlamıştır [22].

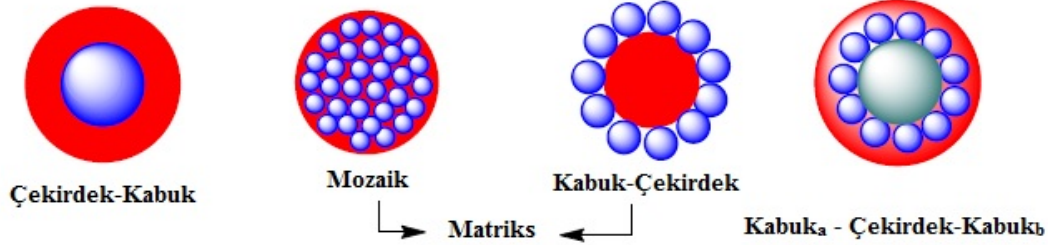
MNP'ler kullanılarak, çeşitli enzimlerle kovalent immobilizasyon uygulanarak reaksiyon ortamından manyetik olarak ayrılabilen biyokatalizörler sentezlenmektedir. Partikül yüzeyine fiziksel olarak bağlanan immobilizasyon yöntemi ile karşılaştırıldığında bu yöntemde daha fazla aktif konum bulunmakta ve aktivite de artmaktadır. Kovalent immobilizasyon ile termal stabilite ve enzimin kullanım ömrü de artmaktadır [23].

Magnetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ve hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) gibi demir oksit nanopartiküller (MIONP) fiziksel özelliklerine göre katalizör desteği olarak biyoproseslerde, gaz sensör yapımında, çevreye yönelik sorunların giderimi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Çizelge 1.2). Fakat bu NP'ler termodinamik açıdan tercih edilen yığın metal oluşumu için agregre olma eğilimindedir, bu eğilim sonucunda yüzey alanında önemli bir azalma söz konusudur. Bu istenmeyen agregasyonu engellemek için demir oksit çekirdeği/ana yapısı fonksiyonel ligandlarla kaplanır, bu fonksiyonel ligandlar çözeltide dispers halde veya demir çekirdek üzerindeki kabukta tutuklanmış halde bulunur. Genelde, bu ligandlar terminal fosforik asit, tiyol veya karboksil asit grupları içerir ki bu gruplar, MIONP yüzeyine kuvvetle bağlanabilir [22].

Çizelge 1.2 MIONP türleri ve fizikokimyasal özellikleri [24]

Özellik	Demir oksit türleri		
	Hematit	Magnetit	Maghemit
Moleküler formül	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Fe_3O_4	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Yoğunluk (g/cm^3)	5.26	5.18	4.87
Erime noktası ($^{\circ}\text{C}$)	1350	1583-1597	-
Sertlik	6.5	5.5	5
Manyetizma tipi	Zayıf ferromanyetik ya da antiferromanyetik	Ferromanyetik	Ferrimanyetik
Kristalografik sistem	Rombohedral, heksagonal	Kübik	Kübik ya da tetrahedral

Organik bileşiklerle fonksiyonelleştirilmiş MIONP'lar iki kısımdan oluşur. Bunlar manyetik demir oksit, manyetik özelliklerinin olduğu kısım ve organik moleküllerin özelliklerinin olduğu kısımdır. Bu yapılar çekirdek-kabuk, matriks, kabuk-çekirdek-kabuk olmak üzere farklı formlarda olabilir (Şekil 1.6) .



Şekil 1.6 Organik bileşiklerle fonksiyonelleştirilmiş MIONP formları [25].

Organik bileşiklerle fonksiyonelleştirilmiş MIONP'lar, MIONP'ların sadece temel manyetizma özelliklerini sağlamazlar, biyouyumluluk ve biyodegradasyon özelliklerine de sahiptirler [25].

Manyetik NP üretim yöntemleri fiziksel yöntemler, ıslak kimyasal hazırlama yöntemleri ve mikrobiyal yöntem olmak üzere üç ana başlıkta sıralanabilir. Çizelge 1.3'de üç ana başlık altında toplanan NP üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları sunulmuştur.

Çizelge 1.3 Manyetik nanopartiküllerin üretim yöntemlerinin karşılaştırılması [26]

Yöntemler		Avantaj	Dezavantaj
Fiziksel yöntemler	Gaz faz çökeltme	Kolay uygulanabilir	Partikül boyut kontrolü zor
	Elektron ışın demeti litografisi	Partiküller arası boşluk kontrolü iyi	Pahalı ve oldukça karmaşık, cihazlara ihtiyaç duyar
Islak kimyasal hazırlama yöntemleri	Sol-jel yöntemi	Boyut, en-boy oranı, içyapı tam kontrolü	Zayıf bağ, düşük aşınma direnci, yüksek geçirgenlik
	Oksidasyon yöntemi	Uniform bir boyut ve dar boyut dağılımı	Küçük boyutlu ferrit kolloidler
	Kimyasal birlikte çöktürme	Basit ve etkili	Yüksek saflıkta, doğru stokiometrik oranın sağlanması için uygun değildir
	Hidrotermal sentez	Partikül boyutu ve şekil kontrolü kolay	Yüksek reaksiyon sıcaklığı ve yüksek basınç
	Akış enjeksiyon sentezi	İyi tekrarlanabilirlik ve sürecin hassas kontrolü ile birlikte yüksek karıştırma homojenliği	Bir kılcal reaktör içinde bir laminer akış rejimi altında reaktifler sürekli veya bölünmüş bir karıştırma gerektirir
	Elektrokimyasal yöntem	Kolay partikül boyutu kontrolü	Tekrarlanabilirlik
	Aerosol/buhar faz yöntemi	Yüksek verim	Çok yüksek sıcaklık gerektirir
	Sonokimyasal dekompozisyon	Dar partikül boyutu dağılımı	Mekanizma hala anlaşılmaş değil
	Superkritik akış yöntemi	Etkili partikül boyutu kontrolü, organik çözücü içermez	Kritik sıcaklık ve basınç
	Nanoreaktör kullanarak sentez	NP boyutunu tam kontrol imkanı	Kompleks şartlar
Mikrobiyal yöntem	Mikrobiyal inkübasyon	Yüksek verim, iyi tekrarlanabilirlik, iyi ölçeklenebilirlik, düşük maliyet	Zaman alıcı

Çok çeşitli yöntemlerle üretilen NP'ler için ideal bir üretim yöntemi;

- Partikül boyut ve boyut dağılımı, şekli, kristal yapısı ve bileşim dağılımının kontrolünü
- Nanopartiküldeki düşük safsızlıkların giderimini
- Agregasyonun kontrolünü
- Fiziksel özelliklerin ve yapının kararlılığını
- Tekrarlanabilirliğin yüksek olmasını
- Yüksek miktarda üretim, ölçek büyütme ve düşük maliyeti

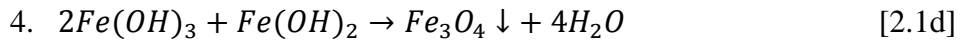
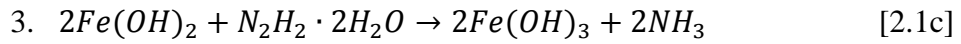
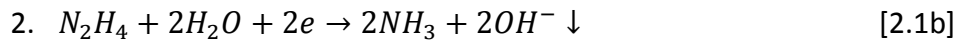
sağlamalıdır [27].

1.3.2.1 MIONP üretim yöntemleri

Çizelge 2.2'de belirtildiği gibi MIONP üretiminde farklı yöntemler olmakla birlikte bu bölümde en çok kullanılan yöntemler açıklanmıştır.

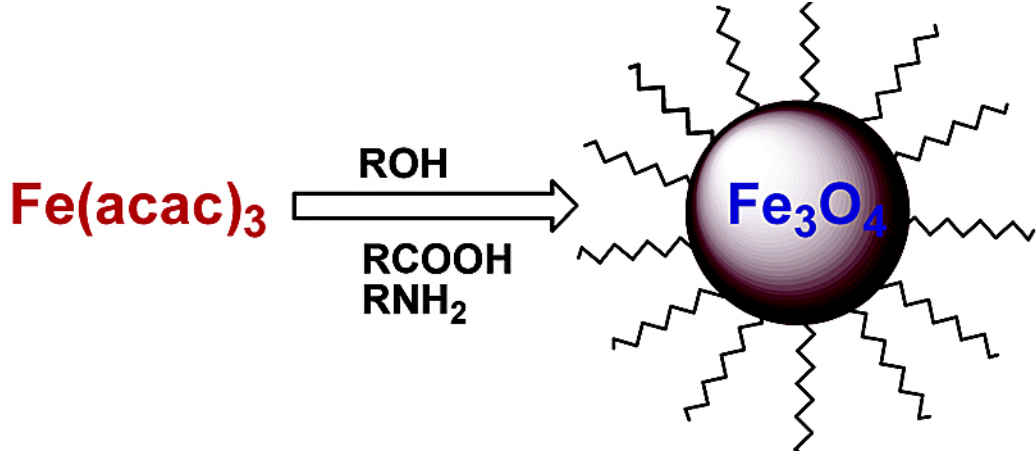
Birlikte çöktürme yöntemi: En yaygın konvensiyonel yöntem Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzları kullanılarak yapılan birlikte çöktürme metodudur. Ferrik ve ferrous iyonlarının 1:2 mol oranlarında karışımını içeren bu yöntemde oda sıcaklığı veya artan sıcaklıklarda basit çözeltilerini içerir. MIONP'ların boyut ve şekilleri kullanılan tuz tiplerinin (kloridler, sülfatlar, nitratlar, perkloratlar gibi) oranına, reaksiyon sıcaklığına, pH değerine iyonik kuvvetlere ve diğer reaksiyon parametrelerine (karıştırma hızı, diğer basit çözeltilerin damlama hızı) bağlıdır. Bu yöntem, nano boyuttaki MIONP'ların kimyasal ve fiziksel özelliklerini önemli ölçüde etkiler. Genel olarak, nano yapılarda bulunan doygunluk manyetizasyonu (M_s) değerleri, yığın faza göre daha küçüktür, bu nedende iyonik değişimler meydana gelmez. Buna bağlı olarak MNP'nin M_s 'nin deneysel değeri, yığın manyetik değer olan 100 emu g^{-1} 'dan daha küçük olan $30-80 \text{ emu g}^{-1}$ aralığında rapor edilmiştir. Ayrıca Fe_3O_4 nanopartikül (NP)'leri ortam koşullarının altında çok stabil değildir ve kolayca Fe_2O_3 'e veya çözülmüş bir asidik maddeye dönüşebilir. Bu yüzden muhtemel oksidasyonu önlemek için havadaki oksijenden kaçınılmalı ve anaerobik koşullarda Fe_3O_4 sentezlenmelidir. Bu bağlamda, Fe_3O_4 NP'leri uygun oksijen atmosferi altında tavlama veya oksidasyon işlemiyle Fe_2O_3 hazırlamak için de kullanılabilir. Oksidasyon, asidik ortam veya alkalik içinde kendi kimyasal stabilitesinden dolayı Fe_2O_3 NP'leri için önemli bir etken değildir [25]. Birlikte

çöktürme yöntemi, MIONP'ları elde etmek için hızlı ve yüksek verimli en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Birlikte çöktürme yönteminde, demir oksitler (Fe_3O_4 ya da $\gamma-Fe_2O_3$), genellikle stokiyometrik reaksiyona uygun olarak, sulu bir ortam içinde çözülmüş demir ve demir tuzları (genellikle, $FeCl_2$ ve $FeCl_3$ gibi) içeren bir karışımdan bazik ortamda hazırlanır. Alkali çözeltilerde Fe^{3+} ve Fe^{2+} çok az çözünürlüğe sahiptir. Birlikte çöktürme yöntemi ile Fe_3O_4 üretim tepkimesi basamakları Eşitlik 2.1 ile verilmiştir [28].



Tepkimenin başarısı için stokiyometrik oran (Fe^{3+}/Fe^{2+}), pH ve işlem koşulları (oksitleyici atmosfer-hava veya inert gaz N_2) önemlidir. Maity ve Alibeigi birlikte çökeltme yöntemi için Fe^{+3} / Fe^{+2} arasında $\leq 2:1$ mol oranı kullanıldığında, oksidatif koşullar (hava) altında gerçekleştirildiği zaman maghemit fazının (Fe_2O_3) doğrudan elde edildiğini saptamışlardır [29]. Birlikte çöktürme yönteminde reaksiyon sıcaklığı, suyun kaynama noktası ile sınırlıdır ve sentezlenen MIONP'lar genellikle bu koşullarda düşük derece kristalinite ve büyük polidispersite gösterirler [30].

Termal parçalanma: Termal parçalanma yönteminde, organik bir çözelti fazının ayrıştırılması işlemi uygulanarak MIONP'ların üretimi gerçekleştirilir. Bu parçalanmada genellikle $Fe(CO)_5$, $Fe(cup)_3$ ($cup=N$ -nitrofenilhidroksilamin) veya $Fe(acac)_3$ ($acac$ =asetilasetonat) yapıları kullanılır ve oksidasyonla, sırasıyla yüksek sıcaklık ve karmaşık bir operasyon gerektiren parçalanma reaksiyonları sonucu yüksek kalitede monodispers MIONP'lar elde edilir. Termal parçalanmada boyut kontrollü yüksek, monodispers bir MIONP molekülü sentezlemek için yüksek sıcaklıkta oleilamin, oleik asit alkol varlığında, fenil eter içinde $Fe(acac)_3$ 'ün reaksiyonuyla elde edilir (Şekil 1.7). Küçük çekirdekli MIONP'lar gibi, daha büyük monodispers MIONP'lar da (çapı 20 nm'den büyük), çekirdek aracılı büyüme metoduyla polar olmayan bir çözücü içinde dağıtılıp ve sentezlenebilir [25].



Şekil 1.7 Termal parçalanma ile Fe_3O_4 sentezi.

Bu prosedürde Fe_3O_4 nanopartikül sentezlemeleri, $\gamma-Fe_2O_3$ NP'leri içerisinde 2h boyunca oksijen ve yüksek sıcaklıkta ($250\text{ }^\circ\text{C}$) tavlama ile dönüştürülebilir [31]. $Fe(cup)_3$ 'ün tek ön maddesinin direk parçalanması ile $\gamma-Fe_2O_3$ NP'ünün oluşması sağlanabilir [32]. Termal parçalanma metodunun dar bir boyut dağılımı ile yüksek monodispers partikül üretiminde birçok avantajı olmasına rağmen, elde edilen NP'ler genellikle polar olmayan çözücüler içinde çözdürülmesi gerekir. Bu da termal parçalanma yönteminin en büyük dezavantajıdır [25].

Mikroemülsiyon: Mikroemülsiyon, yüzey aktif madde varlığı altında birbirine karışmayan (su ve yağ) iki fazın termodinamik olarak kararlı izotropik dağılımıdır. Yüzey aktif madde molekülleri, sıvı faz içeren hidrofilik baş grupları ve yağ içinde dağılmış yüzey aktif moleküllerin hidrofobik kuyrukları ile su-yağ ara yüzeyinde bir tek tabaka yapısı oluşturabilir. İki bileşenli sistemlerde (su/yüzey aktif madde ya da yağ/yüzey aktif madde) olduğu gibi, farklı tipteki kendi kendine oluşan yapılar, değişebilir ve şekillenebilir. Mikroemülsiyon ve ters miseller yöntemi sayesinde, boyut ve şekil kontrollü MIONP'lar elde edilmesi mümkündür [25].

Hidrotermal sentez: Kontrollü boyut ve şekil özelliklerinden dolayı MIONP'ları teknolojik açıdan çok önemli bir yere sahiptir. Mikroemülsiyon ve termal parçalanma yöntemlerinde, genellikle artan yüksek sıcaklığa veya karmaşık proseslere ihtiyaç duyulur. Bu yöntemlere alternatif olarak hidrotermal sentez, yüksek buhar basıncında ($0.3\text{-}4\text{ MPa}$), yüksek sıcaklıktaki ($130\text{-}250\text{ }^\circ\text{C}$) sulu

çözeltiden kapalı bir tanktaki kristalize maddelerin çeşitli ıslak kimyasal teknolojilerine ihtiyaç duyar.

Bu teknik aynı zamanda kayma içermeyen tek bir kristal büyümesi için kullanılmıştır ve bu işlemde oluşturulan taneler diğer işlemlerden daha iyi kristaliniteye sahiptir. Bu yüzden hidrotermal sentezde üretilen MIONP'lar yüksek oranda kristal yapıya sahiptir [25]. Hidrotermal yöntemde, yüksek kristaliniteye sahip MIONP'lar üretilse de havayla temas olduğundan yüksek oranda oksidasyon problemi gözlenmektedir.

Sonokimyasal sentez: Sonokimyasal yöntem farklı özellikteki yeni malzemeler üretmek için geniş ölçekte kullanılmaya başlayan rekabetçi ve alternatif bir yöntemdir. Ultrasesin kimyasal etkisi yani sıvı içindeki kabarcıkların oluşumu, büyümesi ya da patlayarak sönmesi akustik kavitasyondan kaynaklanmaktadır. Kabarcıkların patlayarak sönmesi gaz faz içinde şok ısı dalgası oluşumu veya adyabatik sıkıştırma yollarından biri ile lokalize sıcak bölgelerin oluşumu sağlar. Sıcak bölgelerin oluşum koşulları; 5000 K sıcaklık ve 1800 atm basınç ve 10^{10} K/s soğuma hızı değerleri deneysel olarak belirlenmiştir. Bu alışılmadık aşırı değerler yeni bir faz oluşumu için oldukça uygundur ayrıca NP'lerin aglomerasyonunu engellemek için kesme etkilerine sahiptir. Dolayısıyla bu yöntem ile oldukça monodispers yapılar elde etmek mümkündür [25].

