

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİFENOLLERLE FONKSİYONELLEŞTİRİLMİŞ  
Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NANOPARTİKÜLLERİNE TRİPSİN  
İMMOBİLİZASYONU VE SİNDİRİM UYGULAMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Keziban ATACAN**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mahmut ÖZACAR**

**Temmuz 2016**

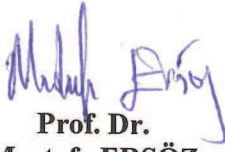
T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

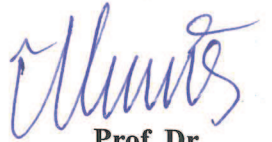
POLİFENOLLERLE FONKSİYONELLEŞTİRİLMİŞ  
Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NANOPARTİKÜLLERİNE TRİPSİN  
İMMOBİLİZASYONU VE SİNDİRİM UYGULAMASI


DOKTORA TEZİ  
Keziban ATACAN

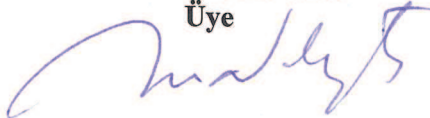
Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA


Bu tez 25 / 07 / 2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr.  
Mustafa ERSÖZ  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr.  
Mahmut ÖZACAR  
Üye

  
Prof. Dr.  
Ahmet ALP  
Üye

Doç. Dr.  
Mehmet NEBİOĞLU  
Üye  


Yrd. Doç. Dr.  
Serpil EDEBALI  
Üye  


## **BEYAN**

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Keziban ATACAN  
24.06.2016

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgisi ve deneyimi ile sürekli yanımda olan ve desteğini esirgemeyen, sorularıma her zaman cevap bulabilmeme yardımcı olan, beni teşvik eden ve aynı titizlikte yönlendiren danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Mahmut ÖZACAR'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince tezimi izleyerek fikirlerini paylaşan ve beraber tartışma ortamı oluşturan değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet ALP ve Doç. Dr. Mehmet NEBİOĞLU'na saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarından dolayı Arş. Gör. Bekir ÇAKIROĞLU, Arş. Gör. Nuray GÜY ve Uzman Soner ÇAKAR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Öğrenim hayatım boyunca benim yetişmemde emeği geçen tüm öğretmenlerim ve hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığı'na (Proje No: 2015-50-02-014) teşekkür ederim.

Her zaman büyük desteğini gördüğüm ve başarılarımı borçlu olduğum beni sevgiyle büyüten annem Havva CAN ve babam Fazlı CAN'a, doktora'yı bitireceğime yürekten inanan Abim'e, Ablam'a ve kardeşim'e teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana her zaman moral veren, destekçim ve yol arkadaşım sevgili eşim Ekrem ATACAN'a, çalışmalarımın birlikte büyüyen ve bana her zaman anlayış gösteren canım yavrum, oğlum Emir Akif ATACAN'a teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xi
TABLOLAR LİSTESİ .....	xv
ÖZET .....	xvi
SUMMARY .....	xvii

## BÖLÜM 1.

GİRİŞ .....	1
-------------	---

## BÖLÜM 2.

METAL OKSİTLER VE MANYETİK NANOPARTİKÜLLER .....	3
2.1. Nano Boyutlu Demir Esaslı Malzemeler .....	3
2.2. Nano Boyutta Demirin Manyetik Özellikleri .....	4
2.3. Nano Boyutlu Demir-Esaslı Malzemelerin Eldesi .....	5
2.3.1. Fiziksel elde etme yöntemleri .....	5
2.3.1.1. İnert gaz yoğunlaşması yöntemi .....	5
2.3.1.2. Şiddetli plastik şekil değişimi yöntemi .....	5
2.3.1.3. Yüksek enerjili bilyeyle öğütme yöntemi .....	5
2.3.1.4. Ses ötesi atışla dövme yöntemi .....	6
2.3.2. Kimyasal elde etme yöntemleri .....	6
2.3.2.1. Ters misel yöntemi .....	6
2.3.2.2. Kontrollü kimyasal çöktürme yöntemi .....	7
2.3.2.3. Kimyasal buhar yoğunlaşması yöntemi .....	7
2.3.2.4. Elektronik darbeyele çöktürme yöntemi .....	8

2.3.2.5. Sıvı alev püskürtme yöntemi .....	8
2.3.2.6. Sıvı fazda indirgeme yöntemi .....	8
2.3.2.7. Gaz fazda indirgeme yöntemi .....	9
2.4. Manyetik Nanopartiküller .....	9
2.5. Demir Oksitler .....	10
2.6. Manyetit Kararlılığı .....	10
2.7. Histerisiz Eğrisi .....	11
<b>BÖLÜM 3.</b>	
<b>ENZİMLER VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU .....</b>	<b>13</b>
3.1. Enzimler ve Enzimlerin Yapısı .....	14
3.2. Enzimlerin Sınıflandırılması .....	16
3.3. Enzim İmmobilizasyonu .....	17
3.3.1. İmmobilizasyon metotları .....	19
3.3.1.1. Kovalent bağlanma .....	19
3.3.1.2. Fiziksel adsorpsiyon .....	20
3.3.1.3. İyonik bağlanma .....	20
3.3.1.4. Çapraz bağlanma .....	21
3.3.1.5. Tutuklama yöntemi .....	21
3.4. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi ve Aktiviteyi Etkileyen Faktörler ....	22
3.5. Enzim Kinetiği .....	24
3.6. Tripsin Enzimi ve Uygulamaları .....	28
<b>BÖLÜM 4.</b>	
<b>MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>31</b>
4.1. Materyal .....	31
4.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....	31
4.2. Yöntem .....	31
4.2.1. Kullanılan cihazlar .....	31
4.2.2. Kullanılan çözeltiler .....	32
4.2.2.1. Asetat tampon çözelti hazırlanması .....	32
4.2.2.2. Fosfat tampon çözelti hazırlanması .....	33

4.2.2.3. Tris-HCl tampon çözelti hazırlanması .....	34
4.2.2.4. Bikarbonat tampon çözelti hazırlanması .....	34
4.2.2.5. %0,9 luk NaCl çözeltisinin hazırlanması .....	35
4.2.2.6. 1 mM HCl çözeltisinin hazırlanması .....	35
4.2.2.7. %0,1 lik BApNA çözeltisinin hazırlanması .....	35
4.2.2.8. 0,1 M $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ (pH=8) çözeltisinin hazırlanması ...	35
4.2.2.9. Elektroforez çalışması için yürütme tampon çözeltisinin hazırlanması .....	35
4.2.2.10. Elektroforez çalışması için yükleme tampon çözeltisinin hazırlanması .....	35
4.2.2.11. Elektroforez çalışması için fiksasyon çözeltisinin hazırlanması .....	36
4.2.2.12. Elektroforez çalışması için boya çözeltisinin hazırlanması .....	36
4.2.2.13. Elektroforez çalışması için boya çıkarma çözeltisinin hazırlanması .....	36
4.3. Tripsin Aktivite Tayini .....	36
4.3.1. Serbest tripsin aktivite tayini .....	37
4.3.2. İmmobilize tripsin aktivite tayini .....	38
4.4. Protein Tayini (Bradford Metodu) .....	38
4.5. $\text{Fe}_3\text{O}_4$ Sentezi .....	40
4.5.1. Kimyasal çöktürme yöntemi ile $\text{Fe}_3\text{O}_4$ sentezi .....	40
4.5.2. Solvotermal yöntem ile $\text{Fe}_3\text{O}_4$ sentezi .....	41
4.6. $\text{Fe}_3\text{O}_4$ Nanopartiküllerin Organik Maddelerle Fonksiyonelleştirilmesi .....	41
4.6.1. $\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanopartikülleri üzerine tannik asit ile fonksiyonelleştirilmesi .....	42
4.6.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanopartikülleri üzerine gallik asit ile fonksiyonelleştirilmesi .....	42
4.6.3. $\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanopartikülleri üzerine tanin ile fonksiyonelleştirilmesi .....	42
4.7. Tripsin İmmobilizasyonu .....	43

4.7.1. Tannik asit ile fonksiyonelleştirilmiş $Fe_3O_4$ nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu .....	43
4.7.2. Gallik asit ile fonksiyonelleştirilmiş $Fe_3O_4$ nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu .....	44
4.7.3. Tanin ile fonksiyonelleştirilmiş $Fe_3O_4$ nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu .....	45
4.8. Tripsin İmmobilizasyonundan Sonra Karakterizasyon .....	46
4.8.1. Tripsin enzimi aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi .....	47
4.8.2. Tripsin enzimi aktivitesi üzerine pH etkisi .....	47
4.8.3. Tripsin enzimi aktivitesi üzerine substrat (BapNA) konsantrasyonu etkisi .....	48
4.8.4. Tripsin enzimi aktivitesi üzerine depo kararlılığı .....	48
4.8.5. Tripsin enzimi aktivitesi üzerine termal kararlılık .....	49
4.8.6. İmmobilize tripsinin tekrar kullanılabilirliği .....	49
4.9. Serbest Tripsin ve İmmobilize Tripsin Maddelerinin Protein Hidrolizleri .....	50
4.9.1. Serbest tripsinin BSA proteini hidrolizi .....	50
4.9.2. İmmobilize tripsinin BSA proteini hidrolizi .....	50
4.9.3. Serbest tripsinin kazein proteini hidrolizi .....	51
4.9.4. İmmobilize tripsinin kazein proteini hidrolizi .....	51
4.10. Protein Hidrolizi için LC-MS/MS Çalışmaları .....	51
4.11. Protein Hidrolizi için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Çalışmaları .....	52
4.11.1. SDS-PAGE jel kasetinin hazırlanması .....	52
4.11.2. SDS-PAGE alt jel ve üst jel çözeltilerinin yerleşimi .....	52
4.11.3. SDS-PAGE oluşan jellerin yerleşimi ve numunelerin yüklenmesi .....	54

## BÖLÜM 5.

DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	56
5.1. $Fe_3O_4$ Nanopartiküllerinin XRD ile Karakterizasyonu .....	56



5.2. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Tannik asit-Tripsin İmmobilizasyonu İçin Karakterizasyon Çalışmaları .....	57
5.2.1. Termal analiz çalışmaları .....	57
5.2.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi çalışmaları .....	59
5.2.3. Taramalı elektron mikroskobu çalışmaları .....	60
5.2.4. Titreşen örnek magnetometresi çalışmaları .....	61
5.2.5. Zeta potansiyeli analiz çalışmaları .....	63
5.2.6. pH kararlılığı çalışmaları .....	66
5.2.7. Sıcaklık kararlılığı çalışmaları .....	69
5.2.8. Substrat (BapNA) konsantrasyonu çalışmaları .....	70
5.2.9. Depo kararlılığı çalışmaları .....	72
5.2.10. Termal kararlılık çalışmaları .....	73
5.2.11. Tekrarlanabilirlik çalışması. ....	74
5.3. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Tannik Asit-Tripsin İmmobilizasyonu İçin LC-MS/MS Çalışmaları .....	76
5.3.1. Kazein proteini hidrolizinden sonra LC-MS/MS çalışmaları ...	76
5.3.2. BSA proteini hidrolizinden sonra LC-MS/MS çalışmaları .....	78
5.4. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Gallik Asit-Tripsin İmmobilizasyonu İçin Karakterizasyon ...	80
5.4.1. Termal analiz çalışmaları .....	80
5.4.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi çalışmaları .....	81
5.4.3. Taramalı elektron mikroskobu çalışmaları .....	82
5.4.4. Titreşen örnek magnetometresi çalışmaları .....	84
5.4.5. Zeta potansiyeli analiz çalışmaları .....	85
5.4.6. pH kararlılığı çalışmaları .....	86
5.4.7. Sıcaklık kararlılığı çalışmaları .....	87
5.4.8. Substrat (BapNA) konsantrasyonu çalışmaları .....	88
5.4.9. Depo kararlılığı çalışmaları .....	90
5.4.10. Termal kararlılık çalışmaları .....	91
5.4.11. Tekrarlanabilirlik çalışması .....	91
5.5. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Gallik Asit-Tripsin İmmobilizasyonu İçin LC-MS/MS Çalışmaları .....	93
5.5.1. Kazein proteini hidrolizinden sonra LC-MS/MS çalışmaları ...	93

5.5.2. BSA proteini hidrolizinden sonra LC-MS/MS çalışmaları .....	93
5.6. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Tanin-Tripsin İmmobilizasyonu İçin Karakterizasyon .....	95
5.6.1. Termal analiz çalışmaları .....	95
5.6.2. Taramalı elektron mikroskobu çalışmaları .....	96
5.6.3. Enerji dağılım spektroskopisi çalışmaları .....	96
5.6.4. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi çalışmaları .....	98
5.6.5. Titreşen örnek magnetometresi çalışmaları .....	99
5.7. Protein Sindirimi için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez Çalışmaları .....	100
5.7.1. BSA sindirimi için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez çalışması .....	101
5.7.2. Kazein sindirimi için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez çalışması .....	102
5.8. BSA Sindirimi için Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi Çalışmaları .....	103
BÖLÜM 6.	
GENEL DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER .....	106
KAYNAKLAR .....	109
ÖZGEÇMİŞ .....	126

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Å	: Angstrom
ark.	: Arkadaşları
APS	: Amonyum persülfat
BAPNA	: N $\alpha$ -Benzoil-DL-arginin 4-nitroanilit hidroklorit
BSA	: Bovin serum albumin
C	: Konsantrasyon
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dTGA	: Diferansiyel termogravimetrik analiz
EDÇ	: Elektronik darbeyle çöktürme
EDS	: Enerji dağılım spektroskopisi
EG	: Etilen glikol
e.m.k	: Elektro motor kuvveti
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	: Gram
GA	: Gallik asit
HCl	: Hidroklorik asit
IU	: International Unit (Uluslararası ünite)
İGY	: İnert gaz yoğunlaşması
K	: Kelvin
KBY	: Kimyasal buhar yoğunlaşması
kDa	: Kilo Dalton
K <sub>m</sub>	: Michaelis-Menten hız sabiti
L	: litre
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
M	: Markır (belirteç)

MALDI	: Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
MNP	: Manyetik nanopartikül
mM	: Milimolar
MPTS	: 3-(mercaptopropil) trimetoksisilan
MR	: Manyetik rezonans
MS	: Kütle spektrometresi
$\mu$ M	: Mikromolar
$\mu$ L	: Mikrolitre
NaCl	: Sodyum Klorür
nm	: Nanometre
NPs	: Nanopartiküller
PCE	: Tetrakloreten (perkloreten)
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SAP	: Sıvı alev püskürtme
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SÖAD	: Ses ötesi atışla dövme yöntemi
ŞPD	: Şiddetli plastik şekil değişimi
t	: Zaman
T	: Sıcaklık
TA	: Tannik asit
TCA	: Trikloroetan
TCE	: Trikloroeten
TEM	: Geçirgen electron mikroskobu
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGA	: Termogravimetrik analiz
Tris	: Tris(hidroksimetil)- aminometan
TOF/MS	: Uçuş zamanı kütle spektrometresi
U	: Ünite (Unit)

UV	: Ultra viyole
U/mL	: Enzim aktivite birimi (unit /mililitre)
$V_{max}$	: Maximum reaksiyon hızı
VSM	: Titreşen örnek magnetometresi
XRD	: X-ışını kırınımı

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kontrollü kimyasal çöktürme akış şeması .....	7
Şekil 2.2. Histerisiz çevrimi ve genel özellikleri .....	12
Şekil 3.1. Aktif enzim şekilleri .....	16
Şekil 3.2. Enzimlerin immobilizasyonu metodları .....	20
Şekil 3.3. Enzimlerin anahtar-kilit modeli örneği .....	23
Şekil 3.4. Enzim katalizli bir reaksiyon için substrat derişiminin ([S]) reaksiyon hızına (V) etkisi .....	27
Şekil 3.5. Substrat derişiminin (1/[S]) reaksiyon hızına (1/V) etkisinin doğrusallaştırılmış verilerle Lineweaver-Burk grafiği .....	27
Şekil 3.6. Tripsinin 2D kristal yapısı ve tripsinin primer yapısı .....	28
Şekil 4.1. BApNA nın Tripsin ile p-nitroaniline dönüşümü .....	37
Şekil 4.2. Standart p-nitroanilin C (µM) - absorbans grafiği ( $\lambda_{\max} = 410$ nm) .....	37
Şekil 4.3. Standart BSA protein miktarı C (mg/mL) - absorbans grafiği ( $\lambda_{\max} = 595$ nm) .....	40
Şekil 4.4. Tannik asit ile fonksiyonelleştirilmiş $Fe_3O_4$ nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu .....	44
Şekil 4.5. Gallik asit ile fonksiyonelleştirilmiş $Fe_3O_4$ nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu .....	45
Şekil 4.6. Tanin ile fonksiyonelleştirilmiş $Fe_3O_4$ nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu ve BSA sindirimi .....	46
Şekil 4.7. Tripsin immobilize edilmiş $Fe_3O_4$ nanopartiküllerin BSA proteinini hidrolizi .....	51
Şekil 4.8. Elektroforez için alt jel ve üst jel çözeltilerinin hazırlanıp kasetlerin arasına doldurulması .....	53
Şekil 4.9. Bio-rad marka Sodyum dodesilsülfat-Poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sistemi .....	55

Şekil 5.1. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanopartiküllerinin XRD ile karakterizasyonu .....	57
Şekil 5.2. TGA görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-TA, (c) MNP-TA-TR .....	58
Şekil 5.3. dTGA görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-TA, (c) MNP-TA-TR .....	58
Şekil 5.4. FTIR görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-TA, (c) MNP-TA-TR .....	60
Şekil 5.5. SEM görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-TA, (c) MNP-TA-TR .....	62
Şekil 5.6. VSM histerisiz eğrileri (a) MNP, (b) MNP-TA, (c) MNP-TA-TR .....	63
Şekil 5.7. Zeta potansiyelinin şematik gösterimi .....	64
Şekil 5.8. İzoelektrik noktasının ve yayılmanın kararlı olmasının beklendiği pH değerlerini gösteren tipik bir zeta potansiyeline karşı pH grafiği .....	66
Şekil 5.9. MNP-TA ve MNP-TA-TR'in zeta potansiyeline karşı pH grafiği .....	66
Şekil 5.10. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) pH kararlılığı .....	69
Şekil 5.11. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) sıcaklık kararlılığı .....	70
Şekil 5.12. Serbest ve immobilize tripsin (MNP-TA-TR) aktivitelerinin BApNA konsantrasyonununa bağımlı değişimleri .....	71
Şekil 5.13. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) Lineweaver-Burk diyagramı .....	71
Şekil 5.14. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) depo kararlılığı .....	73
Şekil 5.15. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) 45 °C de termal kararlılığı .....	74
Şekil 5.16. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) 55 °C de termal kararlılığı .....	75
Şekil 5.17. İmmobilize tripsinin (MNP-TA-TR) 0,1 M pH=7,5 fosfat tamponunda tekrarlanabilirliği .....	76
Şekil 5.18. Serbest tripsin için kazein proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi	77
Şekil 5.19. İmmobilize tripsin (MNP-TA-TR) için kazein proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi .....	78
Şekil 5.20. Serbest tripsin için BSA proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi ...	79
Şekil 5.21. İmmobilize tripsin (MNP-TA-TR) için BSA proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi .....	79
Şekil 5.22. TGA görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-GA, (c) MNP-GA-TR .....	80
Şekil 5.23. FTIR görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-GA, (c) MNP-GA-TR .....	82
Şekil 5.24. SEM görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-GA, (c) MNP-GA-TR .....	83

Şekil 5.25. VSM histerisiz eğrileri (a) MNP, (b) MNP-GA, (c) MNP-GA-TR .....	84
Şekil 5.26. MNP-GA ve MNP-GA-TR'in zeta potansiyeline karşı pH grafiği .....	85
Şekil 5.27. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) pH kararlılığı .....	86
Şekil 5.28. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) sıcaklık kararlılığı .....	87
Şekil 5.29. Serbest ve immobilize tripsin (MNP-GA-TR) aktivitelerinin BApNA konsantrasyonuna bağımlı değişimleri .....	88
Şekil 5.30. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) Lineweaver-Burk diyagramı .....	89
Şekil 5.31. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) depo kararlılığı .....	90
Şekil 5.32. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) 45 °C de termal kararlılığı .....	91
Şekil 5.33. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) 55 °C de termal kararlılığı .....	92
Şekil 5.34. İmmobilize tripsinin (MNP-GA-TR) 0,1 M pH=7,5 fosfat tamponunda tekrarlanabilirliği .....	92
Şekil 5.35. İmmobilize tripsin (MNP-GA-TR) için kazein proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi .....	93
Şekil 5.36. İmmobilize tripsin (MNP-GA-TR) için BSA proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi .....	94
Şekil 5.37. TGA görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-T, (c) MNP-T-TR .....	95
Şekil 5.38. SEM görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-T, (c) MNP-T-TR .....	97
Şekil 5.39. EDS görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-T, (c) MNP-T-TR .....	98
Şekil 5.40. FTIR görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-T, (c) MNP-T-TR .....	99
Şekil 5.41. VSM histerisiz eğrileri (a) MNP, (b) MNP-T, (c) MNP-T-TR .....	100
Şekil 5.42. SDS-PAGE elektroferogramları marker (1), BSA (2 ve 6), ve immobilize tripsin tarafından sindirilen BSA'nın oluşan peptitleri 10 dk (3), 20 dk (4), ve 30 dk (5) (M: Markır, BSA: Bovine serum albumin) .....	101
Şekil 5.43. SDS-PAGE elektroferogramları marker (1), kazein (2 ve 6) ve immobilize tripsin tarafından sindirilen kazein'in oluşan peptitleri 10 dk (3), 20 dk (4), ve 30 dk (5) (M: Markır) .....	102



Şekil 5.44. Serbest tripsin (a) ve immobilize tripsin tarafından sindirilen BSA proteininin (b) 1 dk, (c) 5 dk ve (d) 15 dk için MALDI-TOF MS spektrumları .....|04

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri .....	10
Tablo 4.1. Serbest tripsin aktivite ölçüm protokolü .....	38
Tablo 4.2. İmmobilize tripsin aktivite ölçüm protokolü .....	39
Tablo 5.1. İmmobilize tripsinin (MNP-TA-TR) immobilizasyon verimi, optimum sıcaklık ve pH ının farklı çalışmalarla karşılaştırılması .....	68
Tablo 5.2. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) kinetik sabitleri .....	72
Tablo 5.3. Serbest ve immobilize tripsin (MNP-GA-TR) için $K_m$ ve $V_{max}$ kinetik parametrelerinin farklı çalışmalarla karşılaştırılması .....	89
Tablo 5.4. EDS analizlerinin elementel bileşim yüzdeleri .....	98

## ÖZET

Anahtar kelimeler: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküller, Tannik asit, Gallik asit, Tripsin, BSA, kazein.

Bu çalışmada, demir oksit manyetik nanopartikülleri sentezlenerek polifenoller ile fonksiyonelleştirilmesi ve tripsin enziminin immobilizasyonu ve proteinleri sindirimi incelenerek bundan sonra yapılacak çalışmalara da öncülük etmesi hedeflenmiştir. Çalışma üç ayrı kısım halinde yürütülmüştür.

İlk kısımda, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküller, çöktürme yöntemi ile sentezlenmiş olup sentezlenen nanopartiküller tannik asit ile fonksiyonelleştirilmiştir. Modifiye nanopartikül üzerine tripsin enzimi immobilize edilmiştir. Immobilize tripsin ve serbest tripsinin pH, sıcaklık, depo ve termal kararlılıkları, substrat çalışması (kinetik parametreleri) ve ayrıca immobilize enzimin tekrarlanabilirliği çalışılmıştır. Enzimin farklı pH lardaki elektrostatik etkileşimi Zeta potansiyel analizi ile açıklanmıştır. Sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ve ara ürünlerin yapıları FT-IR, XRD, TGA-dTGA, SEM ve VSM analiz yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Serbest ve immobilize tripsin enziminin Bovin Serum Albumin (BSA) ve kazein proteinini hidrolizi çalışılmış olup sonuçları LC-MS/MS de analiz edilmiştir.

İkinci kısım birinci kısımdan farklı olarak, çöktürme yöntemi ile sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküller gallik asit ile fonksiyonelleştirilmiştir. Diğer tüm yapılan çalışma ve karakterizasyonlar birinci kısımla paralel olarak yürütülmüştür.

Üçüncü kısımda, solvotermal yöntem ile Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküller sentezlenip, tanin ile fonksiyonelleştirilmiştir. Modifiye nanopartikül üzerine tripsin enzimi immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize tripsin enziminin Bovin Serum Albumin (BSA) ve kazein proteinini sindirimi çalışılmış olup sonuçları SDS-PAGE sisteminde değerlendirilmiştir. Ayrıca immobilize tripsin enziminin Bovin Serum Albumin proteinini sindiriminden sonra oluşan peptitlerin miktarları ve sayısını belirlemek için MALDI-TOF MS analizi kullanılmıştır. Tripsin peptid bağlarını lizin ve arginin artıklarından sonra spesifik olarak yıkıma uğratan bir pankreatik serin endoproteazdır ve çoğunlukla protein yıkımı ve peptid haritalandırılmasında kullanılmaktadır.

# **IMMOBILIZATION OF TRYPSIN ON Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NANOPARTICLES WHICH HAVE BEEN FUNCTIONALIZED WITH POLYPHENOLS AND APPLICATION OF DIGESTION**

## **SUMMARY**

Keywords: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles, Tannic acid, Gallic acid, Trypsin, BSA, casein.

In this study, by synthesizing of iron oxide magnetic nanoparticles were functionalized with polyphenols and immobilization of trypsin enzyme and by examining digestion of proteins after that aimed to lead in the work to be done. This study was carried out in three separate parts.

At the first part, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles were synthesized by the precipitation method and tannic acid was functionalized on the synthesized nanoparticles. Trypsin enzyme was immobilized on modified nanoparticles. pH, temperature, storage stability and thermal stability of the substrate work (kinetic parameters) of the free and immobilized trypsin, and also reuse of immobilized enzyme was studied. Electrostatic interaction of the enzyme at different pH was explained by zeta potential analysis. The structures of synthesized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and its derivative were illuminated by FTIR, XRD, TGA, SEM and VSM analysis. The efficiency on free and immobilized trypsin enzyme of hydrolysis of Bovine Serum Albumin (BSA) and casein protein were studied and the results were also analyzed by LC-MS / MS.

The second part is different from the first part, gallic acid was functionalized on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles which synthesized by the precipitation method. All other studies and characterizations were carried out in parallel with the first part.

At the third part, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles were synthesized with solvothermal method and tannin was functionalized on the synthesized nanoparticles. Trypsin enzyme was immobilized on modified nanoparticles. The efficiency on free and immobilized trypsin enzyme of digestion of Bovine Serum Albumin (BSA) and casein protein were studied and the results were also evaluated by SDS-PAGE. Also MALDI-TOF MS analysis was used to determine the amount and number of peptides formed after digestion of Bovine Serum Albumin (BSA) of immobilized trypsin enzyme. Trypsin, which specifically cleaves peptidic bonds on C-terminal group of lysine or arginine, is a pancreatic serine endoprotease and is used mostly for protein digestion and peptide mapping.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Katalizörün yeniden kullanılması, sürekli işlemlere olanak vermesi ve ürün saflaştırılmasındaki kolaylıklar nedeni ile enzim immobilizasyonu büyük ölçekli uygulamalarda çok kullanılan bir yöntemdir. Bununla birlikte, immobilize enzimlerin biyokatalitik etkinliğindeki zayıflık onların büyük ölçekli işlemlerde geleneksel kimyasal proseslerle yarışmalarını engeller. Biyokatalitik etkinliğin artırılması, enzim immobilizasyonu için taşıyıcı maddelerin yapısının değiştirilmesi ile sağlanabilir. Yüzeylerine enzim bağlanmış gözeneksiz materyaller birim destek kütlesi başına genellikle düşük enzim miktarı ile yüklenirken minimum difüzyon sınırlamasına maruz kalırlar. Diğer taraftan gözenekli materyallere yüksek miktarda enzim yüklemesi yapılabilir fakat substrat çok daha büyük difüzyonel kısıtlanmaya maruz kalır. Enzim taşıyıcı materyallerin boyutlarındaki küçülme genelde immobilize enzimlerin etkinliğini arttırabilir. Yüzeğe bağlanma durumunda, daha küçük partiküller enzimlerin bağlanması için daha geniş yüzey alanı sunar ve partiküllerin birim kütlesi başına daha fazla enzim yüklenmesi mümkün olur. Gözenekli materyallere enzim immobilizasyonu durumunda, büyük boyutlu gözenekli materyaller ile karşılaştırıldığında küçük gözenekli partiküllerden substratın difüzyon yolunun kısa olması nedeni ile daha az kütle-transfer direnci beklenir. Enzim immobilizasyonu için mikrometre büyüklüklü partiküllerin kullanımını üzerinde kapsamlı çalışmalar vardır. Son zamanlarda ise, enzim immobilizasyonu için taşıyıcı olarak nanopartiküllerin kullanılmasına olan ilgi oldukça artmıştır. Geniş yüzey alanı nedeni ile nanopartiküllere etkili enzim yüklemesinde birim kütlesi başına % 10'luk (kütlece) bir orana ulaşılmıştır. Özet olarak, immobilize enzimlerin optimizasyonunda sıklıkla rastlanan çelişkili meseleler olan minimum difüzyonel sınırlama, birim kütle başına maksimum yüzey alanı ve yüksek miktarda enzim yüklenebilmesi gibi konularda nanopartiküller ideal çözüm sunarlar [1].

Son birkaç yıldır, nanopartiküllerin birçok türü nanoteller, nanotüpler, nanoçubuk ve nanohalkalar gibi çeşitli nanoyapıların üretiminde yoğun olarak iş görmektedir [2-3].

Katı taşıyıcılar üzerine enzimlerin immobilizasyonu serbest enzimlerin üstünde birçok avantajlar sunabilmesine rağmen, substratın düşük kütle transfer etkisi, immobilize enzimin işlevsel kararsızlığı ve bazen taşıyıcının yüksek maliyeti proteinlerin hidrolizi uygulamalarını sınırlandırmaktadır [4].

Taşıyıcıların birçok yeni türü ve teknolojiler son zamanlarda, sanayi biyoteknolojisinde enzim biyokataliz maliyetini azaltmak için kararlılık, aktivite ve enzim bağlanmasını artırmayı amaçlayan geleneksel enzim immobilizasyonu geliştirmek için uygulanmaktadır [5].

Polimer mikrokürecikler ve çeşitli metal nanopartiküller, enzimler ve proteinlerle başarılı bir şekilde bağlanmaktadır [6-7].

Manyetik özelliğe sahip moleküller, enzim immobilizasyonu çalışmak için destek sistemlere sentezlenmektedir [8-12]. Yüksek katalitik özelliğe sahip konjuge enzim ve yüksek bağlanma kapasiteli manyetik nanopartiküller tarafından hacim oranı geniş yüzey elde edilmektedir [13,14]. Enzim kararlılığı, katalitik özelliklerin avantajlarına ek olarak nanoboyuttaki desteklerle ve düşük maliyetle maximize edilir [15,16].

Bu çalışmanın amacı, literatürde yer almayan tannik asit, gallik asit ve tanin gibi polifenol türevlerinin üzerine enzim immobilize ederek daha kararlı, biyouyumlu ve toksik olmayan malzeme üretip literatüre katkı sağlamaktır. Bu çalışmada,  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartikülleri kimyasal çöktürme ve solvotermal yöntem ile sentezlenmiştir. Kimyasal çöktürme ile sentezlenen  $Fe_3O_4$ , tannik asit ve gallik asit ile, solvotermal yöntem ile sentezlenen  $Fe_3O_4$  ise tanin ile fonksiyonelleştirilmiştir. Modifiye nanopartiküller üzerine tripsin enzimi immobilize edilmiş ve immobilize tripsinin BSA ve kazein proteinlerini sindirimi uygulama olarak çalışılmıştır.

## **BÖLÜM 2. METAL OKSİTLER VE MANYETİK NANOPARTİKÜLLER**

Metal oksit nanopartiküller ve uygulamaları fizik, kimya, biyoloji ve ilaç alanında fiziksel ve kimyasal özelliklerinin etkisinden dolayı son on yıldır araştırmaları artmaktadır. Son yıllarda nanoboyutlu demir oksit nanopartiküller biyolojik uygulamalarda gözle görülür bir şekilde önemsenmektedir [17].

Yine son yıllarda nanopartikül katalizörler birinci sıra geçiş metallere Fe [18], Ni [19-23] ve Co [24-26] çalışılmaktadır. Fakat onlar yalnızca hidroliz durumlarında gereken kararlılık eksikliğine ve yavaş katalitik aktiviteye sahiptirler [27].

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> gibi süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller ve onun türevleri kimyasal, termal ve manyetik özelliklere sahiptirler [28,29]. Bu özellikler onları, özellikle biyolojik ve medikal uygulamalar için MR, biosensörler, kanserin hedeflenen terapisi/HIV [29,30] için daha uygun kılar.

### **2.1. Nano Boyutlu Demir Esaslı Malzemeler**

Nano boyutlu metal malzemeler, nano boyutta tanecik büyüklüğüne ve yapısına sahip metallere aittir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, bu malzemelerin özelliklerinin çoğunlukla tanecik boyutuna bağlı olduğunu göstermiştir [31]. Dahası, nano malzemelerin yapısı, fiziksel ve kimyasal özelliklerde önemli değişimlere sebep olmaktadır. Örneğin, manyetik malzemelerdeki zorlayıcı kuvvet değiştirilebilir, yüzeyin tepkimeye girme kabiliyeti ve katalitik yeteneği artırılabilir ve mekanik dayanıklılık beş veya daha fazla kat artırılabilir [32]. Yapısal unsurlar arasında, nano taneciğin yüzey etkileri oldukça önemli bir yere sahiptir. Örneğin, nano boyutlara getirilen kristalitlerin yüzey kimyası, mikro boyutlu taneciklerden farklılık gösterir.