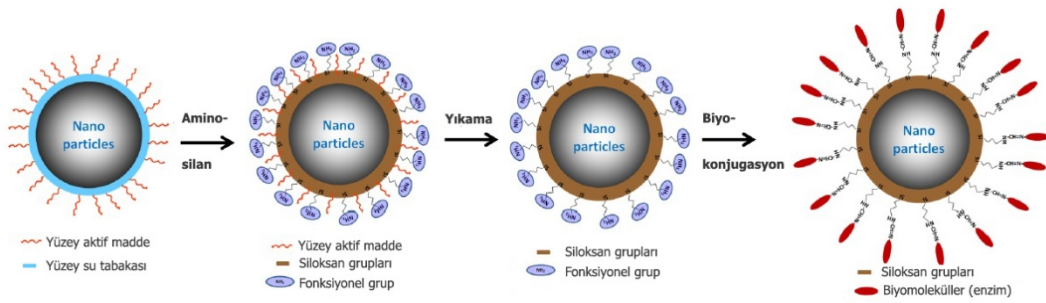
Bahsedilen MIONP üretim yöntemlerinin çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır. MIONP boyutu ve yapısının kontrolü açısından termal bozunma ve hidrotermal sentez yöntemleri daha uygundur. Suda çözünür ve biyoyumlu MIONP elde edilmesi için çoğu zaman birlikte çöktürme yöntemi kullanılmıştır ancak bu yöntemde partiküllerin şekil kontrolünün düşük olması, geniş bir boyut dağılımı ve partiküllerinin agregasyon eğiliminin fazla olduğu görülmektedir. Yöntemlerin sadece prensipleri değil ayrıca gerekli ekipman maliyeti ve uygulanabilirliği de farklıdır [33]. Örneğin, Maity vd. (2009) aynı öncü maddeler ile sonokimyasal ve kimyasal birlikte çöktürme yöntemleri ile elde edilen Fe_3O_4 nanopartiküllerin özellikleri karşılaştırılmış ve her iki yöntemle üretilen ürünün spinel kristal yapısına sahip magnetit olduğunu, fakat sonokimyasal yöntemle üretilen magnetit NP'lerinin kristallik düzeyinin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [34]. Kim vd (2009) Fe_3O_4

kristalinite boyutunun kontrolünde pH değerinin önemi üzerinde durmuşlardır. Birlikte çöktürme yönteminde, reaksiyon sıcaklığı suyun kaynama sıcaklığı ile sınırlı olduğunu belirtmiş ve sentezlenen MIONP'ların genellikle bu koşullarda düşük derece kristalinite ve büyük polidispersite gösterdiklerini belirtmişlerdir [35].

1.3.2.2 MIONP yüzeylerinin silanlama tepkimesi ile fonksiyonelleştirilmesi

MIONP'ların yüzey kimyasının kontrolü biyolojik temelli uygulamalar için gereklidir. Süspansiyon içerisindeki MIONP'ların stabilitesini üç temel unsur kontrol eder; bunlar hidrofobik-hidrofilik etkileşimler, manyetik ve van der Waals kuvvetleridir. MNP'ler ara yüzey veya tüm yüzey enerjisini minimize etmek için van der Waals kuvvetlerinin etkileşimlerinden dolayı süspansiyon içerisinde daha büyük kümeler haline gelme eğilimindedirler. Elde edilen iri topaklar orijinal manyetik özellikleri azaltır. MIONP'ların modifikasyonu sadece kolloidal stabilizasyona yol açan partiküllerin birikmesini/yığılmasını engellemez ayrıca onları suda çözünür, biyouyumlu, biyokonjüge, hücrelere özgün olmayan adsorpsiyona uygun hale getirir [30].

Biyomedikal uygulamalarda MNP'ler yüksek kararlılık için bir hidrofobik tabakaya, biyouyumluk için hidrofilik bir tabakaya ve hücre tanısı/hedefe yönlenebilmesi için en dışta fonksiyonel bir tabakaya sahip olmalıdır (Şekil 1.8).



Şekil 1.8 MIONP'un yüzey modifikasyonu [36].

NP yüzey modifikasyonu için farklı kriterler mevcuttur. Yüzey bileşimi ve yapısı yüzey kaplama tabakasının sentezi ve tasarımında çok önemlidir. Bu yaklaşımlar, Stöber yöntemi ve diğer sol-jel yöntemleriyle inorganik öncülerin polikondenzasyonu veya organik monomerlerin polimerleşmesine dayalı çekirdek-

kabuk yapısının oluşması ile sonuçlanan kovalent bağlama, küçük moleküllerin veya polimerlerin adsorpsiyonu işlemlerini içerir [37].

Farklı şekillerde yapılabilmesine karşın MNP'lerin yüzey modifikasyonlarını ligand değişimi, ligand ilavesi ve inorganik kaplama olarak üç kategoride sınıflandırmak mümkündür.

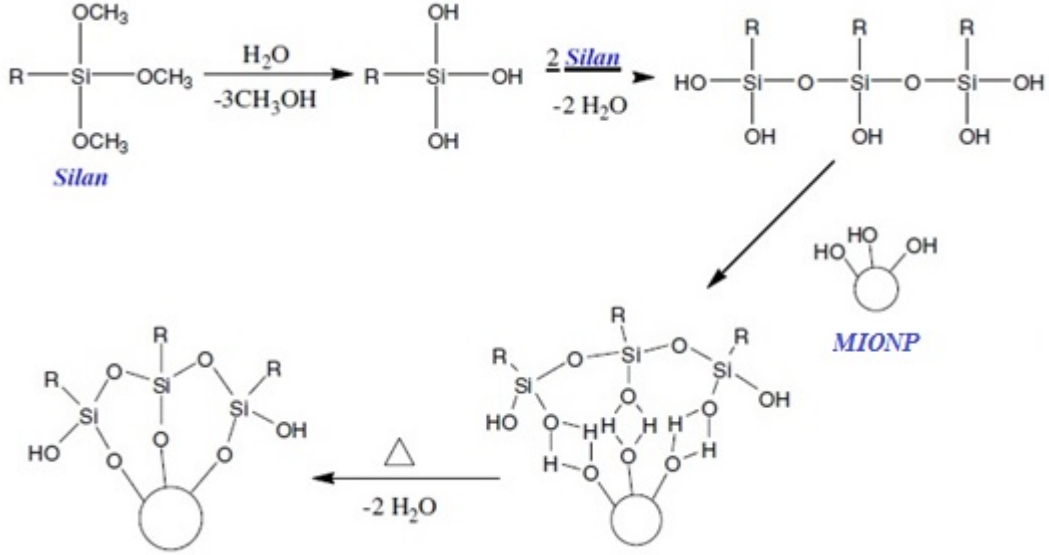
Ligand değişiminde, hidrofobik yüzey ligandları doğal tek tabaka MNP yüzeyi ve sulu çözücü ile etkileşimde hidrofobik uca bağlanan baş gruplarını ihtiva eden ligandlar ile değiştirilir. En yaygın olarak kullanılan ligandlar; oleik asit, laurik asit, alkan sülfonik asitler, fosfonik asitler ve alkanlardır. Silanlar, ferrit manyetik nano yapıların üzerindeki hidrofobik ligandların değişimi için kullanılmaktadır.

Ligand ilavesi, amfifilik moleküllerin MNP'lere adsorpsiyonu ile gerçekleşir. Hidrofilik gruplar MNP'lerin dış yüzeyin daki -OH kısmına bağlanarak MNP'yi suda çözünür hale getirirken, hidrofobik grup orijinal bir hidrokarbon zinciri bulunan, çift katmanlı bir yapı oluşturur.

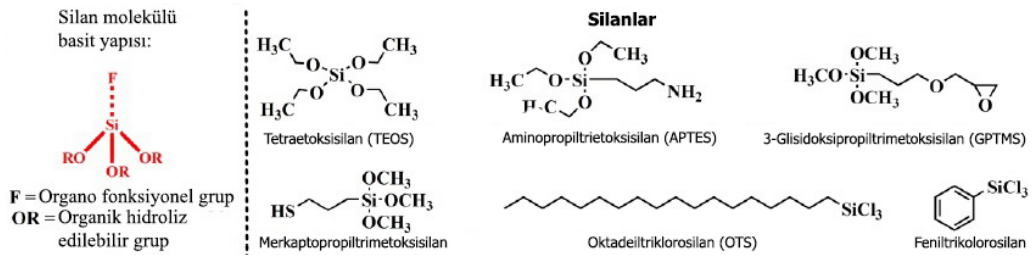
MNP yüzey modifikasyonu için üçüncü yöntemde temel olarak silisten oluşan bir inorganik kabuğun sentezi vardır. Silis kaplama Stöber işlemi yoluyla ya da sentez yoluyla bir mikroemülsiyon ortamında gerçekleştirilir. Silika yaygın olarak MNP stabilitesini iyileştirmek, dış ortamdan çekirdek NP'leri korumak için kullanılmaktadır. Ayrıca, silika yüksek biyoyumludur ve yüzeyi kolayca biyolojik moleküllerin partikül yüzeylerinin kovalent bağlanmasını sağlayan amin, tiol, karboksil ile modifiye edilebilmektedir [37].

MNP'lerin yüzey modifikasyonlarında, yüzey uyumluluğu, biyoyumluluk ve MIONP'lerinin fonksiyonel yüzey uç gruplarında yüksek yoğunluk sağlama avantajlarından dolayı silan grupları tercih edilir (Şekil 1.9). Ayrıca silan kaplı MNP'ler yüksek doygunluk manyetizasyon değerlerini korurlar ve bu değerde en fazla 10 emu g⁻¹ oranında bir azalma gerçekleşir. Yüzey modifikasyonunda kullanılan 3-aminopropiltrioksilan (APTES), *p*-aminofeniltrimetoksilan (AFTS) ve merkaptopropiltrioksilan (MPTES) kimyasal yapılar sırasıyla amino ve sülfidril gruplarını sağlamak için kullanılırlar (Şekil 1.10). MIONP yüzeyi

üzerindeki hidroksil grupları, Si-O bağlarının oluşumunu sağlayarak silan moleküllerinin metoksi grubu ile tepkimeye girerler.



Şekil 1.9 Silanlama tepkimesi ile MNP'lerin yüzey modifikasyonu [25].



Şekil 1.10 MNP yüzey modifikasyonunda kullanılan silan grupları [26].

1.3.3 Lipazlar

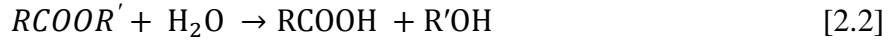
Lipazlar, hidrolazlar enzim grubunda yer alır. Diğer isimleri; gliserol ester, hidrolaz, triaçil gliserol hidrolazdır [38]. Tributiraz lipazlar, bilimsel araştırmalarda ve endüstride geniş kullanım alanına sahiptir (Çizelge 1.4). Lipazlar, farklı hayvan, bitki ve mikrobiyal (bakteri ve fungus) kaynaklardan elde edilmektedir. Mantar ve bakteri kullanarak biyoteknolojik reaktör sistemlerinde de üretilebilirler. Bitki, hayvan ve mikrobiyal lipazlar arasında çok geniş uygulama alanı bulan lipazlar ise mikrobiyal lipazlardır.

Çizelge 1.4 Lipazların endüstrideki bazı uygulamaları [39]

Endüstri	Tepkime	Ürün/Uygulama
Deterjan	Yağların hidrolizi	Fabrikalardan yağ atıklarının uzaklaştırılması
Süt Ürünleri	Süt yağının hidrolizi, peynirin olgunlaşması	Süt, peynir ve tereyağında tat geliştirme
İçki	Aroma geliştirme	İçkiler
Yağ	Transesterleşme, hidroliz	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol
Et ve balık	Tat artırma	Et balık ürünleri
Kimyasallar	Enantiyoseçimlilik, sentez	Kiral yapı taşları
Farmasotik	Transesterleşme, Hidroliz	Sindirime yardımcı, özel yağlar
Kozmetik	Sentez	Nemlendirme
Deri	Hidroliz	Deri Ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kaliteli kağıt üretimi
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması

Kimyasal ve biyokimyasal uygulamalarında substrat seçimliliği, ürün verimliliği ve enantiyo seçimliliği yüksektir. Hidrofobik yüzeyleri sayesinde substratlarla kolayca etkileşime girebilirler [40]. Lipazlar suda çözünmeyen substratların tepkimelerini katalizlemektedirler ve verimli bir katalizlenme için su/yağ arayüzeyinin var olması gerekmektedir. Farklı mikroorganizmlardan elde edilen lipazlar en küçük 20-25 kDa moleküler ağırlığında iken en büyükleri ise 60-65 kDa molekül ağırlığına sahiptir [39]. Lipazlar yağ metabolizması ve sindirim önemli bir rol oynayan, suda çözünür enzimlerdir. Lipazlar, sulu çözelti içinde moleküler olarak çözülmüş substrat tabakasına karşı sınırlı aktiviteye sahiptir. Fakat substrat konsantrasyonu, misel agregatlarının veya emülsiyon damlacıklarının yeterince yüksek olduğu durumlarda yüksek aktivite gösterir. Aynı zamanda lipazlar uzun zincirli açilgliseridler üzerinde etkili karboksil esterazlardır. Bu yapının katalitik üçlüsü aynı zamanda serin proteazlarda da bulunan serin (Ser), histidin (His) ve aspartat (Asp) ya da glutamin (Glu)'den oluşmaktadır. Lipaz katalizli reaksiyonlar; hidroliz ve sentez reaksiyonları olarak iki ana gruba ayrılır. Bu reaksiyonlardan sentez reaksiyonları; esterleşme, interesterleşme, alkoliziz ve asidolizizdir [41].

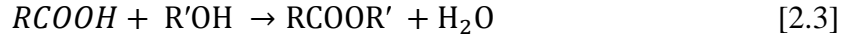
i. Hidroliz reaksiyonları:



ii. Sentez reaksiyonları:

Bu tip reaksiyonlar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

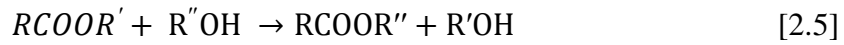
(a) Esterleşme reaksiyonu



(b) İnteresterleşme reaksiyonu



(c) Alkoliziz reaksiyonu



(d) Asidoliz reaksiyonu

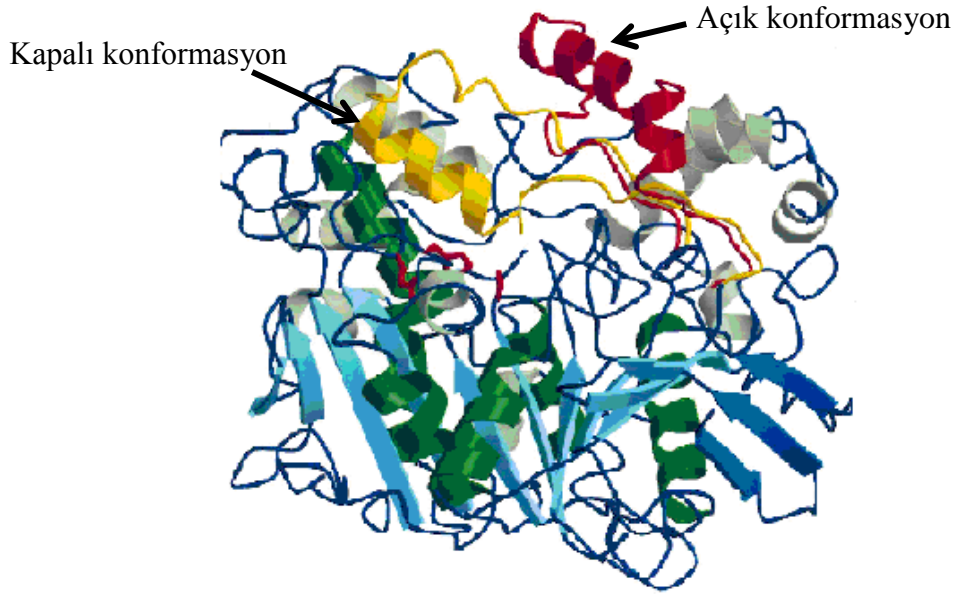


Lipazlar trigliseritler gibi nötral lipidlerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyebilen çok yönlü enzimlerdir [42]. Lipazlar; esterleşme, transesterleşme, interesterleşme, alkoliziz, aminoliziz ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizleyebilirler. Organik çözücülere karşı toleransı ve sıcaklığa karşı stabilitesi nedeniyle biyoteknoloji uygulamalarında yaygın kullanım alanına sahiptirler. Ester bağına spesifik olan lipazlar, yüksek sıcaklık koşullarında da aktif özellik gösterir. Enzim substrat ilişkisinden sonra mikrobiyal kontaminasyonu ve yan ürün oluşumunu engeller. Son yıllarda farklı biyolojik kaynaklardan izole edilen lipazlar ile organik çözücülere ve yüksek sıcaklığa karşı kararlılıklarını artırmaya yönelik bilimsel çalışmalar geniş bir spektrumda sürdürülmektedir. Diğer enzimlerin aksine lipazlar, ekonomik ve kolay bulunabilirliğinin yanı sıra hem kimyasal hem de biyoteknolojik proseslerde hızla artan geniş bir potansiyel kullanıma sahiptir [43].

1.3.3.1 *Candida rugosa* lipaz enzimi

Candida rugosa lipazı (CRL), kapalı konformasyonlarının yanı sıra açık olanlarının da çalışıldığı lipaz formlarıdır (Şekil 1.11). CRL'nin izoformları mevcuttur. CRL ticari uygulamalar için büyük öneme sahiptir ve biyolojik dönüşümler için verimli bir biyokatalizör olarak görev yapmaktadır. CRL, tahmini 60 kDa'luk bir moleküler kütle ile 534 aminoasit kalıntısı polipeptid zincirden oluşur. CRL, serin, glutamin ve histidin (Ser209-Glu341-His449) katalitik üçlüsünden oluşan ve bu katalitik

üçlüyü kaplayan bir kapağa sahiptir. Bu kapak, α -heliks yapısında olup kapağın aktif bölgeye bakan iç yüzeyi, hidrofobik, dış yüzeyi ise hidrofilik özelliğe sahiptir [44]. CRL enzimi, geniş özgüllük ve yüksek aktiviteye sahip olması nedeniyle sulu ve susuz faz içinde biyokataliz reaksiyonlar için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. CRL enzimi Lip1'den Lip7'ye kadar olan 7 izoenzim aileden oluşur [45].



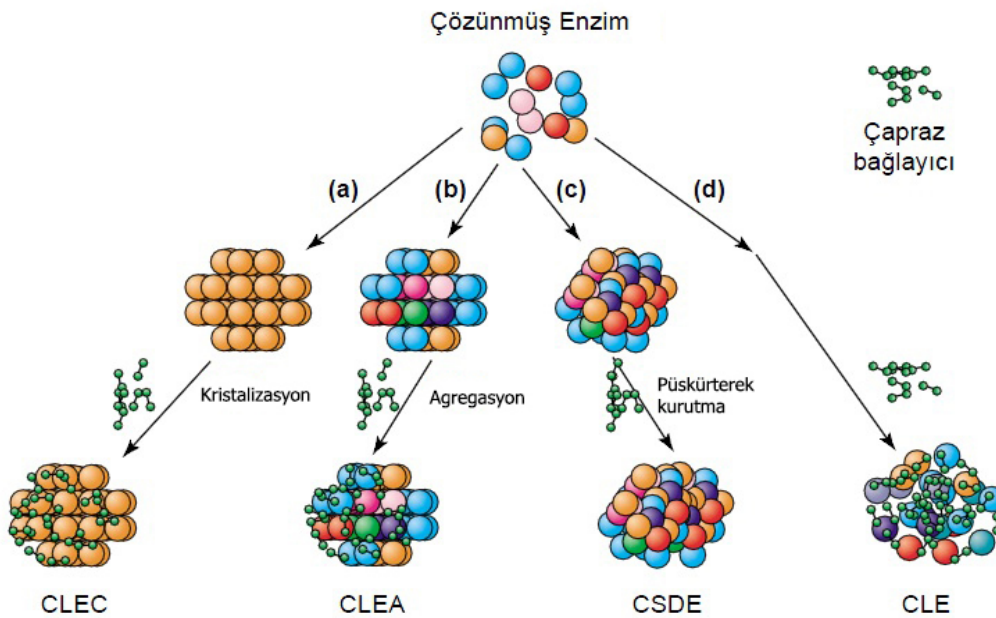
Şekil 1.11 Açık ve kapalı kısımların da eklendiği *Candida rugosa* lipazının üç boyutlu yapısı [38]

1.3.4 Taşıyıcısız enzim tutuklama yöntemi: Çapraz bağlı enzim agregatları

Enzimatik tepkimeler oda sıcaklığı ve basıncında, fizyolojik pH değerinde ılımlı koşullarda gerçekleşir. Biyokatalitik sentezler organik sentezlere kıyasla daha az atık üretir ve daha az enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bu avantajlara rağmen, işletim ve saklama kararlılıklarının olmayışı, geri kazanım ve geri döngüye uygun olmaması ticarileştirilme sürecini engellenmiştir. Enzimlerin katı bir desteğe tutuklanması ile saklama ve işletim kararlılığı, tepkime ortamından ayrılma ve tekrar kullanım özellikleri geliştirilmiştir. Enzim tutuklama yöntemleri taşıyıcıya bağlama, inorganik veya organik polimer matrise enkapsülasyon ve protein moleküllerinin çapraz bağlanması olmak üzere üçe ayrılabilir. Taşıyıcıya bağlama veya enkapsülasyonda katalitik aktivitenin azalması kaçınılmazdır bu yüzden verimlilik

(kg enzim başına kg ürün) düşüktür, bunun nedeni ise katalitik olmayan kütlelerin büyük bir oranının (%90-99) işin içine girmesidir. Bunun aksine enzimin çapraz bağlanması taşıyıcısız bir yöntemdir ve tutuklanmış biyokatalizör yüksek bir oranda aktif enzim içerir [46].

Son yıllarda ortaya çıkan taşıyıcısız enzim tutuklama yöntemleri geleneksel taşıyıcıya tutuklama yöntemlerinin yarattığı darboğazları ortadan kaldırmak için alternatif olarak geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemde taşıyıcıya gerek duyulmaksızın enzimler birbirlerine bifonksiyonel ajan yardımı ile çapraz bağlanır. Bu yöntemin temel amacı, taşıyıcıya tutuklama yöntemine kıyasla enzimlerin katalitik aktivitesini arttırmak, yüksek seçicilik kazandırmak ve daha düşük maliyetli biyokatalizör sistemlerini geliştirmektir. Taşıyıcısız enzim tutuklama yöntemleri; çapraz bağlı çözünmüş enzim (CLE, Cross-Linked Enzymes), çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC, Cross-Linked Enzyme Crystals), çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim (CSDE, Cross-Linked Spray Dried Enzyme) ve çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA, Cross-Linked Enzyme Aggregates) olmak üzere dört farklı grupta sınıflandırılabilirler (Şekil 1.12) [43].



Şekil 1.12 Taşıyıcısız enzim tutuklama yöntemleri için farklı yaklaşımlar:
a) Kristalizasyon b) Agregasyon c) Püskürtürerek kurutma
d) Direkt [47].

Protein yüzeyindeki $-NH_2$ grupları ile gluteraldehitin (GA) $-CHO$ grupları birbirine kovalent bağlanma ile çapraz bağlanması yaklaşık 50 yıl önce geliştirilmiştir. Bu şekilde çapraz bağlı enzimler, sulu enzim ve GA çözeltilerinin karıştırılmasıyla üretilirler. Fakat çapraz bağlı enzimlerin aktivite kararlılığı ve mekanik kararlılığı düşüktür ve jelatin benzeri yapılarından dolayı muamele etmek zordur. Bu sıkıntının sonucunda bir taşıyıcıya bağlamak enzim tutuklanmasında yaygınlaşan bir yöntem olarak gelişmiştir. 1990'ların başlarında Altis Biologics endüstriyel biyokatalizör olarak CLEC'leri geliştirdi. Yöntem geniş bir enzim spektrumu için uygulanabilir olmuştur ve CLEC çözünür enzim veya liyofilize toz enzime kıyasla ısı, organik çözücü ve proteoliz ile denatürasyona karşı daha kararlı olduğu kanıtlanmıştır. İşletme kararlılığı, kontrol edilebilen partikül boyutu ve geri dönüşüm kolaylığı üstünlükleri sayesinde CLEC endüstriyel biyokataliz tepkimeleri için önemli hale gelmişlerdir. Ancak, CLEC'in sahip olduğu bir sınırlama; kristal halde enzime uygulanmasıdır, bu ise yüksek saflıkta enzim gerektiren pahalı bir yöntemdir. CLEC üretiminde kristalizasyon basamağının, sulu tampondan enzimin çöktürülmesi ile yer değiştirmesi fikri yüksek saflıkta enzim gerektirmeyen daha ucuz ve basit bir yöntem olarak taşıyıcısız enzim tutuklama yöntemlerinin yeni bir sınıfı olarak CLEA'ların üretimini sağlamıştır.

CLEA'lar oluşturulurken çöktürülen enzim, bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajanlar ile kovalent olarak bağlanır. Bu yöntemde fazladan katalitik kütleye ihtiyaç duyulmadığından enzim aktivitelerinde önemli düşüş gözlenmez. Çapraz bağlı enzim agregatları oluşturulurken yüksek saflıkta enzime de gerek duyulmaz. Bilindiği gibi organik çözücüler, tuzlar ya da iyonik sıvılar proteinleri çöktürürler. Çapraz bağlı enzim agregatlarında çözünmüş enzim moleküllerinin bu uygun çöktürme ajanları yardımıyla çökmesi sağlanır. Yani enzim moleküllerinin arasındaki uzaklığı etkileyen özellikler değiştirilir. Çöktürme koşullarında, sulu sistemlerde yüksek çözünürlüklü enzim molekülleri bir araya toplanarak doğal enzim konformasyonunda çözünmez enzim agregatları oluşturmak üzere çökelti oluştururlar. Bu fiziksel olarak çözünmeyen agregatlar, enzim kristallerinin çapraz bağlanmasına benzer şekilde bifonksiyonel çapraz bağlayıcılar ile ardışık olarak bağlanır. Çapraz bağlı enzim agregatlarının spesifik aktivitesi yüksektir, oda sıcaklığında ve belirli pH aralığında kararlı olup yüksek ürün verimliliğine sahiptir.

Ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde denatürasyona uğramazlar, kararlıdırlar. Yeniden kullanılabilirliği yüksek, biyoteknolji ortamlarından filtrasyon gibi basit ayırma süreçleri ile geri kazanımı serbest enzimlere kıyasla kolay, kesikli sistemlerde yeniden kullanılabilir, sürekli sistemlerde ise uzun süre ve pratik olarak kullanılabilirler. CLEA üretim sürecinde kullanılan çöktürme işlemi, protein ya da enzim saflaştırılmasında genelde kullanılan bir yöntemdir ve dolayısıyla CLEA formu şeklinde biyokatalizör üretimi temel olarak saflaştırma enzimin fiziksel agregatları şeklinde çöktürme ve tutuklamayı içeren tek bir işlem olma avantajına sahiptir [46].

Geçen 13 yılda çapraz bağlı enzim agregatları yeni ve çok yönlü taşıyıcısız tutuklama yöntemi olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemde ilk olarak enzimler süper moleküler yapı içinde inorganik tuzları organik çözücüleri ve bazı iyonik olmayan polimerleri içeren uygun çöktürme ajanları ile çöktürülmüşlerdir. Sonuçta oluşan agregatlar kimyasal olarak birbirine bifonksiyonel ajan -genellikle GA- kullanılarak çapraz olarak bağlanmışlardır. CLEA'lar ile yüksek saflıkta ve yüksek aktivitede enzim elde edilebilmektedir. Ayrıca saklama ve proses kararlılığı CLEA'larda önemli ölçüde artmıştır. CLEA'ların üretim maliyeti ucuzdur ve pahalı taşıyıcı gerektirmezler. Tüm bu üstünlüklerine rağmen CLEA teknolojisiyle tutuklanan enzim sayısı azdır. Bunun iki sebebi olabilir. Birincisi düşük lizin içerikli enzimler için CLEA'ların beklendiği kadar etkin olmamasıdır. Çünkü çapraz bağlama büyük ölçüde enzimin dış yüzeyi üzerinde bulunan lizin kalıntıları üzerinden gerçekleşmektedir Bu ise yetersiz çapraz bağlanmış CLEA'ların ve dolayısıyla mekanik kararlılığı düşük CLEA'ların üretimine sebep olur İkincisi, reaksiyon ortamından santrifüj veya filtrasyon ile CLEA'ların ayrılması işlemi sırasında oluşan CLEA kümelerinin boyutunun artması ve bunun sonucunda makromoleküler substrat üzerine etki eden enzimde iç kütle aktarım sınırlamalarının ortaya çıkmasıdır [46].

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Bu çalışmada manyetik demir oksit nanopartikül (MIONP) üretimi için FeCl_3 (Sigma-Aldrich, 157740) ve $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, 215422) tuzları kullanılmıştır. Bazik ortam %30'luk NH_4OH (Sigma Aldrich, 320145) ile sağlanmış ve stabilizasyon ajanı olarak oleik asit (27728, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Üretilen nanopartikülün yüzey modifikasyonu işleminde 3-aminopropiltrimetoksisilan (APTS; Sigma-Aldrich, 281778), metanol (Sigma-Aldrich, 322415), gliserol (Sigma-Aldrich, G5516) ve deiyonize su kullanılmıştır. Çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanması sürecinde *Candida rugosa* lipazı (Sigma-Aldrich, L1754), bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehit (Sigma-Aldrich, G5882, Grade I %25'lik çözelti) ve presipitasyon ajanı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck, 101217) kullanılmıştır. Enzim çözeltileri Na_2HPO_4 (Merck, 106586) ve $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, 106345) tuzları kullanılarak hazırlanan tamponlarda hazırlanmıştır. Çapraz bağlı enzim agregatları biçiminde hazırlanan taşıyıcısız enzim immobilizasyon sistemlerinin aktivitelerinin belirlenmesinde substrat olarak *p*-nitrofenil asetat (Sigma Aldrich, N8130) kullanılmıştır. *p*-Nitrofenil asetat çözeltisi asetonitril (Merck, 100030) ortamında hazırlanmıştır.

Deneyleerde tüm çözeltilerin hazırlanmasında ultrasaf su sisteminden (Milli Q, Gradient, Millipore) alınan ve iletkenlik değeri 18.2 M Ω .cm (25 °C) olan deiyonize su kullanılmıştır.

2.2 Manyetik Demir Oksit Nanopartikül Üretimi: Birlikte Çöktürme Yöntemi

MIONP'lar birlikte çöktürme yöntemi ile demir tuzları kullanılarak üretilmiştir. Birlikte çöktürme yönteminde; $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$ farklı mol oranlarında (1:1, 1:2 ve 1:3) olacak şekilde $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve FeCl_3 tuzlarının 50 mL deiyonize su içinde sonikatör (Elma S30H) cihazı kullanılarak oda sıcaklığında 1-2 dakika boyunca çözünmesi sağlanmıştır. Tepkime kabına geri soğutucu bağlanarak 800 rpm karıştırma (Velp Scientifica AREX) hızında, önceden 80 °C'ye ayarlanmış su banyosunda tepkime başlatılarak, 2 mL hacminde %30'luk NH_4OH çözeltisi 66.7 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ hızda 30 dakika boyunca tepkime ortamına eklenmiştir (Şekil 2.1). NH_4OH bazı eklenmesi işleminin ardından çözelti üzerine 300 μL oleik asit eklenerek 80 °C ve

800 rpm karıştırma hızında bir saat boyunca olgunlaştırma işlemine bırakılmıştır. Olgunlaştırma işlemi sonrası birlikte çöktürme yöntemi ile üretilen MNP'ler oda sıcaklığında pH=7 (Sartorius PP-50 professional model) olana kadar deiyonize su ile yıkanmıştır [48]. Yıkama işleminde neodimium mıknatıs kullanılmıştır. pH'ı 7 olan MIONP çözeltisi liyofilizatörde (Lyostar-85, Telstar) dondurularak kurutulmuş ve bir sonraki basamağa kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 2.1 MIONP üretim aşaması.

2.3 Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin Fonksiyonelleştirilmesi

Üretilen MIONP yüzeylerinin fonksiyonel hale getirilmesi için APTS kullanılarak silanlama tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Silanlama tepkimesinin ilk aşamasında; MIONP'lara metanol, deiyonize su ve APTS içeren ortamda oda sıcaklığında 30 dakika boyunca sonikasyon işlemi uygulanmış ve ardından çözelti üzerine gliserol eklenerek 90 °C'ye ayarlanmış manyetik karıştırıcılı ısıtıcıda 6 saat boyunca 800 rpm karıştırma hızında silanlama tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Tepkime sonunda yüzeyi silanlanarak aktif hale getirilen MIONP'lar sırası ile metanol ve su ile yıkanmıştır. Silanlanmış MIONP'lar vakum etüvünde (Forma Scientific 6515) 40 °C sıcaklık, 20 kPa vakum basıncında, 15 kW/h kurutma hızında kurutulmuştur. Kuruyan örnekler, bir sonraki basamağa kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır [35].

2.4 CLEA ve Manyetik CLEA Üretimi

CLEA üretimi, Talekar vd. (2012)'nin kullandığı yöntem temel alınarak gerçekleştirilmiş ve yöntemde bazı modifikasyonlar yapılmıştır [35]. Taşıyıcısız tutuklama yöntemi olan CLEA üretimi için *Candida rugosa* lipazı pH'ı 7.5 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tuzlarından hazırlanan tampon ortamında vorteks cihazı (Vorteks Genius 3, IKA) kullanılarak çözülmüş ve ardından +4 °C sıcaklığındaki ceket tipi reaktöre yerleştirilerek üzerine enzimin üretim ortamından gelen safsızlıkların çöktürülmesi amacıyla (NH₄)₂SO₄ tuzu eklenmiş ve 2 saat boyunca 200 rpm karıştırma hızında karıştırılmıştır. Reaktörde +4 °C sıcaklık sirkülatör (Thermo Elektron Co., HAAKE Phoenix II P2-C25P sirkülatör) yardımı ile sağlanırken karıştırma işlemi orbital karıştırıcı (Selecta Co., Rotabit Model) ile yapılmıştır. Karıştırma işlemi sonunda lipaz enziminin çapraz bağlanma işlemi %25'lik glutraldehitin eklenmesi ile sağlanmıştır. Çapraz bağlayıcı ajan GA'nın eklenmesinden sonra 30 dakika devam eden karıştırma işlemi ardından örnekler buzdolabında +4 °C değerinde 1 gün boyunca bekletilmiştir. Bu süre sonunda çapraz bağlı enzim agregatları şeklinde üretilen lipaz biyokatalizörlerinin çözelti ortamından geri kazanımı için örnekler +4 °C sıcaklık ve 10000 rpm hızda 30 dakika boyunca soğutmalı santrifüj cihazında (Medifriger BL-S Model, Selecta Co.) santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonunda üst sıvı fazı atılan örnekler, pH=7.5 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tamponu ile 5 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra örnekler liyofilizatörde (Lyostar-85, Telstar) kurutulularak bir sonraki adımda kullanılmak üzere buzdolabında +4 °C sıcaklıkta saklanmıştır.

Manyetik CLEA üretiminde de yukarıda verilen yöntem uygulanmıştır. Tek fark başlangıç aşamasında pH'ı 7.5 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tamponunda lipaz enzimi çözüldükten sonra ortama, silanlama reaksiyonu sonucu yüzeyi modifiye edilerek fonksiyonel hale getirilen MIONP eklenmesi ve demir nanopartikülleri disperse etmek için 3 dakika sonikasyon işleminin uygulanmasıdır.