Ayrıca bunlar benzersiz bir tepkime kimyasına sahiptirler. Bunun yanı sıra, geniş özgül yüzey alanına sahip olmaları nedeniyle nano tanecikler, makro boyutta yüzeyler gibi düşünülebilir. Bu da onların hacim özelliklerini etkiler. 3 nm civarındaki bazı küresel nano taneciklerin, atom ya da iyonlarının yaklaşık %50'si yüzeydedir. Bu sayede, yüzey özellikleri, hacim özelliklerini etkileyebilir ve yakınstokiyometrik tepkimeler oluşabilir [31]. Çoğunlukla malzemelerin yüzeylerinde bozulmalar meydana gelir. Bu nedenle, yüzey yapısının optimizasyonu, nano taneciğin tüm davranışını etkin bir şekilde geliştirebilir. Demir-esaslı nano malzemeler, çevresel uygulamalarda, kirlenmiş toprak ve yeraltı suyunun temizlenmesinde dikkat çekecek derecede etkindir. Küçük boyutları nedeniyle, tepkimeye yatkınlıkları, geleneksel demir tozlarından çok daha fazladır. Ayrıca sulu çamur içinde askıda tutulabilir ve kirlenmiş bölgeye doğrudan, kolayca pompalanabilir. Saf demirin bilinen hiçbir zehirli özelliği yoktur; zaten dünyada en bol bulunan metallere biridir. Saf demir havaya maruz kaldığında, tuğla kırmızısı renge sahip olan demir okside yükseltgenir. Metalik demir, organik kirliliklerin (trikloroetan (TCA), trikloroeten (TCE), tetrakloreten (PCE) veya karbon tetraklorür... v.s.) varlığında yükseltgenirse, bu organik bileşenler, daha az zehirli olan basit karbon bileşiklerine parçalanırlar. Dahası, demir yükseltgenirken, kurşun, nikel ve civa gibi ağır metalleri indirger; toprakta sabit kalan ve çözünmeyen bir yapıya dönüştürür [33].

## 2.2. Nano Boyutta Demirin Manyetik Özellikleri

Nano demir partiküllerin manyetik özellikleri manyetik kayıta, manyetik akışkanlarda, biyomedikal uygulamalarda ve katalizde önemli rol oynamaktadır [34]. Ancak, çevresel uygulamalarda araştırmacılar bu manyetik özelliklerden kaçınırlar. Çünkü, geniş yüzey alanı ve manyetik dipol-dipol çekimi nedeniyle manyetik nanopartiküller, kümelenmeye meyillidir [35]. Bunun sonucu olarak çok daha uzun zincirler oluşur ve kirlenmiş yüzeylerde nanopartiküllerin reaktifliği ve aktarımı düşer. Bu nedenle, manyetik nanopartiküllerin dağılması, tepkimedeki etkinliklerinin artırılmasında hayati öneme sahiptir. He ve Zhao, Fe-Pd nanopartiküllerini sağlamlaştırmak için çözünür nişasta kullanmışlardır [36]. Bu nişasta kaplanmış



nanopartiküller ayrı taneciklerdir ve çok daha az kümelenme gösterirler. Ayrıca elde ettikleri sonuçlar göstermiştir ki nişasta kaplanmış nanopartiküller tepkimeye oldukça fazla yatkındırlar.

### **2.3. Nano Boyutlu Demir-Esaslı Malzemelerin Eldesi**

Elde edilen nano boyutlu taneciğin boyut ve şeklini belirleyen unsur, uygulanan yöntemdir. Son zamanlarda geliştirilen farklı elde etme yöntemleri iki ana gruba ayrılabilir: Fiziksel yöntemler ve kimyasal yöntemler.

#### **2.3.1. Fiziksel elde etme yöntemleri**

##### **2.3.1.1. İnert gaz yoğunlaşması yöntemi**

İnert gaz yoğunlaşması (İGY) pek çok araştırmacı tarafından kabul görmüştür. İGY yöntemiyle ilk kez nano boyutlu demir malzeme üreten Gleiter'dir. Sanchez- Lopez ve ark. İGY yöntemiyle, başarılı bir şekilde, ortalama çapları 17 nm olan nano boyutlu demir tanecikler üretmiştir [33].

##### **2.3.1.2. Şiddetli plastik şekil değişimi yöntemi**

Şiddetli plastik şekil değişimi (ŞPD) çalışmalarını Bridgman 1952'de başlatmıştır. ŞPD yöntemleri, yüksek basınç altında ve nispeten düşük sıcaklıklarda önemli şekil değişimi sağlar. Bu gibi şartlar, mikro veya nano yapıda, önemli incelmelere sebep olabilir. Yüksek açılı tane sınırlarına sahip üstün-ince-taneli yapı elde edilebilir [33].

##### **2.3.1.3. Yüksek enerjili bilyeyle öğütme yöntemi**

Yüksek enerjili bilyeyle öğütme yönteminde, geleneksel mekanik öğütme tekniği kullanılarak işlenmemiş metal parçaları, mikro veya nano boyutta taneciklere parçalanır. Bilye ve taneciğin sürekli çarpışması, parçaların boyutunu sadece birkaç nanometre kadar küçültür. Bunun yanı sıra, şekil değişimine, çatlak oluşumuna ve

taneciklerin birbirleriyle kaynamasına neden olabilir. Del Bianco ve ark. bilyeli öğütme yöntemiyle 10 nm boyutunda demir tanecikleri elde edebilmiştir. Malow ve ark. bilyeli öğütme yöntemiyle, 800 K tavlama sıcaklığında, izotermal olarak elde ettiği 15–24 nm arasındaki nano kristal demir taneciklerini, yaklaşık olarak tam yoğunlukta bulunan numunelere sıkıştırmıştır [33].

#### **2.3.1.4. Ses ötesi atışla dövme yöntemi**

Ses ötesi atışla dövme yöntemi (SÖAD) Tao ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Tao, yüksek frekanslı (20 kHz) ses ötesi bir cihaz ve numune olarak da endüstriyel saflıkta demir levha kullanmıştır. Bu yöntemde, numune yüzeyine rastgele noktalara, yüksek hızla mekanik yükler gönderilir; böylece çıkıntılar meydana gelir. İşlem devam ettikçe bu çıkıntılar birleşir ya da yeniden düzenlenir; tanelerin konumları da değişir. Yük yoğunluğuna ve germe hızına bağlı olarak böyle bir inceltme işlemi ile üstün incelikte tanecikler elde edilebilir [33]. Tao'nun geçirgen electron mikroskobu (TEM) sonuçları göstermiştir ki başlangıçta işlenmemiş olan ve yüzey tabakasında bulunan taneler, ortalama 10 nm'ye kadar incelmıştır. TEM sonuçlarına göre taneler çoğunlukla tek düze yapıdadır [32].

#### **2.3.2. Kimyasal elde etme yöntemleri**

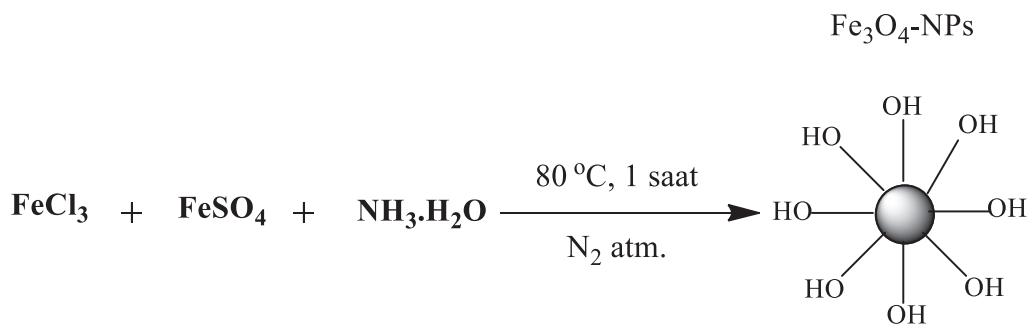
##### **2.3.2.1. Ters misel yöntemi**

Ters misel ya da mikroemülsiyon yöntemi, dar bir boyut dağılımı gösteren ve tekdüze biçime sahip nano tanecik eldesi için mükemmel bir yöntemdir. Carpenter, demir(II) sülfatı ( $\text{FeSO}_4$ ) sodyum borohidritle indirgemek için setiltrimetil amonyum bromür, oktan, n-bütanol ve sulu kimyasallardan oluşan bir ters misel sistemi kullanmıştır [37]. Nano demir tanecikleri ince bir altın tabakasıyla kaplanmıştır; böylece paslanmaktan korunmuştur. Sonuçta elde edilen nano tanecikler 1 nm altın tabakasıyla birlikte 7 nm'lik bir çapa sahiptir. Li ve ark. benzer bir sistem kullanmış ve çapı 10 nm'den az olan, neredeyse küresel demir tanecikler elde etmiştir [38]. Wiggins ve ark. ters misel yöntemini kullanarak Fe–Au üzerine yaptıkları çalışmalar

sonucu, 3 nm Au çekirdek üzerine, 1 nm Fe tabaka ve 2 nm Au kaplamaya sahip nano tanecikler elde etmişlerdir [32]. Song vd. nano boyutta  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> elde etmek için sodyumdodesil benzen sülfonat, stiren, benzen, amonyum peroksidisülfat, etanol, demir(II) sülfat ve hidroklorik asitten oluşan bir sistem kullanmıştır [39]. Elde edilen tanecikler ortalama 10 nm çapa sahiptir ve tekdüze boyut dağılımı gösterirler.

### 2.3.2.2. Kontrollü kimyasal çöktürme yöntemi

Kontrollü kimyasal çöktürmeyi sağlamak amacıyla uygun pH aralığında uygun bir çöktürücü ilave edilir. Eldeki aşırı ince başlatıcı (precursor) olgunlaştırılır, süzülür, yıkanır, kurutulur ve ayrıştırılır; böylece nano boyutta tanecikler elde edilir (Şekil 2.1.). Yaygın olarak kullanılan çöktürücüler NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH ve amonyaktır [32]. Liu ve ark. kontrollü kimyasal çöktürme yöntemiyle ortalama boyutu 5 nm'den küçük olan demir oksit tanecikleri elde etmiştir [35]. Jiang ve ark. nano boyutta Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> tanecikleri elde ederken, ferrit çözeltisinin pH'ını ayarlamak için NH<sub>4</sub>OH baz çözeltisine üre ilave etmiştir [40]. Ferrit çözeltisinde çözülen üre miktarı değiştirilerek, elde edilen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> taneciklerinin ortalama çapı 8–50 nm arasında ayarlanabilir. Kim ve ark., iyonik olmayan yüzey aktif maddeyle kaplı Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> tanecikleri elde etmiştir; bu taneciklerin ortalama boyutu 2-6 nm'dir [41].



Şekil 2.1. Kontrollü kimyasal çöktürme akış şeması

### 2.3.2.3. Kimyasal buhar yoğunlaşması yöntemi

Farklı türde malzemeler üretmek amacıyla “kimyasal buhar yoğunlaşması” yöntemi (KBY) geliştirilmiştir. Piyasada pek çok başlatıcının (precursor) bulunması da bunu

kolaylaştırmıştır [42]. Choi ve ark. bu yöntemle, akışkan helyum atmosferinde manyetik Fe nano tanecikleri elde etmiştir [43]. Başlatıcı ve temel olarak da demir karbonil ( $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ) kullanmışlardır. Elde ettikleri küresel nano tanecikler, ortalama 5-13 nm boyutlarındadır ve tekdüze bir dağılım gösterir.

#### **2.3.2.4. Elektronik darbeyle çöktürme yöntemi**

Son zamanlarda yapılan araştırmalar göstermiştir ki elektronik darbeyle çöktürme (EDÇ) yöntemiyle de nano boyutlu demir esaslı malzemeler üretilebilir. Natter ve ark. nano-Fe üretmek için Fe bir anotla etkisiz (inert) bir Ti katot kullanmıştır [44]. Elektrolit (sitrata banyosu) 50 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ , 20 g/L sitrik asit trisodyum tuzu, 10 g/L sitrik asit ve 40 g/L borik asit içermektedir. Banyo sıcaklığı 303 K'dir. Tane boyutunu kontrol altında tutmak için küçük genişlikte darbelerle elektrik akımı uygulanmıştır. Sonuçta elde edilen nano boyutta demir taneciklerinin ortalama boyutu 19 nm'dir ve bu tanecikler ısı açısından 550 K'e kadar kararlıdır.

#### **2.3.2.5. Sıvı alev püskürtme yöntemi**

Sıvı alev püskürtme (SAP) yönteminin üstünlüklerinden bir tanesi de neredeyse bütün sıvı halde beslenebilen elementlerin, nano tanecik eldesinde kullanılabilmesidir. Makela ve ark. bu yöntemle, nano boyutta Fe, Pd ve Ag elde ettiklerini bildirmişlerdir [45]. Elde ettikleri sonuçlar göstermiştir ki bu üç metalin ortalama tanecik boyutu 10-50 nm arasındadır (örneğin, nano-demirin tanecik boyutu 40 nm'dir). Taneciklerin boyut dağılımının standart sapması 1,35-1,5 arasındadır.

#### **2.3.2.6. Sıvı fazda indirgeme yöntemi**

Sıvı fazda indirgeme yönteminin (borohidrit indirgeme de denir) temel ilkesi, metalik iyon çözeltisine güçlü bir indirgen ilave ederek metali indirgemek ve nano boyutta metal tanecik elde etmektir. Glavee ve ark., bu yöntemle elde edilen nano-demir tanecikler "FeBH" simgesiyle gösterilmiştir [46]. Sıvı fazda indirgeme yöntemiyle demir nano taneciklerin eldesi, kolaylığı ve verimliliği nedeniyle en çok araştırılan

yöntemdir. Ayrıca çevresel uygulamalarda da en sık kullanılan yöntemlerden biridir. En yaygın kullanılan indirgen  $\text{NaBH}_4$ 'dir. Demir(III) klorür ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ve demir(II) sülfatın ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) sıvı fazdaki demir çözeltisi olarak kullanımına ilişkin başarılı çalışmalar yapılmıştır. Nurmi ve ark. ve Liu ve ark. bu yöntemle elde edilen nano demir taneciklerinin yapısını incelemiştir [47,35]. Her iki yazar da tanecik boyutuyla ilgili aynı sonuca varmıştır. Zhang, kendi yöntemleriyle ürettikleri nano taneciklerin ortalama boyutunun 60,2 nm olduğunu bildirmiştir [48].

### 2.3.2.7. Gaz fazda indirgeme yöntemi

Geleneksel demir nano taneciklerden RNIP (Toda Kogyo Corp., Schaumburg, IL), gaz fazda indirgeme yöntemiyle üretilmiştir ve çevresel uygulamalarda geniş ölçüde kullanılmaktadır. RNIP (Nurmi ve ark. tarafından  $\text{Fe}^{\text{H}2}$  olarak gösterilmiştir, aynı simge yöntemle nano boyutta demir tanecikler elde edilmiştir [47].) RNIP, götit (goethite) ve hematit taneciklerinin  $\text{H}_2$  ile yüksek sıcaklıkta (350–600 °C) indirgenmesiyle üretilmiştir. Demir tanecikleri gaz fazda su içinde soğutulur. Sudaki taneciklerin yüzeylerinde pas tabakası oluşur. Bu demir nano tanecikler kurutulduktan sonra, organik halojen bileşenlerin ve/veya ağır metallerin indirgenmesinde kullanılabilir. Elde edilen taneciklerin ortalama boyutu 50-300 nm, özgül yüzey alanı ise 7-55  $\text{m}^2/\text{g}$  arasındadır. Fe içeriği genelde (ağırlıkça) %65'den az değildir [32].

### 2.4. Manyetik Nanopartiküller

Bir sıvı içersinde süperparamanyetik dispersiyonlar oluşturan manyetik partiküller 1'den 100 nm boyuna kadar değişen boyutlarda metal ve metal oksitlerden oluşmaktadır. Bu metal ve metal oksitler Ni, Co, Fe,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ve  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 'den oluşmaktadır.

## 2.5. Demir Oksitler

Demir oksitler, farklı manyetik özellikler ile değişik kimyasal bileşenlerden oluşmaktadır. Ferrimanyetizma gösteren bu ilginç materyaller  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, MO.Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M=Co, Mn, Ni veya Cu) gibi demir oksitlerdir. Ferrimanyetik demir oksitler geçiş metalleri gibi ferromanyetik metallere daha küçük bir manyetik cevap özelliği gösterirler. Fakat, demir oksitler oksidasyona daha az duyarlı ve bu nedenle kararlı manyetik etkilerini korumaktadırlar.

Manyetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ve maghemit ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) en genel ve en çok araştırılan demir oksitlerdir. Manyetit ve maghemit aynı fiziksel özelliklere ve kristal yapısına sahiptir (Tablo 2.1). Her ikisi de ferrimanyetik özellik gösterir. Fakat maghemit daha düşük doygunluk mıknatıslığına sahiptir. Bunların manyetik cevapları alt örgü etkileşimleri nedeniyle değişmektedir. Maghemit ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) sadece Fe<sup>3+</sup> iyonlarından oluşmaktadır. Kristal yapısında Fe<sup>3+</sup> iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısı da oktahedral düzenlenmiştir. Manyetit ise (FeO.Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 1:2 molar oranında Fe<sup>2+</sup> ve Fe<sup>3+</sup> iyonlarından oluşmaktadır. Fe<sup>3+</sup> iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısı oktahedral ve Fe<sup>2+</sup> iyonlarının hepsi oktahedral olarak düzenlenmiştir [49].

Tablo 2.1. Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri [49]

	<b>Kristal yapısı</b>	<b>Hücre boyutu (nm)</b>	<b>Renk</b>	<b>Doygunluk mıknatıslığı</b>	<b>Curie Sıcaklığı (K)</b>
Manyetit	Kübik	a <sub>0</sub> =0,839	Siyah	90-98	850
Maghemit	Kübik tetragonal	a <sub>0</sub> =0,834	Kırmızı kahve	76-81	820-986

## 2.6. Manyetit Kararlılığı

Manyetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) havada kolayca maghemite oksitlenir. Maghemit sadece az manyetik özelliğe sahip ferrimanyetikdir. Fakat 300 °C'den büyük sıcaklıklarda manyetit hematite oksitlenir.

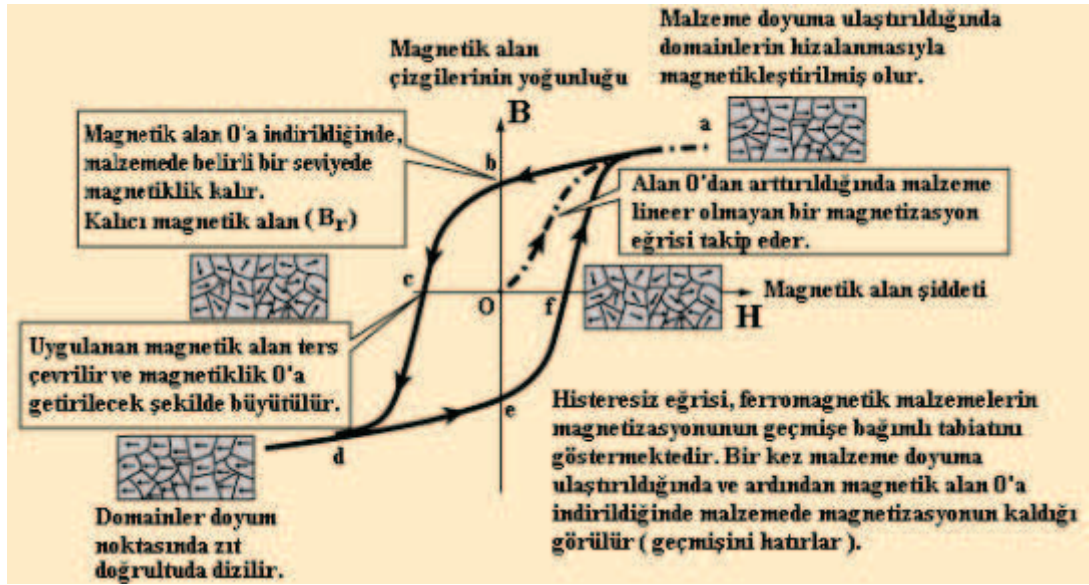


Hematit antiferromanyetikdir, bu nedenle bu dönüşüm bazı uygulamalarda göz önünde bulundurulabilir. Manyetit nanopartiküllerin kullanımı ve özellikleri dikkate alındığında bu partiküllerin yüzey özellikleri ve kimyası büyük önem taşımaktadır. Manyetitin sudaki dispersiyonu ne pozitif ne de negatiftir, çözeltinin pH'ına bağlıdır. Manyetitin izoelektrik noktası 6,8'dir. Manyetit nanopartiküllerin elektrostatik çift tabaka oluşturulması, sterik stabilizasyonu veya izoelektrik noktasının sitrat ya da silika kaplanarak modifiye edilmesiyle stabilizasyonu sağlanmaktadır. Demir oksit nanopartiküllerin stabilizasyonu kararlı bir manyetik kolloidal ferrosıvılar oluşturulması için çok önemlidir [50].

## 2.7. Histerisiz Eğrisi

Histerisiz, ferromanyetik malzeme kütlesine etki eden manyetik alan şiddeti değiştirildiğinde, manyetik etkinin gecikmesi anlamına gelmektedir (Şekil 2.2.). Eğrinin düşey eksenini B, malzemedeki akı yoğunluğunu, H ise uygulanan alan şiddetini göstermektedir. Eksenlerin kesişim noktası olan sıfır, mıknatıslamanın olmadığı ve hiçbir kuvvetin uygulanmadığı anı temsil eder. Manyetik alan şiddeti artırıldığında, akı yoğunluğu önce hızlı, sonra maksimum ya da doyma noktasına ulaşmaya kadar yavaşlayarak artar. Manyetik alan şiddetinin daha fazla artırılması akı yoğunluğunda bir artış meydana getirmez. Akı yoğunluğunun yükselişi noktalı çizgi ile gösterilmiştir. Manyetik alan şiddeti ters yönde sıfıra düşürüldüğünde B noktasında malzeme bir miktar mıknatıslanma mevcut kalır. Buna malzemenin artık mıknatıslığı (remanens) adı verilir. Mıknatıslama akımını ters çevrilerek yavaşça sıfıra düşürüldüğünde malzemedeki akı yoğunluğu azalır. Artık mıknatıslık c noktasında sıfır olur. Yatay eksenindeki mesafe, giderme kuvveti (koersitif) olarak adlandırılır. Giderme kuvveti, mıknatıslanma sonrasında malzemelerdeki manyetik akı yoğunluğunu sıfıra indirmek için gerekli olan manyetik alan şiddeti değeridir. Bu noktadan manyetik alan şiddeti daha da artırılırsa malzeme tekrar doyuma ulaşır (d). Manyetik alan şiddeti tekrar yavaş yavaş sıfıra düşürüldüğünde, akı yoğunluğu bir miktar azalır (e). Bu noktada da malzeme bir miktar artık mıknatıslanma

görülür. Manyetik alan ilk yönde arttırılmaya devam edilirse artık akı yoğunluğu azalır ve f noktasında sıfır olur. F noktasından manyetik alan arttırılmaya devam edilirse başlangıç doyma noktasına (a) ulaşılır. Histerisiz eğrisinin daralması malzemenin kolay mıknatıslanabileceğini ve düşük artık mıknatısa sahip olacağını, genişlemesi ise malzemenin zor mıknatıslanabileceği ve daha kuvvetli bir artık mıknatıslığa sahip olacağını gösterir [51].



Şekil 2.2. Histerisiz çevrimi ve genel özellikleri [51]



### **BÖLÜM 3. ENZİMLER VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU**

Enzimler hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden proteinlerdir. Enzimler de diğer katalizörler gibi reaksiyonların hızlarını arttırmaktadırlar. Benzer koşullar altında enzim varlığındaki reaksiyon oranı, katalizörün yokluğundaki reaksiyon oranına göre bir veya birkaç milyon kat daha yüksek olabilmektedir [52,53].

Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir, ancak enzimlerin avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması yüksek maliyet gerektirmektedir. Doğal ortamlarından izole edilen enzimlerin yapısında kararsızlık oluşmaktadır. Ayrıca, enzimlerin proses koşullarına karşı duyarlılıkları da oldukça fazladır. Enzimler reaksiyonlar sonucunda modifiye olmadıkları için aynı enzim bir kereden fazla kullanılabilir, ancak endüstriyel, analitik ve klinik proseslerin pek çoğunda enzimler substrat çözeltisi ile karıştırılmaktadır. Substratların ürünlere dönüştürülmesinden sonra, enzimlerin substrat ve ürünlerle birlikte bulunduğu çözeltiden ayrılması zorlaşmaktadır ve enzimler ekonomik olarak geri kazanılamamaktadır. Bu yönüyle enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları ve pahalı olmaları uygulamalarda büyük masraflara neden olmaktadır [52-55]. İmmobilize enzimlerin sahip olduğu avantajlar, enzim mühendisliği olarak da bilinen enzim teknolojisi, analiz, tıp ve ilaç, organik kimya gibi alanlarda kanıtlanmıştır [56].

Enzimler sentetik proseslerin tasarımları için çevresel durumlarda ve ürünlerin geniş bir oranını elde etmek için mükemmel özelliklere (aktivite, seçicilik, spesifik) sahiptirler. Enzimin biyokimyasal özellikleri onun moleküler ağırlığı, yüzey üzerinde fonksiyonel grubu ve saflığı gibi immobilizasyon için önemli bir faktördür. Enzimin

yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, örneğin enzim ve destek arasında meydana gelebilen ne türde etkileşimler olduğu bilgisini verir. Aynı zamanda safsızlıklar substratlara etki edebileceğinden enzimin saflığı önemlidir. İmmobilize enzimin parametrelerine karar veren, enzimin diğer özellikleri enzim tarafından katalizlenen reaksiyon kinetiği ve reaksiyon tipidir. Spesifik aktiviteler, aktivasyon ve inhibisyon için kinetik parametreler, pH, sıcaklık, çözücülere karşı kararlılık ve safsızlıklar aynı zamanda immobilize enzimlere etki etmektedir [57].

Birçok yazar immobilize enzimleri proteinleri hidroliz etmek için kullanmaktadırlar. Suksinamidopropil selit üzerine tripsin immobilizasyonu peynirden elde edilen proteinleri hidroliz etmek için kullanılmıştır [58]. Paramanyetik gözenekli cam boncuklar tripsin immobilizasyonu fetuini hidroliz etmek için kullanılmıştır [59].

### **3.1. Enzimler ve Enzimlerin Yapısı**

Biyokimyasal reaksiyonların pek çoğu protein yapısındaki organik kimyasal maddeler tarafından katalizlenir. Bu çeşit biyolojik katalizörlere "Enzim" adı verilir.

İlk defa 1833 yılında Payan ve Persöz, alkol kullanmak suretiyle malt ekstresinden nişastayı sindiren enzimi presipitasyon (çökelme) yolu ile ayırt ettiler ve buna "Diastaz" adını verdiler.

Pepsin, tripsin ve kemotripsin'in Notrhrop tarafından kristal halde elde edilmeleri ise 1930-1936 yılları arasına rastlamaktadır [60].

Enzimlerin etki yaptığı maddeler genellikle tek ve belirli maddelerdir. Pek az enzim mevcut protein yapıları ile etkili olabilirler, çoğunlukla enzimlerin etkili hale geçebilmeleri için aktive edici bir ek maddeye ihtiyaçları vardır.

Tüm enzim proteinleri genler tarafından şifrelenir. Dolayısıyla aminoasit dizilimi kendine özgüdür (bir gen-bir enzim kuralını). Yapıları sadece proteinden ibaret olup koenzim veya prostetik grup gibi ayrı bir kısım ihtiva etmeyen enzimlere örnek

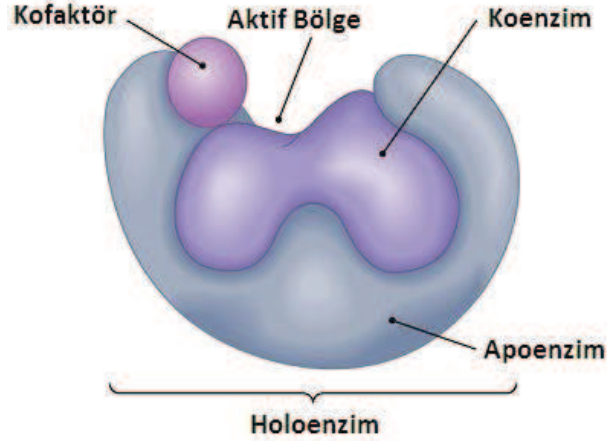
olarak; pepsin, tripsin, üreaz ve bazı hidrolazlar verilebilir. Organik fakat protein olmayan bir prostetik grup ihtiva eden enzimlere flavin nukleotidli enzimler, sitokramlar, katalaz ve peroksidaz; koenzim ihtiva eden enzimlere nikotinamid nukleotidli enzimler örnek verilebilir.

Fakat diğer çoğunluğu iki farklı kısımdan meydana gelmiştir. Bunlar:

- a. Apoenzim Kısmı (enzimin protein kısmı): Bu kısım enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar.
- b. Koenzim (kofaktör) (protein olmayan kısmı): Organik ya da inorganik, çok defa fosfattan meydana gelmiş, protein kısmına göre çok daha küçük moleküllü bir kısımdır. Enzimde işlev gören ve esas iş yapan kısım bu kısımdır. Koenzim kısmı genellikle protein kısmından ayrılabilir ve analizlerinde birçok vitamini bünyesinde bulundurduğu (thiamin, niacin, riboflavin vs.) görülmüştür. Buradan şu genelleştirme yapılabilir:

Bütün vitaminler hücrede enzimlerin koenzim kısmı olarak ödev görürler. Ne koenzim ne de apoenzim kısmı yalnız başına etkindir. Bazı enzimler ortama yalnız belirli iyonlar eklendiğinde etkindirler, örneğin bazı enzim zincirine ancak  $Mg^{++}$  iyonu eklenince glikozu laktik aside çevirebilir. Tükürükteki amilaz nişastayı yalnız Cl iyonlarının bulunduğu ortamda parçalayabilir. Canlı bünyesinde bulunan eser elementler, Mn, Cu, Zn, Fe ve diğer elementler bu enzimatik işlevlerde aktivatör olarak kullanılır. Bazen enzimin iş görebilmesi için bir metal iyonuna gereksinim vardır. Yani koenzim kısmı metal iyonu ise ( $Ca^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ) buna "Kofaktör" denir. Enzimin etkinlik göstermesi için gereksinme duyduğu organik moleküllere "Koenzim" denir (Şekil 3.1.). Bazı durumlarda koenzim kısmı apoenzim kısmına kuvvetlice (kovalent) bağlanmıştır; bu sıkı bağlanan kısma "Prostetik Grup"; prostetik grupla apoenzim kısmınının her ikisine birden de "Holoenzim" denir. Enzimlerin bir kısmı sitoplazmaya serbestçe dağılmış olarak, diğer bir kısmı da hücredeki bazı yapılara sıkıca bağlanmış olarak bulunur. Laktik asit, amino asit ve yağ asitlerinden türeyen maddeleri karbondioksit ve suya kadar parçalayan solunum

enzimleri, mitokondri zarlarının yapışma katılır. Keza ribozomların işlevsel bütünlüğüne katılan enzimler de bu tiptir. Dokulardaki enzimler değişik yöntemlerle saptanabilir [60].



Şekil 3.1. Aktif enzim şekilleri [61]

### 3.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliği'nin enzim komisyonunca 1961'de yayımlanan karara göre enzimler 6 gruba ayrılır:

1. Oksido-redüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
2. Transferazlar: Grup transferi reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Hidrolitik reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
4. Liyazlar: Çifte bağlara grup ekleyen veya bunlardan grup ayıran enzimlerdir.
5. İzomerazlar: İzomerizasyon reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
6. Ligazlar: ATP'nin parçalanması ile bağ yapan enzimlerdir: ATP veya diğer fosfatlardan yararlanarak, bunlardaki pirofosfat bağının parçalanması sonucu iki molekül arasındaki yeni bağların meydana gelmesini sağlarlar.

Enzim komisyonunca, her enzim için kullanışlı ve kısa bir isim, enzimin katalize ettiği reaksiyonu belirleyen bir sistemik isim ve enzimin durumunu kesinlikle ortaya koyan sınıflandırma numarası verilmiştir.

Enzimlerin sınıflandırılmalarında 4 diziden oluşan sayılar kullanılmaktadır. Dizide yer alan birinci sayı, enzimin hangi sınıfa mensup olduğunu gösterir. İkinci ve üçüncü sayılar, alt ve daha alt sınıfları açıklar. Dördüncü sayı üçüncü sayı ile ifade edilen alt sınıftaki seri numarasını belirtir.

Örneğin: Sınıflandırma numarası; EC 1.1.1.1 Alkol dehidrojenaz

İlk 1 sayısı: enzimin oksido-redüktaz sınıfına dahil olduğunu, ikinci 1 sayısı verici dönor maddenin CH-OH grubu üzerine etki yaptığını, üçüncü 1 sayısı akseptör olarak NAD ve NADP'den yararlandığını, dördüncü 1 sayısı doğrudan enzimin sistemik adı olan Alkol-NAD Oksidoredüktazı açıklar.

### 3.3. Enzim İmmobilizasyonu

Katalizör, kimyasal reaksiyon esnasında tükenme olmaksızın reaksiyon oranını artırır ve geri dönüşülebilir [62]. Katalizörün immobilizasyonu bu geri dönüşebilirliği başarmak için doğru bir yol olabilmektedir [63,64]. Enzimler özellikle çok amaçlı katalizörler sınıfındadır ve canlı maddelerde çok etkili ve kesin katalizörlerdir. Enzimler genellikle uygun reaksiyon şartlarında yüksek seçicilik gösterir [65]. Ancak, enzimlerin hassas ve aktiviteyi korumak için çok spesifik durumlar gerektirdiği de yaygın bir algılamadır. Ek olarak, enzimlerin su bazlı ortamda kullanılması gerekmektedir ve birçok endüstriyel sentezler için sorunlu olan geri dönüşüme ilişkin konulara sahiptir. Enzim immobilizasyonu bu engellerin üstesinden gelmek için yardım edebilir [66].

İmmobilizasyon, enzimlerin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanması, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılması ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanmasıdır [67].

İmmobilizasyon, aynı zamanda enzim özelliklerini geliştirmek için önemli bir araçtır. İmmobilize enzimler genellikle daha iyi pH ve sıcaklık kararlılığı gösterir, ayırmak için daha kolaydır, tekrar kullanılabilir ve pratik uygulamalar için daha uygundur. Sonuç olarak, immobilize biyokatalizler yüksek tonajlı proseslerde ve farmasotik sanayi biyoayırıcılar ya da biyosensörler olarak birçok pratik ve ticari uygulamalarda kullanılmaktadır [68-75].

Suda çözünmez bir taşıyıcı üzerine enzim immobilizasyonu, ticari kullanımlar ve sürekli prosedürler üzerine enzimin uygulamalarını artırmak için istenen biyolojik bir metottur [76]. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aşağıdaki bazı özellikler bulunmalıdır.