2.5 Analitik Yöntemler

2.5.1 CLEA ve manyetik CLEA aktivitesinin belirlenmesi

Candida rugosa lipazı kullanılarak hazırlanan CLEA ve manyetik CLEA formundaki taşıyıcısız enzim sistemlerinin hidrolitik aktivitesi, substrat olarak

p-nitrofenilasetat (*p*-NPA)'ın lipaz enzimi ile tepkimesi sonunda üretilen *p*-nitrofenol (*p*-NP)'ün üretim hızı 25 °C sıcaklık, 200 rpm karıştırma hızı ve 5 dakikalık tepkime süresince ölçülerek belirlenmiştir [49,50]. Tepkimenin stokiyometrik denklemi Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2 *p*-NPA'nın lipaz katalizli enzimatik hidroliz tepkimesi.

p-NP üretim hızı spektrofotometrik olarak UV-vis spektrofotometre cihazında (UV-vis 1800, Shimadzu) *p*-NP'nin maksimum absorbanstaki $\lambda=404$ nm dalga boyunda (EK 1) kinetik modda belirli zaman aralığında okunan absorbanstaki değerlerinin farkından yararlanılarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon doğrusu için pH=7.5 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tamponunda hazırlanan *p*-NP'nin belli derişimlerdeki çözeltileri kullanılmıştır (EK 2). CLEA ve manyetik CLEA aktivite hesaplanmasında kullanılan denklem EK 3'te verilmiştir. CLEA ve manyetik CLEA aktivitesi ünite (U) cinsinden belirlenmiş olup bir enzim ünitesi; birim zamanda 1 µmol substratı (*p*-NPA) ürüne (*p*-NP) dönüştüren enzim miktarı (g) olarak verilmiştir.

2.5.2 Biyokatalizörlerin en uygun işletim koşullarının belirlenmesi

CLEA ve manyetik CLEA biyokatalizörleriyle gerçekleştirilecek tepkimeler için en uygun pH ve sıcaklık değerleri, enzim aktivitesinin en yüksek olduğu pH ve sıcaklık değerleri belirlenerek bulunmuştur.

CLEA ve manyetik CLEA için optimum pH değeri; *p*-NPA substratı içeren 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tamponunda her bir koşul için 1 mg enzim kullanılarak 25 °C sıcaklıkta ve 200 rpm karıştırma hızında, pH= 6, 7, 7.5 ve 8 değerlerinde 30 dakika süresince inkübe edilen enzimin aktivitesi Bölüm 3.5.1'de anlatılan

yöntemle ölçülerek belirlenmiş ve aktivitenin en yüksek olduğu pH değeri saptanmıştır.

CLEA ve manyetik CLEA için optimum sıcaklık değeri; *p*-NPA substratı içeren pH için belirlenen en uygun koşul olan pH=7.5 değerinde 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tamponunda her bir koşul için 1 mg enzim kullanılarak T=15, 25, 35 ve 45 °C sıcaklıklarda, 200 rpm karıştırma hızında ve 30 dakika süresince inkübe edilen enzimin aktivitesi Bölüm 3.5.1’de anlatılan yöntemle ölçülerek belirlenmiş ve aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık değeri saptanmıştır

2.5.3 CLEA ve manyetik CLEA saklama kararlılığı

CLEA ve manyetik CLEA saklama kararlılığı +4 °C’de depolanan biyokatalizörlerin 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon sisteminde pH=7.5 ve T=25 °C koşullarında belirli periyotlarda alınan örneklerinin aktivitesi Bölüm 3.5.1’de anlatılan yöntemle ölçülerek belirlenmiş 2 ay süresince takip edilmiştir.

2.5.4 Manyetik demir nanopartiküllerin hidrodinamik boyut ve zeta potansiyelinin belirlenmesi

Birlikte çöktürme yöntemiyle üretilen orjinal MIONP’ların APTS ile silanlama tepkimesi sonucunda yüzeyi fonksiyonel hale getirilen MIONP’ların ortalama hidrodinamik çapı (Z_{ort}), polidispersivite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli (ZP) ölçümleri Zetasizer (Nano ZS, Malvern) cihazında yapılmıştır. Analizlerden önce örnekler 1/99 oranında seyreltilerek beş dakika sonikasyona tabi tutulmuştur.

Zetasizer cihazında hidrodinamik boyut analizleri; 25°C sıcaklıkta, 633 nm dalga boyunda 4.0 mV He-Ne lazer kullanılarak foton kolerasyon spektroskopisi yöntemi ile yapılmaktadır. Dinamik ışın saçılımı (Dynamic Light Scattering; DLS) ile ölçülen Z_{ort} değeri bir partikülün sıvı içerisinde nasıl hareket ettiğini göstermektedir. Analizlerde ortamın viskozite değeri 0.8872 cP ve kırılma indisi 1.33 olarak alınmıştır. Z_{ort} değeri, Eşitlik 3.1 ile verilen Stokes-Einstein denkleminde hesaplanmaktadır.

$$Z_{ort} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad [3.1]$$

Eşitlik 3.1’de Z_{ort} ; hidrodinamik çapı (nm), k_B ; Boltzmann sabiti ($1.38 \times 10^{-23} \text{J K}^{-1}$), T ; sıcaklık (K), η ; viskozite, D ; difüzyon katsayısını göstermektedir.

Zetasizer NanoZS cihazında ZP ölçümü faz analizi ışın saçılımı (Phase Analysis Light Scattering; PALS) yöntemine göre yapılmaktadır. Partiküllerin ZP değerleri, ölçülen elektroforetik hareketlilik yardımı ile Henry denklemi kullanılarak Eşitlik 3.2 ile hesaplanmaktadır:

$$\mu_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad [3.2]$$

Eşitlik 3.2’de μ ; elektroforetik hareketlilik ($8.854 \times 10^{-12} \text{F m}^{-1}$), ε ; ortamın dielektrik sabiti (78.5), ζ ; zeta potansiyeli (mV), η ; ortamın viskozitesi (0.8872 cP) ve $f(\kappa a)$; Henry fonksiyonudur. κ ; elektriksel çift tabaka kalınlığının/Debye uzunluğunun tersi, a ; partikül yarıçapıdır. Çift tabaka kalınlığının partikül boyutundan daha küçük olduğu varsayımını kullanan Smoluchowski yaklaşımı ile $f(\kappa a)=1.5$ değeri alınarak zeta potansiyeli değeri polar çözücüler için hesaplanabilmektedir [51].

2.5.5 FTIR spektrofotometre

Birlikte çöktürme yöntemi ile üretilen orjinal MIONP, yüzeyi fonksiyonel hale getirilmiş MIONP ve CLEA bağlı MIONP’ların yapısında meydana gelen değişimler; KBr pelletleri hazırlanarak FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrum 100, Perkin Elmer) spektrofotometresinde, $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ bölge aralığında, 4 cm^{-1} spektral çözünürlüğünde ve 4 tarama sayısı ile belirlenmiştir.

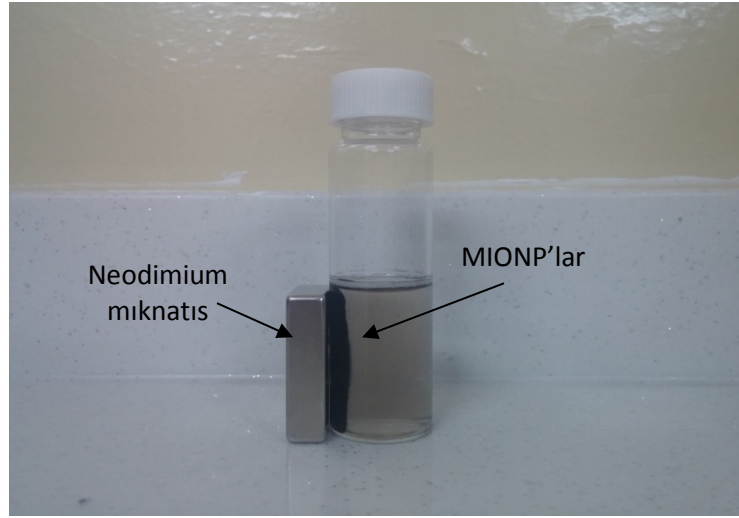
2.5.6 SEM analizleri

Birlikte çöktürme yöntemi ile üretilen MIONP’lar ile manyetik CLEA’ların SEM analizleri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde bulunan Leo 440 Computer Controlled Digital model SEM cihazında hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1 Manyetik Demir Oksit Nanopartikül Üretimi ve Mol Oranı Etkisi

Manyetik demir oksit nanopartiküller, Bölüm 3.2’de verilen birlikte çöktürme yöntemi ile üretilmiştir. $Fe^{2+}:Fe^{3+}$ ’nin 1:1, 1:2 ve 1:3 mol oranlarında Fe_2SO_4 ve $FeCl_3$ tuzları kullanılarak MIONP üretimine mol oranı etkisi incelenmiştir. Her bir koşulda üretilen MIONP’lar çözelti pH’ı 7 olana kadar neodimium mıknatıs kullanılarak yıkanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 MIONP’ların neodimium mıknatıs ile yıkanması.

Farklı mol oranlarında üretilen MIONP’ların ortalama hidrodinamik çap (Z_{ort}), zeta potansiyeli (ZP) ve polidispersite indeks PDI değerleri ZetaSizer cihazında sırası ile DLS ve PALS yöntemleriyle belirlenerek Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 MIONP’ların Z_{ort} PDI ve ZP değerleri: Mol oranı etkisi

$Fe^{2+}:Fe^{3+}$ mol oranı	Z_{ort} (nm)	PDI	ZP (mV)
1:1	218.9	0.311	-29.3
1:2	72.06	0.187	-28.8
1:3	401.1	0.441	-27.3

Farklı mol oranlarında üretilen MIONP’ların Z_{ort} değerlerinin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Z_{ort} değerlerini, PDI değerleri ile birlikte yorumlamak gerekir. PDI değerinin küçük olması monodispers yapının hakim olduğunu

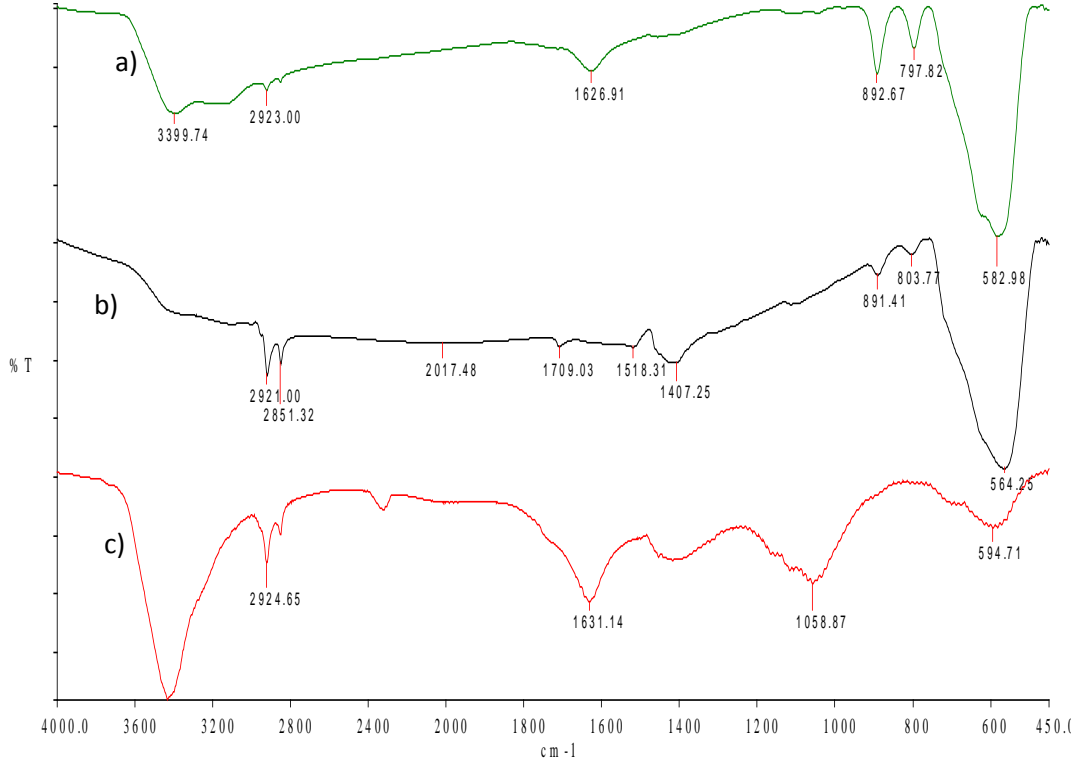
göstermektedir. 1:2 mol oranında üretilen demir nanopatiküllerin PDI değeri en küçüktür ve dolayısıyla Z_{ort} değeri de diğer iki koşulda üretilen partiküllere göre küçüktür.

Maity ve Agrawal (2007) çalışmalarında sulu ortamdan çöktürme yöntemi ile magnetit (Fe_3O_4) nanopatikül sentezinde, Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} 'e oksidasyonundan dolayı $Fe^{3+}:Fe^{2+}$ mol oranının tepkime süresince 2:1 oranında tutulamayacağını bildirmişlerdir. Bu nedenle $Fe^{3+}:Fe^{2+}$ mol oranının 2:1 oranından küçük olması gerektiğini dolayısıyla Fe^{2+} 'nin oksidasyonunun bu şekilde telafi edilebileceğini bildirmişleridir. Üretilen partiküllerin temel yapısının maghemitten oluştuğunu az miktarda ise magnetit içerdiklerini bildirmişlerdir [52].

Mascolo vd. (2013), magnetit NP'leri tek basamakta birlikte çöktürme yöntemi ile oda sıcaklığında üretmişler ve NaOH, KOH ve $(C_2H_5)_4NOH$ gibi farklı baz türlerinin etkisini incelemişlerdir. Üretilen magnetit NP'leri boyutunun NaOH>KOH> $(C_2H_5)_4NOH$ sırasına göre azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca $Fe^{2+}:Fe^{3+}$ mol oranının 2:1 olması durumunda maghemit gibi diğer fazlar oluşmadan magnetit oluşumu için uygun oran olduğunu belirtmişlerdir [53].

Farklı mol oranlarında üretilen demir nanopatiküllerin zeta potansiyeli değerleri yaklaşık aynı ve negatif değer olarak ölçülmüştür. Zeta potansiyelinin büyüklüğü koloidal sisteminin kararlılığının bir göstergesidir. Kararlı ve kararsız sulu dispersiyonlarda zeta potansiyeli için genel olarak +30 ya da -30 mV değerleri bir ayırım çizgisi olarak alınır. Yani sistemin kararlı olması için mutlak değerce 30 mV'dan büyük olması gerekmektedir [51]. Tüm partiküller nispeten büyük negatif veya pozitif ZP değerine sahipse, birbirlerini iterler ve kararlı bir yapı oluşur. Oldukça düşük ZP değerlerine sahip partiküller varsa agregasyon önlenemez ve kararsız bir yapı oluşur. Her üç mol oranında zeta potansiyeli değerinin negatif olması manyetik demir nanopatikül yüzeyindeki FeO^- ve $-OH^-$ iyonlarından kaynaklanmaktadır [54]. Üretilen demir nanopatiküllerin zeta potansiyel değeri -30 mV sınırına oldukça yakındır. Ölçülen bu değerler demir nanopatiküllerin kararlı yapıda olabileceğini göstermektedir [55].

Farklı mol oranlarında üretilen MIONP'ların kimyasal yapılarının karakterizasyonu FTIR analizleri ile belirlenmiş ve elde edilen spektrumlar karşılaştırmalı olarak Şekil 3.2'de sunulmuştur.



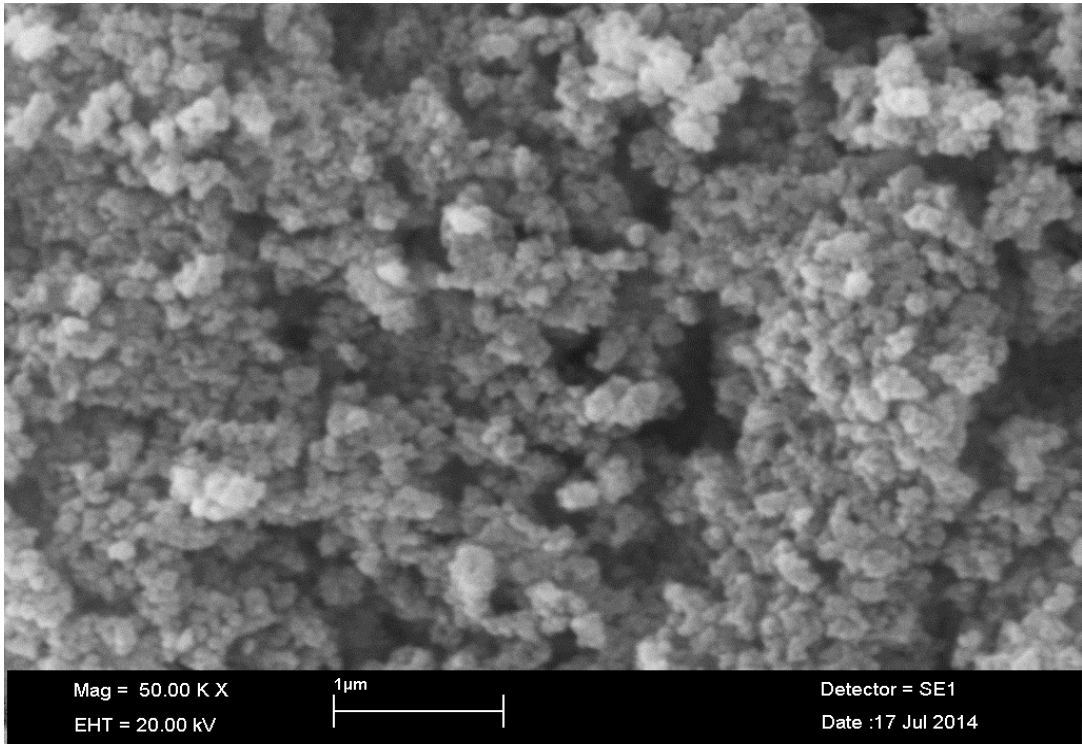
Şekil 3.2 Fe²⁺:Fe³⁺ farklı mol oranlarında birlikte çöktürme yöntemi ile üretilen MIONP'ların FTIR spektrumları: a) 1:2 b) 1:1 c) 1:3.