- Suda çözünmeme,
- Hidrofilik karakter,
- Gözenekli (poröz) yapı,
- Mekanik stabilite ve uygun partikül formu,
- Kimyasal ve termal stabilite,
- Mikroorganizmaya karşı dirençlilik,
- Düşük maliyet,
- Zehirsizlik
- Rejenere olabilme [77]

Enzimlerin katalitik aktiviteleri için çok büyük öneme sahip olan moleküler yapıları; yüksek sıcaklık çok yüksek ya da çok düşük pH ve organik çözücülerin varlığı gibi zorlu ortam ve proses koşullarında yıkılmaya eğilimlidir. Reaksiyonlarda serbest enzimlerin kullanılması, katalizledikleri reaksiyondan sonra ürünü kontamine etmeleri ve tekrar elde edilme süreçlerinin pahalı oluşu gibi problemlere sebep olur. İmmobilizasyon, enzimlerin doğasında mevcut olan bu sorunları ortadan kaldırma metodlarından bir tanesidir. İmmobilize enzimlerin sahip olduğu avantajlar, enzim mühendisliği olarak da bilinen enzim teknolojisi, analiz, tıp ve ilaç, organik kimya gibi alanlarda kanıtlanmıştır [56].

İmmobilize enzimlerin kullanımını içeren bazı avantajları özetlemek gerekirse:

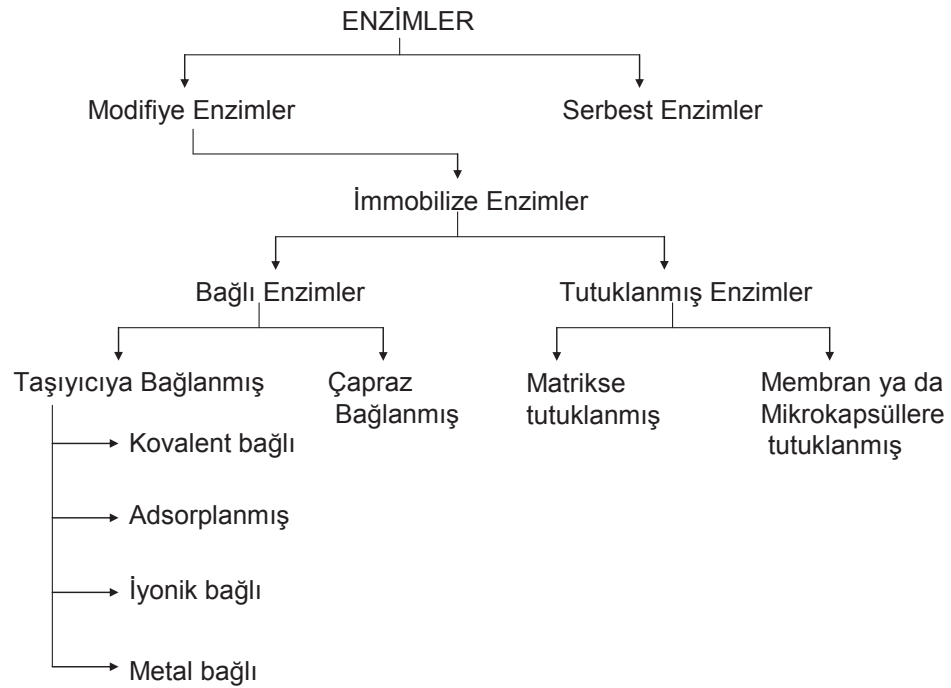
1. Tekrar kullanılabilirler, böylece üretim maliyetini azaltmaktadırlar.
2. Katalizörün üründen olağan ayrılma problemi pratik olarak giderilmiştir.
3. İmmobilize enzimlerin reaksiyonları daha az yer gerektirir.
4. Reaksiyonun daha iyi kontrolü mümkündür.
5. Sürekli akış sistemlerine uygulanabilirler.
6. İmmobilize enzimlerin bazı durumlarda çözümlü proteinlerden daha kararlı olduğu gösterilmiştir (yüksek sıcaklık, daha yüksek basınç ve bazik ya da asidik pH). Ayrıca, tıbbi uygulamalarda, olumsuz immünolojik reaksiyonlar sadece enzimlerin enkapsülasyon veya tutuklanması ile önenebilir [54,56,78].

### 3.3.1. İmmobilizasyon metotları

İmmobilizasyon yöntemi seçilirken kullanılan enzimin kimyasal yapısı ve bileşimi, substrat ve ürünlerin özellikleri, oluşan ürünün kullanılacağı alanlar dikkate alınmalıdır (Şekil 3.2.). Ayrıca, immobilizasyon işleminde, enzimin bağlanma bölgesindeki aktif gruplarını ve kimyasal yapısını değiştirmeyecek, enzimde aktivite kaybına neden olmayacak bir yöntem seçilmesi çok önemlidir. Bu nedenle enzimin bağlanma bölgesindeki gruplarla reaksiyon vermektan kaçınılmalıdır [54].

#### 3.3.1.1. Kovalent bağlanma

Kovalent bağlama, suda çözümlü olmayan bir taşıyıcıya enzimin kovalent bağlarla tutturulmasıdır. Kovalent bağlama diğer yöntemlere göre daha karmaşık ve zor koşullar altında yapılır. Kovalent bağlama yönteminde taşıyıcı ile enzimin katalitik aktif bölgesindeki fonksiyonel gruplar arasında bağ oluşmaması gerekmektedir. Kovalent bağlanmada enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlar diğer immobilizasyon yöntemlerindeki göre daha kuvvetlidir. Bu nedenle substrat veya yüksek iyonik kuvvete sahip çözeltiler varlığında bile enzim ile taşıyıcı arasında sızıntı olmamaktadır.



Şekil 3.2. Enzimlerin immobilizasyonu metodları [67]

Ayrıca enzim taşıyıcının üzerine tutturulmuş olduğundan, immobilize edilmiş enzim substratla çok kolay bağlantı kurabilir [55].

### 3.3.1.2. Fiziksel adsorpsiyon

İmmobilizasyon için kullanılan en basit yöntemdir. Yöntem; suda çözünmeyen yüzey aktif bir adsorbanın, enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Bu yöntemin avantajı destek materyalinin pH, sıcaklık gibi etkiler sonunda tekrar kullanılabilmesidir. Sıcaklık ve zaman adsorpsiyonda önemli iki parametredir. Özellikle gözenekli taşıyıcılarda difüzyon önemli bir faktördür. Fiziksel adsorpsiyonda oluşan bağlardaki zayıflık nedeniyle kullanım sırasında desorpsiyon gerçekleşmektedir. Bu, aktivite kaybına ve üründe kirliliğe yol açabilmektedir [67].

### 3.3.1.3. İyonik bağlanma

İyonik bağlanma metodu, enzimin iyon değiştirici ajanlar içeren ve suda çözünmeyen



bir taşıyıcıya iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. Genellikle iyon-değiştirici merkezlere sahip olan polisakkaritler ve sentetik polimerler taşıyıcı olarak kullanılır. Enzimin taşıyıcıya bağlanması kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Ayrıca iyonik bağlanma yöntemindeki immobilizasyon koşulları kovalent bağlanmaya göre daha ılımlı olduğu için enzimin konformasyonel yapısında ve aktif bölgelerinde çok az değişiklik gözlenir [67].

#### **3.3.1.4. Çapraz bağlanma**

Enzimlerin serbest amin ve karboksil gruplarıyla çok fonksiyonlu maddelerin kovalent bağlarla üç boyutlu çapraz bağlanarak enzim kümeleri oluşturmasıdır. Bu yöntemde enzimleri birbirine bağlamak amacıyla glutaraldehit, diazobenzidin gibi maddeler kullanılır. Çapraz bağlanma reaksiyonları zor koşullarda gerçekleşir. Bu zor koşullar enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişikliğe yol açabilir. Bu da önemli miktarda aktivite kaybı ile sonuçlanabilir. Fakat çapraz bağlanmada enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlar çok kuvvetli olduğundan pH, sıcaklık ve iyon şiddetindeki değişimler sonucunda enzim taşıyıcıdan sızmaz ve kararlılığını korur [55].

#### **3.3.1.5. Tutuklama yöntemi**

Tutuklama metoduyla immobilizasyonda enzim kafes görevi gören polimer matris veya membran içerisinde tutulmaktadır. Bu tutulma öyle bir şekilde gerçekleşir ki, substratın içeri girmesine izin verilirken, protein de içeride muhafaza edilmektedir. Bu yöntemin kovalent bağlanma ve çapraz bağlanmadan farkı enzimin çözeltide serbest olması, ancak jel matris ya da membran içerisinde tutularak hareketinin kısıtlanmasıdır. Bu nedenle tutuklama yöntemi geniş uygulanabilirlik alanı kazanmıştır [55].

Tutuklama metodunun en önemli avantajı tekil enzimlerin dışında değişik tipte enzim, organel ve hücrelerin de hemen hemen aynı prosedürle immobilize edilebilir olmasıdır. Ayrıca biyokatalizörlerin çeşitli modifikasyonlara uğramamaları ve immobilizasyonun yüksek molekül ağırlıklı enzim inhibitörlerinin etkisini elimine

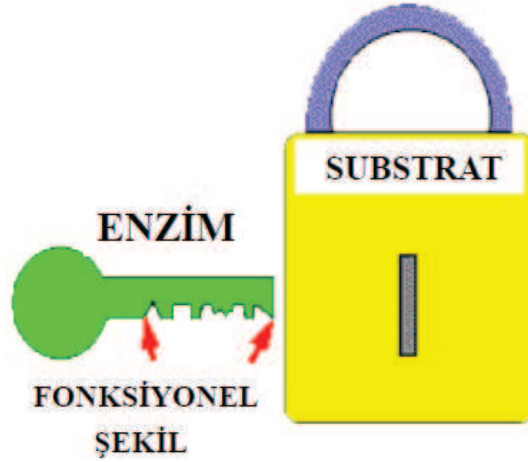
etmesi de yöntemin avantajları arasında sayılmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı substratların enzime zorlukla tutunmaları ve taşıyıcıların yeniden elde edilemez olması yöntemin dezavantajlarından [67].

### 3.4. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi ve Aktiviteyi Etkileyen Faktörler

Enzim aktivitesi; belirli bir zamanda ve belirli başlangıç şartlarında, bilinen bir enzim miktarının etkisiyle değişime uğrayan substrat miktarının ölçülebilmesiyle ifade edilen değerdir.

Herhangi bir enzim için ideal bir aktivite belirleme yolu yoktur. Çünkü bir yöntemin uygunluğu belirli faktörlere bağlıdır. Bunların başında, enzimin saflığı, fizikokimyasal özellikleri, katalizlediği reaksiyonun tipi, lokalize olduğu yer, ölçüm yönteminin maliyeti, eldeki mevcut ölçüm cihazlarının niteliği ve ölçümün duyarlılığı ile ilgili zorunluluklar gelmektedir. Enzimler ile substrat arasındaki ilişki anahtar kilit modeli ile açıklanabilir (Şekil 3.3.). Enzimler, biyolojik ortamda çok az miktarda buldukları için miktarlarının ölçümü çok zordur, ancak aktiviteleri ölçülebilir. Bir enzimin aktivitesini çeşitli yollardan ifade etmek olasıdır. Örneğin, 1 mg enzim proteini tarafından birim zamanda meydana getirilen absorban değişikliği bir birim olarak ifade edilebilir. Fakat dünya genelinde, elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek için daha standart bir birim tanımlaması geliştirilmiştir. Bu standart birim Uluslararası ünite (International Unit; IU) veya enzim ünitesi olarak ifade edilmekte olup, 1 IU 1 mikromol substratı 1 dakika içinde katalizleyen enzim aktivitesi olarak tanımlanır.

Ortam pH'ı, sıcaklık, enzim derişimi, substrat derişimi, inhibitör, ışınlama ve zaman enzim aktivitesini etkileyen faktörlerdir. Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu derişimine bağlı olarak aktiviteleri değişmektedir. Bazı enzimler düşük pH seviyelerinde (asidik ortamda) daha aktif olmakla beraber, bazıları ise yüksek pH'lı ortamlarda (bazik ortamda) etkindir. Genel olarak enzim aktivitesi nötral ortamlarda en fazla olmaktadır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'a, o enzimin optimum pH'ı adı verilir.



Şekil 3.3. Enzimlerin anahtar-kilit modeli örneği [60]

Genel aralık olarak enzimlerin optimum pH'ı 4,5-8,0 arasında bulunmaktadır. Enzimatik çalışmalarda pH'ı optimumda sabit tutmak için tampon çözeltiler kullanılır. Optimum pH, kullanılan tamponun cinsine, özel substratın yapısına ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlıdır.

Sıcaklık yükseldikçe enzimlerin aktiviteleri de artar ve belli bir derecede en yüksek aktiviteye ulaşır. Bu derece o enzimin en aktif olduğu sıcaklıktır. Ancak sıcaklık belli bir dereceye ulaştıktan sonra enzim, aktivitesini ve kararlılığını yitirmeye başlar. Bunun nedeni enzimlerin protein yapısında bulunması ve belli sıcaklıklarda proteinlerin denatüre olmasıdır. Yüksek sıcaklıklarda enzimlerin aktivitelerini kaybetmeleri, enzimlerin ısıl inaktivasyonu veya denatürasyonu olarak tanımlanır. Denatürasyon hızı diğer reaksiyonlar için de geçerli olan klasik Arrhenius eşitliğine göre değişir.

Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin substratına doymuş olduğu koşullarda enzim derişimine bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekölü ne kadar fazlaysa reaksiyon o kadar hızlı yürür. Enzimin hücrede lokalize olduğu bölgede yeterincesubstrat bulunmadığı için reaksiyon in vitro deneylerde gözleendiği gibi hızlı gerçekleşmez. Substratın bol olduğu koşullarda reaksiyon hızı enzim derişimi ile doğru orantılıdır. Enzim reaksiyonlarının hızı belirli bir sürede üretilen ürün miktarı ile belirlenmektedir. Enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyon sürerken

reaksiyonun hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen/inhibe eden maddelerin oluşması ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. İnhibitörler, substratın enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önleyen substrat veya analogu, ürün ve diğer kimyasallardır. Bu faktörlerin olası etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim kinetik çalışmaları çoğunlukla kesikli ortamda (batch) substratın yaklaşık %10'u sarf edilene kadar reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir [79].

### 3.5. Enzim Kinetiği

Tek substratlı enzim katalizli reaksiyonların matematiksel modeli ilk olarak V.C.R. Henri (1902) ve L. Michealis ile M. L. Menten (1913) tarafından geliştirilmiştir [80]. Kompleks olmayan enzim katalizli reaksiyonların kinetiği genellikle Michealis-Menten kinetiği veya doyumluk kinetiği olarak adlandırılır.

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce “Enzim-Substrat kompleksi” oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve tekrar enzime dönüşür. Enzim kinetiği mekanizması aşağıdaki (Denklem 3.1) şekilde gösterilir:



Burada enzim-substrat kompleksi [ES]; enzim [E] ve substrat [S]'den  $k_1$  hız sabiti ile oluşur. Bu reaksiyonun hızlı ve tersinir olduğu, kimyasal bir değişim olmadan enzim ile substratın bir arada fiziksel kuvvetler yardımıyla buldukları kabul edilir. Daha sonra [ES] kompleksi,  $k_{-1}$  hız sabitli geri reaksiyonla ve  $k_2$  hız sabiti ile ürün ve enzime ayrışır. Reaksiyon kararlı duruma ulaştınca “Kararlı Durum İlkesine” göre [ES]'nin oluşma hızı ayrışma hızına eşit olur, yani derişimi zamanla değişmez.

Katalitik reaksiyon iki ayrı basamağa ayrılmıştır; ilk olarak enzim ile substrat birleşerek enzim-substrat kompleksini [ES] oluşturmaktadırlar. Bu basamağın hızlı ve tersinir olduğu, kimyasal bir değişim olmadan enzim ile substratın bir arada fiziksel kuvvetler yardımıyla buldukları kabul edilir. Daha sonra [ES] kompleksi ürünlere ve enzime ayrışır. Burada gerçekleşen reaksiyon birinci derecedendir ve reaksiyon sabiti  $k_2$  dir.

Denklem 3.1 kullanılarak;

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (3.2)$$

Denklemleri elde edilebilir. [ES] kompleksinin değişim hızı aşağıdaki gibidir;

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (3.3)$$

Enzim harcanmadığı için, enzimin kütle korunumundan;

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (3.4)$$

olur. Yatışkın durum yaklaşımı denklem (3.3)'e uygulanarak;

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad (3.5)$$

eşitliği elde edilir. Enzimin korunumu denklemleri (3.4), denklem (3.5)'te yerine konularak;

$$[ES] = \frac{k_1([E_0] - [ES])[S]}{k_{-1} + k_2} \quad (3.6)$$

denklemlere ulaşılır. Bu denklem (3.2)'de yerine konularak düzenlendiği zaman;

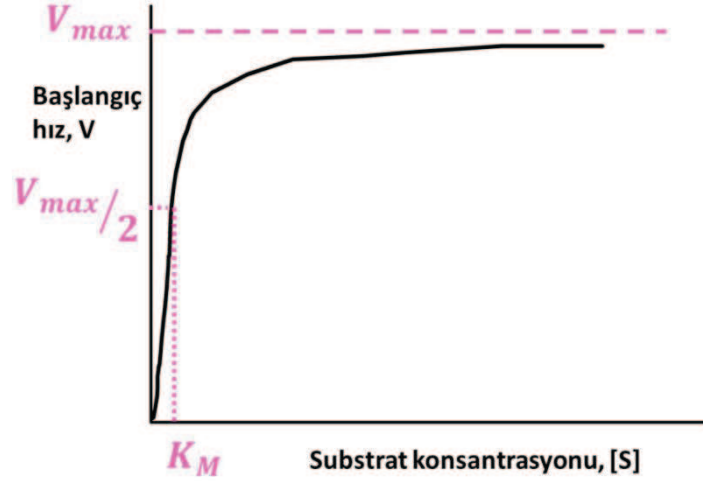
$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (3.7)$$

eşitliği elde edilir. Burada  $K_m$   $((k_{-1}+k_2)/k_1)$  ve  $V_m$   $(k_2[E_0])$ 'dır. Bu durumda reaksiyonun maksimum ileri hızı  $V_m$ 'dir. Enzim derişiminin artırılması ile  $V_m$  değişir, ancak substrat derişiminin artırılması ile değişmez.  $K_m$ , Michealis-Menten sabiti veya doygunluk sabiti olarak bilinir.  $K_m$ 'nin değerinin düşük olması enzimin substrata afinitesinin yüksek olduğunu gösterir. Aynı zamanda  $K_m$ , maksimum reaksiyon hızının yarısına karşılık gelen substrat derişimini de gösterir [80].

Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağlılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 3.4.). Bu grafikte  $V_{\max}$ ; hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına ( $V_{\max}/2$ ) karşılık gelen substrat derişimi  $K_m$  (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir.  $V_{\max}$  ve  $K_m$ , bir enzimin aktivitesini belirleyen özgün enzim sabitleridir. Enzimin substrata ilgisi ne kadar fazla ise  $K_m$  değeri o kadar küçüktür.

Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat derişimi düşük olacağından ( $[S] \ll K_m$ ) grafik doğrusaldır. Burada reaksiyon hızı birinci derecedendir. İkinci bölgede substrat derişimi arttıkça reaksiyon derecesi birden sıfıra doğru azalır. Üçüncü bölgede  $[S] \gg K_m$ 'dir.  $V=V_{\max}$  olur ve reaksiyon değişmez bir hızla sıfırıncı dereceden devam eder [79,81].

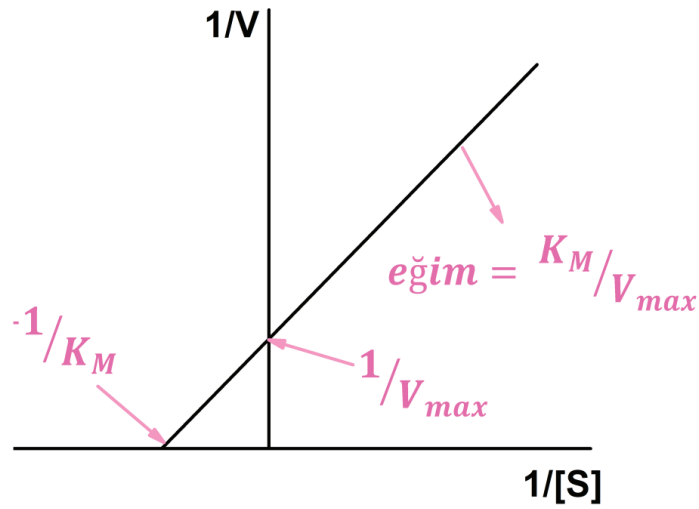
Michealis-Menten eşitliğinin doğrusallaştırılması, verilerin incelenmesini ve ideal davranıştan sapmaların belirlenmesini kolaylaştırır. En çok kullanılan doğrusallaştırma yöntemi Lineweaver-Burk çizimidir. Denklem 3.7'nin her iki tarafı ters çevrilip düzenlendiği zaman doğrusallaştırılmış Lineweaver-Burk denklemini (Denklem 3.8) verir.



Şekil 3.4. Enzim katalizli bir reaksiyon için substrat derişiminin ( $[S]$ ) reaksiyon hızına ( $V$ ) etkisi

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max} [S]} \quad (3.8)$$

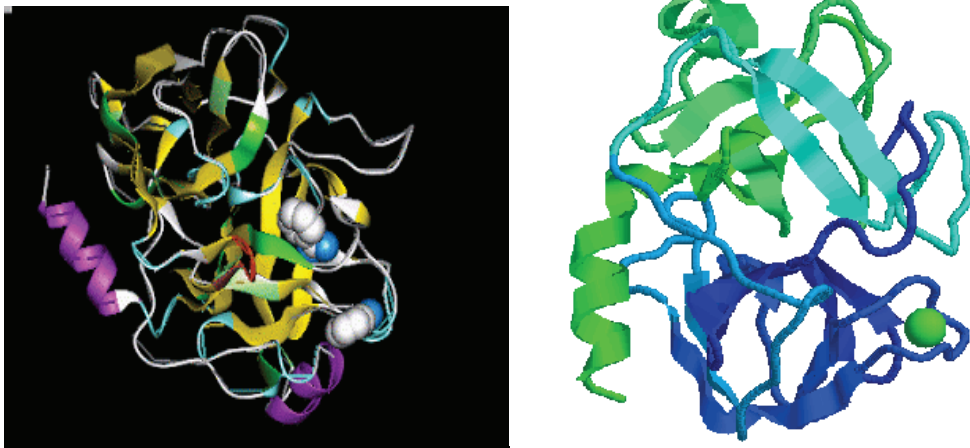
$1/V$ 'ye karşı  $1/[S]$ 'nin çizilmesi ile eğimi  $K_m/V_{\max}$  ve y eksenini kestiği nokta  $1/V_{\max}$ 'yi veren bir doğru elde edilir (Şekil 3.5.).  $1/V$ 'ye karşı  $1/S$  çizimi  $V_{\max}$  değeri için uygun değerler verir, ancak bir veri noktasının tersi için hatanın aynı olmaması  $K_m$  değerinin tam olarak bulunmasını engeller. Elde edilecek doğrunun eğimi ve kesim noktasını düşük substrat derişimlerdeki veri noktaları yüksek derişim verilerine göre daha çok etkiler.



Şekil 3.5. Substrat derişiminin ( $1/[S]$ ) reaksiyon hızına ( $1/V$ ) etkisinin doğrusallaştırılmış verilerle Lineweaver-Burk grafiği

### 3.6. Tripsin Enzimi ve Uygulamaları

Tripsin (3.4.21.4) (Şekil 3.6.) [82,83], serin proteaz ailesinden endopeptidaz sınıfı bir enzim olup proteinlerin lizin ve arginin artıklarının karbonil uçlarının spesifik hidrolizinden sorumludur. Proteazlar ligand-protein etkileşimlerini çalışmak için önemli model sistemlerdir. Yapısal ve enerjik özellik seçiciliğinden sorumludurlar [84] ve geniş olarak endüstriyel ve biyomedikal uygulamalarda kullanılır. Bunların arasında da tripsin en yoğun ilgi duyulandır [85]. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 23.000 Dalton'dur (223 amino asit artığı) ve esas florofor olarak kullanılabilen dört triptofana sahip olan [86–88] tripsin, tripsinojen olarak adlandırılan uzun, inaktif öncü protein (zimojen) şeklinde pankreastan salgılanır. Tripsinojen onikiparmak bağırsağına geldiğinde, bağırsak mukozasından salgılanan ve tripsinojenin aktif forma geçmesinde öncü olan “enterokinaz” enzimi tarafından yıkıma uğratılır ve aktif tripsin formuna geçer. Oluşan tripsin daha sonra tripsinojen aktivasyonunu otokatalitik olarak gerçekleştirirken diğer proteazların aktivitesinden de sorumlu olmaktadır [84,89].



Şekil 3.6. Tripsinin 2D kristal yapısı [82] ve primer yapısı [83]

Tripsin suda çözünebilir ve omurgalıların sindirim prosesinde önemli bir rol oynar [90]. Tripsin, protein sindirimi için yüksek yarımlama özelliğinden dolayı geniş bir şekilde kullanılan enzimdir. İmmobilize tripsin protein sindirimi için birçok avantaj sağlar [91]. Tripsin, aynı zamanda otolize karşı enzim aktivite ve stabilitesi ile ilişkili olarak bilhassa enzim özelliklerini geliştirmeye yol açan farklı etkileşimlerle,



paramanyetik gözenekli cam boncuklar ve amin fonksiyonelli manyetik nanokürecikler gibi çeşitli inorganik maddeler üzerine immobilize edilmektedir [92,93].

Tripsin birçok endüstriyel uygulamalara sahiptir ve kandaki proteinlerin kullanımı [94], transesterleşme [95], proteinlerin tespiti için biosensörlerde [96], tripsin inhibitörlerinin saflaştırılması [97,98] ve peptid sentezlerinde [99-102] kullanılmaktadır. Aynı zamanda aminoasit analizleri, proteinlerin sekanslama, haritalama ve yapısal çalışmaları, doku kültür camlarından yapışmış hücrelerin çıkarılması ve soya tripsin inhibitörlerinin saflaştırılması gibi geniş bir uygulama alanına sahiptir. Tripsin, peptid bağlarını çok spesifik olarak hidrolizlemesinden dolayı özellikle sekans çalışmalarında önemli bir araç haline gelmiştir. İmmobilize tripsin otolizi elimine etmesi, örneklerin proteaz tarafından kirletilmemesi, uzaklaştırılabilirliği ile kontrollü parçalamaya olanak sağlaması gibi avantajlarından dolayı uygulama alanlarında serbest tripsine göre daha tercih edilir bir konuma gelmiştir [103].

Tripsin enzimi nötral proteazların en az kararlılarından bir tanesi olmasına rağmen, protein hidrolizi tripsin kullanılarak gerçekleştirilir [104]. Buna ek olarak, çözeltideki tripsinin hızlı otolizi karışan ve istenmeyen parçaları üretir [105] ve aynı zamanda, reaksiyon durumlarını kontrol etmek için onu canlandırır. Böylece katalitik etkideki bir azalmaya ve maliyette önemli bir artışa neden olur [106]. Enzim immobilizasyonu artan kararlılık, otolize karşı koruma ve katalitik maddelerin tekrar kullanımının olasılığı avantajlarını sağlar. Ancak, başarılı bir şekilde immobilize enzimin hazırlanışı, çalışılan immobilizasyon metoduna ve desteğin kimyasal karakteristiklerine önemli ölçüde bağlıdır. İmmobilize enzim, kütle spektrometresi (MS) sonuçlarında enzim parçalarının etkisi elenebilir diye MS analizlerinden önce protein sindirimlerinden kolayca izole edilebilir [78]. Daha önemlisi, proteazlar biyouyumlu katı desteklere immobilize edildiğinde, enzimin kararlılığı artırılabilmiştir [107]. Son zamanlarda, tripsin proteinlerin parçalanması için bioreaktörleri üretmeye sol-jel enkapsülleme [108], kovalent bağlanma [109], ve

çoklu tabaka toplanma [110] yaklaşımlar tarafından mikroçiplerdeki kanal duvarlara immobilize edilmektedir.

## **BÖLÜM 4. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **4.1. Materyal**

#### **4.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler**

FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (>%99), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (>%99), amonyak çözeltisi (NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O, %25, w/w), tannik asit, tanin, gallik asit, sodyum klorür, tris(hidroksimetil)- aminometan (%99,8–100,1, TRIS), sodyum hidroksit (≥%97), etanol (>%99,2) Merck (Almanya)'den ve HCl, N $\alpha$ -Benzoil-DL-arginin 4-nitroanilit hidroklorit (BAPNA, %98), tripsin (inek pankreasından), Albumin (inek serumundan) (BSA)(98%, agoroz jel elektroforezi), Bradford reaktifi, kazein, 4-nitroanilin (*p*-nitroanilin), tetrametiletilendiamin (TEMED), amonyum persülfat (APS), sodyum dodesil sülfat (SDS),  $\beta$ -merkaptotanol (%99,0), asetik asit, metanol (>%99,8), dimetilsülfoksit (DMSO), amonyum bikarbonat Sigma-Aldrich (USA) firmasından temin edilmiştir. Etilen glikol (EG) (%99, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) ve amonyum hidrojen fosfat Tekkim (Türkiye)'den alınmıştır. PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder protein belirteci Thermo Scientific firmasından temin edilmiştir. Elektroforez alt ve üst jel çözeltileri Bio-rad (United States) firmasından alınmıştır. Tüm su içeren çözeltiler Millipore Milli-Q Plus su saflaştırma sisteminde deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır. Kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıktadır.

### **4.2. Yöntem**

#### **4.2.1. Kullanılan cihazlar**

Manyetik nanopartiküllerin atomik ve moleküler yapısı Cu KR ( $\lambda$ ) 0,154 nm radyasyonda RIGAKU D max 2200 marka X-ışınım kırınımı (XRD) cihazı ile

yapılmıştır. Setaram thermogravimetric analyzer (TGA) (Setsys Evolution, France) marka termogravimetrik analiz cihazı kullanılmıştır. Bu cihazda numune ağırlığı 15–17 mg'dır. Analiz argon atmosferinde oda sıcaklığından 1000 °C ye kadar 10 °C/dk ısıtmalı olarak, 20 mL/dk gaz akış hızında yapılmıştır. Hazırlanan numunelerin tanecik boyutu ve morfolojisi 20 kV da JEOL JSM-6060 LV marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak yapılmıştır. Manyetik nanopartikül ve modifiye nanopartiküllerin yapısal farklılıkları Shimadzu IR Prestige 21 Fourier Transformation infrared spektrofotometre (FTIR) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Manyetik nanopartiküllerin manyetik eğrileri oda (300 K) sıcaklığında titreşen örnek magnetometresi (VSM), LakeShore-7407, USA cihazı kullanılarak alınmıştır. Tripsin enzimi ve immobilize tripsin enzimi için yapılan tüm aktivite ölçümleri için Shimadzu UV-2401PC marka ultraviyole spektrofotometre kullanılmıştır. Tripsin enzimi ve immobilize tripsin enziminin taneler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümü için Malvern Zeta Sizer (Nano-ZS) marka cihaz kullanılarak, 30 °C de belirlenen pH aralıklarında izoelektrik nokta ve elektrostatik dağılıma kontrolü ölçümü yapılmıştır. Serbest tripsin enzimi ve immobilize tripsin enziminin BSA ve kazein proteinlerinin sindirimi için AB SCIEX 4000QTRAP Sıvı Kromatografi-Kütle spektrometresi (LC-MS/MS) sistemi kullanılmıştır. Yine enzim çalışmaları için BİO-RAD mini-PROTEAN tetra cell marka elektroforez cihazı kullanılmıştır. Sıcaklık kontrollü çalkama deneyleri için IKA KS 4000 i marka çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır. Deney boyunca kullanılan sular deiyonize saf su olup Milli-Q Millipore cihazı ile elde edilmiştir. Nüve FN500 marka etüv, Mettler Toledo seven easy marka pH metre, Isolab marka vorteks, maksimum 210 g minimum 10 mg kapasiteli And (gr 200) marka terazi, Arçelik marka buzdolabı, Eppendorf 5000 marka pipet ve Elma marka ultrasonik banyo kullanılmıştır.

#### **4.2.2. Kullanılan çözeltiler**

##### **4.2.2.1. Asetat tampon çözelti hazırlanması**

Asetat tampon çözeltisi (0,1 M, pH=4): 0,5103 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 1,275 g  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ilave edilmiş ve

pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 250 mL lik balon jojeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

Asetat tampon çözeltisi (0,1 M, pH=5): 1,7445 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 0,4308 g  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ilave edilmiş ve pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 250 mL lik balon jojeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

Asetat tampon çözeltisi (0,1 M, pH=6): 1,2873 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 0,0318 g  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ilave edilmiş ve pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 100 mL lik balon jojeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

#### 4.2.2.2. Fosfat tampon çözelti hazırlanması

Fosfat tampon çözeltisi (0,1 M, pH=6): 1,128 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 0,0837 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ilave edilmiş ve pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 100 mL lik balon jojeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

Fosfat tampon çözeltisi (0,1 M, pH=7): 0,7356 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 0,5495 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ilave edilmiş ve pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 100 mL lik balon jojeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

Fosfat tampon çözeltisi (0,1 M, pH=7,5): 1,998 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 4,7286 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ilave edilmiş ve pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 500 mL lik balon jojeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

Fosfat tampon çözeltisi (0,1 M, pH=8): 0,1642 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 1,2257 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ilave edilmiş ve pH

metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 100 mL lik balon jöjeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

#### **4.2.2.3. Tris-HCl tampon çözelti hazırlanması**

Tris-HCl tampon çözeltisi (0,1 M, pH=8): 1,21 g tris bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 1 M HCl kontrollü bir şekilde damla damla ilave edilerek pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 100 mL lik balon jöjeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

Tris-HCl tampon çözeltisi (0,1 M, pH=9): 1,21 g tris bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 1 M HCl kontrollü bir şekilde damla damla ilave edilerek pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 100 mL lik balon jöjeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

#### **4.2.2.4. Bikarbonat tampon çözelti hazırlanması**

Bikarbonat tampon çözeltisi (0,1 M, pH=9): 0,0019 g  $\text{NaHCO}_3$  bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 1,0607 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ilave edilerek pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 100 mL lik balon jöjeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

Bikarbonat tampon çözeltisi (0,1 M, pH=10): 0,0020 g  $\text{NaHCO}_3$  bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 1,0589 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ilave edilerek pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 100 mL lik balon jöjeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

Bikarbonat tampon çözeltisi (0,1 M, pH=10,5): 0,0001 g  $\text{NaHCO}_3$  bir behere alınmış ve bir miktar deiyonize suda çözülmüştür. Üzerine 1,0559 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ilave edilerek pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir. 100 mL lik balon jöjeye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

#### 4.2.2.5. %0,9 luk NaCl çözeltisinin hazırlanması

2,25 g NaCl 250 mL lik balon jøjeye alınmış ve üzeri 250 mL'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

#### 4.2.2.6. 1 mM HCl çözeltisinin hazırlanması

1 M HCl den 0,25 mL 250 mL lik balon jøjeye alınmış ve üzeri deiyonize su ile tamamlanmıştır.

#### 4.2.2.7. %0,1 lik BApNA çözeltisinin hazırlanması

10 mg  $\alpha$ -Benzoil-DL-arginin 4-nitroanilit hidroklorit (BApNA), 0,2 mL dimetil sülfoksit (DMSO) ve 9,8 mL deiyonize su ile çözelti hazırlanmıştır (10 mL ve katları istenirse oran artırılarak çözelti hazırlanmıştır).

#### 4.2.2.8. 0,1 M $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ (pH=8) çözeltisinin hazırlanması

0,79 g  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mL lik balon jøjeye alınmıştır. Üzeri 100 mL oluncaya kadar deiyonize su ile tamamlanmıştır. pH metre yardımı ile pH'ı kontrol edilmiştir.

#### 4.2.2.9. Elektroforez çalışması için yürütme tampon çözeltisinin hazırlanması

4,5 g Tris bazı, 22,5 g glisin ve 1,5 mL SDS (%10, W/V) 1500 mL'lik balon jøjeye alınmış ve üzeri deiyonize su ile tamamlanmıştır.

#### 4.2.2.10. Elektroforez çalışması için yükleme tampon çözeltisinin hazırlanması

1,0 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 1,6 mL glisin, 0,2 mL %10 SDS (W/V), 0,4 mL  $\beta$ -merkaptöetanol, 8,0 mL deiyonize su ve çok az miktarda bromfenol mavisi ilave edilerek hazırlanmıştır.

#### 4.2.2.11. Elektroforez çalışması için fiksasyon çözeltisinin hazırlanması

250 mL metanol (%50,V/V) ve 50 mL asetik asit (%10,V/V) çözeltisi 500 mL'lik bir balon jöjeye konulmuş ve deiyonize su ile 500 mL hacime tamamlanmıştır (%10, V/V).

#### 4.2.2.12. Elektroforez çalışması için boya çözeltisinin hazırlanması

55 g amonyum sülfat 220 mL deiyonize suda çözülerek (%17, W/V) A çözeltisi hazırlanmıştır. 0,2 g Coomassie G250 (%0,065, W/V), 110 mL metanol (%34, V/V) ve 10 mL fosforik asit (%3, V/V) içerisinde çözülerek B çözeltisi hazırlanmıştır. Boya çözeltisi, boyamadan hemen önce karıştırılmakta olan B çözeltisi üzerine A çözeltisi ilave edilerek hazırlanmıştır.

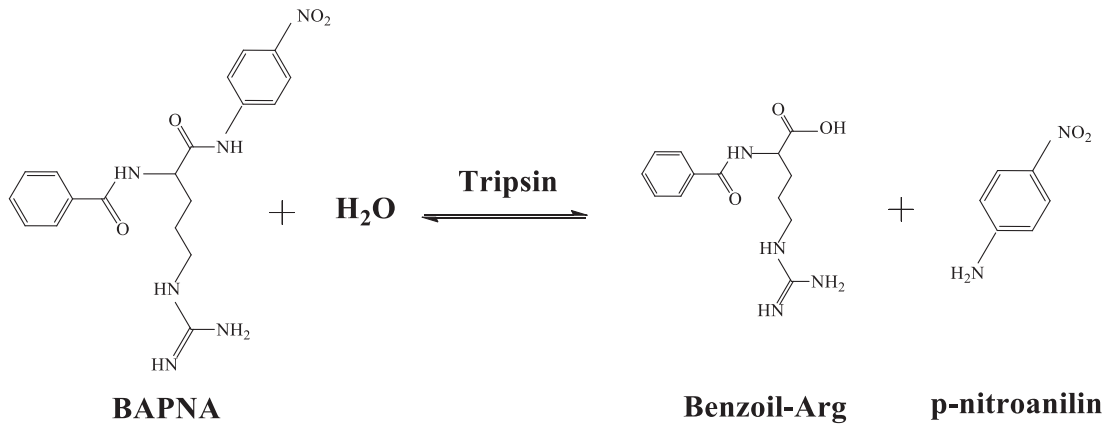
#### 4.2.2.13. Elektroforez çalışması için boya çıkarma çözeltisinin hazırlanması

100 mL asetik asit çözeltisi 1 L'lik balon jöjeye alınmış ve deiyonize su ile 1 L hacime taamlanmıştır (%10, V/V).

### 4.3. Tripsin Aktivite Tayini

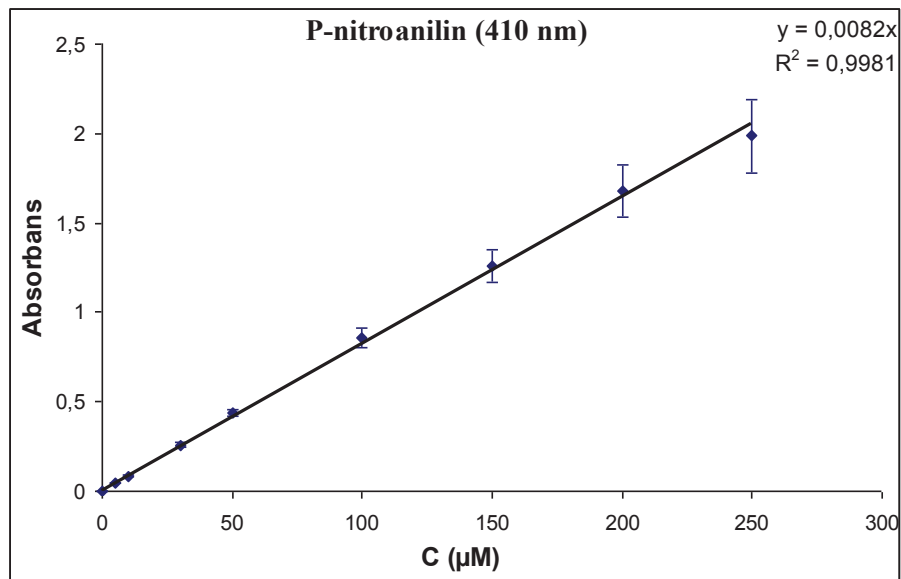
Tripsin aktivitesi, sentetik bir substrat olan N $\alpha$ -Benzoil-DL-arginin 4-nitroanilit hidroklorit (BAPNA) kullanılarak tayin edilir. Prosedürün temeli, reaksiyon sonucu açığa çıkan p-nitro anilinin 410 nm'de spektrofotometrik ölçümüne dayanır (Şekil 4.1.). Bir tripsin aktivite birimi (Unit), optimum koşullarda dakikada 1  $\mu$ mol p-nitro analin açığa çıkaran enzim miktarı olarak ifade edilir [111,112].





Şekil 4.1. BApNA nın Tripsin ile p-nitroaniline dönüşümü

5-250  $\mu\text{M}$  / 2 mL konsantrasyon aralığında hazırlanan p-nitro anilin standart grafiği (Şekil 4.2.) kullanılarak enzim aktivitesi sonucu oluşan p-nitro anilin konsantrasyonları hesaplanmaktadır (Bu grafik her ölçümden önce tekrarlanmıştır. Bu grafik sadece örnektir).



Şekil 4.2. Standart p-nitroanilin C( $\mu\text{M}$ )- absorbans grafiği ( $\lambda_{\text{max}}=410$  nm)

#### 4.3.1. Serbest tripsin aktivite tayini

Serbest tripsin aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 1067  $\mu\text{L}$  0,1 M pH 7,5 fosfat tamponu, aynı tamponda hazırlanan 133  $\mu\text{L}$  tripsin (10 mg/ml), 133  $\mu\text{L}$  %0,9'lük NaCl, ve %0,1'lik 667  $\mu\text{L}$  BApNA içermektedir. Kör olarak aynı reaksiyon

karışımında tripsin çözeltisi yerine 133 µL 1 mM HCl kullanılmıştır (Tablo 4.1). Karışım 28 °C’de 10 dakika inkübasyon yapılmış ve 410 nm de absorbansı okunmuştur.

Tablo 4.1. Serbest tripsin aktivite ölçüm protokolü

	KÖR (µL)	ÖRNEK (µL)
<b>Fosfat Tamponu (0,1 M, pH=7,5)</b>	1067	1067
<b>HCl (1 mM)</b>	133	–
<b>Tripsin (10 mg/mL)</b>	–	133
<b>NaCl (%0,9)</b>	133	133
<b>BAPNA (%0,1)</b>	667	667
<b>28 °C’de 10 dakika inkübasyon</b>		
<b>410 nm de köre karşı absorbansı okunur.</b>		

#### 4.3.2. İmmobilize tripsin aktivite tayini

İmmobilize tripsin aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 1200 µL 0,1 M pH 7,5 fosfat tamponu, 133 µL % 0,9’luk NaCl, 0,01 g immobilize tripsin ve % 0,1’lik 667 µL BAPNA içermektedir. Kör olarak aynı reaksiyon karışımında immobilize tripsin yerine 0,01 g tripsin bağlanmadan önceki modifiye Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> kullanılmıştır (Tablo 4.2). Karışım 28 °C’de 10 dakika inkübasyon yapılmış ve 410 nm de absorbansı okunmuştur.

#### 4.4. Protein Tayini (Bradford Metodu)

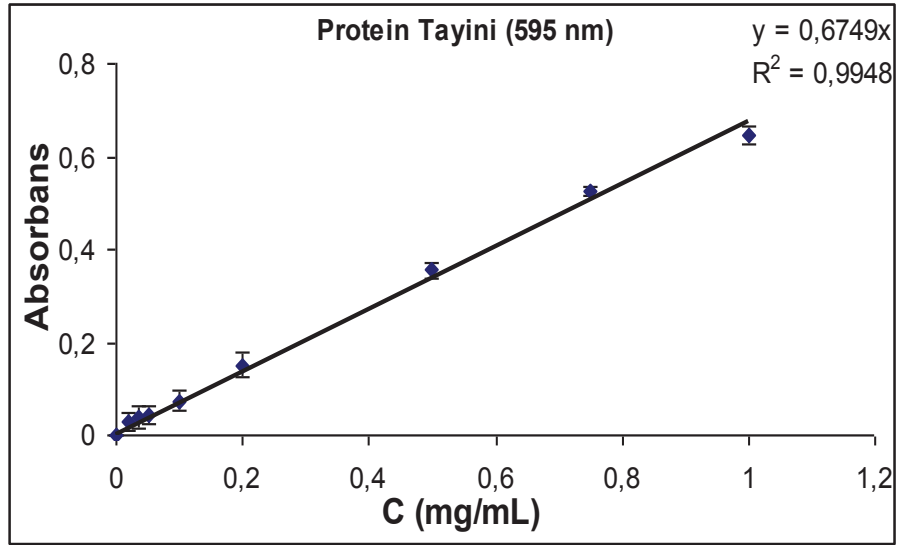
Boya bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından gerçekleştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Bradford metodu kantitatif protein tayini için sık sık biyokimya ve biyoteknoloji laboratuvarlarında gereklidir. Yöntem, organik boyaların asidik grupları ile

Tablo 4.2. İmmobilize tripsin aktivite ölçüm protokolü

	KÖR (µL)	ÖRNEK (µL)
<b>Fosfat Tamponu (0,1 M, pH=7,5)</b>	1200	1200
<b>HCl (1 mM)</b>	-	-
<b>Tripsin</b>	0,01 g Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> +TA	0,01 g immobilize tripsin
<b>NaCl (%0,9)</b>	133	133
<b>BAPNA (%0,1)</b>	667	667
<b>28 °C'de 10 dakika inkübasyon</b>		
<b>410 nm de köre karşı absorbanı okunur.</b>		

proteinlerin bazik gruplarının (Lys, Arg) etkileşerek renk oluşturması esasına dayanmaktadır. Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyondaki protein çözeltilerinde farklı şiddette mavi renk oluşturmasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Boya özellikle arginin gibi bazik aminoasitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanmaktadır. Bu yöntemle oldukça geniş bir aralıkta protein tayini yapmak mümkündür [113].

Tripsin immobilizasyon sonrası yıkama sularının tayini Bradford metodu ile gerçekleştirilmiştir. İmmobilize enzim içerisindeki protein miktarı Bradford metoduna göre tayin edilebilmesi için standart olarak Bovine serum albumin (BSA) in belirli konsantrasyonlardaki (0,02-0,035-0,05-0,1-0,2-0,5-0,75-1 mg/mL) çözeltileri hazırlanarak bu çözeltilerin 1 mL si 3 mL Bradford reaktifi (Coomassie Brilliant Blue G-250) ile etkileştirilip 595 nm dalga boyundaki absorbanları UV-visible spektrofotometresinde ölçülmüştür. Standart olarak, absorban-protein miktarı (mg/mL) grafiği çizilmiş (Şekil 4.3.) ve yapılan bütün protein çalışmalarında bu grafik referans alınmıştır (Bu grafik her ölçümden önce tekrarlanmıştır. Bu grafik sadece örnektir). Protein miktarları Şekil 4.3. grafiği esas alınarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. Standart BSA protein miktarı C(mg/mL)- absorbans grafiği( $\lambda_{max}=595$  nm)

Bradford reaktifi hazır olarak alındığı gibi laboratuvar ortamında da hazırlanabilir. Bradford reaktifi: 40 mg Coomassie Brilliant Blue G250, %95'lik 50 mL etanolde çözülür, üzerine 55 mL % 88'lik fosforik asit ilave edilerek distile su ile 1 L'ye tamamlanıp filtre edilir.

#### 4.5. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Sentezi

##### 4.5.1. Kimyasal çöktürme yöntemi ile Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sentezi

Manyetik nanopartiküllerin boyut, şekil ve bileşimleri kullanılan tuzların tiplerine, Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> oranına, reaksiyon sıcaklığına, pH değerine, ortamın iyonik şiddetine ve zamana bağlıdır [114].

Kimyasal çöktürmede en önemli nokta uygun pH ortamında ve Fe<sup>2+</sup> ve Fe<sup>3+</sup> iyonlarının reaksiyona girme oranları daha önceki çalışmalarda 1:1,1:1.25,1:1.50,1:1.75 oranları denenerek en uygun değer 1:1.75 olduğu bulunmuştur [115].

Bu çalışmada, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (270,33 g/mol) ve FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (278,02 g/mol) 500 mL lik deney balonuna alınmış (Fe<sup>2+</sup>/ Fe<sup>3+</sup>: 1/1.75) ve 320 mL deiyonize suda

çözölmüştür. Çözelti 80 °C de N<sub>2</sub> atmosferinde 1 saat geri soğutucu altında karıştırılmıştır. Daha sonra Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> çöktürmek için 40 mL %25'lik NH<sub>4</sub>OH baz çözeltisi ilave edilerek aynı koşullarda 1 saat karıştırılmıştır. 1 saat sonunda sıcaklık kapatılmış ve çözeltide kalan baz fazlasını gidermek için 1 kez sıcak saf su 2 kez saf su ile yıkama işlemi yapılarak çökelti magnet yardımı ile ayrılmıştır. Çökeltinin kuruması için vakumlu etüvde 70 °C de bir gece bekletilmiştir [115]. Sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküller (MNP) sonraki kullanımlar için desikatörde bekletilmiştir.

#### 4.5.2. Solvotermal yöntem ile Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sentezi

Solvotermal yöntemde FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (5,44 g) ve NaAc (14,4 g) 250 mL lik behere alınmış ve üzerine 160 mL etilen glikol (EG) ilave edilerek 200 rpm de 1 saat karıştırılmıştır. Homojen bir karışım sağlandıktan sonra karışım 50 mL lik teflon kaplara konulmuş ve paslanmaz çelik otoklava yerleştirilmiştir. Otoklav vidaları ile sıkıca kapatılarak 200 °C de 8 saat ısıtılmıştır. 8 saat sonunda sıcaklık kapatılmış ve karışım oda sıcaklığına soğutulmuştur. Karışım deiyonize su ve etanol ile yıkanarak magnet yardımı ile süzütüsünden ayrılmıştır. Çökeltinin kuruması için vakumlu etüvde 60 °C de bir gece bekletilmiştir [116,117]. Sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküller (MNP) sonraki kullanımlar için desikatörde bekletilmiştir.

#### 4.6. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanopartiküllerin Organik Maddelerle Fonksiyonelleştirilmesi

Manyetik nanopartikülleri organik maddelerle fonksiyonelleştirmek için tannik asit, tanin ve gallik asit gibi fenolik ve polifenolik yapılar seçilmiştir. Fenolik ve polifenolik yapıların seçilmesindeki en önemli etken; alkaloid, jelatin ve diğer proteinlere bağlanabilme yeteneği gibi özelliklere sahip fenolik reaksiyon veren ve su ile çözünebilen bileşikler olması ve daha az oranla da metal iyonları, aminoasitler ve polisakkaritlerle karmaşık yapılar oluşturmalarıdır. Ayrıca polifenoller, proteinler ve polisakkaritler gibi diğer bitkisel polimerlerle kararlı bileşikler oluşturabilen maddeler olarak tanımlanırlar [118, 119].

#### 4.6.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin tannik asit ile fonksiyonelleştirilmesi

1,0551 g Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülleri üzerine 0,5 g tannik asitin 40 mL sudaki çözeltisi hazırlanarak 40 °C de azot atmosferinde bir saat geri soğutucu altında karıştırılarak demir nanopartiküllerine modifikasyonu sağlanmıştır. Bir saat sonunda karışım bir magnet yardımı ile çekilip, süzütünün dekantasyonla süzülmesi sağlanmıştır. Deiyonize su ile yıkama yapılarak süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. 70 °C de bir gece vakumlu etüvde kuruması sağlanmıştır [120]. Tannik asit ile modifiye edilmiş MNP'ler (MNP-TA) sonraki kullanımlar için desikatörde bekletilmiştir.

#### 4.6.2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin gallik asit ile fonksiyonelleştirilmesi

1,0003 g Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülleri üzerine 0,5 g gallik asitin 40 mL sudaki çözeltisi hazırlanarak 40 °C de azot atmosferinde bir saat geri soğutucu altında karıştırılarak demir nanopartiküllerine modifikasyonu sağlanmıştır. Bir saat sonunda karışım bir magnet yardımı ile çekilip, süzütünün dekantasyonla süzülmesi sağlanmıştır. Deiyonize su ile yıkama yapılarak süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. 70 °C de bir gece vakumlu etüvde kuruması sağlanmıştır. Gallik asit ile modifiye edilmiş MNP'ler (MNP-GA) sonraki kullanımlar için desikatörde bekletilmiştir.

#### 4.6.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin tanin ile fonksiyonelleştirilmesi

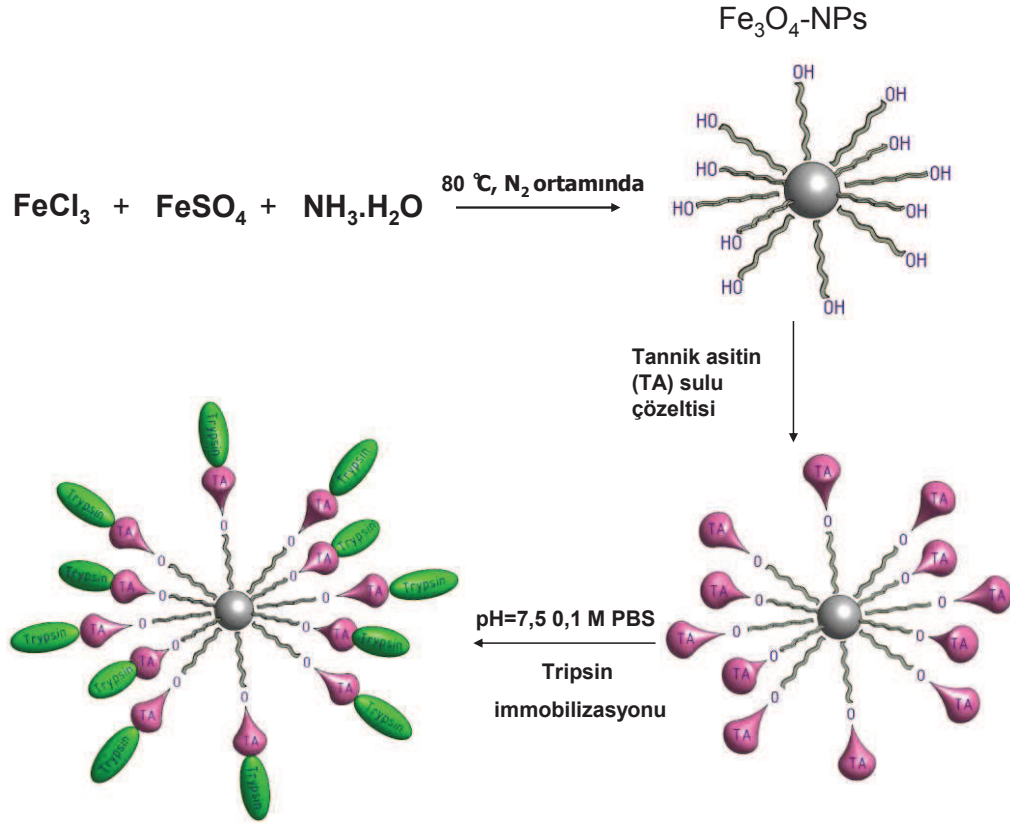
2,9708 g Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülleri üzerine 1,4862 g tanin 100 mL sudaki çözeltisi hazırlanarak 40 °C de azot atmosferinde bir saat geri soğutucu altında karıştırılarak demir nanopartiküllerine modifikasyonu sağlanmıştır. Bir saat sonunda karışım bir magnet yardımı ile çekilip, süzütünün dekantasyonla süzülmesi sağlanmıştır. Deiyonize su ile yıkama yapılarak süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. 70 °C de bir gece vakumlu etüvde kuruması sağlanmıştır. Tanin ile modifiye edilmiş MNP'ler (MNP-T) sonraki kullanımlar için desikatörde bekletilmiştir.

#### 4.7. Tripsin İmmobilizasyonu

Tripsin immobilizasyonu için çeşitli çalışmalardan faydalanılarak 1 mg/mL ve 10 mg/mL tripsin çözeltisi (pH=7,5, 0,1 M) hazırlanarak immobilizasyon yapılmıştır. En iyi immobilizasyon verimi 10 mg/mL tripsin konsantrasyonunda elde edilmiştir.

##### 4.7.1. Tannik asit ile fonksiyonelleştirilmiş Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu

Tannik asit ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküllerden 0,1 g behere alınmıştır. Üzerine 10 mg/mL olacak şekilde fosfat (pH=7,5, 0,1 M) tamponunda çözünmüş tripsin enzimi ilave edilmiştir. 4 °C de üç saat karıştırılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonunda süzöntü magnet yardımı ile dekantasyonla alınmış ve ayrıca 1+1+1 mL fosfat tamponu ile 3 kez yıkama yapılarak, süzme işlemi gerçekleştirilmiştir [120]. Tüm süzöntülerde protein tayini yapılmıştır. İmmobilize enzim (MNP-TA-TR) buzdolabında kurutulmuştur. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNP'lerin sentezi, fonksiyonelleştirilmesi ve tripsin immobilizasyonu şeması Şekil 4.4.'te verilmiştir.

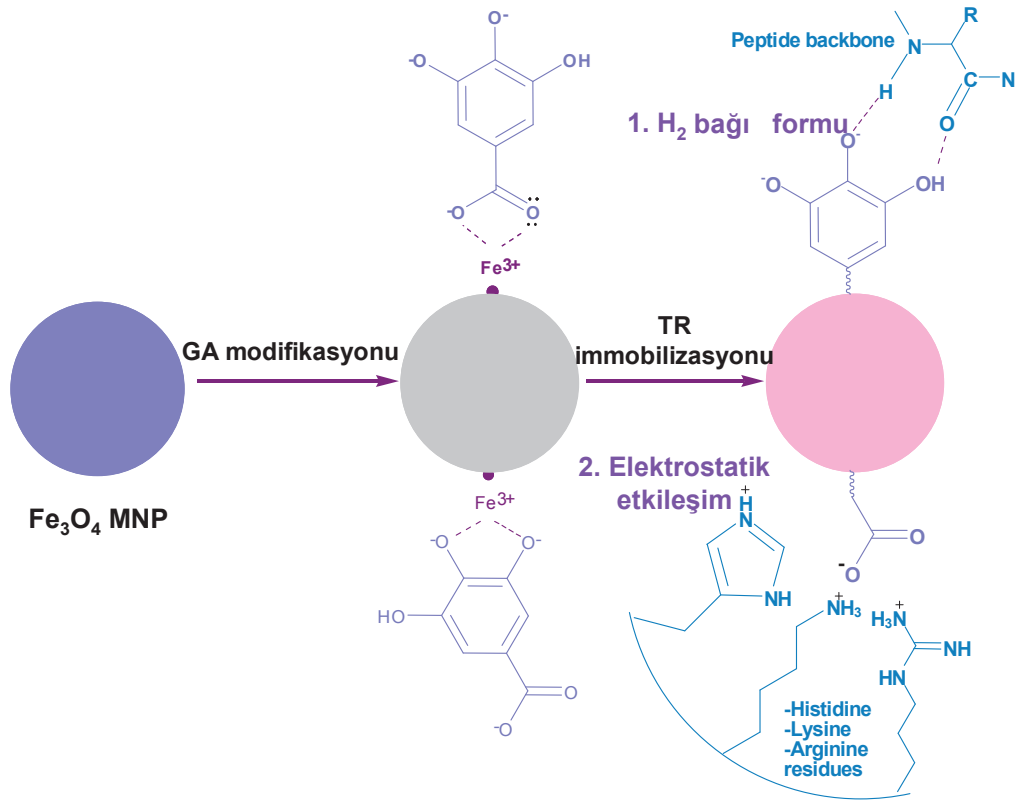


Şekil 4.4. Tannik asit ile fonksiyonelleştirilmiş  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu [120]

#### 4.7.2. Gallik asit ile fonksiyonelleştirilmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu

Gallik asit ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküllerden 0,1 g behere alınmıştır. Üzerine 10 mg/mL olacak şekilde fosfat (pH=7,5, 0, 1 M) tamponunda çözülmüş tripsin enzimi ilave edilmiştir. 4 °C de üç saat karıştırılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon sonunda süzüntü magnet yardımı ile dekantasyonla alınmış ve ayrıca 1+1+1 mL fosfat tamponu ile 3 kez yıkama yapılarak, süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm süzüntülerde protein tayini yapılmıştır. Immobilize enzim (MNP-GA-TR) buzdolabında kurutulmuştur.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNP'lerin gallik asit ile fonksiyonelleştirilmesi ve tripsin immobilizasyonu şeması Şekil 4.5.'te verilmiştir.



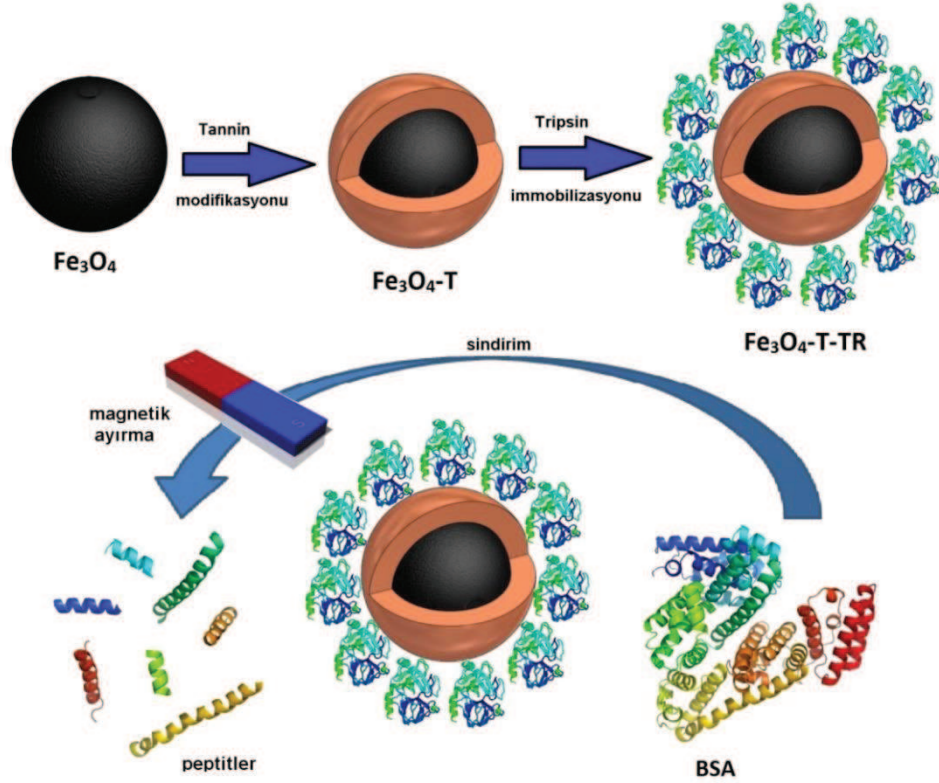


Şekil 4.5. Gallik asit ile fonksiyonelleştirilmiş  $Fe_3O_4$  nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu

#### 4.7.3. Tanin ile fonksiyonelleştirilmiş $Fe_3O_4$ nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu

Tanin ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküllerden 0,5 g behere alınmıştır. Enzimin kovalent bağlanması için, tanin ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküller üzerine 0,1 M NaOH (pH=9,4) çözeltisinden 3 mL ilave edilmiş ve bir saat karıştırılmıştır. Sonrasında tanin ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküller magnet yardımı ile dekantasyonla alınmıştır. 0,06 g benzamidin 10 mL fosfat (pH=7,5, 0,1 M) tamponunda çözülmüştür. 10 mg tripsin enzimi 10 mg/mL olacak şekilde benzamidin çözeltisinde hazırlanmıştır (kendi kendini sindirimini önlemek için benzamidin ilave edilmiştir). Hazırlanan 10 mg/mL tripsin enzimi, tanin ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküller üzerine ilave edilerek 4 °C de üç saat karıştırılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonunda süzüntü magnet yardımı ile dekantasyonla alınmış ve ayrıca 1+1+1 mL fosfat tamponu ile 3 kez yıkama yapılarak, süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm süzüntülerde protein tayini yapılmıştır. İmmobilize enzim

(MNP-T-TR) buzdolabında kurutulmuştur.  $Fe_3O_4$  MNP'lerin tanin ile fonksiyonelleştirilmesi, tripsin immobilizasyonu ve BSA proteinini sindirimi şeması Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Tanin ile fonksiyonelleştirilmiş  $Fe_3O_4$  nanopartikülleri üzerine tripsin immobilizasyonu ve BSA sindirimi

#### 4.8. Tripsin İmmobilizasyonundan Sonra Karakterizasyon

Tripsin enzimi immobilize edildikten sonra enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi doğaldır. Enzim molekülünün hareket yeteneği sınırlanır, konformasyonu değişir. Teorik olarak immobilizasyondan sonra enzimin spesifik aktivitesinde düşme beklenir. Fakat hiç değişmediği veya arttığı durumlar söz konusudur. İmmobilize ve serbest enzimlerin aktivitelerinin kıyaslanabilmesi için bağlanan enzim miktarının bilinmesi gerekir. Bu amaçla immobilizasyon öncesi serbest enzimin ve immobilizasyon sonrası immobilize enzimin aktiviteleri belirlendi. Benzer şekilde serbest enzim ve immobilizasyon sonrası süzüntü ve

yıkama sularında protein tayinleri Bradford yöntemine göre gerçekleştirildi. İmmobilizasyon verimleri gerek aktivite gerekse protein miktarı cinsinden başlangıç ve yıkama sularındaki bağlanmayan enzim miktarı arasındaki farktan hesaplanarak belirlendi. Tripsin immobilizasyonu için uygun optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları serbest enzimle kıyaslamalı olarak yapılmıştır.

#### **4.8.1. Tripsin enzimi aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi**

Enzimlerin aktivitesi sıcaklığa bağlıdır ve reaksiyon hızı sıcaklıkla beraber bir artış göstermektedir, fakat belirli sıcaklık limitlerinin üzerindeki değerlerde enzim proteininin denatürasyonundan dolayı enzim aktivitesinde düşme gözlenir. Serbest ve immobilize enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi genellikle optimum eğriler çizilerek izlenir. Bu grafik bağlı aktivitenin sıcaklık ile değişimini gösterir. Genellikle inkübasyon süresi arttıkça termal denatürasyon nedeniyle optimum sıcaklık düşmekte, immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı ise genellikle değişmektedir. Serbest ve immobilize tripsinin sıcaklığa bağımlı aktivitelerini belirlemek amacı ile 4-85 °C sıcaklık aralığında (4, 15, 25, 37, 45, 55, 70, 85 °C) 30 dakika bekletilmiş ve buza konularak aniden soğutulmuştur. Aktiviteleri ölçüldükten sonra relatif aktivite değerleri hesaplanıp grafiğe geçirilerek her iki formun optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

#### **4.8.2. Tripsin enzimi aktivitesi üzerine pH etkisi**

Enzimler protein yapısındaki moleküller olduklarından aktiviteleri çevre koşullarından oldukça etkilenmektedir. Bunlardan birisi de ortamın pH'ıdır. Bir enzimin pH optimumu; reaksiyon süresi, sıcaklık, substrat yapısı ve konsantrasyonu, kullanılan tamponun türü ve konsantrasyonu, ortamın iyonik şiddeti, enzimin saflığı gibi bir seri deneysel parametreye bağımlı bir değişkendir. İnkübasyon ortamının pH'ı protein molekülünün yük ve dissosiasyon durumuyla beraber aktif merkezi de etkilemektedir. Bu nedenle pH-aktivite ilişkisinin incelenmesi, immobilizasyonun neden olduğu pH-aktivite davranışlarındaki değişimler hakkında bilgi vermekte

ayrıca enzim proteinlerinin yapı fonksiyon ilişkilerinin anlaşılması açısından da yol gösterici olmaktadır.

Serbest ve immobilize enzim aktivitelerine pH etkisini incelemek için inkübasyon tamponunun pH'ı 4-10,5 aralığında değiştirilerek standart koşullarda aktiviteleri ölçülmüştür. İnkübasyon karışımlarının içerdiği tampon türü ve pH değerleri: Sodyum asetat (pH 4-6), sodyum fosfat (pH 6-8), tris-HCl (pH 8-9) ve sodyum bikarbonat (pH 9- 10,5) olarak seçilmiştir. Düşük pH'larda aktivite çok çok düşük olduğundan pH değeri yüksek olarak çalışılmıştır.