Şekil 3.2'de verilen FTIR spektrumunda; 582-594 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında düşük frekansta gözlenen titreşim bandları Fe₃O₄ molekülünün kristal kafes yapısının oluştuğunu göstermektedir ve bu bantlar MIONP'un tetrahedral kristal kafes yapısındaki Fe-O gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1:1 ve 1:2 mol oranlarında bu piklerin şiddetleri hemen hemen aynı iken 1:3 mol oranında bu pik şiddetinin -diğer iki mol oranına kıyasla- küçük olması Fe₃O₄ sentezinin başarılı olmadığını göstermektedir. 1626-1631 cm⁻¹ dalga sayısındaki absorpsiyon bantları sudan kaynaklanan O-H gerilme titreşiminden, 3367-3400 cm⁻¹ dalga sayısındaki absorpsiyon bantları oleik asit veya sudan kaynaklanan O-H gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır [56, 57, 58]. 2852 ve 2921-2924 cm⁻¹ arasındaki absorpsiyon bantları oleik asitten kaynaklanan C-H gerilme titreşiminden, 1407 cm⁻¹

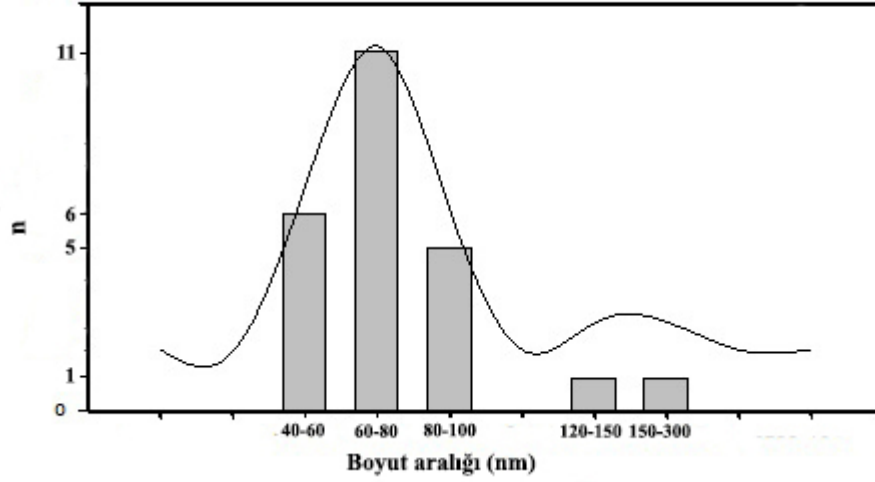
frekansındaki absorpsiyon bandı havadaki CO₂'den kaynaklanan C-O titreşiminden kaynaklanmaktadır [52].

Farklı mol oranlarında üretilen MIONP'ların Z_{ort}, PDI, ZP değerleri ve FTIR spektrumları birlikte değerlendirildiğinde partikül boyutunun en küçük ve monodispers yapının hakim olduğu, ZP değeri açısından koloidal kararlılık sınırına giren ve Fe₃O₄ magnetit kristal kafes yapısının başarılı bir şekilde olduğu mol oranı değeri olarak Fe²⁺:Fe³⁺'ün 1:2 değerinin uygun olduğu belirlenmiştir.

Şekil 3.3'de Fe²⁺:Fe³⁺'ün 1:2 mol oranında üretilen MIONP'ların SEM fotoğrafı sunulmuştur. Birlikte çöktürme yöntemi ile üretilen MIONP'un DLS analizlerinden elde edilen Z_{ort} değeri 72.06 nm olarak belirlenmiştir. SEM fotoğrafından yararlanarak üretilen MNP'lerin yapılan boyut dağılımı analizinde (Şekil 3.4) farklı büyüklükte partiküller olmasına karşın ortalama çapının %45 oranında 60-80 nm aralığında olduğu partiküllerin homojen, düzenli ve küresel yapıda olduğu belirlenmiştir. DLS ve SEM analizlerinin uyum içinde olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.3 Manyetik demir oksit nanopartikül SEM görüntüsü.



Şekil 3.4 Manyetik nanopartiküllerin ortalama boyut dağılımı (n=24).

Rahman vd. (2011) hidrotermal sentez yöntemi ile ürettikleri demir nanopartiküllerin çapının SEM analizleri yardımı ile 50-90 nm aralığında olduğunu ve ortalama olarak 60 nm çaplı uniform, küresel demir nanopartiküller ürettiklerini bildirmişlerdir [57]. Shen vd. (2013) Fe^{2+} ve Fe^{3+} sülfat tuzlarını kullanarak NaOH ortamında birlikte çöktürme yöntemi ile ürettikleri demir nanopartiküllerin ortalama çapını TEM analizlerinden belirleyerek, partiküllerin 50-70 nm aralığında düzenli bir yapıya sahip olduğunu bildirmişlerdir [59].

Fe_3O_4 çözeltisinin PDI değeri 0.187 olarak ölçülmüştür. Ölçülen PDI değerinin düşük olması DLS analizleri için örneğin uygun olduğunu, mono disperse yapının hakim olduğunu ve agregasyonun olmadığı göstermektedir [60]. SEM analiz sonuçlarının da literatür ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

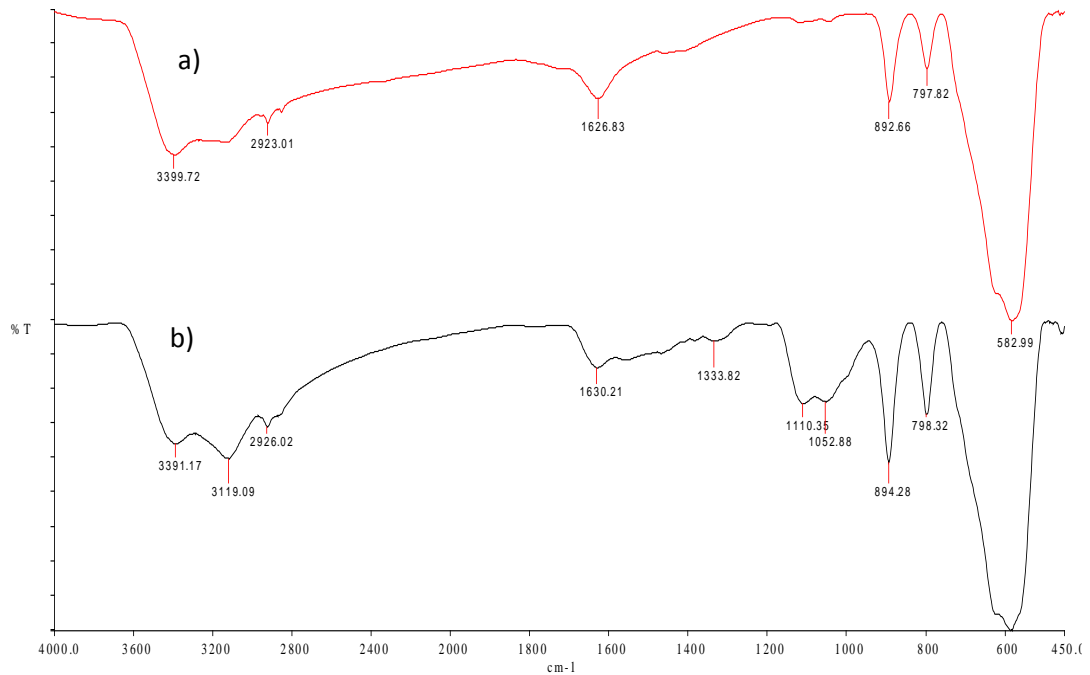
3.2 Manyetik Demir Oksit Nanopartikül Yüzeyinin Fonksiyonelleştirilmesi

Birlikte çöktürme yöntemiyle üretilen MIONP'ların yüzeyinde APTS ile silanlama tepkimesi sonucunda CLEA'nın bağlanması için $-NH_2$ grupları oluşturularak MIONP yüzeyleri fonksiyonel hale getirilmiştir. Silika, MNP'ler için kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır. Bölüm 2.3'de anlatılan yöntem ile üretilen yüzeyi fonksiyonel hale getirilen MIONP'lar Şekil 3.5'de sunulmuştur.



Şekil 3.5 Yüzeyi fonksiyonelleştirilmiş MIONP.

Silanlama tepkimesiyle yüzeyi fonksiyonelleştirilen MIONP'lar ve orjinal MIONP'ların ile karşılaştırmalı FTIR spektrumları Şekil 3.6'da sunulmuştur.



Şekil 3.6 MIONP FTIR spektrumları: a) Orjinal b) APTS ile yüzeyi fonksiyonelleştirilmiş.

APTS ile yüzeyi fonksiyonel hale getirilen edilen MIONP'ların FTIR spektrumunda (Şekil 3.6b) orijinal MIONP spektrumunda (Şekil 3.6a) yer almayan yeni pikler gözlenmiştir. Bu ortaya çıkan yeni pikler MIONP yüzeyine yeni grupların bağlandığını ve silanlama reaksiyonunun başarılı olduğunu göstermektedir. Şekil 3.6b'deki 1110.35 cm⁻¹ ve 1052.88 cm⁻¹ dalga sayısındaki

pikler sikloksanların Si-O-Si gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır ve silan polimerinin magnetit NP yüzeyine bağlandığını göstermektedir. Ayrıca 894 cm⁻¹ dalga sayısındaki pik şiddetinin orijinal MIONP'lara kıyasla silanlama tepkimesinden sonra artması da magnetit NP yüzeyine silan polimerinin bağlandığını göstermektedir ve bu artış Si-O-OH gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1333.83 cm⁻¹ bandı ise APTS molekülündeki primer amin grubundan kaynaklı C-N gerilmesine aittir [36, 61].

Yüzeyi APTS ile tepkimesiyle fonksiyonel hale getirilen MIONP'ların Z_{ort}, PDI ve ZP değerleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Yüzeyi fonksiyonelleştirilen MIONP'ların Z_{ort} PDI ve ZP değerleri

MIONP	Z_{ort} (nm)	PDI	ZP(mV)
Fe ₃ O ₄	159.3	0.309	-20.9

Yüzeyi modifiye edilmiş MIONP'ların DLS analizi sonucu Z_{ort} değeri 159.3 nm olarak belirlenmiştir. Orjinal MIONP'un Z_{ort} değeri 72.06 nm iken (Çizelge 3.1) yüzeyi fonksiyonel hale getirilen MIONP'un Z_{ort} değerindeki artış yüzeye yeni bir grup bağlandığını göstermektedir. Benzer şekilde literatürde yapılmış olan ve aşağıda özetlenmiş olan çalışmalarda demir nanopartiküllerin yüzeyinin kaplanma / modifikasyon işleminden sonra Z_{ort} değerinde artışlar gözlenmiştir:

Marinin (2012) çalışmasında birlikte çöktürme yöntemi ile ürettiği demir nanopartikülleri SiO₂ ile kaplamış ve kaplama işleminden sonra yaptığı boyut analizinde Z_{ort} değerinin arttığını bildirmiştir [62].

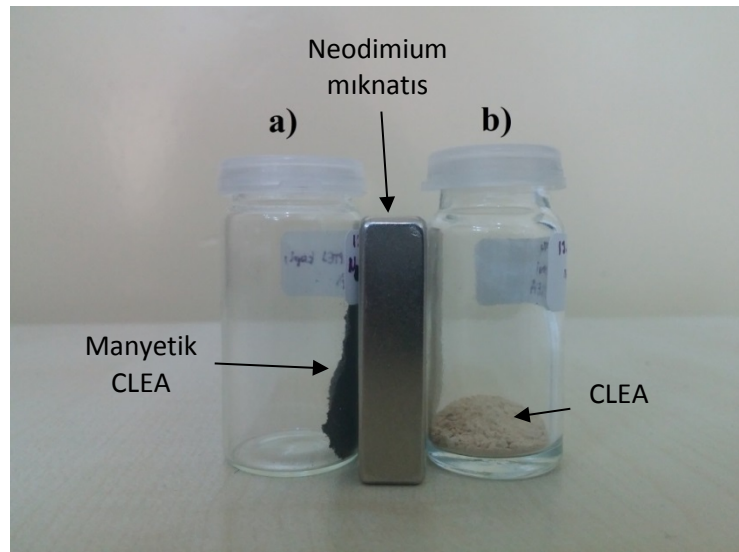
Lancucka vd. (2014) katyonik kitosanla modifiye ettikleri demir nanopartikülleri silika ile kaplamışlar ve kaplama işlemi sonucunda Z_{ort} değerlerinde artış gözlemlemişlerdir. Bu artış partikül boyutunun artması ile saçılan ışığın yoğunluğundaki artıştan dolayı kümülant analizde fazla hesaplama nedeniyle olduğunu belirtmiştir [63].

Orjinal demir nanopartikülün zeta potansiyeli değeri -28.8 mV (Çizelge 3.1) iken fonksiyonel hale getirilen demir nanopartikülün zeta potansiyeli -20.9 olarak belirlenmiştir. Yükteki bu değişim APTS molekülünden kaynaklanan pozitif yüklü

-NH₂ grubu ile negatif yüklü SiO⁻ grubunun yer değiştirmesi sebebiyle olmaktadır. Bu yer değiştirme yükte pozitif bir artışa neden olmaktadır [64].

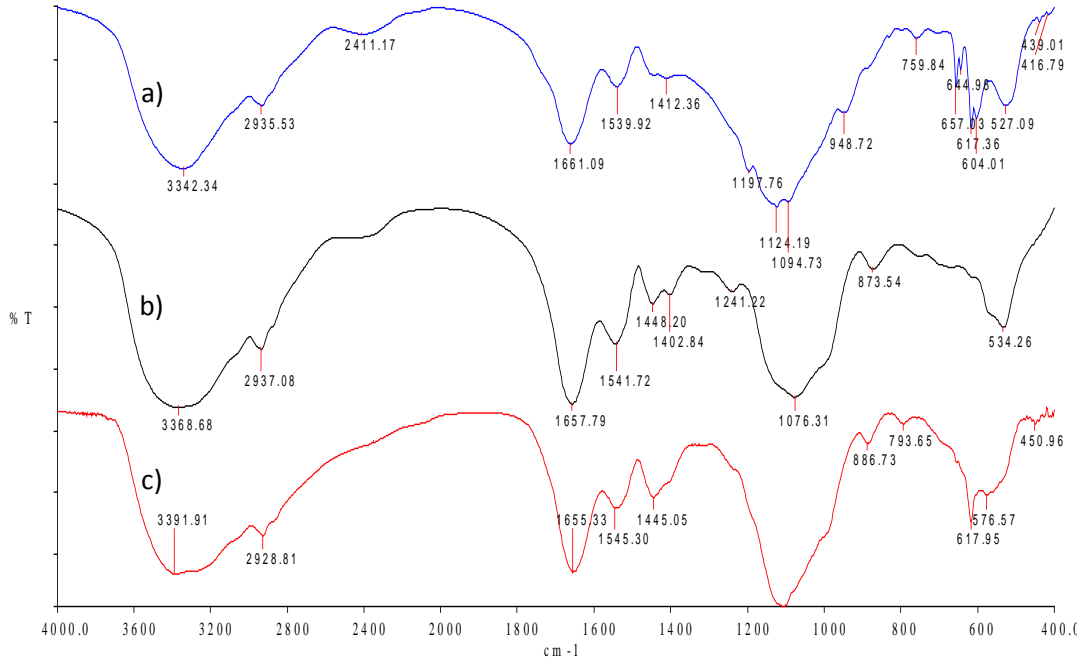
3.3 CLEA ve Manyetik CLEA Karakterizasyonu

Bölüm 2.4’de verilen yöntemle CLEA ve manyetik CLEA’lar sentezlenmiştir. Sentezlenen CLEA ve manyetik CLEA’ların fiziksel görünümleri Şekil 3.7’de sunulmuştur. Şekil 3.7’den MIONP tabanlı CLEA’nın neodimium mıknatıs tarafından çekildiği dolayısıyla manyetik ayırma ile CLEA biyokatalizrnn tepkime ortamından kolaylıkla ayrılabilceği gözlenmektedir.



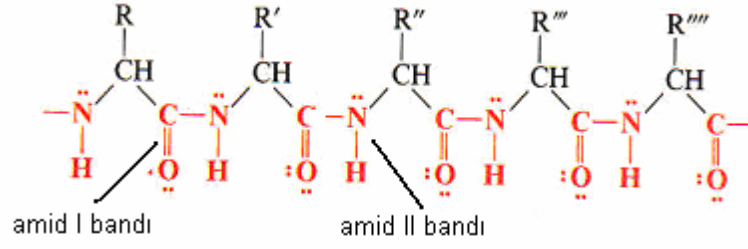
Şekil 3.7 Sentezlenen CLEA’lar: a) manyetik CLEA b) CLEA.

CRL, CLEA ve manyetik CLEA’nın kimyasal yapısı Şekil 3.8’de karşılaştırmalı olarak verilen FTIR spektrumlarından belirlenmiştir.



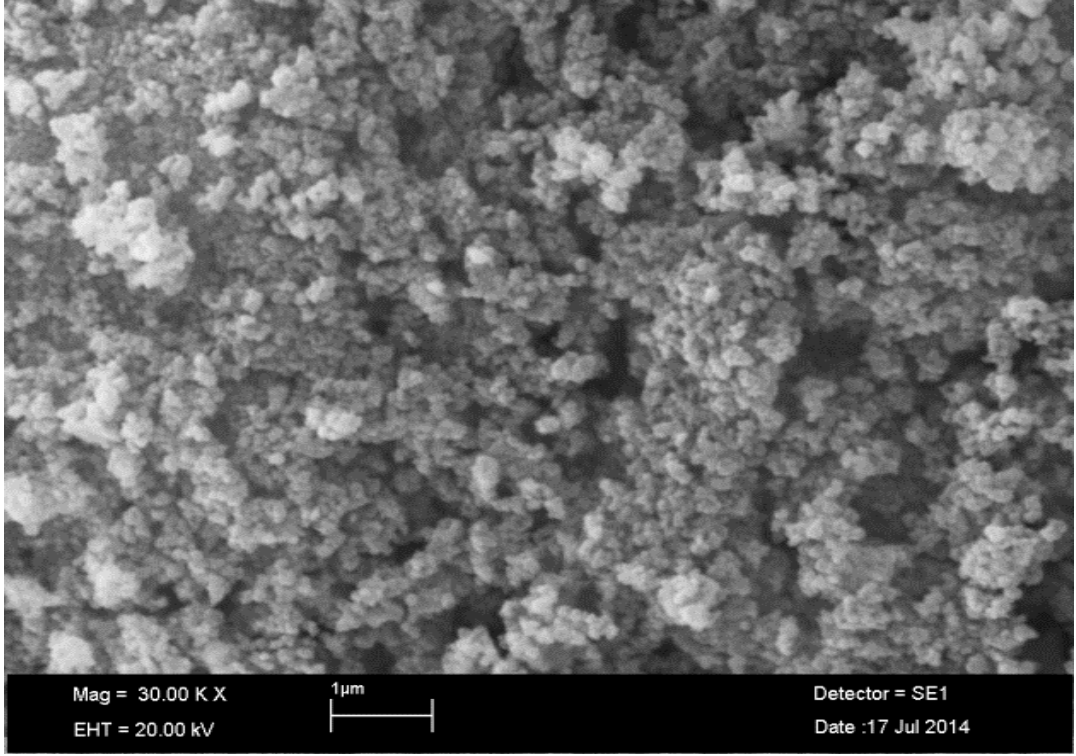
Şekil 3.8 FTIR spektrumları: a) CRL ve b) CLEA c) manyetik CLEA.