Ortamın pH'ının serbest ve immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacı ile serbest ve immobilize enzim preparatları farklı pH'lardaki (6, 7, 8, 9, 10, 10,5) tamponlarda oda sıcaklığında 1 saat boyunca bekletilmiş ve standart koşul olan 0,1 M, pH=7,5 fosfat tamponunda aktiviteleri ölçülmüştür.

#### **4.8.3. Tripsin enzimi aktivitesi üzerine substrat (BapNA) konsantrasyonu etkisi**

İmmobilizasyon sırasında enzim proteinindeki konformasyonel değişiklikler, sterik etkiler, mikroçevre etkileri ve difüzyon etkileri, immobilize enzimlerin serbest enzimden farklı kinetik davranışlar göstermesine neden olurlar. O nedenle immobilize enzimlerin kinetik davranışlarının incelenmesi, kinetik sabitlerinin tayini ve serbest enzimle kıyaslanması oldukça önemlidir.

Serbest ve immobilize tripsin aktivitelerinin substrat konsantrasyonuna bağımlı değişimleri substrat olarak BApNA kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla hazırlanan denemede farklı konsantrasyonlarda (0,5–3 mM) BApNA kullanılarak standart koşul olan 0,1 M, pH=7,5 fosfat tamponunda aktivite tayini yapılmıştır.

#### **4.8.4. Tripsin enzimi aktivitesi üzerine depo kararlılığı**

Depo kararlılığı, immobilize enzim uygulamalarını ilgilendiren önemli bir parametre olup uzun süre saklama durumunda enzimin aktivite kaybının bir ölçüsüdür. Depo

kararlılığını belirlemek için 4 °C'de 0,1 M, pH=7,5 fosfat tamponunu altında saklanan serbest ve immobilize enzimlerden belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktiviteleri optimum koşullarda tayin edilmiştir. Bu çalışmada 20 gün aralıklarla aktivite ölçümü yapılmıştır.

#### **4.8.5. Tripsin enzimi aktivitesi üzerine termal kararlılık**

Enzimler protein yapıda oldukları ve ısıya karşı duyarlı olduklarından, sıcaklık yükseldikçe inkübasyon süresine bağımlı olarak aktivite kaybı hızlanır. Sıcaklık sabit tutulursa bile yalnız inkübasyon süresinin uzaması bile denatürasyon sonucu aktivite kaybına neden olur. Eğer bir enzimin termal kararlılığı immobilizasyon ile değişiyorsa böyle enzimlerin kullanımı pek çok alanda yaygın olacaktır.

Serbest ve immobilize enzimin zamana bağımlı termal kararlılıklarını belirlemek için 45 °C ve 55 °C'de farklı sürelerde (30, 60, 90 ve 120 dakika) inkübe edilen serbest ve immobilize enzim aktiviteleri standart koşul olan 0,1 M pH=7,5 fosfat tamponunda ölçülmüştür.

#### **4.8.6. İmmobilize tripsinin tekrar kullanılabilirliği**

Enzim immobilizasyonundaki en önemli amaçlardan biri immobilize edilmiş olan enzimin bir proseste kullanıldıktan sonra geri kazanımı ve tekrar kullanılabilmesidir.

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için 0,1 M pH=7,5 fosfat tamponunda aktivitesi 30 °C'de ölçülmüştür. Daha sonra immobilize enzim, immobilizasyon prosesi esnasında kullanılan uygun tampon çözelti (0,1 M pH=7,5 fosfat tamponu) ile yıkanmış ve tekrar aktivite ölçümü yapılmıştır. Bu işlemler ardarda tekrarlanarak enzimin kaçınıcı ölçümde ne kadar aktivite kaybettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada ard arda sekiz kez tekrar kullanılabilirlik test edilmiştir.

#### **4.9. Serbest Tripsin ve İmmobilize Tripsin Maddelerinin Protein Hidrolizleri**

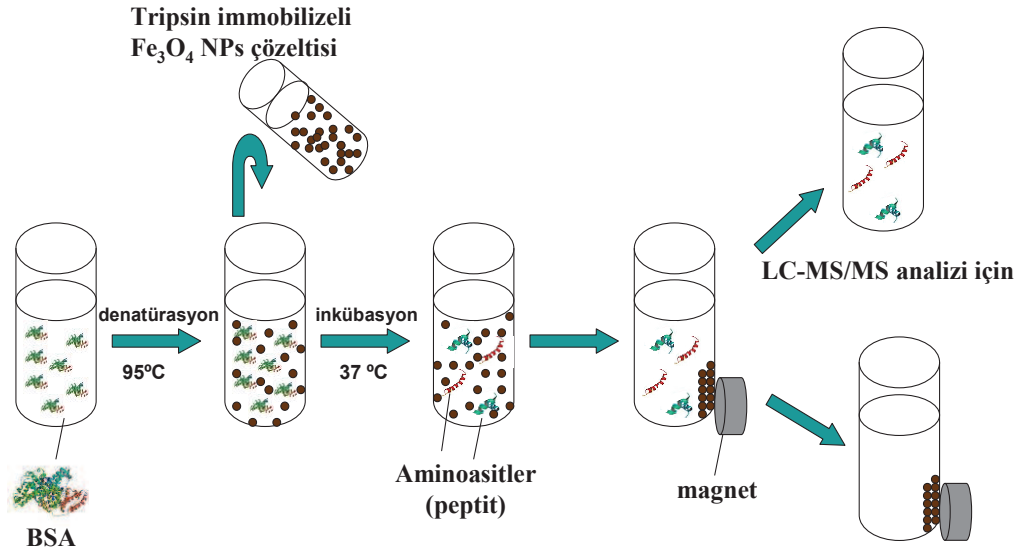
Protein hidrolizi için BSA ve kazein proteinleri seçilmiştir. 1 mg/mL BSA ve 1 mg/mL kazein stok çözeltileri  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0,1 M, pH=8,0) tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Protein sindirimlerinde  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0,1 M, pH=8,0) tampon çözeltisi kullanılmasının sebebi, çok kolay uçucu özelliğinden dolayı yapılacak analizlerde fazla çözücü olarak uzaklaştırılarak analizlerin daha kolay alınmasını sağlamaktır. Hidroliz işlemlerine başlamadan önce proteinlerin daha iyi ve etkili hidrolizi için, proteinlere 95 °C de 15 dakika su banyosunda denatürasyon işlemi uygulanmıştır [78, 121].

##### **4.9.1. Serbest tripsinin BSA proteini hidrolizi**

1 mg/mL BSA çözeltisinden 100 µL ependorf tüpüne alınmıştır. Üzerine 875 µL  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0,1 M, pH=8,0) tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Son olarak, 1 mg/mL serbest tripsin çözeltisi ilave edilerek 37 °C de su banyosunda 13 saat çözeltinin karışması sağlanmıştır. 13 saat sonunda reaksiyonu durdurmak için ortama 15 µL asetik asit ilave edilmiş ve LC-MS/MS için analizleri için saklanmıştır.

##### **4.9.2. İmmobilize tripsinin BSA proteini hidrolizi**

1 mg/mL BSA çözeltisinden 100 µL ependorf tüpüne alınmıştır. Üzerine 900 µL  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0,1 M, pH=8,0) tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Son olarak, 1 mg/mL immobilize tripsin çözeltisi ilave edilerek 37 °C de su banyosunda 1 saat çözeltinin karışması sağlanmıştır. 1 saat sonunda çözelti manyetik dekantasyon yoluyla ayrılmış ve süzüntü LC-MS/MS için analizleri için saklanmıştır. Tripsin immobilize edilmiş  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartiküllerin BSA proteinini hidrolizi ve LC-MS/MS için manyetik ayırma şeması Şekil 4.7.'de açık bir şekilde verilmiştir.



Şekil 4.7. Tripsin immobilize edilmiş  $Fe_3O_4$  nanopartiküllerin BSA proteinini hidrolizi

#### 4.9.3. Serbest tripsinin kazein proteini hidrolizi

1 mg/mL kazein çözeltisinden 100  $\mu$ L ependorf tüpüne alınmıştır. Üzerine 875  $\mu$ L  $NH_4HCO_3$  (0,1 M, pH=8,0) tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Son olarak, 1 mg/mL serbest tripsin çözeltisi ilave edilerek 37 °C de su banyosunda 13 saat çözeltinin karışması sağlanmıştır. 13 saat sonunda reaksiyonu durdurmak için ortama 15  $\mu$ L asetik asit ilave edilmiş ve LC-MS/MS için analizleri için saklanmıştır.

#### 4.9.4. İmmobilize tripsinin kazein proteini hidrolizi

1 mg/mL kazein çözeltisinden 100  $\mu$ L ependorf tüpüne alınmıştır. Üzerine 900  $\mu$ L  $NH_4HCO_3$  (0,1 M, pH=8,0) tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Son olarak, 1 mg/mL immobilize tripsin çözeltisi ilave edilerek 37 °C de su banyosunda 1 saat çözeltinin karışması sağlanmıştır. 1 saat sonunda çözelti manyetik dekantasyon yoluyla ayrılmış ve süzüntü LC-MS/MS için analizleri için saklanmıştır.

#### 4.10. Protein Hidrolizi için LC-MS/MS Çalışmaları

LC-MS/MS, protein sindirimlerini ayırmak için kullanılan bir sistemdir. %0,1 sulu formik asit tampon A ve %0,1 asetonitril içerisinde çözülmüş formik asit tampon B

sistemde mobil faz olarak kullanılır. Akış hızı 0,5 µL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL dir. Eğimli ayırma ile 30 dakikadan fazla, mobil faz B %5 lineerlikten %35 artarken sonrasında mobil faz B 20 dakika içinde %35 den %100 e performans göstermiştir ve mobil faz B %100 e ayarlanmıştır ve 10 dakika yapılmıştır. Tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ESI problu, donanımlı AB SCIEX 4000QTRAP üzerinde gerçekleştirilmektedir. Cihaz püskürtme voltajı 5 kV ayarlanmış ve pozitif iyon modunda çalışmaktadır. Tam kütle spektrometresi için tarama aralığı 100-2800 kütle/yük olarak ayarlanmıştır. Proteinlerin ayrılması Phenomenex Synergi Fusion-RP C18 (4.6x150mm, 5µm) kolonunda uygulanmış ve kolon sıcaklığı 40 °C'ye ayarlanmıştır.

#### **4.11. Protein Hidrolizi için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Çalışmaları**

Elektroforez, bir elektrik alan altındaki moleküllerin, bu alanda farklı hareket etmeleri esasına dayanılarak yapılan bir ayırma yöntemidir. Bu elektrik alan altında pozitif yük taşıyan proteinler katoda, negatif yük taşıyan proteinler anoda doğru geç ederler. Elektroforez çalışması için aşağıdaki işlemler sırasıyla yapılmaktadır.

##### **4.11.1. SDS-PAGE jel kasetinin hazırlanması**

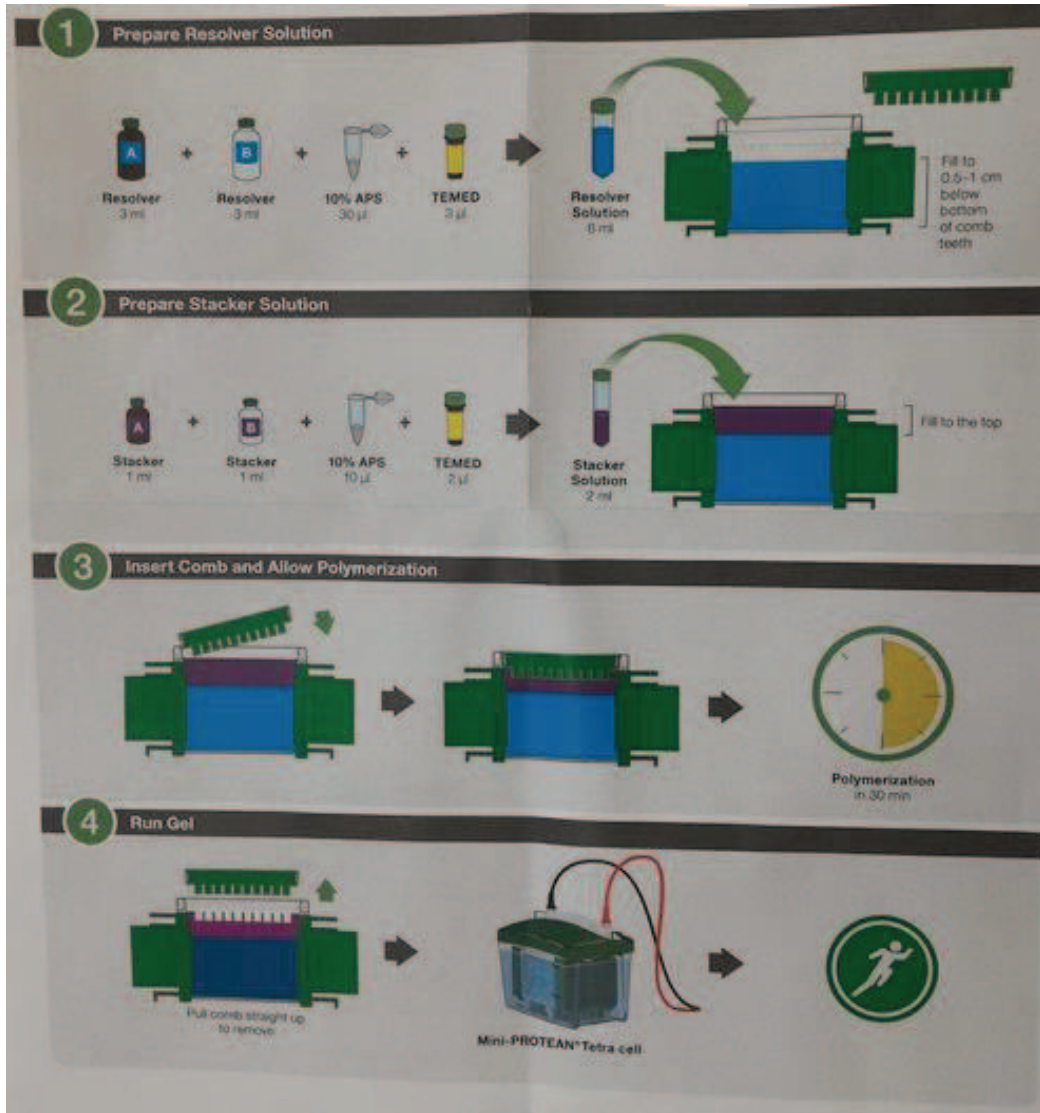
İçinde jelin polimerize olacağı kuru ve temiz cam levhalar aralarına plastik ayırıcı konularak üst üste yerleştirilmiştir. Kısaçklar takılarak döküm standına yerleştirilmiştir.

##### **4.11.2. SDS-PAGE alt jel ve üst jel çözeltilerinin yerleşimi**

Alt jel olarak, hazır olarak alınan resolver A ve resolver B çözeltilerinden 3'er mL alınmış, üzerine %10'luk APS çözeltilerinden 30 µL ve TEMED çözeltilerinden 3 µL ilave edilmiştir. Bu hazırlanan alt jel (resolver) çözeltileri kasetlerin yerleştirildiği standı yukarıdan 1 cm boşluk kalacak şekilde doldurulmuştur. Üst jel olarak, hazır olarak alınan stacker A ve stacker B çözeltilerinden 1'er mL alınmış, üzerine %10'luk



APS çözeltisinden 10  $\mu$ L ve TEMED çözeltisinden 2  $\mu$ L ilave edilmiştir. Bu hazırlanan üst jel (stacker) çözeltisi kasetlerin yerleştirildiği standın yukarisana yani alt jelin üstüne doldurulmuştur (Şekil 4.8.). Kuyucukların oluşması için taraklar yerleştirilmiş ve 30-45 dakika jellerin polimerleşmesi için beklenilmiştir. Polimerleşme tamamlandıktan sonra tarak kuyuların bozulmamasına dikkat edilerek çıkartılmıştır.



Şekil 4.8. Elektroforez için alt jel ve üst jel çözeltilerinin hazırlanıp kasetlerin arasına doldurulması

### 4.11.3. SDS-PAGE oluşun jellerin yerleşimi ve numunelerin yüklenmesi

Kasette polimerleşen jeller elektroforez hücreye düzgün bir şekilde yerleştirilmiştir. Hücre yürütme tampon çözeltisi ile doldurulmuştur. Kasetteki taraklar düzgün bir şekilde çıkarılmıştır. 20 mg tartılan katı numunemiz tüpe alınmış ve üzerine 1 mL sindirimi gerçekleştirilecek protein çözeltisinden (BSA ve kazein çözeltisi, 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  içerisinde çözülmüş 6 mg/mL) ilave edilmektedir. Sindirim süreleri 10, 20, 30 dakika olarak seçilmiştir. Hazırlanan numuneler belirlenen sürelerde inkübatörde bekletilmiş ve süre sonunda numuneden 30  $\mu\text{L}$  ependorf tüpe alınmış üzerine 70  $\mu\text{L}$  yükleme tamponu ilave edilmiştir. Her sürede aynı işlem tekrarlanmıştır. Saf BSA veya kazein çözeltisi içinde aynı işlem yapılmıştır. Hazırlanan ependorf tüplerindeki çözeltiler 95 °C'de kaynar suda 3 dakika bekletilmiştir. Böylece denatüre edilmiştir. 3 dakika sonunda her bir numuneden 10  $\mu\text{L}$  alınarak elektroforez hücredeki kuyucuklara konulmuştur. Marker ve saf çözeltiler içinde aynı miktarda alınmış ve hücredeki kuyucuklara konulmuştur. Elektroforez hücrenin kapağı kapatılarak 200 Volt ayarında 20 dakika süre ile elektroforez sisteminde yürütme gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.9.). Bu aşamadan sonra kasetteki jeller dikkatli bir şekilde spatül yardımı ile fiksasyon çözeltisine yerleştirilmiş ve 1 saat proteinlerin tutunmasını sağlamak amacıyla inkübatörde çalkanmıştır. Bu süre sonunda jeller boya çözeltisine koyulmuş ve 1 saat inkübe edilmiştir. Boya çözeltisinin fazlasını gidermek amacı ile %10 luk asetik asit çözeltisinde peptitlerine ayrılan jeller 1 gece bekletilmiştir. Sonrasında jeller düzgün olarak temiz bir zemine yerleştirilmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.



Şekil 4.9. Bio-rad marka Sodyum dodesilsülfat-Poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sistemi

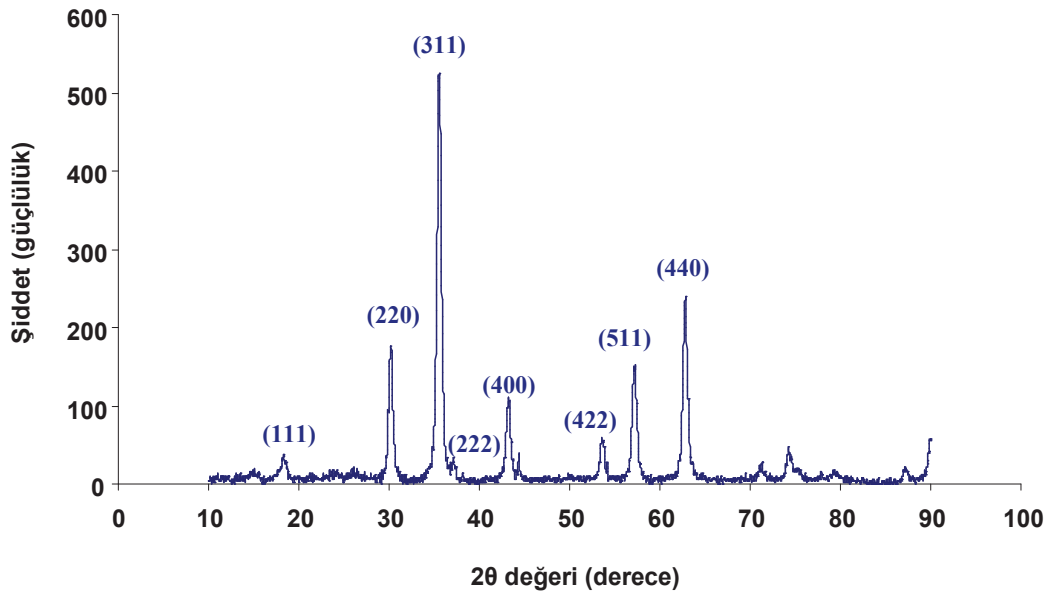
## BÖLÜM 5. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 5.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanopartiküllerinin XRD ile Karakterizasyonu

Saf Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin kristal yapısı XRD deseni olarak Şekil 5.1.'de gösterilmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküllerine ait 7 farklı karakteristik pikler sırasıyla 18,38-30,24-35,58-43,34-53,74-57,3-62,8 teta açıları olacak şekilde (111), (220), (311), (400), (422), (511) ve (440) noktaları işaretlenmiştir [78,122]. Bu noktaların yakınlığı ve durumları göz önüne alındığında benzer çalışmalarda da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> kristali için aynı noktalar bulunmuştur [123-125]. Sahoo ve ark. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülleri için karakteristik baskın pik olarak (311) noktasını bulmuşlardır [124]. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerinin baskın olarak gösterilen pike karşılık gelen teta açısı değeri yaklaşık 35,58° dir [126,127]. Maciel ve ark. manyetik levan nanopartikülleri üzerine tripsin immobilize etmiş ve 2θ=35 olarak bulmuşlardır [78,125]. Kristal boyutu ve kafes gerilmesi Williamson-Hall metodu kullanılarak eşitlik (5.1) deki gibi hesaplamıştır [128].

$$\beta \cdot \cos \theta = \frac{K\lambda}{D} + 4\varepsilon \cdot \sin \theta \quad (5.1)$$

Williamson-Hall metoduna göre hesaplanan partikül boyutu 17 nm dir. En şiddetli pik olan 311 için; en küçük kareler metoduna göre hesaplanmış kafes sabiti 8,366 Angstrom (Å) ve kafes hacmi 585,505 Angstrom (Å<sup>3</sup>)'dür.



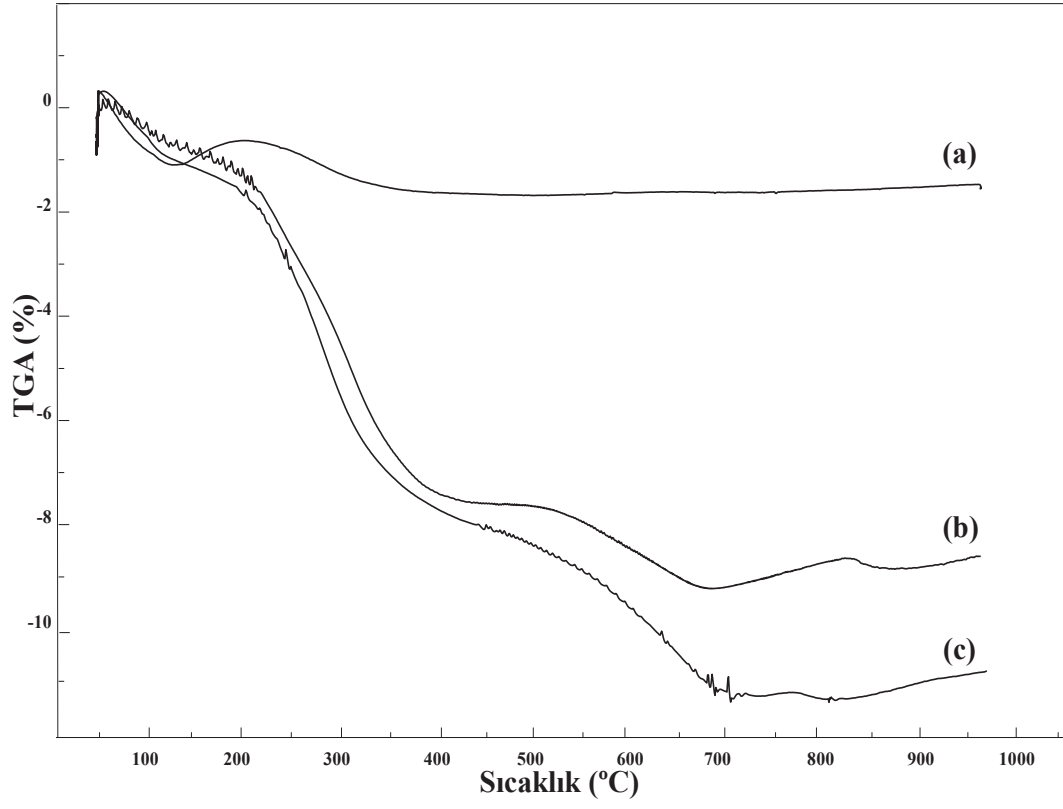
Şekil 5.1.  $Fe_3O_4$  nanopartiküllerinin XRD ile karakterizasyonu

## 5.2. $Fe_3O_4$ -Tannik asit-Tripsin İmmobilizasyonu İçin Karakterizasyon Çalışmaları

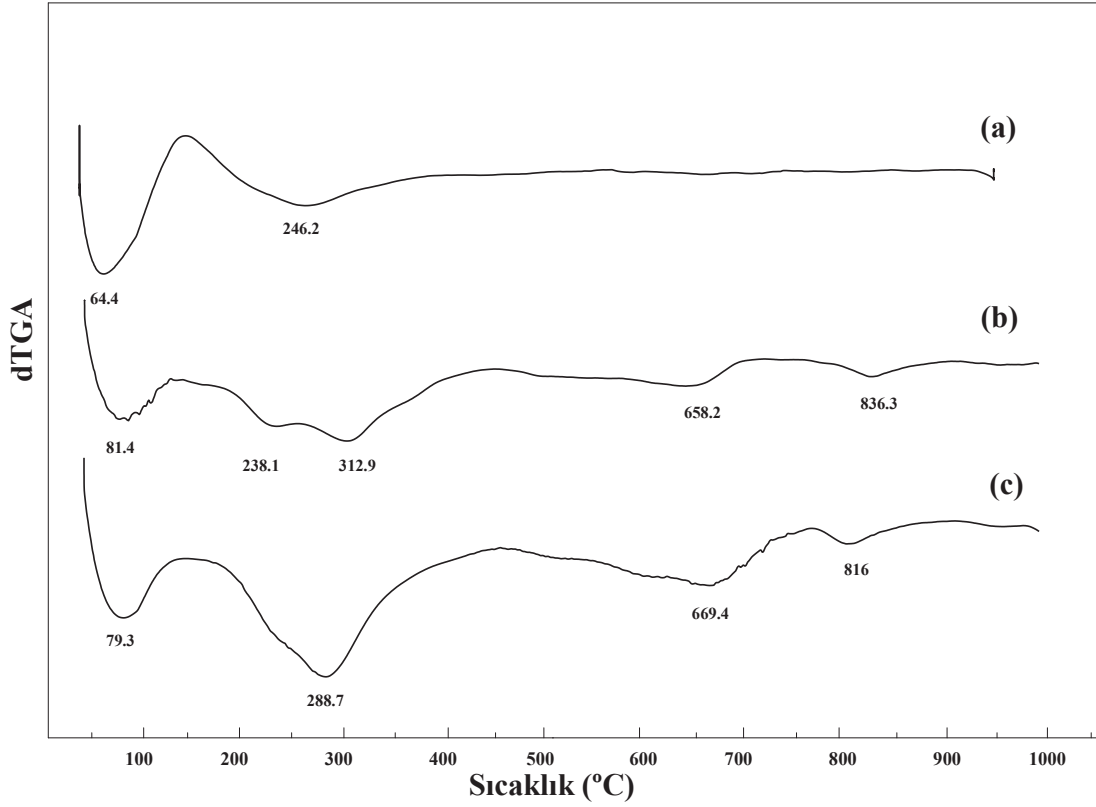
### 5.2.1. Termal analiz çalışmaları

Termogravimetrik analiz, malzemenin bozunmasına, oksidasyonuna ya da bileşenlerinden uçucu moleküllerin kaybına bağlı olan kütledeki azalış değerleridir. TGA deneylerinde numunede gözlenen kütle kaybının nedenlerinden bazıları, numune içinde bulunan uçucu bileşenlerin buharlaşması (numunenin su kaybetmesi ve gaz emilimi gibi), numunenin oksijenli ortamda oksitlenmesi, inert atmosferde bulunan numunenin sıcaklık altında bozunması, ya da ferromanyetik malzemelerde numunenin sıcaklığa bağlı olarak manyetik özelliklerinin değişmesi olarak sayılabilir.

MNP, MNP-TA ve MNP-TA-TR'in termal kararlılıkları TGA ve birincil türevi olan dTGA kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 5.2. ve 5.3.).  $Fe_3O_4$  nanopartiküller  $65^\circ C$  den  $120^\circ C$  ye kadar %0,8 ağırlığını kaybetmiştir. Bu, madde üzerinde fiziksel olarak adsorblanan suyun kaybedilmesidir [115]. Benzer çalışmalarda da  $Fe_3O_4$  için fiziksel olarak adsorblanan su miktarı yakın miktarlarda bulunmuştur [124,129].



Şekil 5.2. TGA görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-TA, (c) MNP-TA-TR



Şekil 5.3. dTGA görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-TA, (c) MNP-TA-TR

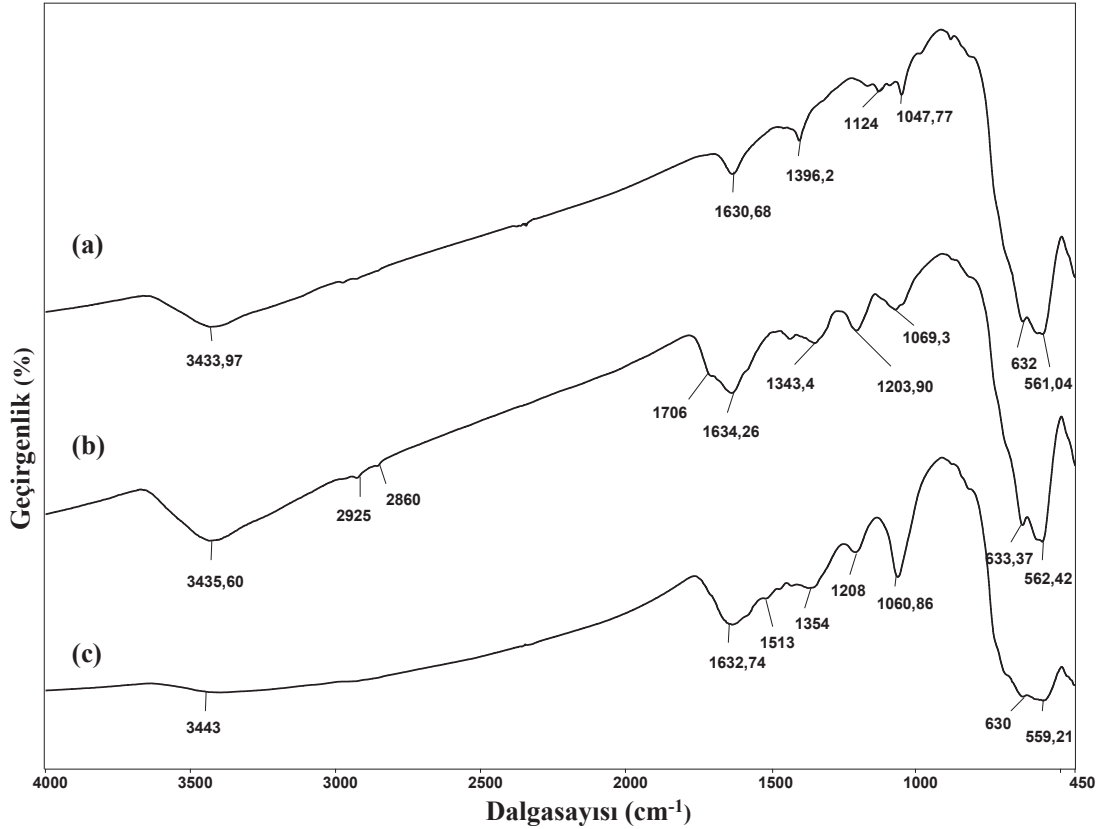
Qin ve ark. silika kaplı manyetik nanopartiküller üzerine polimer yapıda molekül çalışmışlardır ve sonuçta fiziksel adsorblanan miktarı yaklaşık %5 olarak bulmuşlardır [129]. Tannik asit ile fonksiyonelleştirilmiş  $Fe_3O_4$  ise 50-1000°C arası %9,86 ağırlık kaybettiği açıkça görülmektedir. Son olarak, MNP-TA-TR ise 50-1000°C aralığında %11,35 ağırlık kaybetmiştir. Hem MNP-TA asit hem de MNP-TA-TR'in bozunması üç adımda meydana gelmiştir. İlk adımda, 50-200°C arasında %1,5'lük bir kayıp vardır. Bu tannik asit molekülü üzerinde –OH gruplarına bağlanan su moleküllerinin kaybedilmesinden kaynaklı olabilmektedir. İkinci adımda, 200-450°C arasındaki bozunmalar molekülerarası bağların kırılması, halkanın sıyrılması, zincir kopmaları ve buharlaşan kısımların ayrılması olabilmektedir. Bu adımda MNP-TA ve MNP-TA-TR sırasıyla %7,5 ve %8 ağırlık kaybetmiştir. Üçüncü adımda ise, 450-700°C arasında tannik asit ve tripsin arasındaki oksidatif bozunmalardan dolayı kayıp olabilmektedir. MNP-TA ve MNP-TA-TR sırasıyla %9,86 ve %11,35 ağırlık kaybetmiştir [120].

### 5.2.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi çalışmaları

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) bir tür titreşim spektroskopisidir; IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Titreşim spektrumları, titreşen enerji düzeylerinin değişmesiyle oluşurlar. İnfrared bölgede bir titreşim bandının gözlenebilmesi için molekülün titreşimi sırasında elektriksel dipol momentinin değişmesi gerekir.

Şekil 5.4.'te MNP, MNP-TA ve MNP-TA-TR'in FTIR pikleri verilmiştir. 700  $cm^{-1}$  den küçük alanlarda düşük dalga boylarında demiroksite ait Fe–O bağları elde edilmektedir. Manyetik nanopartiküllerin varlığı 632, 561 ve 585  $cm^{-1}$  dalga boylarında görülmektedir [130,131]. Bayramoğlu ve ark.  $Fe_3O_4$  nanopartiküllerin karakteristik pikini 612  $cm^{-1}$  olarak bulmuşlardır [8]. Şekil 5.4. (a) da 561  $cm^{-1}$ , 1396  $cm^{-1}$  ve 1630  $cm^{-1}$  pikleri demiroksitin tipik Fe–O titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Şekil 5.4. (b) de 1000  $cm^{-1}$  ve 1700  $cm^{-1}$  arasında adsorbsiyon pikleri Şekil 5.4. (a) dan farklıdır [132]. Özellikle 1634  $cm^{-1}$  yer alan pik çok belirginleşmiştir. Şekil 5.4. (b) de 1706  $cm^{-1}$  dalga boyundaki pik –C=O grubuna

aittir. Tannik asit molekülünün bağlanması sonucu olarak 2925 ve 2860  $\text{cm}^{-1}$  dalga boylarında  $-\text{O}-\text{H}$  ve  $-\text{C}-\text{H}$  gruplarına ait titreşimler görülmektedir. 3600–3100  $\text{cm}^{-1}$  geniş pik aralığı tannik asit molekülünün metilol ve fenolik gruplarının  $-\text{O}-\text{H}$  uzantılarının karakteristik piklerinden kaynaklanmaktadır [133–135]. Şekil 5.4. (c) de 3600–3100  $\text{cm}^{-1}$  geniş bölgesi yalnızca tripsinin bağlanmasıyla değil aynı zamanda tannik asit molekülünün serbest hidroksil gruplarına da aittir. 1343 ve 1048  $\text{cm}^{-1}$  pikleri taninin fenolik gruplarına aittir [136,137]. MNP-TA ve MNP-TA-TR karşılaştırıldığında, 1000–1700  $\text{cm}^{-1}$  bölgesindeki değişiklikler tripsin enzimi ve taninin bazı fenolik grupları arasındaki protein-tannat kompleksinden kaynaklandığı görülmektedir.



### 5.2.3. Taramalı elektron mikroskobu çalışmaları

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), malzemelerin yüzey özellikleri, korozyon dayanımları, kaplama kalınlığı, partikül boyutu, morfolojisi gibi özelliklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

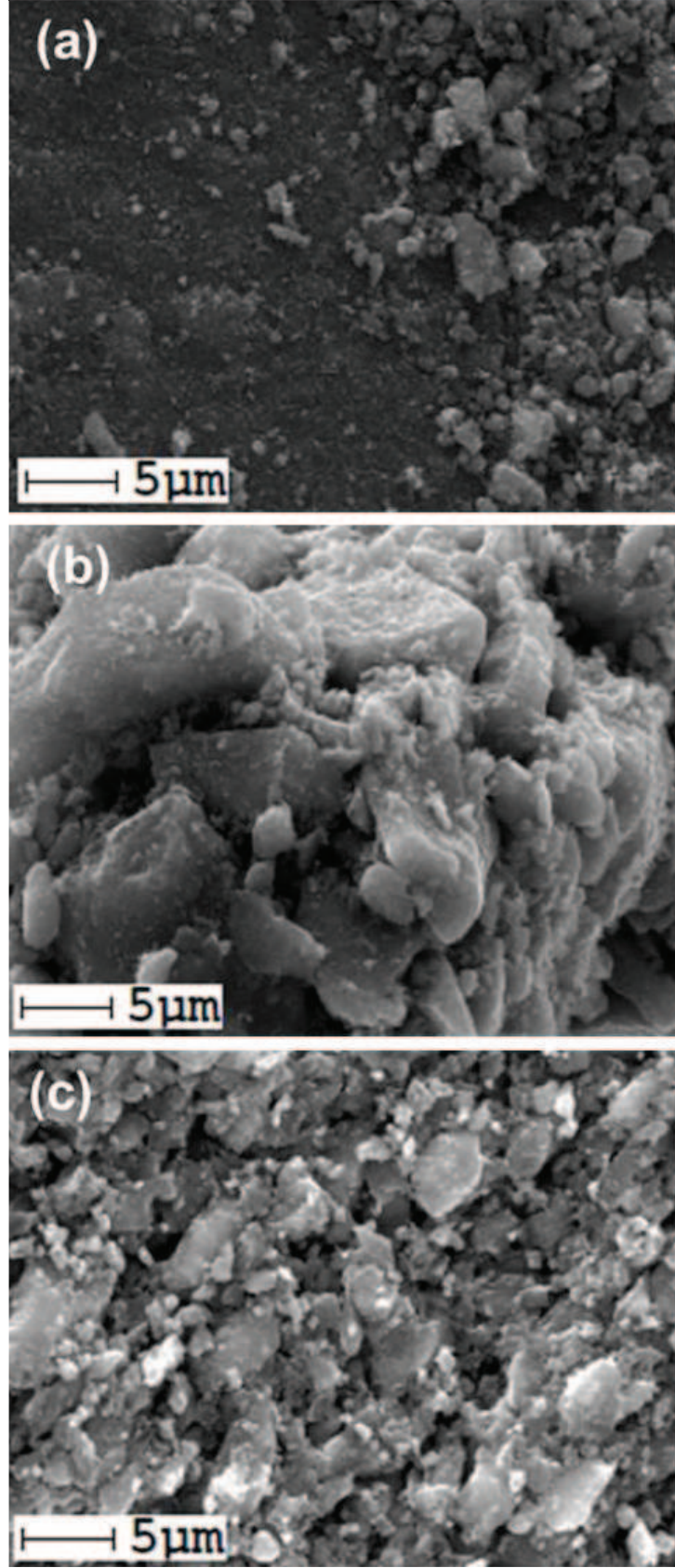


Şekil 5.5.'te MNP, MNP-TA ve MNP-TA-TR'in SEM analizleri verilmiştir. Bu görüntülerden tanecik boyutlarının 100 nm den daha küçük olduğu görülmektedir. SEM ile küçük boyutlarda görüntü net olmamaktadır. Bu nedenle 5 µm olacak şekilde görüntüler alınmıştır. Görüntüler siyah, yoğun ve manyetik toz şeklinde heterojen yapılardır. Şekil 5.5. (b) ve 5.5. (c), Şekil 5.5. (a) ile karşılaştırıldığında Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülleri modifiye olduktan sonra pürüzlülüğün arttığı görülmektedir [138]. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülleri çok farklı boyutlarda üretilebilmektedir, bu nanopartiküller çoklu kabuk veya dış yapısından kaynaklanabilmektedir [127,139].

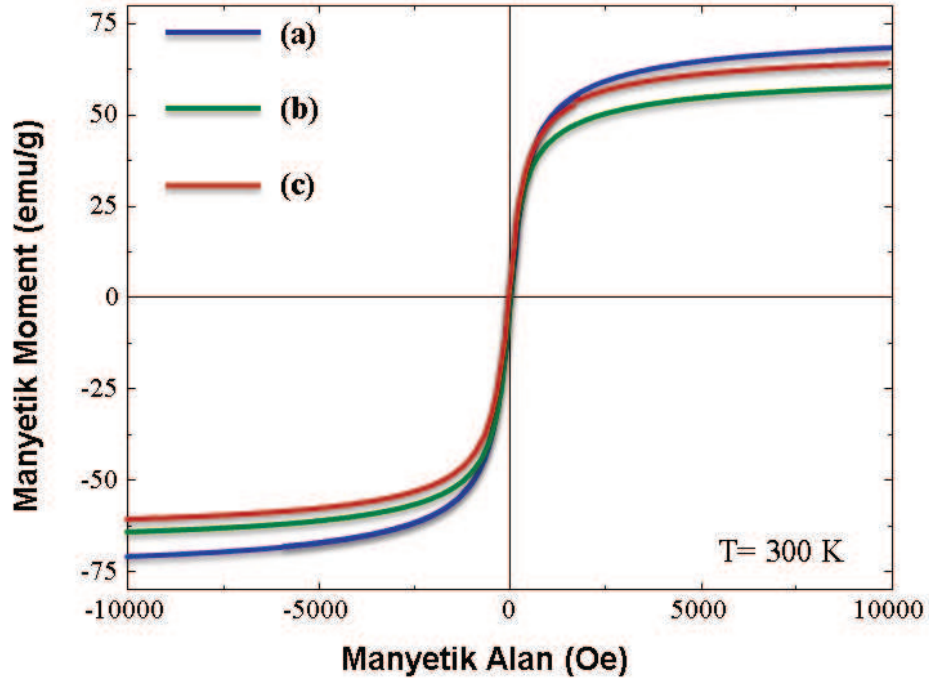
#### 5.2.4. Titreşen örnek magnetometresi çalışmaları

Titreşen örnek magnetometresi (VSM) ile mıknatıslanma ölçme metodu, Foner tarafından geliştirilmiş ve çalışma prensibi, titreştirilen örnek yanındaki sarımlarda meydana gelen akı değişimlerinin ölçülmesine dayanmaktadır [140]. VSM, elektromanyetik indüksiyon prensibine göre çalışmaktadır. Faraday indüksiyon kanununa göre bir kapalı devredeki manyetik akı değişimi, devrede bir indüksiyon elektro motor kuvveti (e.m.k.) oluşturmaktadır. Elektromanyetik indüksiyon kavramı, manyetik akı değişiminin indüklenen e.m.k.'e eşit olduğu söylenerek açıklanmaktadır [141].

Şekil 5.6.'da MNP, MNP-TA ve MNP-TA-TR'in oda sıcaklığında VSM cihazından elde edilen histerisiz eğrileri yer almaktadır. Histerisiz eğrileri manyetik nanopartiküllerin yapılarını ve davranışlarını gösteren mıknatıslanma eğrisidir. Histerisiz eğrisinin daralması malzemenin kolay mıknatıslanabileceğini ve düşük artık mıknatısa sahip olacağını (artık mıknatıs, sıcaklıkla veya darbelerden sonra mıknatıslık özelliğinin düşük olması), genişlemesi ise malzemenin zor mıknatıslanma özelliği göstereceğini ve daha kuvvetli bir artık mıknatıslığa sahip olacağını göstermektedir [141-143].



Şekil 5.5. SEM görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-TA, (c) MNP-TA-TR



Şekil 5.6. VSM histerisiz eğrileri (a) MNP, (b) MNP-TA, (c) MNP-TA-TR

Şekil 5.6.'da MNP için doymuş manyetiklik 69,51 emu/g, MNP-TA için ise doymuş manyetiklik 60,98 emu/g değerindedir. Bu farklılık  $Fe_3O_4$  nanopartikülleri üzerine çok çok büyük ve geniş bir molekül olan tannik asit bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Büyük bir molekülün bağlanması doymuş manyetikliği düşürmüştür. MNP-TA-TR doymuş manyetiklik değeri 62,19 emu/g dır. Tripsin enzimi de yapısındaki karboksilik asit ve amin grupları taşıyan büyük bir molekül olmasına rağmen tannik asit gibi bir molekül üzerine bağlanması sebebiyle doymuş manyetikliği tannik asit immobilizasyonundan daha büyüktür [120].

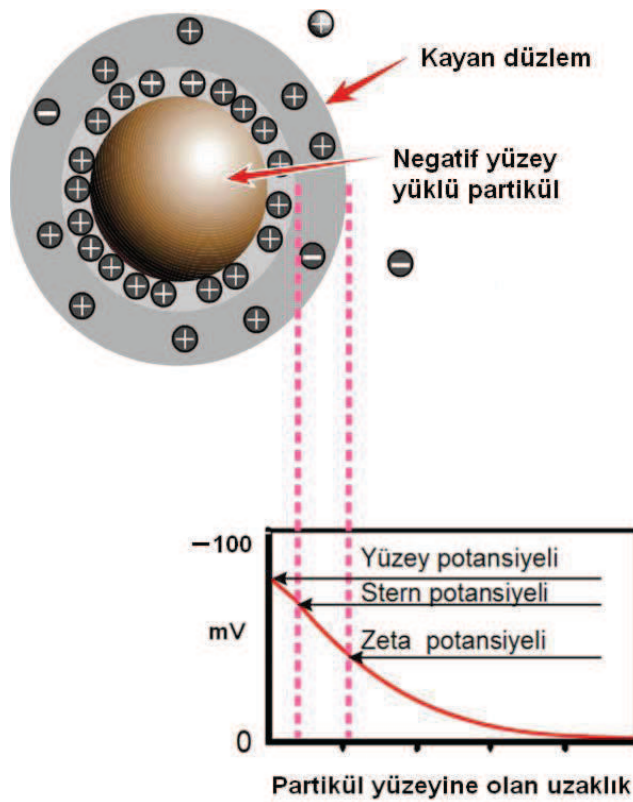
### 5.2.5. Zeta potansiyeli analiz çalışmaları

Zeta potansiyeli, bir süspansiyondaki parçacıklardan herhangi biri tarafından sergilenen fiziksel bir özelliktir. Süspansiyon ve emülsiyonların formüllerini optimize etmekte kullanılabilir ve uzun süreli kararlılığın tahmininde de yardımcı olur. Bir partikül yüzeyinde net yükün oluşturulması çevredeki temas bölgesindeki iyonların dağılımını etkiler ve yüzeye yakın olan zıt iyonların (partiküle zıt yükte

olan iyonlar) konsantrasyonun artmasına sebep olur Bu nedenle, her partikülün çevresinde bir “elektriksel çift tabaka” mevcuttur.

Her partikülün etrafında iki kısımdan oluşan elektriksel çift tabaka bulunmaktadır. Bu kısımlar; iyonların kuvvetli bir şekilde bağlandığı bir iç tabaka (Stern tabakası) ve iyonların daha gevşek olduğu bir dış (difüze) bölgedir. Bu difüze bölge içinde, her partikülün tek bir varlık gibi davrandığı kavramsal bir sınır bulunmaktadır. Bu sınırdaki potansiyel “zeta potansiyeli”dir (Şekil 5.7.).

Zeta potansiyelinin büyüklüğü, koloidal sistemin kararlılığının bir göstergesidir. Eğer süspansiyondaki tüm parçacıklar büyük bir eksi ya da artı zeta potansiyeline sahip ise, birbirlerini itmeye meyillidirler ve böylece parçacıkların biraraya gelme eğilimleri bulunmayacaktır. Değerin düşürülmesi, parçacıkların biraraya gelmelerini ve floküle olmalarına olanak sağlar. Flokülyasyonun en yüksek değeri zeta potansiyeli sıfırken görülür. Bir süspansiyon içinde negatif zeta potansiyeline sahip bir partikül

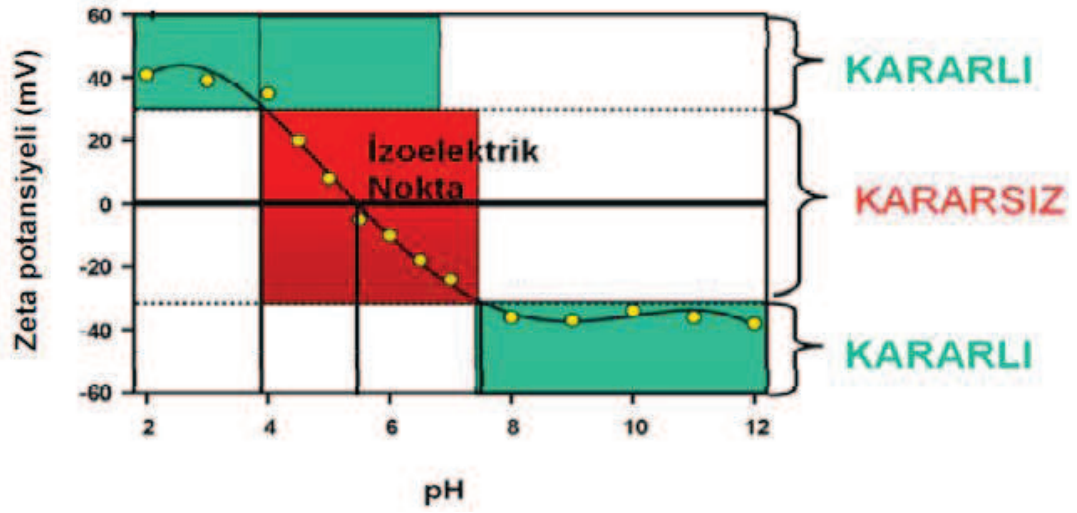


Şekil 5.7. Zeta potansiyelinin şematik gösterimi [33]

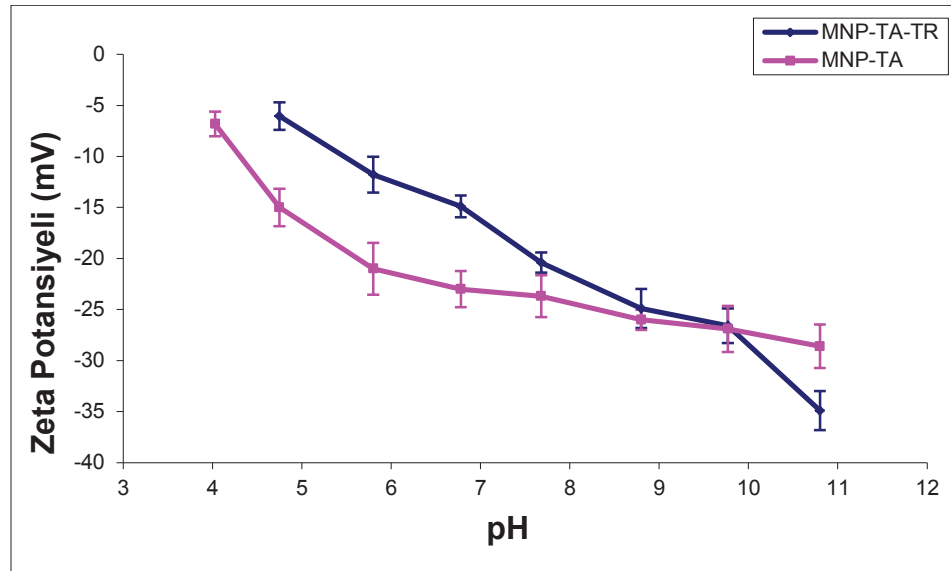
düşünülerek, eğer bu süspansiyona daha fazla alkali ilave edilirse, partiküller daha fazla negatif yükü yüklenme eğilimi gösterirler. Eğer bu süspansiyona asit ilave edilirse, bir süre sonra yükün nötralize olacağı bir noktaya ulaşılacaktır. Daha fazla asit ilavesi, pozitif yükün oluşmasına sebep olur. Bu nedenle bir zeta potansiyeline karşı çizilen pH eğrisi düşük pH değerlerinde artı, yüksek pH değerlerinde ise düşük ya da eksi değerde olacaktır. Eğrinin sıfır zeta potansiyelinden geçtiği bir nokta olması muhtemeldir. Bu noktaya izoelektrik nokta (İEN) denir ve pratik açıdan çok önemlidir. Bu nokta, normal olarak kolloidal sistemin en az kararlı olduğu noktadır (Şekil 5.8.). Kararlı ve kararsız süspansiyonlar arasındaki genel ayrıma çizgisi genellikle +30 veya -30 mV olarak alınır. Zeta potansiyeli +30 mV değerinden daha yüksek veya -30 mV değerinden daha düşük olan parçacıklar kararlı olarak kabul edilir [33].

Şekil 5.9.'da MNP-TA ve MNP-TA-TR sulu çözeltilerinin zeta potansiyel eğrileri görülmektedir. Eğrilere bakıldığında iki numune de, pH 4-11 arasında yüksek negatif potansiyel değerleri göstermektedir. Farklı destek maddeleriyle elektrostatik etkileşim nedeniyle, enzim ve proteinin bağlandığını gösteren bir çok makale vardır [73,144,145]. Tripsinin izoelektrik noktası (pI) 10,5 dur. Zeta ölçümünden, tannik üzerindeki OH gruplarından dolayı (zeta potansiyeli -34.9 mV) MNP-TA epeyce yüksek negatif yükler içermektedir. Tripsin immobilizasyonu sodyum fosfat tampon (0,1 M, pH 7,5) çözeltisinde yürütülmüştür. Bu pH'da, tripsin pozitif bir şekilde yüklenmiş ve MNP-TA yüzeyi çok fazla negatif yük içermektedir.

Sonuç olarak, MNP-TA üzerine tripsinin bağlanması elektrostatik etkileşim meydana getirmektedir. Bu yüzden tripsin ve MNP-TA arasındaki etkileşim basit adsorpsiyon ve kovalent immobilizasyon değil, fakat kovalent olmayan etkileşimler enzimin sülfür ve azot atomları ile MNP-TA'in oksijen atomları arasında meydana gelmektedir [124]. Tripsinin izoelektrik noktasının altındaki pH değerlerinde, immobilize tripsinin zeta potansiyel değeri artmaktadır. Bu, tripsinin immobilizasyon esnasında MNP-TA'in negatif yükleri nötralleştirdiğini göstermektedir. Fakat immobilizasyondan sonra zeta potansiyel değeri tripsinin izoelektrik noktasının



Şekil 5.8. İzoelektrik noktasının ve yayılmanın kararlı olmasının beklendiği pH değerlerini gösteren tipik bir zeta potansiyeline karşı pH grafiği [33]



Şekil 5.9. MNP-TA ve MNP-TA-TR'in zeta potansiyeline karşı pH grafiği

üzerinde azalmaktadır. Bu immobilize tripsinin, MNP-TA'in stern tabakasındaki negatif yüklerini nötralleştirmediğini göstermektedir [120].

### 5.2.6. pH kararlılığı çalışmaları

pH yalnızca aminoasit yan gruplarının özelliklerini değil aynı zamanda çözünmeyen bir desteğin çözelti kimyasını etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesidir. pH

kararlılığını tespit etmek için serbest ve immobilize tripsin, 0,1 M, pH 6-11 aralığında, oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapılmıştır ve aktivitesi standart koşullarda ölçülmüştür.

Şekil 5.10.'da görüldüğü gibi serbest enzim ve immobilize enzim pH kararlılıkları arasında benzer sonuçlar elde edilmiştir. İmmobilize enzim serbest enzim ile karşılaştırıldığında serbest enzim pH 7-9 aralığında stabilitesini korurken immobilize enzimlerin bazik bölgede (pH 7-10) daha kararlı bir yapıya sahip olduğu ve pik alanının yaygınlaştığı görülmektedir. Serbest tripsinin optimum pH değeri 7,5 iken, immobilize tripsinin optimum pH değeri 8,5-9,5 aralığında değişmektedir [120]. Bu sonuçların, immobilizasyondan sonra taşıyıcıya amino gruplarıyla bağlı enzimin pozitif yüklü gruplarının sayısı azaldığı için olduğu düşünülmektedir. Böylece enzimin karakteri daha polianyonik olmaktadır [146].

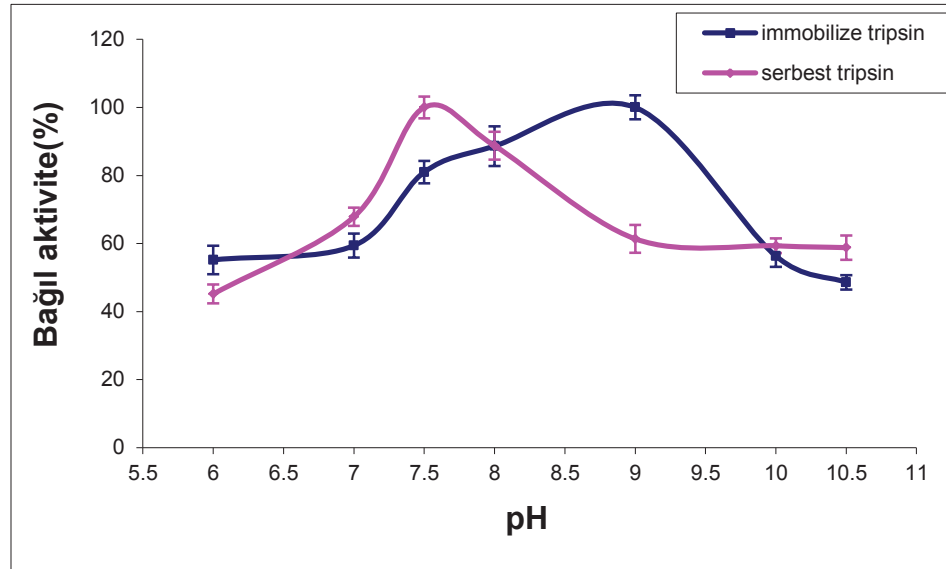
Genel olarak, hayvan menşeli tripsinin optimum pH değerleri pH 6,0-9,0 aralığındadır [147,148]. Farklı destek maddeleri için tripsin enzimine ait optimum pH değerleri bu çalışmada elde edilen sonuçları ile karşılaştırılarak Tablo 5.1 de verilmiştir. Örnek olarak, silika-GA ve kitosan ile modifiye edilmiş mikrokürecikler üzerine tripsinin optimum pH değerleri 9,5 ve 8,5 olarak sırasıyla tespit edilmiştir [112,149]. Ek olarak, PANIG [150], ChGly [151], glutaraldehytli harcanmış amin tahılı [152] ve PVAG-PANIG [153] üzerine tripsinin optimum pH değerleri 7,0 ve 8,0 arasında bulunmuştur. Serbest tripsinin aktivitesi, pH değerindeki değişiklik denatürasyonundan dolayı azalmasına rağmen tripsin moleküllerin denatürasyonu önemli ölçüde immobilizasyon ile azalmaktadır. Tripsin molekülünün terminal amino gruplarına sahip olduğu varsayılmaktadır ve tripsin molekülünün bazı amino grupları, MNP'lerin yüzeyinde tannik asitin karboksil gruplarıyla reaksiyona girmektedir. Serbest tripsin aktivitesi ile karşılaştırıldığında immobilize tripsinin enzimatik aktivitesindeki artış, substratın tripsin enziminin aktif bölgesine daha kolay ulaşmasıyla sonuçlanan, hem tripsinin otolizini küçültme/ortadan kaldırma hem de yüksek yüzey alanı ve sınırlamayla MNP üzerinde immobilize tripsinin olası stabilizasyonuna atfedilmektedir. Tripsin aktivitesinin bu stabilizasyonu, sadece otolizi değil aynı zamanda tripsin denatürasyonunu da önleyen MNP yüzeyinde

tannik asit molekülü ve tripsinin büyük olasılıkla çoklu bağlanmasının sonucudur [154,155].

Tablo 5.1. İmmobilize tripsinin immobilizasyon verimi, optimum sıcaklık ve pH ının farklı çalışmalarla karşılaştırılması

<b>Destek Maddeleri</b>	<b>İmmobilizasyon Verimi (%)</b>	<b>Optimum Sıcaklık (°C)</b>	<b>Optimum pH</b>	<b>Referanslar</b>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -TA	81,1	45	9	Bu çalışma
PANIG	-	45	7,6	[150]
Silika-GA	63	45	9,5	[112]
Nochitosan modified microspheres (M1-M3) and chitosan modified microspheres (M4-M8)	-	40	8 ve 8,5	[149]
ChGly (glutaraldehitte aktive edilmiş kitosan jelleri)	≈100	55	7	[151]
Glutaraldehitli harcanmış amin tahılı	61,3	50-60	7-9	[152]
PVAG-PANIG	-	35	7,6	[153]
Catla catla sazanının sindirim sisteminden tripsin saflaştırılması	-	40	7	[156]





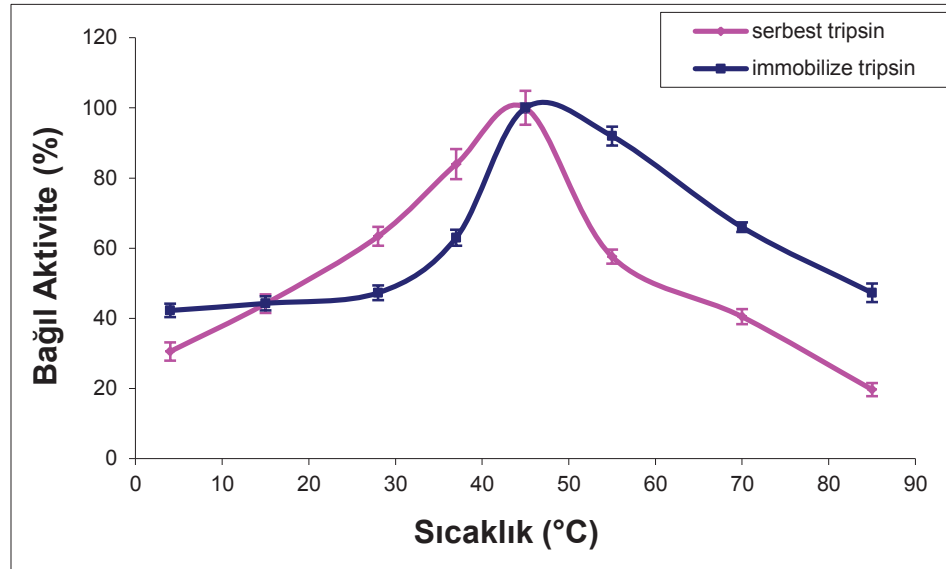
Şekil 5.10. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) pH kararlılığı

### 5.2.7. Sıcaklık kararlılığı çalışmaları

Sıcaklığın serbest ve immobilize tripsin aktivitesine etkisi aktivitelerinin farklı sıcaklıklarda standart koşullarda ölçülmesi ile belirlenmiştir (Şekil 5.11.). Genellikle hayvansal kaynaklı tripsinlerin optimum sıcaklık değerleri 40-65°C arasında değişmektedir [147,156-159].

Şekil 5.11.'de görüldüğü gibi serbest ve immobilize enzimler için optimum sıcaklık değeri 45 °C olarak bulundu. Bu sonuç immobilizasyon işleminin tripsinin optimum sıcaklığında bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Enzimler protein yapıdaki büyük ve oldukça kompleks moleküllerdir. Aktivitesinin korunması için üç boyutlu yapısı korunmalıdır. Aktiviteye etki eden en önemli parametrelerden biri sıcaklıktır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık olan optimum sıcaklık, özellikle operasyonel bir parametre olması açısından önemlidir. Literatürlerde çeşitli taşıyıcılarda immobilize edilmiş glukoz izomerez, lösin aminopeptidaz, kimotripsin, tripsin ve asparaginaz gibi bazı enzimlerin optimum sıcaklıklarının immobilizasyon sonrasında değişmediği örnekler mevcuttur [160].

Optimum sıcaklık değerleri bazı çalışmalarda 45°C olarak bulunduğu gibi [112,150] farklı çalışmalarda 40°C olarak da bulunmuştur (Tablo 5.1) [149,156]. 50–85°C



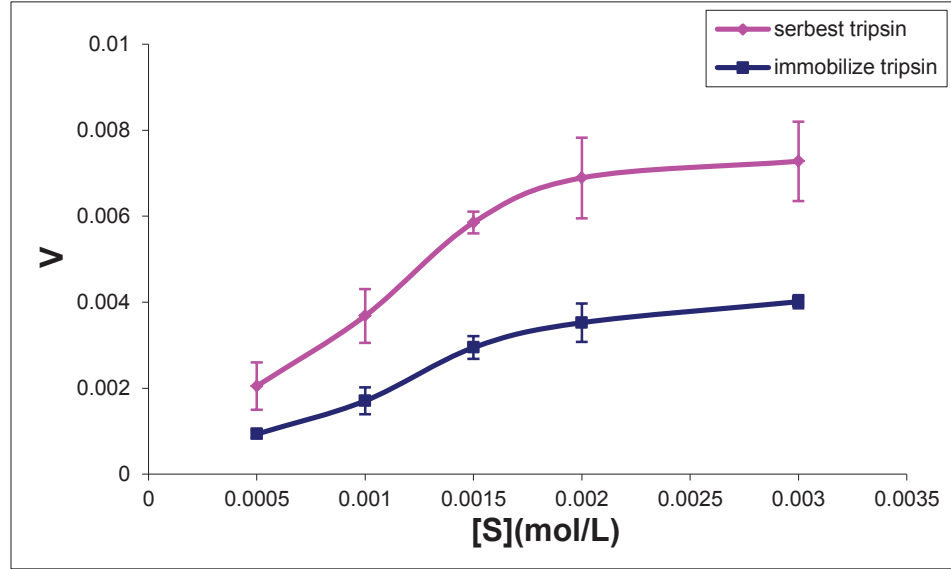
Şekil 5.11. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) sıcaklık kararlılığı

arasında immobilize enzim serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterir ki bu da immobilize enzimin yüksek sıcaklıklarda daha kararlı olduğunu göstermektedir. Optimum sıcaklıktaki artış tripsinin değişen kimyasal ve fiziksel özelliklerinden kaynaklanmıştır. Termal denatürasyonun önlenmesi aynı zamanda tripsin molekülleri ve tannik asit molekülleri arasındaki çoklu bağlanmalardan meydana gelmektedir. MNP üzerine enzim moleküllerinin fonksiyonel grupları büyük ölçüde birbirleriyle teması kısıtlanmış olduğundan, immobilize enzimin daha yüksek stabilitesinden ve azalmış otolizden kaynaklanabilir [8,138,161].

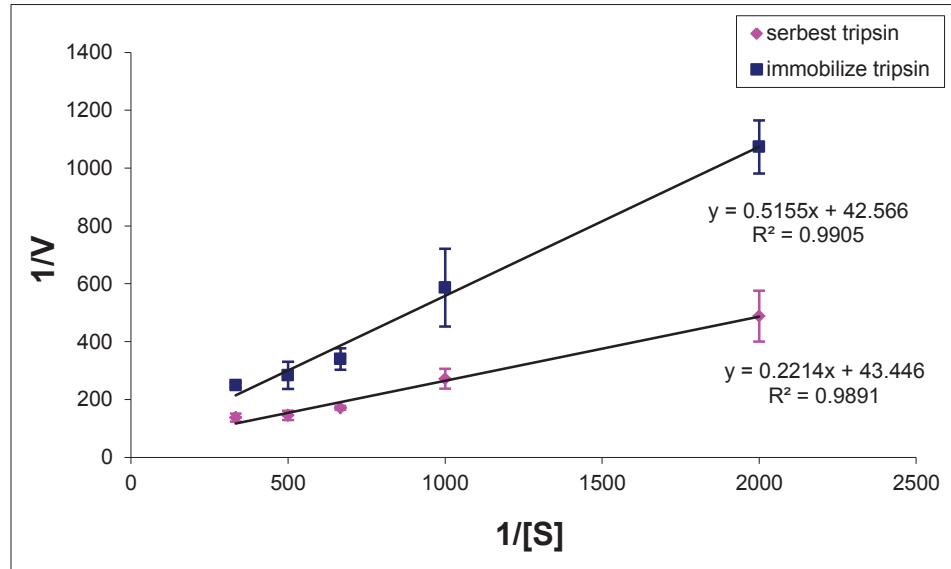
### 5.2.8. Substrat konsantrasyonu çalışmaları

Serbest ve immobilize tripsin aktivitelerinin substrat konsantrasyonuna bağlı değişimleri sabit sıcaklık ve pH da farklı konsantrasyonlarda (0,5–3 mM) N $\alpha$ -Benzoil-DL-arginin 4-nitroanilit hidroklorit (BApNA) kullanılarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize tripsin için konsantrasyona bağlı hız etkisi Şekil 5.12.'de gösterilmiştir.  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik parametreleri, Şekil 5.13. Lineweaver-Burk diyagramı kullanılarak hesaplanmıştır. Bilindiği gibi  $K_m$  bir enzimatik reaksiyonda, reaksiyon hızının maksimum hızın yarısına ulaştığı andaki substrat konsantrasyonunu ifade eder ve substratın enzime olan ilgisinin ölçüsüdür. Yüksek bir Michaelis sabiti, yarı doygunluğa ulaşabilmek için yüksek bir substrat

konsantrasyonu gerektiğini ve enzimin adı geçen substrata ilgisinin yüksek olmadığını göstermektedir. Tablo 5.2.'de immobilize ve serbest tripsinin kinetik parametreleri verilmektedir.