CRL, CLEA ve manyetik CLEA spektrumlarındaki ortak temel pikler protein yapısını gösteren amid I ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) ve amid II ($1480-1585\text{ cm}^{-1}$) bantlarıdır. Amid I bandı peptid bağı üzerinde bulunan C=O gerilmesinden kaynaklanırken amid II bandı peptid bağındaki N-H eğilmesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 3.9) Diğer amid bantları; amid III bandı $1200-1300\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında CRL ve CLEA yapısında gözlenirken amid IV-VI bantları CRL, CLEA ve manyetik CLEA yapılarında $534-800\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında gözlenmiştir. CLEA ve manyetik CLEA arasındaki temel farkı gösteren pik ise manyetik CLEA'daki Fe_3O_4 yapısına ait Fe-O titreşimini gösteren 576.57 cm^{-1} dalga sayısındaki piktir. FTIR spektrumunda $3342-3392\text{ cm}^{-1}$ arasındaki geniş pikler N-H ve O-H gerilme titreşimlerinden, $2928-2937\text{ cm}^{-1}$ dalga sayıları arasındaki pikler C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Manyetik CLEA'daki 1106.91 cm^{-1} dalga sayısındaki pik APTS molekülünden gelen Si-O-Si ve Si-O-H bağı titreşimleri yer alır [65, 66, 67, 68, 69].

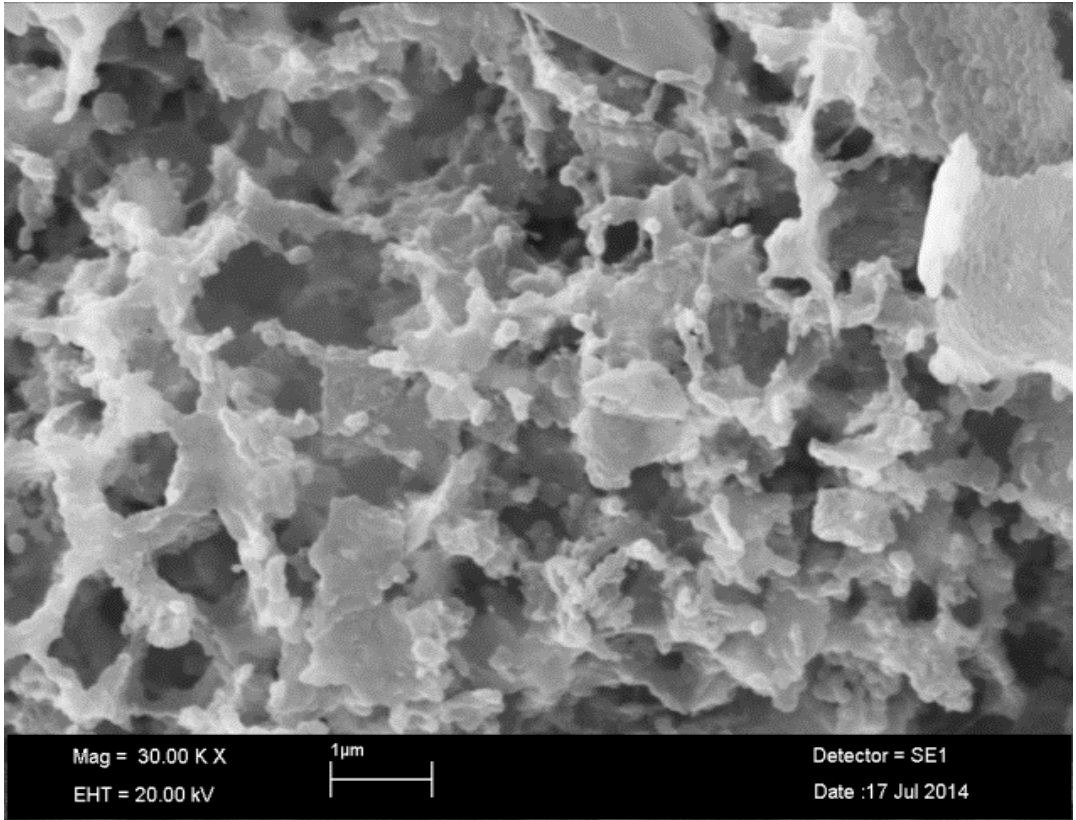


Şekil 3.9 Polipeptid zinciri üzerindeki amid I ve amid II grupları.

Candida rugosa lipazından sentezlenen CLEA ve manyetik CLEA'nın SEM fotoğrafları Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'de sunulmuştur. Manyetik CLEA'nın SEM fotoğrafında enzimin spesifik boşlukları gözlenmektedir (Şekil 3.10). Dolayısıyla bu boşluklar yüzey alanını arttırmaktadır. Şekil 3.10 ile kıyaslandığında Şekil 3.11'de demir NP yapısının baskın olmadığı gözlenmiş, dolayısıyla CLEA boşlukları içinde MIONP'ların tutulduğu belirlenmiştir. Bu boşluklar sayesinde enzim substrata kolayca bağlanabilmiştir. Benzer bir sonucu Xu vd. (2011) çalışmalarında belirtmişlerdir. Çalışmalarında çapraz bağlı tirozinaz agregatlarını, amonyum sülfat ile çöktürme ve devamında GA ile çapraz bağlama işlemleriyle hazırlamışlardır. Bu CLEA'ların aktivite ve stabiliteleri, sulu çözelti, organik çözücü ve iyonik sıvılarda araştırılmıştır. Tirozinaz CLEA'larının SEM fotoğraflarından, yüksek yüzey alanlı ve çok sayıda boşluğa sahip amorf bir yapı gözlenmiştir. Bu yapının substratın enzim moleküllerine ulaşmasını kolaylaştırdığını açıklamışlardır [70].



Şekil 3.10 MIONP SEM görüntüsü.

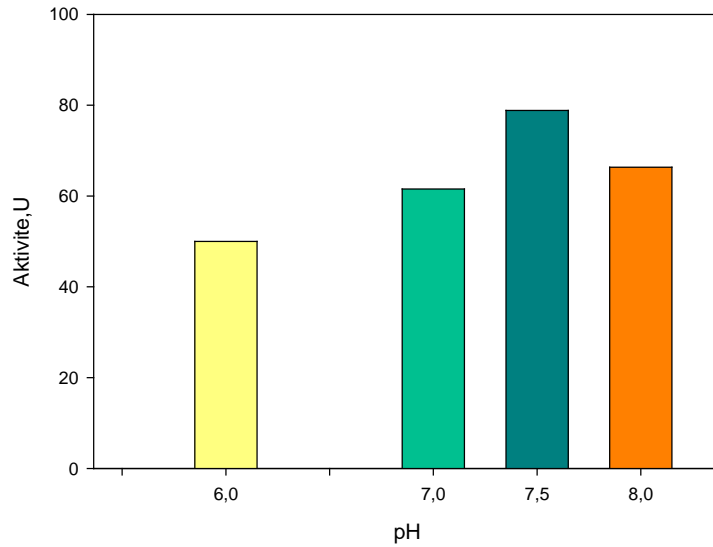


Şekil 3.11 MIONP-CLEA SEM görüntüsü.

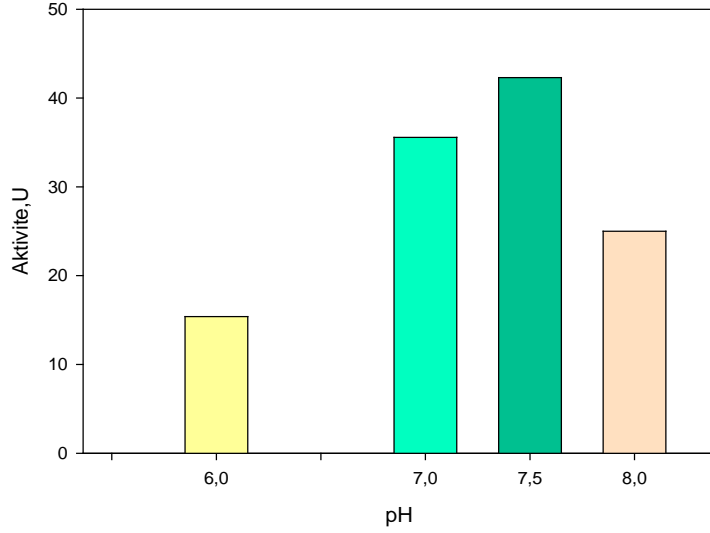
Kopp vd. (2014) yaptıkları çalışmada penisilin G-asilaz enziminin, manyetik çapraz bağlı enzim agregatlarını, çöktürücü ajan olarak 1,2-dimetoksietan, TBA ve PEG 600 kullanarak sentezlemişler, katalitik ve morfolojik özelliklerini incelemişlerdir. Kullanılan farklı çöktürücü türlerinden sentezlenen manyetik CLEA'ların çekilen SEM fotoğraflarında farklılık gözlemlemişlerdir. TBA ile elde edilen CLEA ile daha düzenli bir yapı elde edilmiştir [4].

3.4 CLEA'lar için En Uygun pH Değerinin Belirlenmesi

CLEA ve manyetik CLEA biyokatalizörleri için en uygun pH değerleri Bölüm 2.5.2'de verilen yönteme göre incelenmiştir. CLEA ve manyetik CLEA'lar *p*-NPA substratı içeren 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tamponunda, 25 °C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında, pH= 6, 7, 7.5 ve 8 değerlerinde 30 dakika süresince inkübe edilmiş ve pH ile aktivite değerlerinin değişimi sırası ile Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'de verilmiştir.



Şekil 3.12 pH ile CLEA aktivitesinin değişimi.



Şekil 3.13 pH ile manyetik CLEA aktivitesinin değişimi.

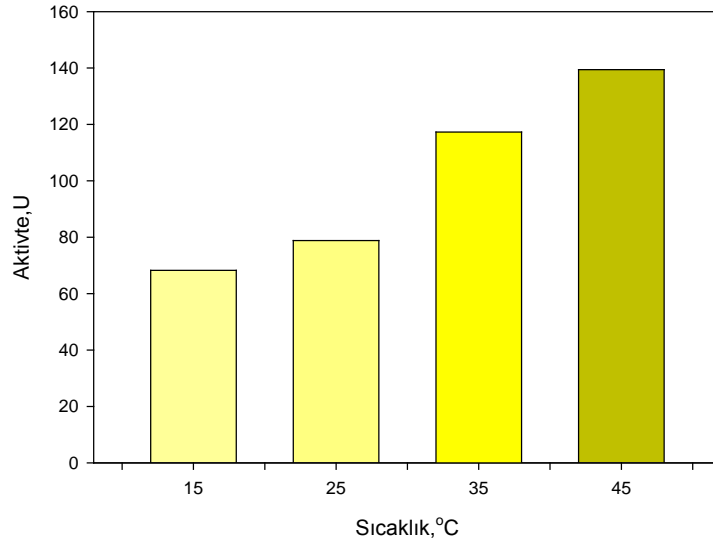
CLEA ve manyetik CLEA'ların pH davranışları benzer özellik göstermiş olup pH'ın 6'dan 7.5'a arttırılması ile aktivite değerleri artmış pH=8 değerinde ise aktivitede azalma gözlenmiştir. CLEA ve manyetik CLEA'lar için en uygun pH değeri 7.5 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde Talekar vd. (2012) çalışmalarında α -amilaz enziminin CLEA ve manyetik CLEA'larını üretmek için her iki enzim için optimum pH değerini 6 olarak belirlemişlerdir [3].

Manyetik CLEA'ların, CLEA'lara göre aktivite değerlerinin her pH değerinde düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi, manyetik CLEA'da var olan MIONP'ların bir kısmının enzimin aktif konumlarını -GA ile çapraz bağlanma tepkimesi sırasında- kapatması olarak düşünülmektedir [5]. Her pH değeri için aktivitedeki % azalmalar sırasıyla pH=6 için %69.23, pH=7 için %42.18, pH 7.5 için %46.34, pH 8 için % 62.31 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla asidik ve bazik koşullarda aktivitedeki düşüş değeri nötral pH değerlerinden daha fazladır. Asidik ve bazik koşullarda CLEA ve manyetik CLEA aktivitesinin azalması enzimin biyokatalitik aktivitesi ile ilgili olan üçüncül yapısının değişmesinden kaynaklanmaktadır [71].

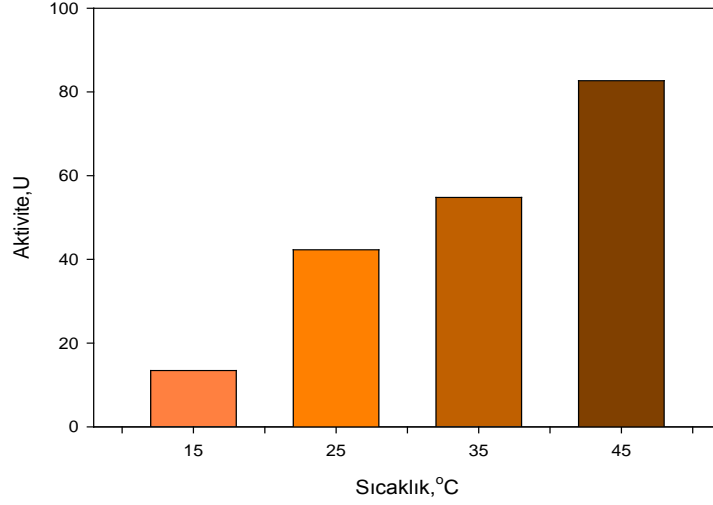
3.5 CLEA'lar için En Uygun Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

CLEA ve manyetik CLEA biyokatalizörleri için en uygun sıcaklık değerleri Bölüm 2.5.2'de verilen yönteme göre; pH 7.5 değerinde 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ tamponunda, T=15, 25, 35 ve 45 °C sıcaklıklarda, 200 rpm karıştırma hızında ve 30 dakika süresince inkübe edilen enzimin aktivitesi ölçülerek belirlenmiş ve aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık değeri saptanmıştır. CLEA ve manyetik CLEA için sıcaklıkla aktivitenin değişimi sırası ile Şekil 3.14 ve 3.15'te verilmiştir.

Sıcaklık artışıyla birlikte CLEA ve manyetik CLEA için aktivitenin arttığı gözlenmiştir. En uygun sıcaklık değeri CLEA ve manyetik CLEA için 45 °C olarak belirlenmiştir. Manyetik CLEA'ların, CLEA'lara göre aktivite değerlerinin her bir sıcaklık değerinde düşük olduğu gözlenmiş, aktivitedeki % azalmalar sırasıyla T=15 °C için %80.28, T=25 °C için %46.34, T=35 °C için %53.27 T=45 °C için % 40.68 olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın artması ile birlikte enzim aktivitesindeki düşüşler azalmıştır. Dolayısıyla CLEA ve manyetik CLEA'ların yüksek sıcaklıklarda daha kararlı olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.14 Sıcaklık ile CLEA aktivitesinin değişimi.



Şekil 3.15 Sıcaklık ile manyetik CLEA aktivitesinin değişimi.

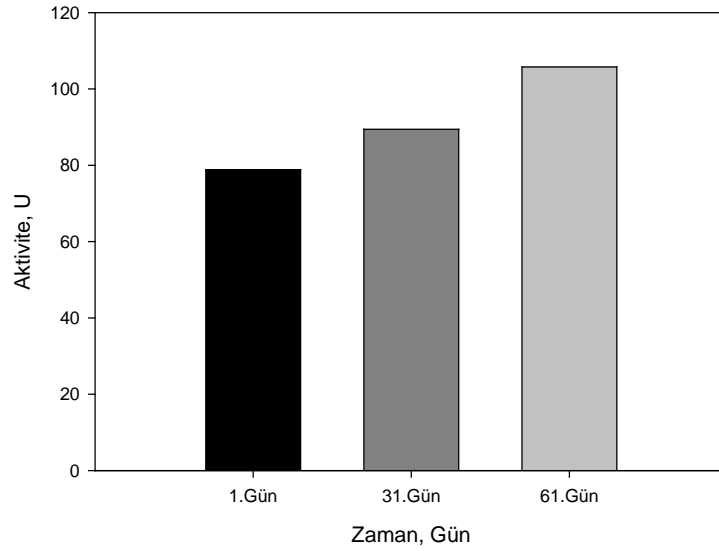
Talekar vd. (2012) α -amilazın GA bifonksiyonel ajanı kullanarak çapraz bağlı enzim agregatları hazırlamış ve yüzeyi amino gruplarıyla fonksiyonel hale getirilmiş manyetik demir nanopartiküller üzerine bağlamışlardır. Üretilen CLEA, manyetik CLEA ve serbest α -amilaz enzimi için optimum sıcaklık koşulları belirlenmeye çalışılmıştır. Farklı sıcaklık değerlerinde yapılan aktivite ölçümlerinde α -amilaz için 45 °C, CLEA için 50 °C ve manyetik CLEA için de 60 °C'de en yüksek aktivite değerlerine ulaşıldığı gözlenmiştir. Optimum sıcaklık değerlerinde ki bu kaymalara, CLEA'ların GA ile çapraz bağlanması sırasında proteinler arasında oluşan kovalent bağların sebep olduğu, bunun sonucunda enzimin konformasyonel esnekliğinin azalabildiği dolayısıyla bu sayede ısıl olarak daha kararlı olduğu belirtilmiştir [3].