Şekil 5.12. Serbest ve immobilize tripsin (MNP-TA-TR) aktivitelerinin BApNA konsantrasyonuna bağlı değişimleri



Şekil 5.13. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) Lineweaver-Burk diyagramı

Tablo 5.2.'den görüldüğü üzere immobilize tripsinin Michaelis sabitinin daha yüksek olduğunu ve bu durumun enzimin ve bağlı olduğu tannik asit molekülünün substratla olan bağlanması, yapısı, sterik engeli ve esnekliği gibi bir çok farklı durumlardan

kaynaklanabileceği üzerinde durulmaktadır [162,163]. Serbest tripsin için  $K_m$  değerinin hayvansal kaynaklı tripsinler ile benzer olduğu bazı literatürlerde de gözlenmiştir [157,158]. İmmobilizasyondan sonra, tripsinin kinetik parametrelerinde benzer değişimler farklı çalışmalarda da gözlenmiştir [164-166]. Sun ve ark. immobilize tripsin için  $K_m$  değerini 24,1 mg/mL bulurken serbest tripsini 23,1 mg/mL olarak bulmuşlardır [164]. İmmobilize tripsin için bulunan değer serbest tripsinden yüksektir. Benzer şekilde Yao ve ark. immobilize tripsin için  $K_m$  değerini 1,19 mM ve  $V_{max}$  değerini 425,53  $\mu\text{M s}^{-1}$  bulurken, serbest tripsin için  $K_m$  değerini 1,11 mM ve  $V_{max}$  değerini 1,34  $\mu\text{M s}^{-1}$  olarak bulmuşlardır [165].

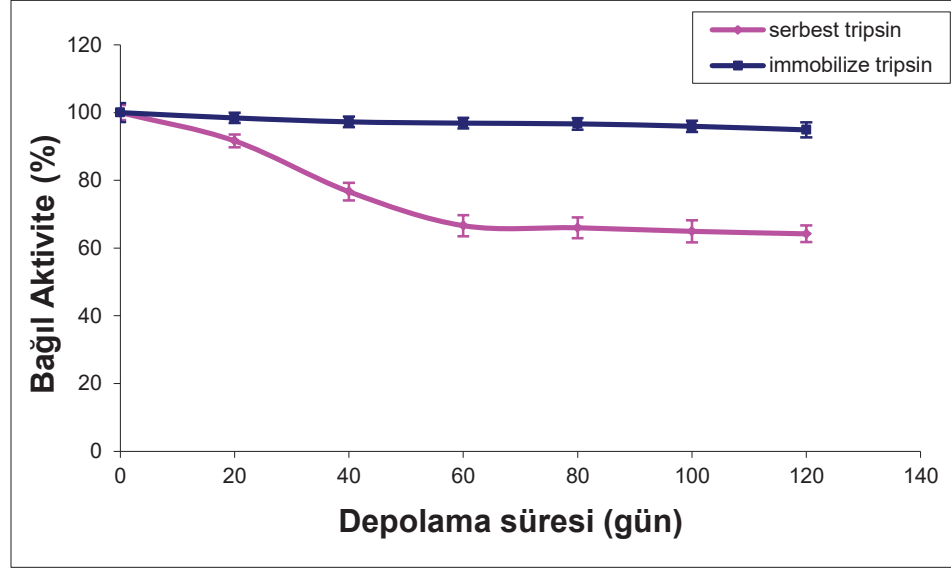
Tablo 5.2. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) kinetik sabitleri

Substrat	Serbest Tripsin		İmmobilize Tripsin	
	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM/min)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM/min)
BAPNA	5,1	23	12,1	23,5

### 5.2.9. Depo kararlılığı çalışmaları

Depo kararlılığı, özellikle immobilize enzimlerin uygulama alanı ile ilgili önemli bir faktördür. Depo kararlılığı, enzimin saklama koşullarına bağlı bir parametredir. Genellikle, suda çözünmez enzim preparatları, liyofilize edilerek ya da süspansiyon şeklinde 4-5°C'de saklanabilirler.

Serbest ve immobilize tripsinlerin depo kararlılıkları 4°C'de 0,1 M, pH=7,5 fosfat tamponunda bekletilerek 20 gün aralıklarla aktiviteleri ölçülmüştür. Toplamda 7 ölçüm alınarak 120. günün sonunda belirlenen son aktiviteyle beraber Şekil 5.14. çizilmiştir. Buna göre, serbest enzim 120 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %40 lık kısmını kaybederken, immobilize enzim ise 120 gün sonunda başlangıç aktivitesinin sadece %10 luk kısmını kaybetmiştir. İmmobilize tripsinin serbest tripsinden daha yüksek depo kararlılığı göstermesi enzim ve tannik asit molekülünün karboksilik grupları arasındaki çoklu bağ etkileşimi ile ifade edilmektedir. Serbest tripsinin daha az depo kararlılığı göstermesi ise, otolizden kolay etkilendiğinden kaynaklı olabilmektedir [8]. Bayramoğlu ve ark. yaptıkları manyetik polimetil



Şekil 5.14. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) depo kararlılığı

metaakrilat üzerine tripsin immobilize edip adsorpsiyon çalışmasında immobilize tripsin aktivitesinin 8 hafta sonunda sadece %39 oranında aktivitesini kaybettiğini bulmuşlardır [8]. Nikolic ve ark. ise yaptıkları çalışmada 60 gün sonunda immobilize tripsinin aktivitesini %90 koruduğunu kanıtlamışlardır [85].

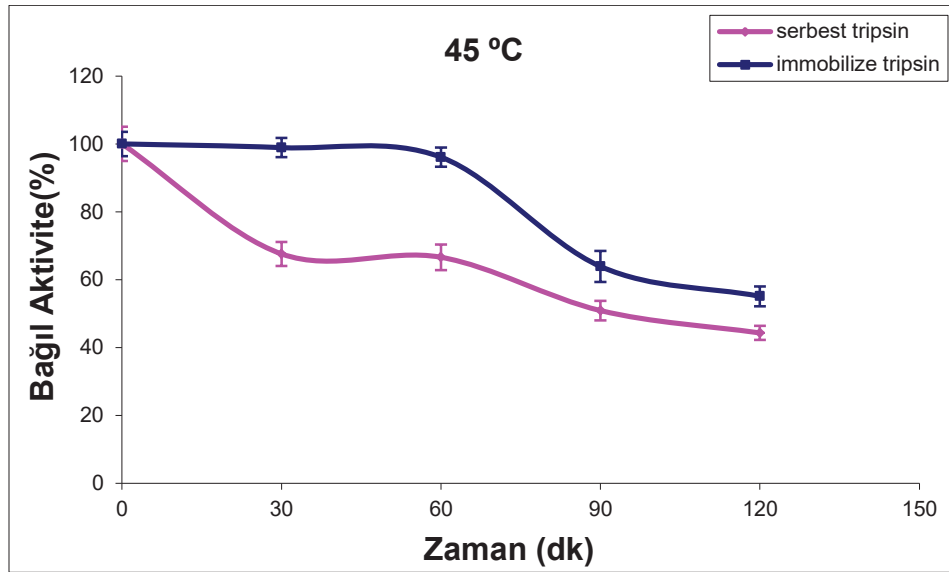
Enzimleri uzun süre saklama durumlarında, enzim immobilizasyonunun enzimdeki aktivite kaybını önemli ölçüde azalttığı görülmektedir.

### 5.2.10. Termal kararlılık çalışmaları

Enzimlerin kararlılığına etki eden parametrelerden en önemlisi sıcaklıktır. Genellikle enzimler düşük sıcaklıklarda daha kararlı olurken yüksek sıcaklıklarda hızlı termal denatürasyona uğrar. Immobilizasyon sonrasında enzimin termal kararlılığı artabilir, azalabilir ya da hiç değişmez. Immobilize enzimlerin termal kararlılığı endüstriyel uygulamalar açısından en önemli kriterlerden birisidir. Enzimler protein yapılarından dolayı ısıtmaya dayanıklı değildir ve pratik olarak enzim reaksiyonu yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilemez.

Serbest ve immobilize tripsinin zamana bağımlı termal kararlılıkları 45 °C ve 55°C sıcaklıklar için farklı sürelerde (30, 60, 90 ve 120 dakika) belirlenmiştir (Şekil 5.15. ve 5.16.).

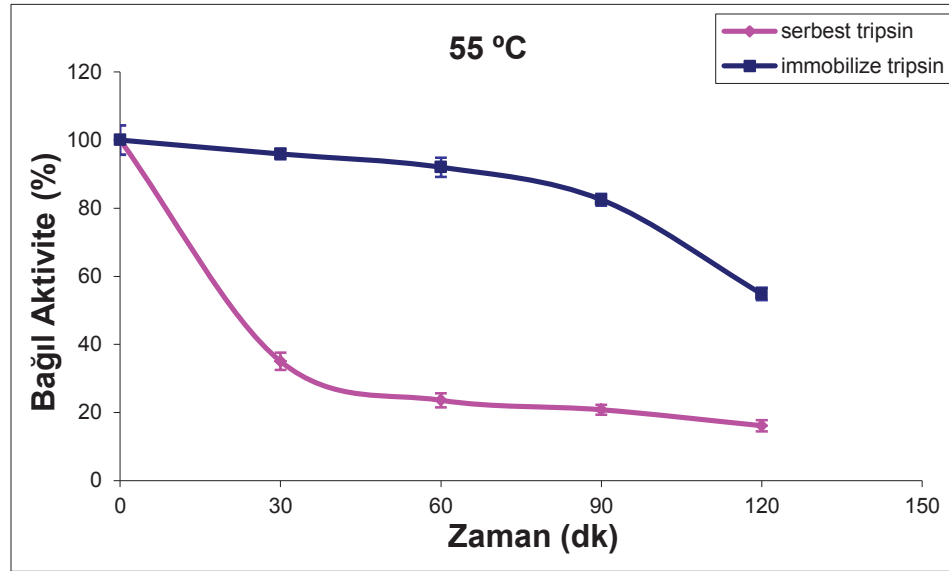
Şekil 5.15.'de görüldüğü gibi 45°C'de serbest tripsin 120 dakika sonunda %45 kararlılığını korurken, immobilize tripsin %55 kararlılığını korumaktadır. Bu sonuç immobilize enzimin immobilizasyondan sonra termostabilitesini geliştirdiğini göstermektedir [120]. Şekil 5.16.'da ise 55°C'de serbest tripsin 120 dakika sonunda %16 kararlılığını korurken, immobilize tripsin %54 kararlılığını korumaktadır. Bu immobilize tripsinin serbest tripsine göre daha iyi bir kararlılığa sahip olduğunu göstermektedir. Birçok inek pankreasından elde edilen tripsin çalışmalarında, enzim 50°C ye kadar aktivitesinin büyük bir bölümünü korurken bu sıcaklığın üzerinde aktivitesini hızlı bir şekilde kaybetmektedir [167,168].



Şekil 5.15. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) 45 °C de termal kararlılığı

### 5.2.11. Tekrarlanabilirlik çalışması

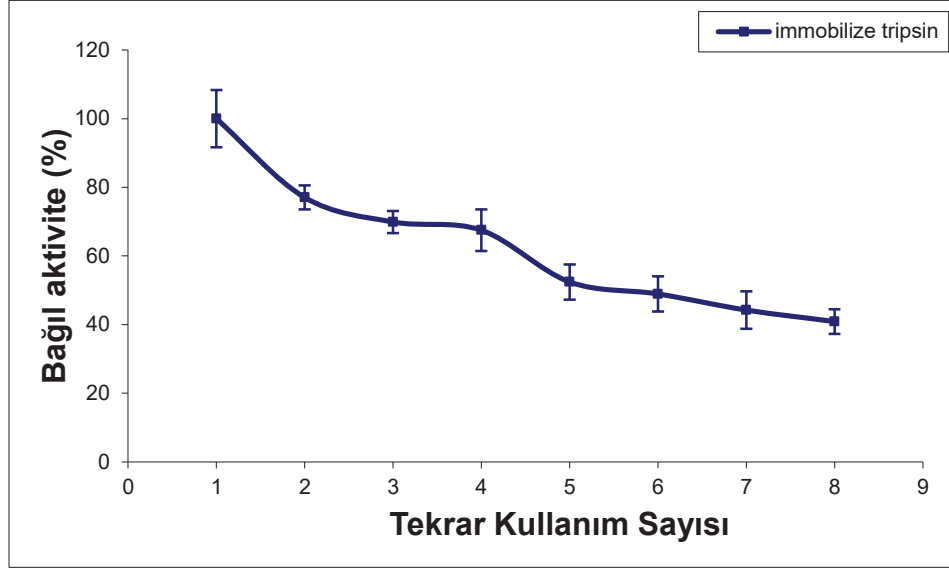
İmmobilize enzimlerin endüstriyel açıdan değerini etkileyen bir parametre de bu preparatların birçok kez ve uzun süre kullanılabilmesidir. Bu amaç ile immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği uygun tampon çözeltisinde (0,1 M, pH=7,5 fosfat tamponu) tespit edilmiştir.



Şekil 5.16. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-TA-TR) 55 °C de termal kararlılığı

30°C’de 10 dakikalık inkübasyonlar sonrasında, immobilize enzimler 4°C’de santrifüjlenerek üst faz alınarak aktiviteleri ölçülmüştür. Daha sonra immobilize enzim, immobilizasyon prosesi esnasında kullanılan uygun çözelti (0,1 M, pH=7,5 fosfat tamponu) ile yıkanarak tekrar aktivite ölçümü yapılmıştır. Bu işlemler ardarda tekrarlanarak enzimin kaçınıcı ölçümde ne kadar aktivite kaybettiği tespit edilmiştir. Bu denemeler için bir ayda dört gün aralıklarla sekiz ölçüm alınmıştır. Immobilize enzim diğer günlük aktivite ölçümüne kadar 4°C’de saklanmıştır.

Şekil 5.17.’de görüldüğü gibi immobilize tripsinin sekiz ölçüm sonunda %40 aktivitesini koruduğu gösterilmektedir [120]. Bu sonuç yalnızca bir kez kullanılabilen serbest enzimden farklı olarak, immobilize enzimin birçok kez tekrar kullanılabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilir olmaları enzimin ekonomik kullanımı için önemli olduğu da bilinmektedir. Tripsin enzimi kullanılarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik yüksek seviyede görülmektedir [8,127,138,169]. Bayramoğlu ve ark. manyetik polimetilmetaakrilat üzerine tripsin immobilize edip adsorpsiyonunu çalışmışlardır ve tekrarlanabilirliğini 7 kez yapılan ardı ardına ölçümlerde %23 oranında aktivitesini yitirdiğini tespit etmişlerdir [8]. Li ve ark. polivinilklorit mikrokürecikler üzerine kemotripsin-tripsin immobilize etmişler ve tekrarlanabilirlik çalışmaları ile yaklaşık %70 oranında başlangıç aktivitesini koruduğunu göstermişlerdir [138].



Şekil 5.17. İmmobilize tripsinin (MNP-TA-TR) 0,1 M pH=7,5 fosfat tamponunda tekrarlanabilirliği

### 5.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Tannik Asit-Tripsin İmmobilizasyonu İçin LC-MS/MS Çalışmaları

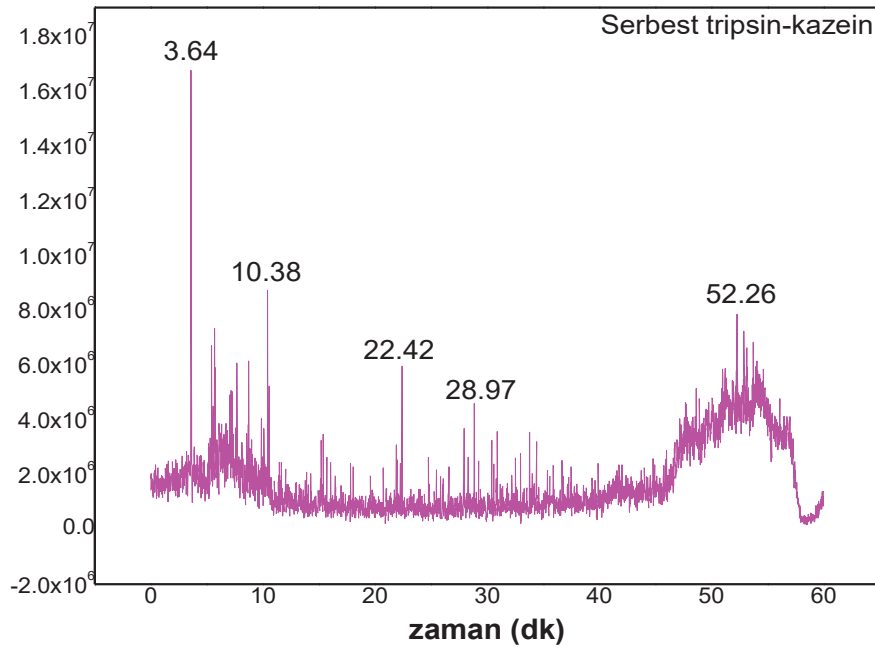
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) çok düşük konsantrasyonlarda maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca sonuçların doğrulanmasına da gerek duyulmamaktadır. LC-MS/MS tekniğinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan örnek moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. Tripsin enzimi proteinleri peptitlere ayırmak için deneylerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tripsin spesifik olarak lizin ve arginin aminoasitlerinin karboksilik zincirindeki peptit bağlarını hidroliz eder. Protein sindirimi için kullanılan immobilize ve serbest tripsinin etkisi ve kullanılabilirliği BSA ve kazein model proteinleri kullanılarak test edilmiştir. Bu peptit parçalarının sonuçları LC-MS/MS ile analiz edilmiştir.

#### 5.3.1. Kazein proteini hidrolizinden sonra LC-MS/MS çalışmaları

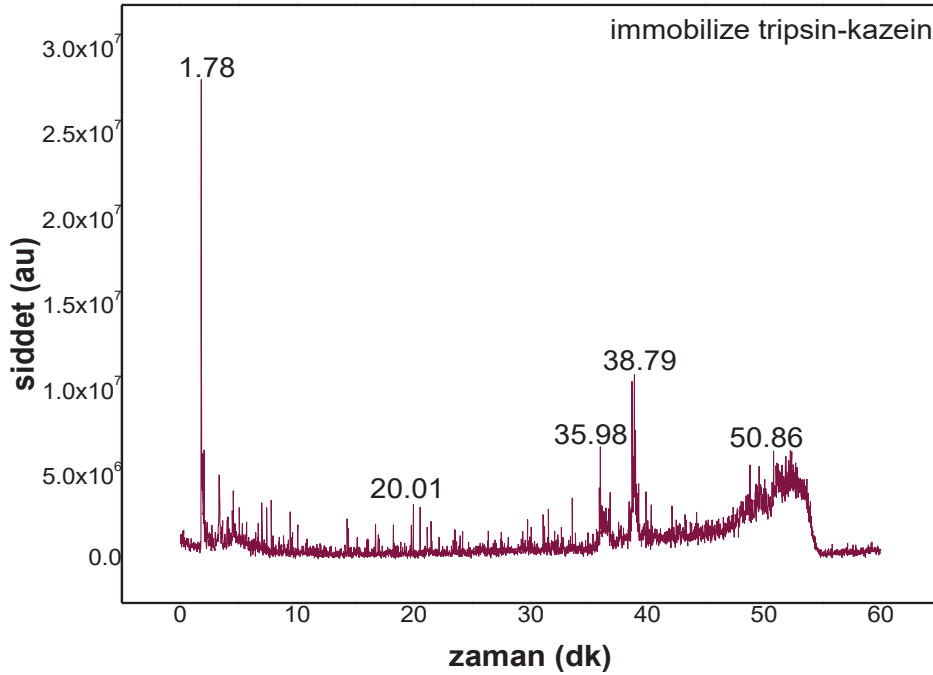
Kazeinin serbest ve immobilize tripsin tarafından sindirimi toplam iyon LC-MS kromatogramları Şekil 5.18.'de ve Şekil 5.19.'da gösterilmiştir. Ancak, serbest tripsin sindirimi durumunda pikler immobilize tripsin piklerinden daha yoğundur. Çünkü kazeinin peptit parçalarına serbest tripsin tarafından daha etkili olarak hidroliz edildiği görülmektedir. Bunun sebebi olarak, kazeinin en önemli özelliği yavaş



sindirilmesidir. Araştırmalara göre kazeinin sindirilmesi yaklaşık 7-8 saat sürebilmektedir. Serbest tripsin ile 13 saatlik hidroliz ve immobilize tripsinin 1 saatlik hidrolizi arasındaki fark kazeinin nasıl davrandığını kromatogramların yoğunluğu şeklinde göstermiştir [170]. Bu sonuçlardan yola çıkarak immobilize tripsinin protein sindiriminde ve birincil yapı tanımlanmasında kullanılabilir olduğunu, fakat kazein hidrolizinin uzun sürdüğü Bayramoğlu ve ark. tarafından da tespit edilmiştir [169].



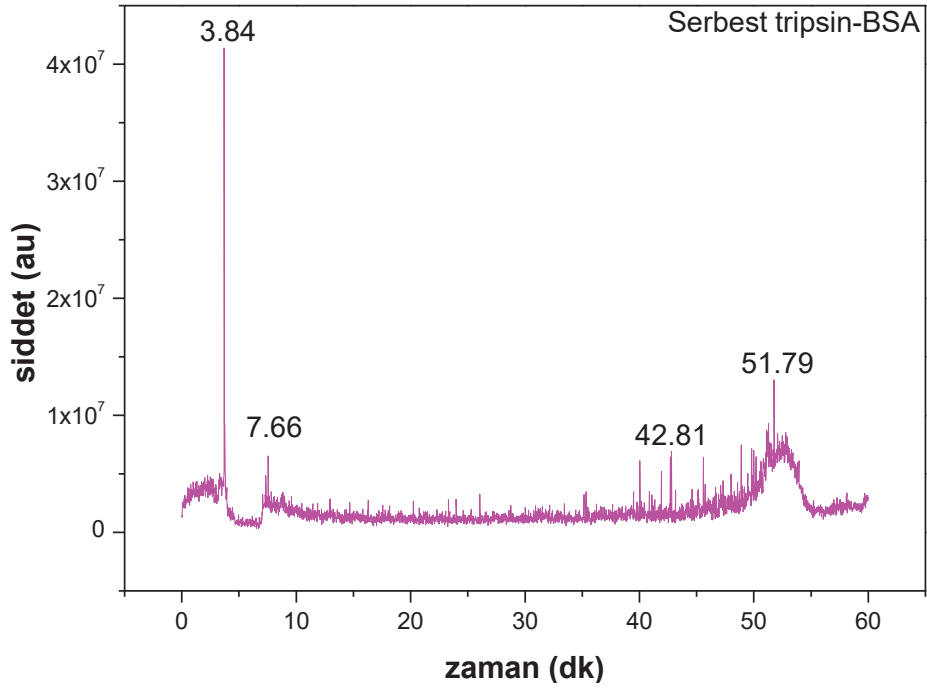
şekil 5.18. Serbest tripsin için kazein proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi



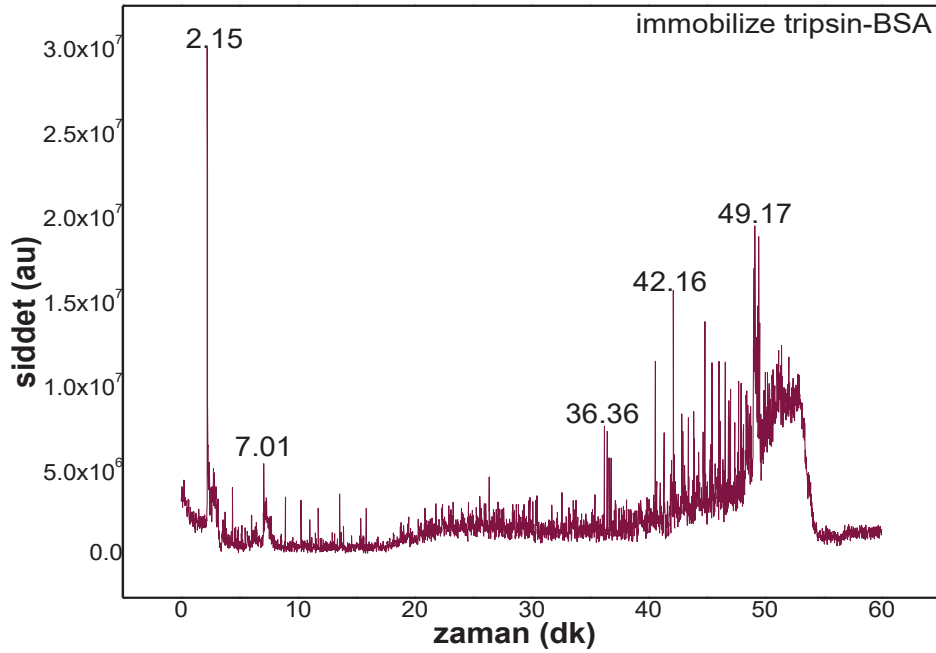
Şekil 5.19. İmmobilize tripsin (MNP-TA-TR) için kazein proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi

### 5.3.2. BSA proteini hidrolizinden sonra LC-MS/MS çalışmaları

BSA proteini 607 amino asitten oluşmaktadır. Bunlardan 26'sı arginin 60'ı lizin artığıdır. Tripsin, BSA'yı bu lizin ve arginin artıklarından sonra parçalayarak fragmanlara ayırır [89]. BSA proteinin serbest ve immobilize tripsin tarafından sindirimi toplam iyon LC-MS kromatogramları Şekil 5.20. ve Şekil 5.21.'de verilmiştir. Kromatogramda piklerin en önemli çoğunluğunun gerçekte aynı olduğu, BSA sindirim mekanizmasının aynı şekilde basit olarak çalıştığını göstermektedir [171, 172]. Ancak, immobilize tripsinin BSA'yı sindirimi durumunda pikler serbest tripsin piklerinden çok daha yoğundur. İmmobilize tripsin daha kısa sürede BSA proteini daha iyi hidroliz etmiştir. Bunun nedeni olarak BSA'nın peptit parçalarına immobilize tripsin tarafından daha etkili olarak hidroliz edildiği görülmektedir. Aynı zamanda, bazı pikler serbest tripsinin hidroliz kromatogramlarında da gözlenmemiştir. Serbest tripsinin, düşük molekül ağırlıklı peptitlere, BSA'nın peptit parçalarını hidroliz etmeye başladığı ileri sürülmektedir. Bu yüzden daha fazla peptit parçaları ve uygun destek maddesi üzerine peptit sindirilmesini önleyen immobilize tripsin tarafından elde edilmektedir. Bu özellik proteomik yaklaşım temelli kütle



Şekil 5.20. Serbest tripsin için BSA proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi



Şekil 5.21. İmmobilize tripsin (MNP-TA-TR) için BSA proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi

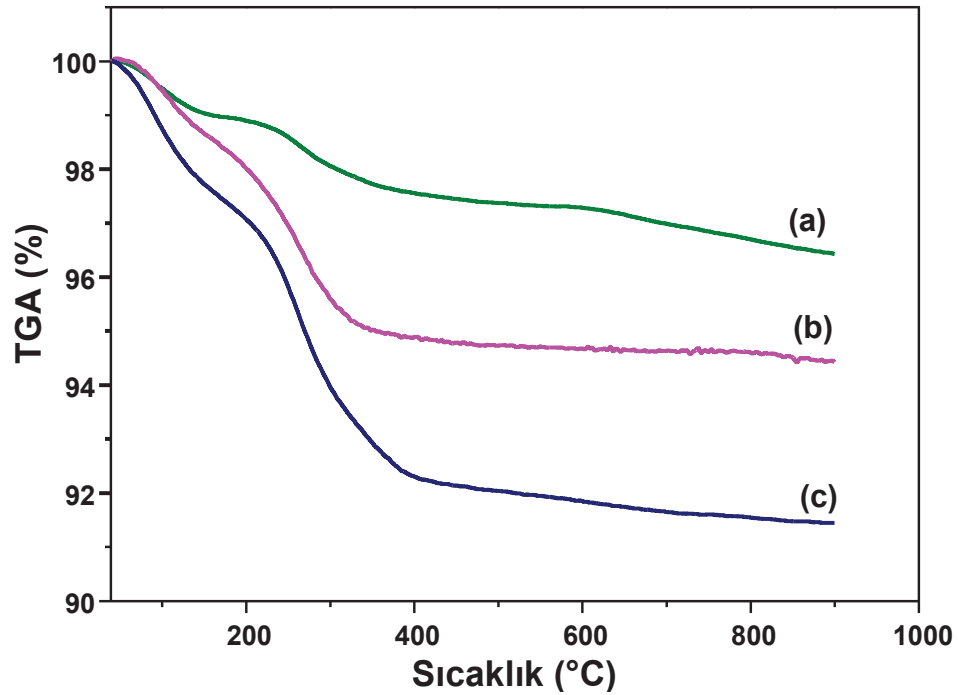
spektrometresi tarafından proteinlerin tanımlanmaları çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda, tripsinin otohidrolizinin önlenmesi ve tripsinin kendi sindiriminden kaynaklanan safsızlıkları uzaklaştırması enzim immobilizasyonu ile elde edilebilmektedir [171,172]. İmmobilize tripsin ile gerçekleştirilen hidroliz

serbest tripsin ile karşılaştırıldığında zaman ve peptid verimi göz önüne alındığında, enzimler için immobilizasyon işleminin ne kadar önemli olduğu görülmektedir [112].

#### 5.4. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Gallik Asit-Tripsin İmmobilizasyonu İçin Karakterizasyon

##### 5.4.1. Termal analiz çalışmaları

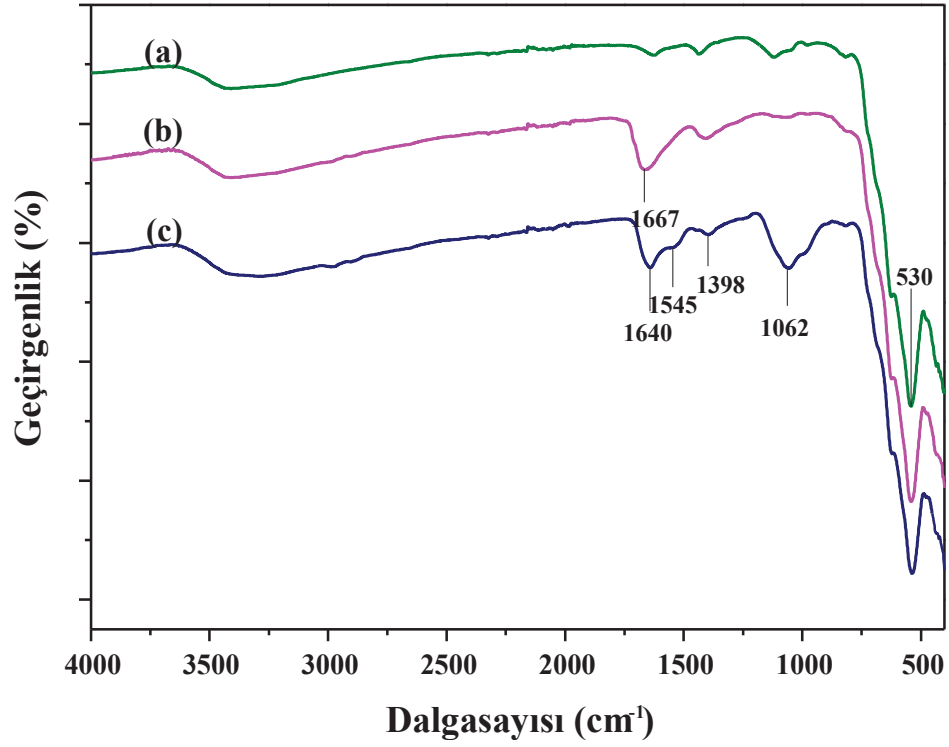
MNP, MNP-GA ve MNP-GA-TR'in termal kararlılıkları TGA kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 5.22.). MNP toplamda %3,57 ağırlık kaybetmiştir. Bu, madde üzerinde fiziksel olarak adsorblanan suyun kaybedilmesidir [115]. Benzer çalışmalarda da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> için fiziksel olarak adsorblanan su miktarı yakın miktarlarda bulunmuştur [124,129]. MNP-GA ise 40-900°C arası %5,6 ağırlık kaybettiği açıkça görülmektedir. Son olarak, MNP-GA-TR ise 40-900°C aralığında %8,6 ağırlık kaybetmiştir. Bunun nedeni, tripsin enzimi ve gallik asit molekülü arasındaki bozunmalardan kaynaklı olabilmektedir.