Sui vd. (2012) glukonik asit ile MNP'lerin yüzey modifikasyonunu yaparak, hidrofilitik ve biyoafinitesini geliştirmişlerdir. Bu yüzey modifikasyonu yapılan MNP'lere immobilize edilmiş lipaz enzimini bağlamışlardır. Yapılan ölçümlerde serbest ve immobilize enzim için en yüksek aktivite değerleri 35 °C'de gözlenmiştir. Sıcaklık 55 °C'ye çıkarılarak yapılan ölçümlerde serbest enzim aktivitesinin %65'ini kaybederken, immobilize enzimde bu değer %20'de kalmıştır. Yüksek sıcaklıklarda serbest enzim ve glukonik asit ile modifiye edilmiş süperparamanyetik demir oksitle bağlı lipaz enziminin termal stabilitesini yüksek

oranda koruduğu gözlenmiştir. Yüksek stabilite, immobilize lipaz enziminin çoklu bağlanma noktalarının varlığından kaynaklandığı belirtilmiştir [72].

3.6 CLEA ve manyetik CLEA üretiminde depolama stabilitesinin ölçülmesi

Optimum üretim koşulları sağlandıktan sonra üretilen CLEA ve manyetik CLEA'nın pH 7.5 ve 25 °C sıcaklıkta 2 ay süresince alınan aktivite ölçümleri sırasıyla Şekil 3.16 ve Şekil 3.17'de verilmiştir. CLEA ve manyetik CLEA aktivitelerinde zamanla azalma gözlenmemiş aksine depolama süresi sonunda başlangıç aktivilerine göre aktivitelere ortalama %25 civarında artış gözlenmiştir.



Şekil 3.16 CLEA aktivitesinin zamanla değişimi.



Şekil 3.17 Manyetik CLEA aktivitesinin zamanla değişimi.

Literatür araştırmalarında Talekar vd.(2012), α -amilazın GA çapraz bağlayıcısı kullanılarak üretilen çapraz bağlı enzim agregatları hazırlamış ve yüzeyi amino gruplarıyla fonksiyonel hale getirilmiş MNP'ler üzerine bağlamışlardır. Depolama kararlılığını ölçmek için serbest enzim, CLEA ve manyetik CLEA tampon içerisinde +4 °C'de bekletilmiştir. Üretilen CLEA, manyetik CLEA ve serbest α -amilaz enziminin 18 gün boyunca depolama kararlılığına bakılmıştır. Serbest enzimin 18 günün sonunda aktivitesinin hemen hemen tamamını yitirdiği gözlenmiştir. CLEA ve manyetik CLEA'nın ise sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %50 ve %80'ini koruduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar manyetik CLEA'nın depolama stabilitesinin CLEA ve serbest enzime göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. [3].

Bu çalışmada ise CLEA ve manyetik CLEA aktivitelerinde zamanla artış gözlenmiş olup, bu artışın sebebi ölçüm çapraz bağlama ile oluşan enzim ağ yapısının daha kararlı hale gelmesi olarak düşünülmektedir [73].

4. SONUÇLAR

Biyoteknolojik proseslerde proteinlerin özellikle de katalitik özelliğe sahip enzimlerin ayırma işlemleri sırasında yüksek saflıkta geri kazanımları, yapılarının denatüre olmaması ve enzimlerin katalitik aktivitelerini kaybetmemeleri kullanılacakları bir sonraki proses için önemlidir. Biyoteknolojik proseslerde ortamdaki biyoyürünleri ayırma ve saflaştırma işlemleri toplam maliyet içinde yaklaşık %60'lık bir paya sahiptir. Biyodönüşüm verimliliği arttıkça ayırma ve saflaştırma işlemlerinin genel maliyet içindeki payları daha da yükselecektir. Bu nedenle ayırma-saflaştırma işlemlerinin biyoteknolojik üretimler için özel olarak geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu projede, taşıyıcısız enzim tutuklama yöntemlerinden olan çapraz bağlı enzim agregatları ve manyetik demir oksit nanopartiküller kullanılarak manyetik CLEA formunda geliştirilen biyokatalizör ile özellikle değerli kimyasalların sentezi, farmasötikler ve gıda prosesleri gibi biyoteknoloji endüstrisinin birçok alanında verimin artırılması söz konusudur. Ayrıca manyetik ayırma işlemi ile biyokatalizörün ortamdaki kolayca ayrılması enzimlerin geri döngüsünü kolaylaştırarak ayırma ve saflaştırma işlemlerinin toplam maliyet içindeki oranını düşürecek ve prosesi daha ekonomik hale getirecektir.

Bu yüksek lisans tez projesinde, manyetik CLEA biyokatalizör üretimi için model olarak seçilen *Candida rugosa* lipaz enziminin CLEA formu oluşturularak; birlikte çöktürme yöntemi ile üretilen MIONP yüzeyine bağlanması ve sentezlenen biyokonjüge materyal sayesinde tepkime ortamından manyetik ayırma ile kolaylıkla ayrılabilen mekanik ve ısı kararlılığı yüksek, aktivitesini uzun süre koruyabilen ve uzun süreli geri döngülü işletimi mümkün bir biyokatalizör geliştirilmiştir. Manyetik CLEA'ların pH, ısı ve depolama kararlılıkları CLEA formu ile karşılaştırılmıştır. Üretilen CLEA ve manyetik CLEA'lar FTIR, SEM, DLS, PALS analizleri ile karakterize edilmiş elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Birlikte çöktürme yöntemi ile üretilen MIONP yapısının magnetitden (Fe_3O_4) oluştuğu FTIR analizlerinde yaklaşık 582.98 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen tetrahedral kristal kafes yapısındaki Fe-O gerilme titreşiminden

belirlenmiştir. Üretilen MIONP'lar harici bir manyetik alan ile kolaylıkla hareket edebildiği gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 MIONP'ların manyetik alan altındaki hareketi.

- Manyetik Fe_3O_4 NP üretimi, birlikte çöktürme yöntemi gerçekleştirilmiş ve SEM analizi ile 60-80 nm partikül çapı, DLS analizinden elde edilen sonuçlar da ise 72.06 nm hidrodinamik çapa sahip manyetik Fe_3O_4 nanopartikül sentezlenmiştir. SEM ve DLS analizleri sonuçlarının uyum içinde olduğu gözlenmiştir.
- Birlikte çöktürme yönteminde; $Fe^{2+}:Fe^{3+}$ tuzlarından farklı mol oranlarında (1:1, 1:2 ve 1:3) üretilen Fe_3O_4 nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiş ve 1:2 mol oranının birlikte çöktürme yönteminde Z_{ort} , PDI ve ZP ölçüm sonuçları açısından uygun olduğu belirlenmiştir.
- Manyetik Fe_3O_4 nanopartikül yüzey modifikasyonu APTS ile silanlama tepkimesiyle yapılmış, tepkimenin başarısı FTIR analizleri yardımı ile yüzeyde yeni yaratılan Si-O-Si, Si-O-H, $-NH_2$ gruplarının varlığından ve ayrıca Fe_3O_4 nanopartikülün DLS ve PALS analizlerinden belirlenen Z_{ort} ve ZP değerlerinin değişiminden belirlenmiştir.
- Üretilen manyetik CLEA'nın FTIR analizleri sonucu amid I ve amid II bandlarının gözlenmesi MIONP yüzeyine enzimin bağlandığını göstermiştir.

Ayrıca Fe_3O_4 yapısına ait gerilme titreşimleri 576.57 cm^{-1} dalga sayısında gözlenmiştir.

- CLEA ve manyetik CLEA'ların, pH ve ısı kararlılıkları benzer davranış göstermiş olup en uygun pH değeri 7.5 olarak belirlenmiştir. İncelenen sıcaklık aralığında sıcaklığın artması ile her iki enzimin aktivitesinin arttığı belirlenerek en uygun sıcaklık değeri $45 \text{ }^\circ\text{C}$ olarak saptanmıştır.
- Üretilen CLEA ve manyetik CLEA'ların 2 ay süresince depolama kararlılıkları incelenmiş ve bu süre zarfında aktivitelere %25 oranında artış gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] **Nidumolu, B.S.G.R.** (2005). Functionalization of gold and glass surfaces with magnetic nanoparticles using biomolecular interactions, *The Department of Biological and Agricultural Engineering*, 64 pages, Jawaharlal.
- [2] **Bhattacharya, A., Pletschke, B.I.**, (2014). Magnetic cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel concept towards carrier free immobilization of lignocellulolytic enzymes, *Enzyme and Microbial Technology* 61–62;17–27.
- [3] **Talekar, S., Ghodake, V., Ghotage, T., Rathod, P., Deshmukh, P., Nadar, S., Mulla, M., Ladole M.**, (2012). Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase, *Bioresource Technology* 123; 542–547.
- [4] **Kopp, W., da Costa, T.P., Pereir, S.C., Giordano, M.J. Jr RC., Marques, R.F.C., Araujo-Moreira, F.M., Giordano, R.L.C.**, (2014). Easily handling penicillin *G*-acylase magnetic cross-linked enzymes aggregates: Catalytic and morphological studies, *Process Biochemistry* 49, 38–46.
- [5] **Vaidya, B. K., Kuwar, S. S., Golegaonkar, S. B., Nene, S. N.**, (2012). Preparation of cross-linked enzyme aggregates of *l*-aminoacylase via co-aggregation with polyethyleneimine, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74, 184– 191.
- [6] **Rossi, L.M., Quach, A.D., Rosenzweig, Z.**, (2004). Glucose oxidase–magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing, *Anal. Bioanal. Chem.*, 380, 606-13.
- [7] **Mosafa, L., Moghadam, M., Shahedi, M.**, (2013). Papain enzyme supported on magnetic nanoparticles: Preparation, characterization and application in the fruit juice clarification, *Chinese Journal of Catalysis* 34;1897–1904.
- [8] **Cui, Y., Li, Y., Yang, Y., Liu, X., Lei, L., Zhou, L., Pan, F.**, (2010). Facile synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and application for lipase immobilization, *J. Biotechnol.* 150; 171-4.
- [9] **Ren, Y., Rivera, J. G., He, L., Kulkarni, H., Lee, D.K., Messersmith, P.B.**, (2011). Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating, *BMC Biotechnology*, 11:63,1-8.
- [10] **Kim, J., Kim, H., S., Lee, N., Kim, T., Kim, H., Yu, T., Song, I. C., Moon, W. K., Hyeon, T.**, (2008) Multifunctional uniform nanoparticles composed of a magnetite nanocrystal core and a mesoporous silica shell for magnetic resonance and fluorescence imaging and for drug delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, (44), 8438-8441.
- [11] **Ying, S., Yu, C., Yong, N., Guang-Ming, X., Guo-Xin, S., Jing-Tian, H.**, (2012). Surface modification of magnetite nanoparticles using gluconic acid and their application in immobilized lipase, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, 23-8.

- [12] **Park, H.J., McConnell, J.T., Boddohi, S., Kipper M.J., Johnson P.A.,** (2011). Synthesis and characterization of enzyme–magnetic nanoparticle complexes: effect of size on activity and recovery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83 198-3.
- [13] **Kanimozhi S., Perinbam K.,** (2013). Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and its application in immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* Lp1, *Materials Research Bulletin* 48;1830–1836.
- [14] **Sulek, F., Drofenik, M., Habulin, M., Knez, Z.,** (2010). Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesteroloxidase, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 322, 179-185.
- [15] **Shakeel, A.A., Qayyum, H.,** (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review, *Biotechnology Advances*, 30, 512-23.
- [16] **Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K.,** (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity, *Biointerphases* vol. 2, issue 4 pages MR17 - MR172.
- [17] <http://www.mvt.ovgu.de/mvt_media/Vorlesungen/VO_ENAP/Folien_EN AP_1.pdf> alındığı tarih 17.12.2014.
- [18] **Rangasamy, M.,** (2011). Nano Technology: A Review *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01 (02); 08-16.
- [19] **Faraji, A.H., Wipf, P.,** (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 2950–2962.
- [20] **Ito,A., Shinkai,M., Honda,H.,1 ve Kobayashi,T.** (2005). Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 1–11.
- [22] **Zhu, Y., Stubbs, L.P., Ho, F., Liu R., Ship C.P., Maguire J.A., Hosmane N.S.,** (2010). Magnetic Nanocomposites: A New Perspective in Catalysis, *ChemCatChem*, 2, 365-74.
- [23] **Nidumolu, B.S.G.R.,** (2005). A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College In partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Biological and Agricultural Engineering, 72 pages.
- [24] **Teja, A.S., Koh P.Y.,** (2009). Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 55 22-45.
- [21] **Ramimoghadam, D., Bagheri, S., Hamid, S.B.A.,** (2014). Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 368 207–229.
- [25] **Wu, W., He, Q., Jiang, C.,** (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies, *Nanoscale Res Lett* 3; 397–415.
- [26] **Xu, J., Sun, J., Wang, Y., Sheng, J., Wang, F., Sun, M.,** (2014). Application of Iron Magnetic Nanoparticles in Protein Immobilization, *Molecules*, 19, 11465-11486.

- [27] **Horikoshi, S., Serpone, N.**, (2013). *Microwaves in Nanoparticle Synthesis, Introduction to Nanoparticles, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, 340 pages.
- [28] **Bakhshayesh, S., Dehghani, H.**, (2013). Synthesis of magnetite-porphyrin nanocomposite and its application as a novel magnetic adsorbent for removing heavy cations, *Materials Research Bulletin* 48, 2614–2624.
- [29] **Feng, B., Hong, R.Y., Wang, L.S., Guo, L., Li, H.Z., Ding, J., Zheng, Y ve Wei, D.G.** (2008). Synthesis of Fe₃O₄/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging, *Colloids and Surfaces A: Physicochem*, 328,52–59.
- [30] **Zayed, A., Badruddoza, Md.**, (2011). *Beta-Cyclodextrin Conjugated Magnetic Nanoparticles For Bio- And Environmental Applications, Thesis Submitted For The Degree Of Doctor Of Philosophy Department Of Chemical & Biomolecular Engineering National University Of Singapore, 271 Pages, Singapore.*
- [31] **S. Sun, H. Zeng, J. Am.**, (2002). Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles, *Chem. Soc.* 124, 8204 .
- [32] **Rockenberger, J., Scher, E.C., Alivisatos, P.A., Am J.**, (1999). A New Nonhydrolytic Single-Precursor Approach to Surfactant-Capped Nanocrystals of Transition Metal Oxides, *Chem. Soc.*121, 11595.
- [33] **Singh, M., Ulbrich, P., Prokopec, V., Svoboda, P., Santava, E., Stepanek, F.**, (2013). Vapour phase approach for iron oxide nanoparticle synthesis from solid precursors, *Journal of Solid State Chemistry*, 200,150–156.
- [34] **Kim, E.H., Lee, H.S., Kwak, B.K., Kim, B.K.** (2005). Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent, 289,328–330.
- [35] **Kim, D.K., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K.V., Muhammed, M.** (2001). Synthesis and characterization of surfactant coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles, 225, 30–36.
- [36] **Sen, T., Bruce, I. J.**, (2012). Surface engineering of nanoparticles in suspension for particle based bio-sensing, 3, 2-564.
- [37] **Güner, B.** (2014). Manyetik Rezonans Görüntülemeye Kontrast Ajanı Taşıyıcı Platformu Olarak Süperparamanyetik Demir Oksit Nanopartikül (Spion) Sentezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 88 sayfa.
- [38] **İşbakan, N.**, (2006). Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Enantiyomerik Safılıkta 1-Fenil-1-Propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 107 Sayfa.
- [39] **Sharmaa R., Chisti Y., Banerjee U.C.**, (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances* 19; 627–662.
- [40] **Sanchez, A., Ferrer, P., Serrano, A., Valero, F., Sola C., Pernas M., Rua, M.L., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., Casa, R.M., Sinisterra, J.V., Sanchez-Montero, J.M.**, (1999). A controlled

- fed-batch cultivation for the production of new crude lipases from *Candida rugosa* with improved properties in fine chemistry, *Journal of Biotechnology* 69 169–182.
- [41] **Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E. and Miller, R.** (2008). Lipases at Interfaces: A Review, 237-250.
- [42] **Bhardwaj, K., Raju, A., Rajasekharan, R.**, (2001). Identification, Purification, and Characterization of a Thermally Stable Lipase from Rice Bran. A New Member of the (Phospho) Lipase Family, 127, 1728-1738.
- [43] **Dinçyürek, D.**, (2011). Süperkritik CO₂ İle Ön İşlem Görmüş *Candida rugosa* ve *Candida antarctica* Lipaz Enzimlerinin Çapraz Bağlı Enzim Agregatları, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 91 Sayfa.
- [44] **Mala, J.G.S., Takeuchi, S.**, (2008). Understanding Structural Features of Microbial Lipases—An Overview, *Analytical Chemistry Insights* 3, 9–19.
- [45] **Otero, C., Fernández-Pérez, M., Pérez-Gil, J.**, (2005). Effects of interactions with micellar interfaces on the activity and structure of different lipolytic isoenzymes from *Candida rugosa*, *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 695–703.
- [46] **Salgın, S.**, (2013). Tepkime Ortamından Manyetik Olarak Ayrılabilen Biyoaktif Demir Nanopartikül Sentezi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Proje No: 113Z170, Sivas.
- [47] **Cao L., van Langen L., Sheldon R.A.**, (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free, *Current Opinion in Biotechnology*, 14;387–394.
- [48] **Sen, T., Magdassi, S., Nizri, G., Bruce, I.J.**, (2006). Dispersion of magnetic nanoparticles in suspension, *Micro & Nano Letters*, Volume 1, Issue 1.
- [49] **Goto, H., Ogawa, H., Isobe, T., Kawasaki, M., Kometani, T.** (2003). 2-Propanol Treatment of *Candida rugosa* lipase and its Hydrolytic Activity, *J. of Molecular Catalysis: B Enzyme*, 24-25, 67-73.
- [50] **Salgın, U., Çalmlı, A., Yıldız, N., Salgın, S., Sarı, M.** (2007). Süperkritik CO₂ Ortamında Lipaz Enzimlerinin Kararlılığı ve Yapısal Bozunmasının İncelenmesi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Proje No: 104M388 Aralık, Sivas.
- [51] **Bahadır, S.**, (2012). Ligand Destekli Ultrafiltrasyon ile Rasemik Aminoasit Karışımlarının Ayrılması, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 75 Sayfa.
- [52] **Maity, D., Agrawal, D.C.**, (2007). Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 308, 46–55.
- [53] **Mascolo, M.C., Pei, Y., Ring, T.A.**, (2013). Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases, *Materials*, 6, 5549-5567.
- [54] **Mandel, K., Hutter, F., Gellermann, C., Sextl, G.**, (2011). Synthesis and stabilisation of superparamagnetic iron oxide nanoparticle

Dispersions, Colloids and Surfaces A: *Physicochem. Eng. Aspects* 390, 173–178.

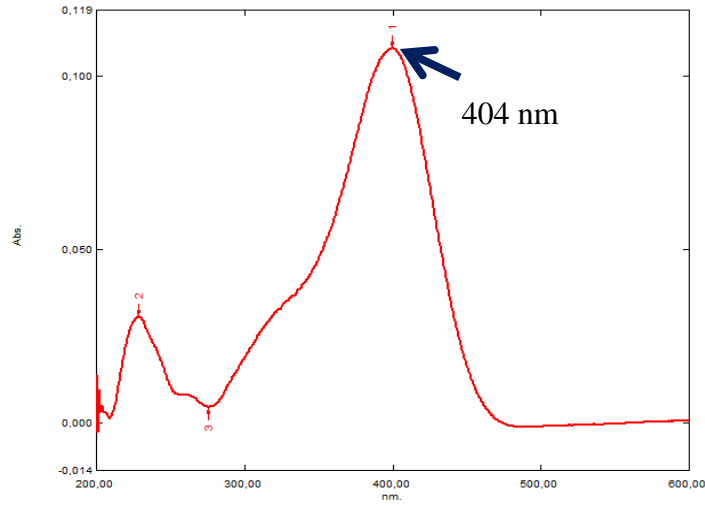
- [55] **Bloemen, M., Brullot, W., Luong, T.T., Geukens, N., Gils, A., Verbiest, T.** (2012). Improved functionalization of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *J Nanopart. Res.* 14 1100-1115.
- [56] **Yang, K., Peng, H., Wen, Y., Li, N.,** (2010) Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles, *Applied Surface Science* 256, 3093–3097.
- [57] **Rahman, M. M., Khan, S. B., Jamal, A., Faisal, M., Aisiri, A. M.,** (2011). Iron Oxide Nanoparticles, Nanomaterials, Prof. Dr Mohammed Rahman (Ed.), ISBN: 978-953-307-913-4.
- [58] **Badruddoza, M., Zayed, A., Tay, A.S.H., Tan, P.Y., Hidajat, K., Uddin, M.S.,** (2011). Carboxymethyl-cyclodextrin conjugated magnetic nanoparticles as nano-adsorbents for removal of copper ions: Synthesis and adsorption studies 185, 1177–1186.
- [59] **Shen, L., Qiao, Y., Guo, Y., Tan J.,** (2013), Preparation and formation mechanism of nano-iron oxide black pigment from blast furnace flue dust, *Ceramics International* 39,737–744.
- [60] **Williams, D.N.,** (2004). Surface-modified magnetic nanoparticles for cellular interactions and improved biological applications, Department of Chemical Engineering, 101 pages, Maryland.
- [61] **Yamaura, M., Camilo, R.L., Sampaio, L.C., Maced, M.A., Nakamura, M., Toma H.E.,** (2004) Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 279;210–217, Brazil.
- [62] **Marinin, A.,** (2012). Division of Functional Materials School of Information and Communication Technology Royal Institute of Technology, Synthesis and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with silica, 50 pages.
- [63] **Digigow, R. G., Dechézelles, J. F., Dietsch, H., Geissbühler I., Vanhecke, D., Geers C., Hirt A.M., Rothen-Rutishauser, B., Petri-Fink, A.,** (2014). Preparation and Characterization of Functional Silica Hybrid Magnetic Nanoparticles, 76 pages.
- [64] **Yu, J.C., Jiang, Z.T., Liu, H.Y., Yu, J. ve Zhang, L.**(2003). β-Cyclodextrin epichlorohydrin copolymer as a solid-phase extraction adsorbent for aromatic compounds in water samples, *Analytica Chimica Acta* 477, 93–101.
- [65] **Xub, L., Kim, M.J., Kim, K.D., Choa, Y.H. ve Kim, H.E.** (2009). Surface modified Fe₃O₄ nanoparticles as a protein delivery vehicle, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 350, 8–12.
- [66] **Salgın, S., Takaç, S., Özdamar, T.H.,** (2006). Adsorption of bovine serum albumin on polyether sulfone ultrafiltration membranes: determination of interfacial interaction energy and effective diffusion coefficient, *Journal of Membrane Science*, 278;251–260.

- [67] **Yong, Y., Bai, Y.X., Li, Y.F., Lin, L., Xia C.G.,** (2008). Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity, *Process Biochemistry* 43,1179–1185.
- [68] **Califano, V., Bloisi, F., Aronne, A., Federici, S., Nasti, L., Depero, L.E., Vicari, L.R.M.,** (2014). Biosensor Applications of MAPLE Deposited Lipase, *Biosensors*, 4, 329-339.
- [69] **Bordbar, A.K., Rastegari, A.A., Amiri, R., Ranjbakhsh, E., Abbasi, M., Khosropour, A.R.,** (2014). Characterization of Modified Magnetite Nanoparticles for Albumin Immobilization, *Hindawi Publishing Corporation Biotechnology Research International* Article ID 705068, 6 pages.
- [70] **Xu, D.Y., Yang, Y., Yang, Z.,** (2011). Activity and stability of cross-linked tyrosinase aggregates in aqueous and nonaqueous media, *Journal of Biotechnology* 152, 30–36.
- [71] **Ahmadi, M.K.,** (2013). Manouchehr Vossoughi, Immobilization of α -Chymotrypsin on the Surface of Magnetic/Gold Core/Shell Nanoparticles, *Journal of Nanotechnology*, *Journal of Nanotechnology Volume*, Article ID 830151, 7 pages.
- [72] **Sui, Y., Cui, Y., Nie, Y., Xia, G.M., Sun, G.Xi., Han, J.T.,** (2012). Surface modification of magnetite nanoparticles using gluconic acid and their application in immobilized lipase, 26-27.
- [73] **Hassani, T., Ba, S., Cabana, H.,** (2013). Formation of enzyme polymer engineered structure for laccase and cross-linked laccase aggregates stabilization, *Bioresource Technology* 128;640–645.

EKLER

EK-1 *p*-NP Spektrum Taraması

0.1 M ve pH=7.5 koşullarındaki Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon sisteminde hazırlanan *p*-NP'ün UV-vis spektrofotometreden elde edilen spektrumu Şekil E1'de gösterilmiştir. Spektrum taramasında da görüldüğü gibi spektrofotometrik çalışmalar için en uygun dalga boyu değeri *p*-NP için 404 nm olarak saptanmıştır.



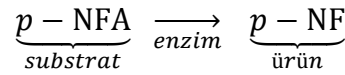
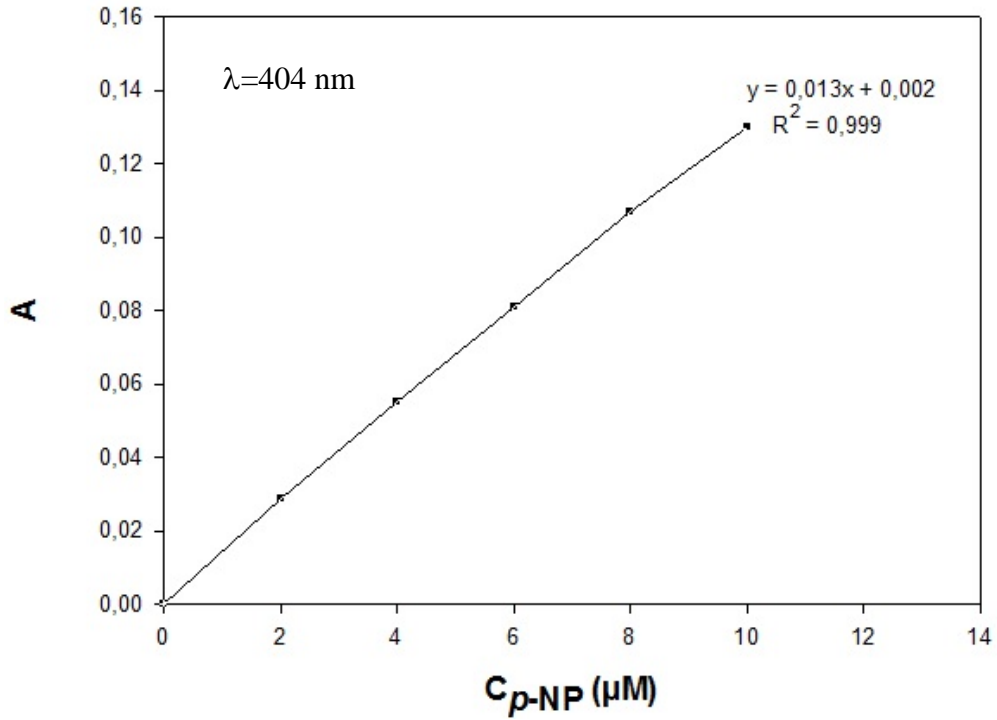
Şekil E1 *p*-Nitrofenol'ün spektrum taraması

EK-2 *p*-NP için Kalibrasyon Doğrusu

Çizelge E1'de *p*-NP'ün 0.1 M ve pH=7.5 koşullarındaki Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tamponunda farklı derişimlerinde hazırlanan çözeltilerinin 25 °C sıcaklıkta ve $\lambda=404$ nm dalga boyunda UV-vis spektrofotometrede okunan absorbans değerleri sunulmuştur. Çizelge E1'deki verilerin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen *p*-NP'ün kalibrasyon doğrusu Şekil E2'de gösterilmiş olup R² değeri ~1 olarak belirlenmiştir.

Çizelge E1 *p*-Nitrofenol derişimlerinde ölçülen absorbans değerleri

<i>p</i> -NP derişimi (μ M)	2	4	6	8	10
Absorbans	0.029	0.055	0.081	0.107	0.130



Şekil E2 *p*-NP için kalibrasyon doğrusu.

EK–3 Enzim Hidrolitik Aktivitesinin Hesaplanması

Seyreltik sistemlerde absorbands ile derişim arasındaki ilişki Lambert–Beer yasası ile tanımlanır (Denklem E1).

$$A = \varepsilon b C \quad (E1)$$

Burada;

- A : Absorbansı
- ε : Molar absorptivite katsayısı
- b : Işığın çözelti içinde aldığı yol
- C : Çözelti derişimi

Denklem (E1)'in her iki tarafı herhangi bir bağımlı değişkene göre türevi alınırsa Denklem (E2) elde edilir.

$$dA = d(\varepsilon b C) \quad (E2)$$

ε ve b birer sabit olduğundan türev dışına çıkartılır ve düzenlenirse Denklem (E3) elde edilir.

$$dA = \varepsilon b dC \quad (E3)$$

Lambert–Beer yasası, derişim ile absorbands ilişkisinin doğrusal olduğu durum için tanımlanmış bir yasadır. Bu durumda bir adi türevli diferansiyel denklem Δ şeklinde farklarla ifade edilebilir (Denklem E4).

$$\Delta A = \varepsilon b \Delta C \quad (E4)$$

Şekil E2'de gösterilen kalibrasyon doğrusu lineer bir değişim göstermektedir. Bu değişimin eğimi Denklem (E4)'de verilen ϵb değerinin kolaylıkla Denklem (E5) yardımıyla bulunmasını sağlar.

$$\text{Eğim} = \frac{\Delta A}{\Delta C} = \epsilon b \quad (\text{E5})$$

Şekil E2'de sunulan *p*-NP derişime karşı absorbans değerleri-grafiğın eğimi Denklem E5 gereğince molar absorptivite katsayısı ve ışığın çözelti içindeki aldığı yolun çarpımına eşittir (Denklem E6).

$$\epsilon b = 0.013 \mu\text{M}^{-1} \quad (\text{E6})$$

Burada; $b=1$ cm olduğuna göre $\epsilon = 0.013 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bulunur.

CLEA ve manyetik CLEA ile *p*-NPA'nın hidroliz tepkimesi tepkime stokiyometrisine göre 1 μmol ürün yani *p*-NP açığa çıkması için eş molar *p*-NPA substratı gerektirmektedir. Denklem (E3)'deki türev zamana göre alınırsa Denklem (E7) elde edilir;

$$\frac{dA}{dt} = \epsilon b \frac{dC}{dt} \quad (\text{E7})$$

Derişimin zamanla değişimi oluşan ürün için de aynı zamanda tanımlanabilir (Denklem E8) ve bu derişim lineer bir ilişkinin söz konusu olduğu bölge için yazılırsa bu durumda Denklem (E9) elde edilir.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{1}{\epsilon b} \frac{dA}{dt} \quad (\text{E8})$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{1}{\epsilon b} \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (\text{E9})$$

Denklem (E9)'daki matematiksel ifade, bölüm 3.5.1'de verilen hidrolitik aktivitenin tanımına göre aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir.

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{1}{(0.013 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}) (1 \text{ cm})} \frac{\Delta A}{(60) \text{ saniye}} \quad (\text{E10})$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = 1.282 \frac{\mu\text{M}}{\text{saniye}} \Delta A \quad (\text{E11})$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = 1.282 \frac{\mu\text{M}}{\text{saniye}} \frac{60 \text{ saniye}}{1 \text{ dakika}} \frac{\mu\text{mol/L}}{1 \mu\text{M}} \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \frac{25 \text{ mL}}{1 \text{ mg enzim}} \frac{1000 \text{ mg CLEA}}{1 \text{ g CLEA}} \Delta A \quad (\text{E12})$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} \cong 1923 \frac{(\mu\text{mol})}{(\text{g CLEA}) (\text{dakika})} \Delta A \quad (\text{E13})$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = U = 1923 \frac{(\mu\text{mol substrat})}{(\text{g CLEA}) (\text{dakika})} \Delta A \quad (\text{E14})$$

Enzimin hidrolitik aktivitesinin belirlenmesine ilişkin örnek bir hesaplama; 35 °C ve pH 7.5 koşullarında manyetik CLEA enziminden yola çıkarak *p*-NPA'nın enzimatik hidroliz tepkimesi sonunda açığa çıkan ürün *p*-NP'ün çözelti içindeki üretim hızı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kinetik modda gerçekleştirilen absorbans ölçümlerinin 2-3 ve 3-4 dakikaları arasında oluşan ürünün absorbans değerleri farklarının aritmetik ortalamalarından yararlanılarak hesaplanmıştır. Bu dakikalar aktivitenin en düzgün artan noktaları olduğundan seçilmiştir. 2, 3 ve 4 noktalarında absorbans değerleri sırasıyla; 0.179, 0.235 ve 0.301 olarak saptanmıştır. Elde edilen deneysel bulgular ışığında enzimin hidrolitik aktivitesi Denklem (E14)'den yararlanarak aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

$$\Delta A_{2,3} = 0.235 - 0.179 = 0.056$$

$$\Delta A_{3,4} = 0.301 - 0.235 = 0.066$$

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{3,4} + \Delta A_{2,3}}{2} = \frac{0.066 + 0.056}{2} = 0.061$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = U = 1923 \frac{(\mu\text{mol substrat})}{(\text{g CLEA}) (\text{dakika})} \times 0.061$$

$$U = 117.303 \frac{(\mu\text{mol substrat})}{(\text{g CLEA}) (\text{dakika})}$$

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Emre AKKUŞ
Doğum yeri ve Tarihi : Samsun,12.01.1990
Yabancı Dil : İngilizce
İletişim Adresi : Selahiye Mahallesi Şehit Polis Ali Yıldırım Sokak
No: 3/2 İlkadım/SAMSUN
E-Posta Adresi : e.akkus8@gmail.com



EĞİTİM VE AKADEMİK DURUMU

Lise : 100.Yıl Süper Lisesi
Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi,2012
Yüksek Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi,2015

Yüksek Lisans Tezi:

Manyetik Nanopartiküller ve Çapraz Bağlı Lipaz Agregatları Kullanılarak Yeni Bir Biyokatalizör Geliştirilmesi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Yüksek Lisans Tezi. 2015, 72 sayfa

Kongreler ve Bildiriler

Ulusal **Emre Akkuş**, Burak Güner, Uğur Salgın, Sema Salgın, Birlikte Çöktürme Yöntemi ile Manyetik Demir Nanopartikül Sentezinde Baz Türü Etkisi, 11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Osman Gazi Üniversitesi, 2-5 Eylül 2014, Eskişehir.
Burak Güner, **Emre Akkuş**, Uğur Salgın, Sema Salgın, Manyetik Fe₃O₄ Nanotanelerin Topaklaşmasının Önlenmesi için Uygun Dağıtıcı Seçimi, 11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Osman Gazi Üniversitesi, 2-5 Eylül 2014, Eskişehir.

Proje Deneyimi:

<i>Proje Yürütücüsü</i>	<i>Destekleyen Kurum</i>	<i>Projedeki Görevi</i>
Prof.Dr. Sema SALGIN	TÜBİTAK 113Z170 Synthesis of bioactive iron nanoparticle with magnetically seperable from reaction medium <i>MPNS COST Action MP1201: Nanoscale Superconductivity: Novel Functionalities through Optimized Confinement of Condensate and Fields (NanoSC-COST)</i>	Bursiyer 01.03.2014- 01.10.2014
Prof.Dr. Sema SALGIN	TÜBİTAK 113M047 Ultrafiltrasyon Membranların Zeta Potansiyelleri Üzerine Membran Yüzey İletkenliğinin Etkisi	Bursiyer 15.04.2013- 15.12.2013
Prof.Dr. Sema SALGIN	CÜBAP M-518 Manyetik Nanopartiküller ve Çapraz Bağlı Lipaz Agregatları Kullanılarak Yeni Bir Biyokatalizör Geliştirilmesi	Araştırmacı