Şekil 5.22. TGA görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-GA, (c) MNP-GA-TR

#### 5.4.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi çalışmaları

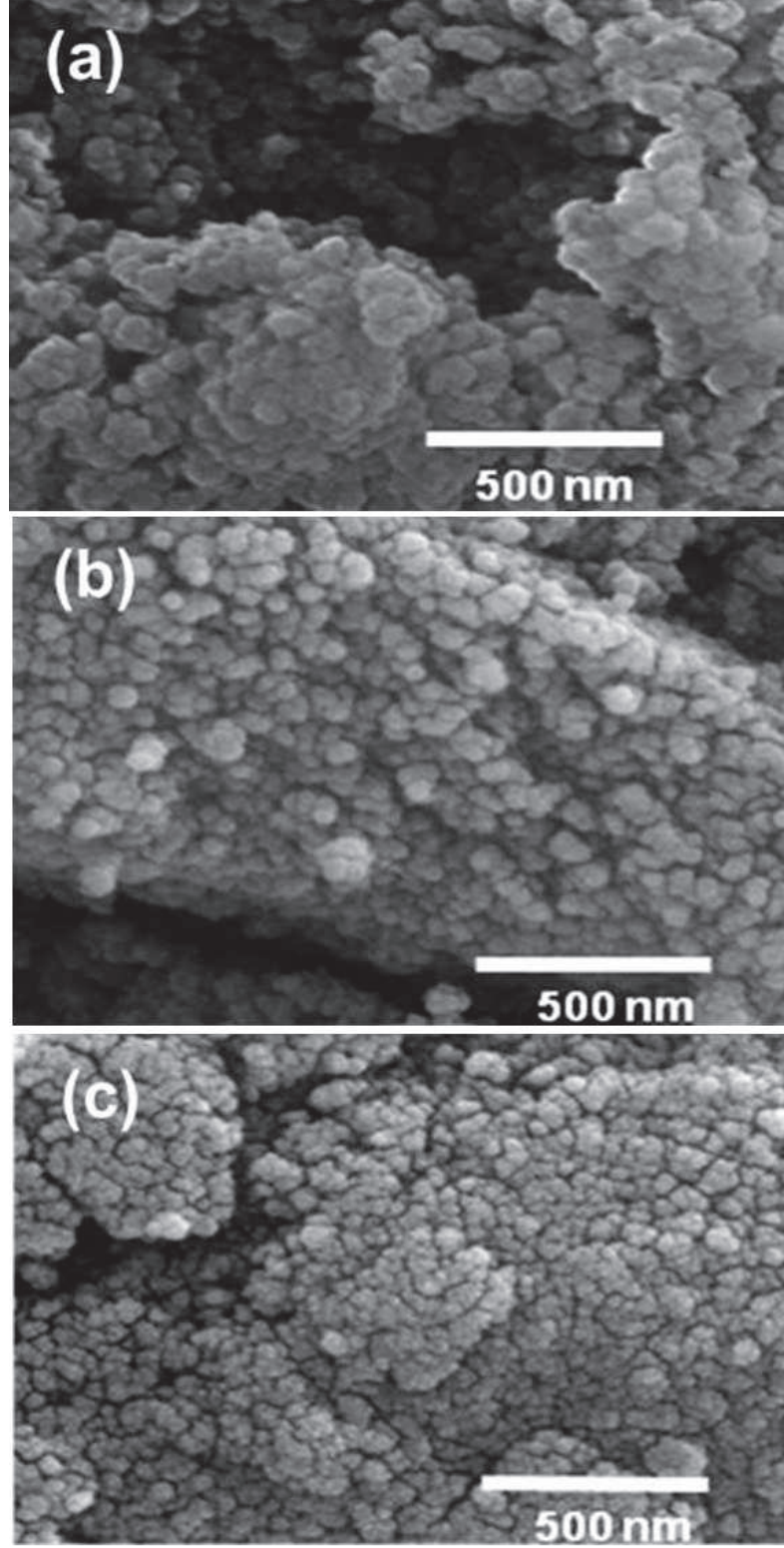
MNP, MNP-GA ve MNP-GA-TR için FTIR görüntüleri Şekil 5.23.'te gösterilmiştir. MNP'lerin varlığı iki güçlü pik olan  $530$  ve  $627\text{ cm}^{-1}$  görülmektedir [120,130,131]. Şekil 5.23. (a) spektrumu  $530\text{ cm}^{-1}$  de güçlü absorpsiyon pikinin demir oksitin tipik Fe–O titreşiminden meydana geldiğini göstermektedir [132]. Şekil 5.23. (a)  $1300\text{ cm}^{-1}$  ve  $1700\text{ cm}^{-1}$  arasındaki adsorbsiyon pikleri Şekil 5.23. (b)'den farklıdır. Bu farklılık, gallik asitin hidroksil ve karboksilik asit gruplarından kaynaklıdır. Şekil 5.23. (b) spektrumunda  $1667\text{ cm}^{-1}$  yer alan yoğun ve belirgin pik, aromatik benzen halkasındaki  $\text{C}=\text{C}$  bağlarını gösteren titreşim uzantılarından kaynaklı olabilmektedir. Bu sonuçlardan IR spektrumuna göre, MNP'ler üzerine gallik asit molekülü başarılı bir şekilde modifiye edilmiştir. Ek olarak Şekil 5.23. (c) spektrumunda amit II bantı düz N–H titreşim bağlarından kaynaklanmaktadır ve karbonil gerilimin titreşiminden kaynaklı amit I bantı  $1545\text{ cm}^{-1}$  ve  $1640\text{ cm}^{-1}$  de sırasıyla yerleşmiştir. Şekil 5.23. (c) spektrumunda  $1062\text{ cm}^{-1}$  deki geniş bant triptofan aminoasit artıklarını onaylar ve serin artıklarını gösteren yaklaşık  $993\text{ cm}^{-1}$  de onun omzudur. Ancak, karbonil grubunun hem tripsin hem de gallik asitle kullanılabilir olmasıyla bu kısma ilişkin titreşim pikleri spektrumun (c) de üst üste gelmiştir [173-175]. Böylece, IR spektrumları manyetik nanopartikülün gallik asit modifikasyonunu ve tripsin immobilizasyonu doğrulamaktadır.



Şekil 5.23. FTIR görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-GA, (c) MNP-GA-TR

### 5.4.3. Taramalı elektron mikroskobu çalışmaları

Şekil 5.24.'de MNP, MNP-GA ve MNP-GA-TR için SEM görüntüleri verilmiştir. Herbiri yoğun, siyah ve toz manyetik nanopatiküllerin tanecik boyutlarının yaklaşık 100 nm den daha küçük olduğu görülmektedir. Şekil 5.24. (b) ve Şekil 5.24. (c), Şekil 5.24. (a) ile karşılaştırıldığında  $Fe_3O_4$  nanopatikülleri modifiye olduktan sonra pürüzlülüğün arttığı görülmektedir [138]. Ayrıca yapılarda bir yığılma ve kümeleşme görülmektedir. Bu partiküller arası manyetik etkileşimden kaynaklanmaktadır.  $Fe_3O_4$  nanopatikülleri üzerine gallik asit ve tripsin enzimi bağlandığında,  $Fe_3O_4$  nanopatikülleri yük kazanacağından dolayı kümeleşme daha fazla olmaktadır.

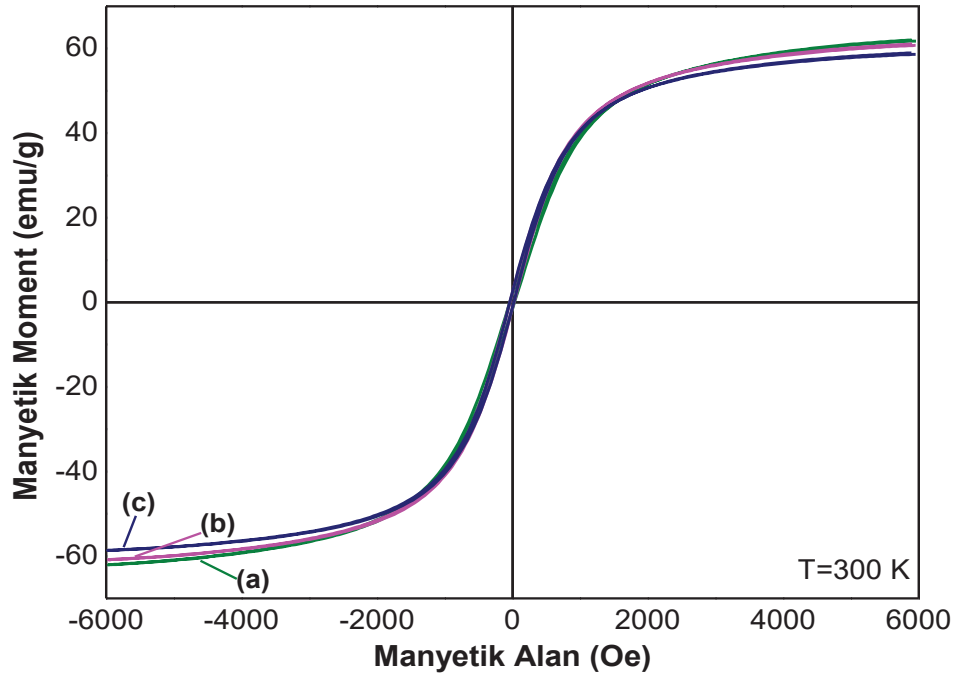


Şekil 5.24. SEM görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-GA, (c) MNP-GA-TR

#### 5.4.4. Titreşen örnek magnetometresi çalışmaları

Şekil 5.25.'te MNP, MNP-GA ve MNP-GA-TR'in oda sıcaklığında VSM cihazından elde edilen histerisiz eğrileri yer almaktadır.

Şekil 5.25.'te MNP için doymuş manyetiklik 61,92 emu/g iken, MNP-GA-TR için doymuş manyetiklik 60,90 emu/g değerindedir [120]. MNP-GA doymuş manyetiklik 58,59 emu/g'dır. Bu farklılık, gallik asitli modifikasyonun ve tripsin immobilizasyonunun mıknatıslanma değerinin doğrulandığını göstermektedir. Kaplama maddesi gallik asitin, malzemelerdeki manyetik baskınlığın zor uyumu nedeniyle nanopartiküller üzerindeki harici bir manyetik alan tarafından uygulanan kuvveti azalır. Böylece kaplanmış parçaçığın mıknatıslanma değeri, kaplanmamış olandan daha küçüktür ve mıknatıslanma daha çok immobilizasyon tarafından azaltılmıştır. [176, 177].

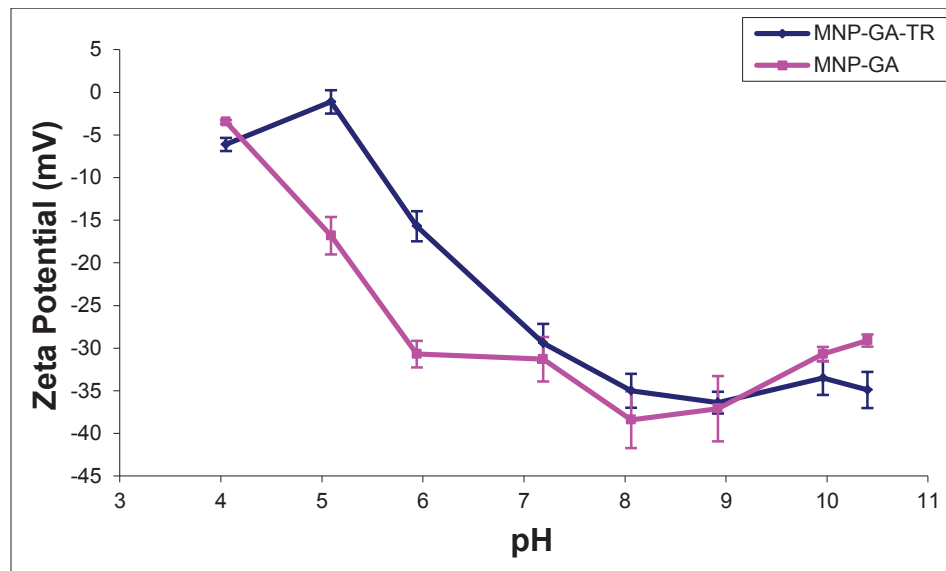


Şekil 5.25. VSM histerisiz eğrileri (a) MNP, (b) MNP-GA, (c) MNP-GA-TR



#### 5.4.5. Zeta potansiyeli analiz çalışmaları

Şekil 5.26.'da MNP-GA ve MNP-GA-TR sulu çözeltilerinin zeta potansiyel eğrileri gösterilmiştir. Eğrilere bakıldığında iki numune de, pH 4-11 arasında yüksek negatif potansiyel değerleri göstermektedir. MNP-GA zeta potansiyeli, gallik asitin karboksilik asit fonksiyonel grubunun bozunmasından dolayı negatif yüklenmiştir. Buna ek olarak, manyetik nanopartikül için zeta potansiyel değerinin tripsinin izoelektrik noktasına yaklaştığında (pH = 10,5) artış gösterdiği görülmektedir. İmmobilizasyon prosedürü elektrostatik etkileşime dayanmaktadır. İmmobilizasyonun yürütüldüğü pH olan 7,5 da tripsin enzimi ve MNP-GA zıt yüke sahiptirler. Elektrostatik etkileşimin pozitif yüklenen tripsin ile gallik asitin  $-COO^-$  den dolayı negatif yüklenmesi arasında olduğunu söylenebilir. Gallik asitin tüm hidroksil grupları molekülün bir bölgesine uzanmaktadır ve bu hidroksiller demir oksitin  $Fe^{3+}$  iyonu ile güçlü kompleksler oluşturmaktadır. Bu nedenle, hidrojen bağlanmasını sağlamak için kalan fonksiyonel gruplar yoktur. Geriye kalan grup, karboksilat anyonu zıt yüklü bir molekülle elektrostatik etkileşim yeteğine sahiptir [178-181].

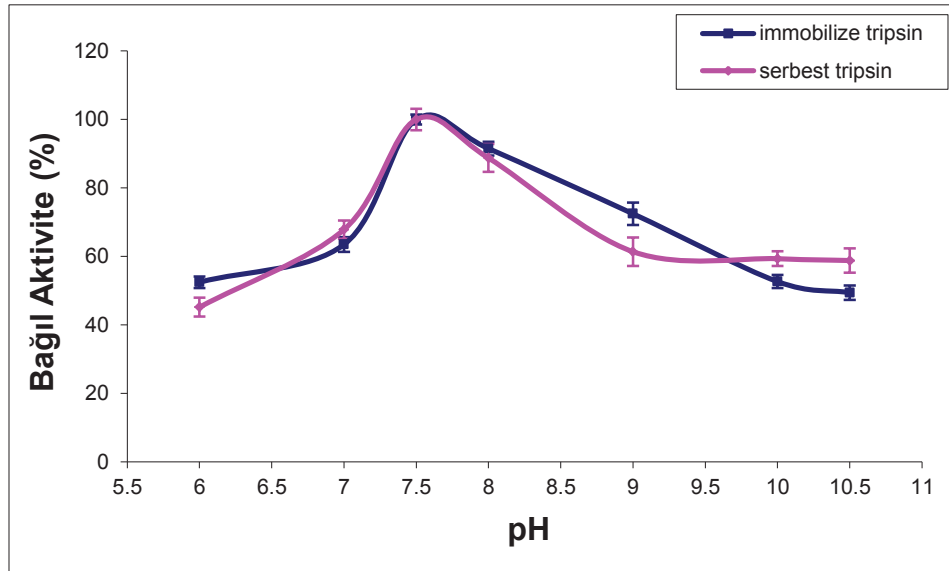


Şekil 5.26. MNP-GA ve MNP-GA-TR'in zeta potansiyeline karşı pH grafiği

#### 5.4.6. pH kararlılığı çalışmaları

Şekil 5.27.'de görüldüğü gibi serbest enzim ve immobilize enzim pH kararlılıkları arasında benzer sonuçlar elde edilmiştir, immobilize enzim serbest enzim ile karşılaştırıldığında serbest enzim pH 7-9 aralığında stabilitesini korurken immobilize enzimlerin bazik bölgede (pH 7-10) daha kararlı bir yapıya sahip olduğu ve pik alanının yaygınlaştığı görülmektedir.

Serbest ve immobilize tripsinin optimum pH değeri 7,5 olarak bulunmuştur [120]. İmmobilize tripsinin aktivitesi, serbest tripsinle karşılaştırıldığında belli pH değerlerinde biraz daha gelişmiştir. Ancak, immobilizasyon üzerinde hiç bir önemli aktivite gelişmesi gözlenmemiştir. Tripsin immobilize edilen manyetik nanopartiküllerin, serbest tripsinin oldukça benzerliğine dayanan immobilize tripsin için bir mikroçevre elde etmesinin muhtemel bir sonucudur. Benzer sonuçlar başka yerlerde de verilmiştir [147,148,182].

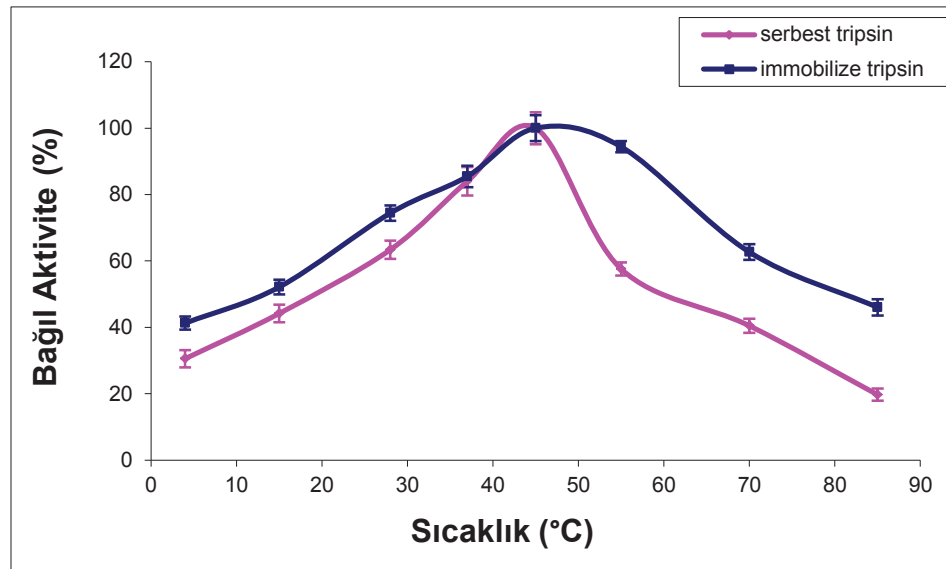


Şekil 5.27. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) pH kararlılığı

#### 5.4.7. Sıcaklık kararlılığı çalışmaları

Hem serbest tripsin hem de immobilize tripsin için optimum sıcaklık 45 °C olarak bulunmuştur (Şekil 5.28.). Benzer sonuçlar farklı çalışmalarda da bulunmuştur [112,120,183]. Immobilize tripsin serbest tripsinle karşılaştırıldığında 45 °C altında ve üzerindeki sıcaklıklarda daha yüksek aktiviteye sahiptir.

İmmobilize tripsin aktivitesinin geliştirilmesi, gallik asit kaplı manyetik nanopartiküllerle tripsinin katı bağlanmasından dolayı ısıtma üzerine tripsinin konformasyonel bir değişim ile azalmasına bağlanabilir. Serbest tripsininin aktivitesi optimum sıcaklıktan sonra immobilize tripsinle karşılaştırıldığında daha da azalır.



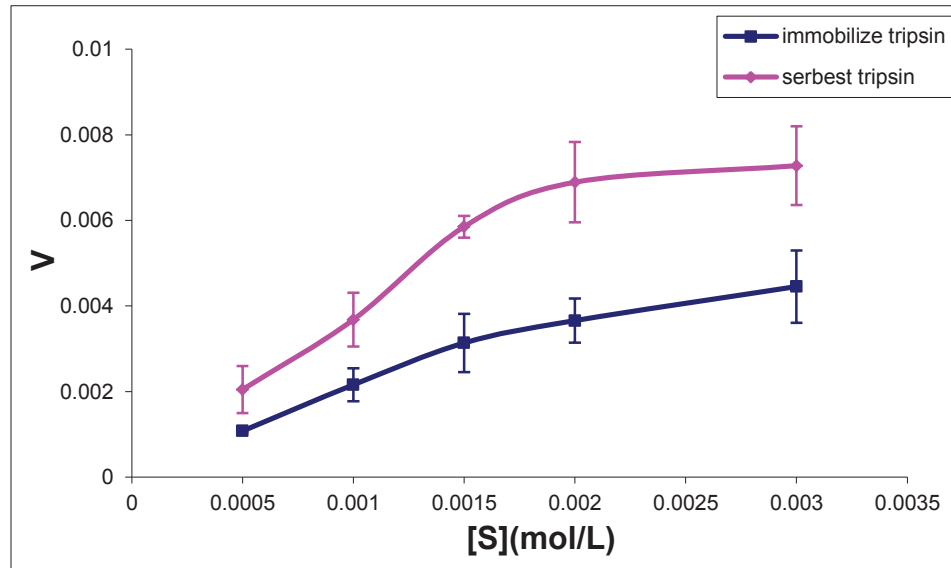
Şekil 5.28. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) sıcaklık kararlılığı

Serbest tripsininin aktivitesi optimum sıcaklıktan sonra immobilize tripsinle karşılaştırıldığında daha da azalır. Bunun nedeni, artan sıcaklıkla enzimatik aktivitenin azalması ve yapısal bozulmaya yol açan enzimlerin denatürasyon geçirmesi gerçeğine dayanmaktadır [174]. 85 °C sıcaklıkta, immobilize tripsin serbest tripsinden daha yüksek bir aktivite sergilemiş ve bu onun daha yüksek termal stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir.

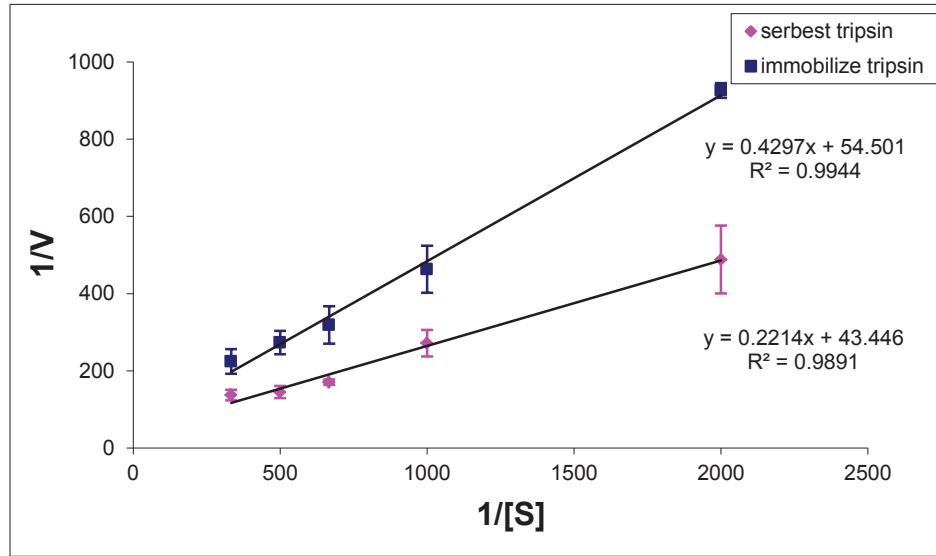
#### 5.4.8. Substrat konsantrasyonu çalışmaları

Serbest ve immobilize tripsin için konsantrasyona bağlı hız etkisi Şekil 5.29.'da gösterilmiştir.  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik parametreleri, Şekil 5.30. Lineweaver-Burk diyagramı kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplanan değerlere göre, serbest tripsin için  $K_m$  değeri 5,1 mM iken immobilize tripsin için 7,88 mM olarak bulunmuştur.  $V_{max}$  kinetik parametre değeri ise, serbest tripsin için 23 mM/dk iken immobilize tripsin için 18,3 mM/dk olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.3).

Tablo 5.3.'de bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile farklı çalışmalardaki immobilize ve serbest tripsinin kinetik parametreleri karşılaştırılmıştır. Tablo 5.3.'den görüldüğü üzere tüm çalışmalarda immobilize tripsinin Michaelis sabitinin daha yüksek olduğu görülmektedir [8,138,169,184]. Bu durumu Agyei ve ark. serbest enzimin substratlarla serbestçe hareket ederken, immobilize enzimin destek maddesi ile sterik olarak engellenmiş olabileceğini belirtmişlerdir [184]. Ayrıca immobilizasyon, enzimlerin yapısal değişikliklerine neden olabilir. Burada gözlenen sonuçlar, substratlar için afinitede de bir azalma gösteren immobilize enzimlerin genel gözlemiyle tutarlıdır [185].



Şekil 5.29. Serbest ve immobilize tripsin (MNP-GA-TR) aktivitelerinin BApNA konsantrasyonuna bağlı değişimleri



Şekil 5.30. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) Lineweaver-Burk diyagramı

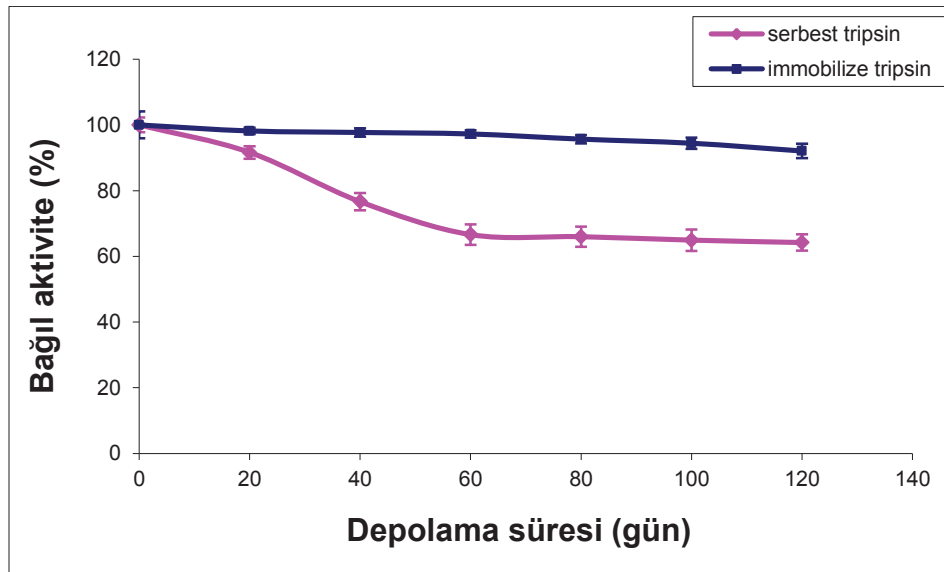
Tablo 5.3. Serbest ve immobilize tripsin (MNP-GA-TR) için  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik parametrelerinin farklı çalışmalarla karşılaştırılması

Trypsin	$K_m$	$V_m$	Referanslar
Serbest tripsin	5,1 mM	23 mM/dk	Bu çalışma
MNP-GA-TR	7,88 mM	18,3 mM/dk	
Serbest tripsin	9,7 mM	5890 U/mg	[8]
Manyetik boncuk üzerine immobilize tripsin	13,6 mM	3946 U/mg	
Serbest tripsin	19,33 ± 3,65 g/L	1,91 ± 0,05 U	[138]
Modifiye polivinil klorit (PVC) üzerine immobilize tripsin-kemotripsin	23,65 ± 4,51 g/L	1,36 ± 0,04 U	
Serbest tripsin	9,3 mM	7345 U/mg	[169]
mp(GMA/MMA)-ABAc üzerine immobilize tripsin	16,8 mM	5115 U/mg	
mp(GMA/MMA)-PhA üzerine immobilize tripsin	21,7 mM	5387 U/mg	
Serbest tripsin	1,8 ± 0,0 mM	296,8 ± 6,1 µmol/mL/min	[184]
Poliester üzerine immobilize tripsin	5,0 ± 0,1 mM	1,0 ± 0,0 µmol/mL/min	

#### 5.4.9. Depo kararlılığı çalışmaları

Genellikle çözelti ya da tampon içerisindeki enzimler bekletme ile kararlılıkları stabil halden uzaklaşmaktadır ve böylece aktivitelerini yitirmektedirler [186].

Şekil 5.31.'de serbest ve immobilize tripsinin depo kararlılıklarını incelemek için 4°C'de 0,1 M, pH=7,5 fosfat tamponunda bekletilerek 20 gün aralıklarla belirlenen aktiviteleri gösterilmiştir. Toplamda yedi ölçüm alınarak 120. günün sonunda belirlenen son aktiviteyle, immobilize enzim 120 gün sonunda aktivitesini %92 oranında korurken, serbest enzim aynı şartlarda daha düşük (%64) bir koruma göstermiştir. Enzimleri uzun süre saklama durumlarında, enzim immobilizasyonunun enzimdeki aktivite kaybını önemli ölçüde azalttığı görülmektedir. Bunun sebebi, immobilizasyon ile tripsin molekülü gallik asite güçlü bağlarla bağlanmış ve böylece serbest tripsinden daha stabil bir yapıya sahip olması gösterilmiştir.

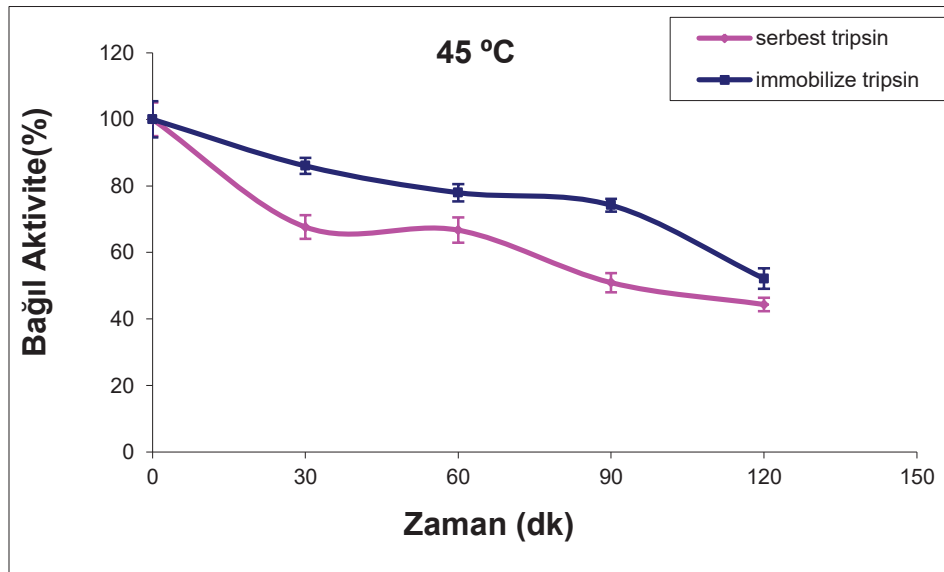


Şekil 5.31. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) depo kararlılığı

#### 5.4.10. Termal kararlılık çalışmaları

Serbest ve immobilize tripsinin zamana bağımlı termal kararlılıkları 45 °C ve 55 °C sıcaklıklar için farklı sürelerde (30, 60, 90 ve 120 dakika) belirlenmiştir (Şekil 5.32. ve Şekil 5.33.).

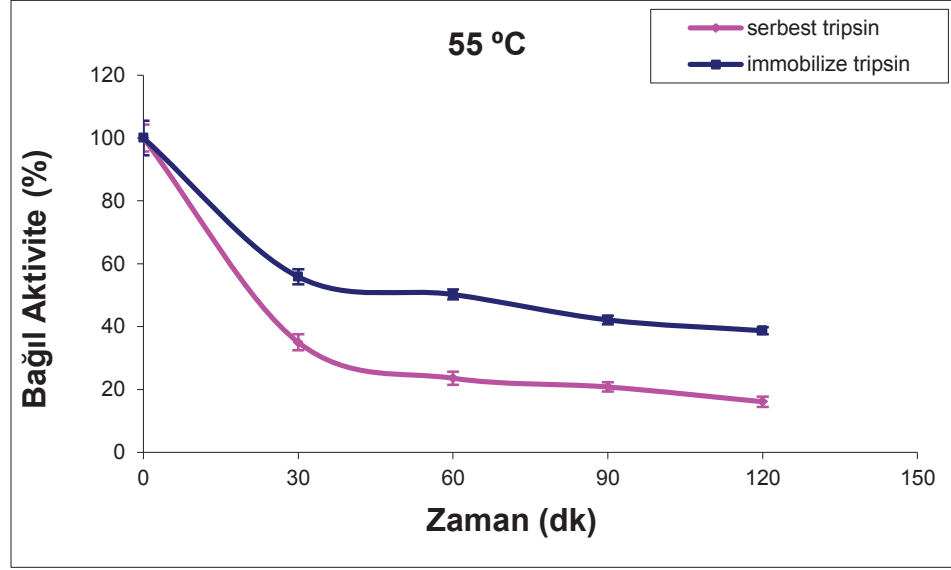
İmmobilize tripsin her iki sıcaklıkta da serbest tripsine göre daha yüksek termal kararlılığa sahiptir. 45 °C’de, immobilize tripsin %52 kararlılığını korurken serbest tripsin %44 kararlılığını korumaktadır. 55 °C’de ise, 120 dakika sonunda immobilize tripsin %38,7 kararlılığını korurken serbest tripsin %16 kararlılığını korumaktadır. Bu immobilize tripsinin serbest tripsine göre daha iyi bir kararlılığa sahip olduğunu göstermektedir. Birçok inek pankreasından elde edilen tripsin çalışmalarında, enzim 50 °C ye kadar aktivitesinin büyük bir bölümünü korurken bu sıcaklığın üzerinde aktivitesini hızlı bir şekilde kaybetmektedir [167,168].



Şekil 5.32. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) 45 °C de termal kararlılığı

#### 5.4.11. Tekrarlanabilirlik çalışması

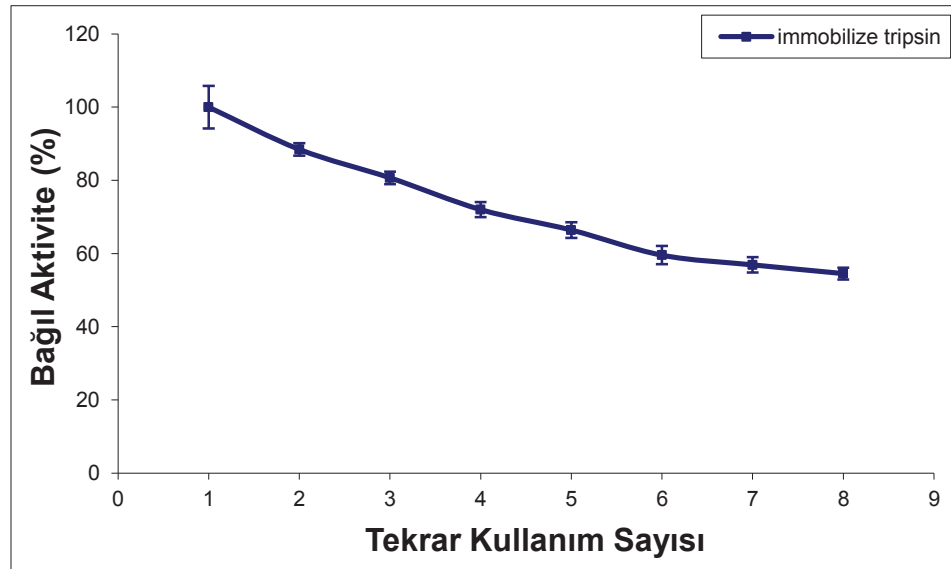
Katalitik ekisini çok az kaybeden immobilize enzimlerin tekrarlanabilirliği enzim immobilizasyonlarının en önemli amaçlarından biridir. Tekrarlanabilirlik çalışması için,



Şekil 5.33. Serbest ve immobilize tripsinin (MNP-GA-TR) 55 °C de termal kararlılığı

immobilize enzime uygun tampon çözeltisinde (0,1 M, pH=7,5 fosfat tamponu) bir aylık sürede toplamda sekiz ölçüm yapılmıştır (Şekil 5.34.).

İmmobilize tripsinin 30 °C'de sekiz ölçüm sonunda ilk aktivitesinin %54,5 olan kısmını koruduğu görülmektedir. Bu sonuç immobilize enzimin birçok kez tekrar kullanılabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.



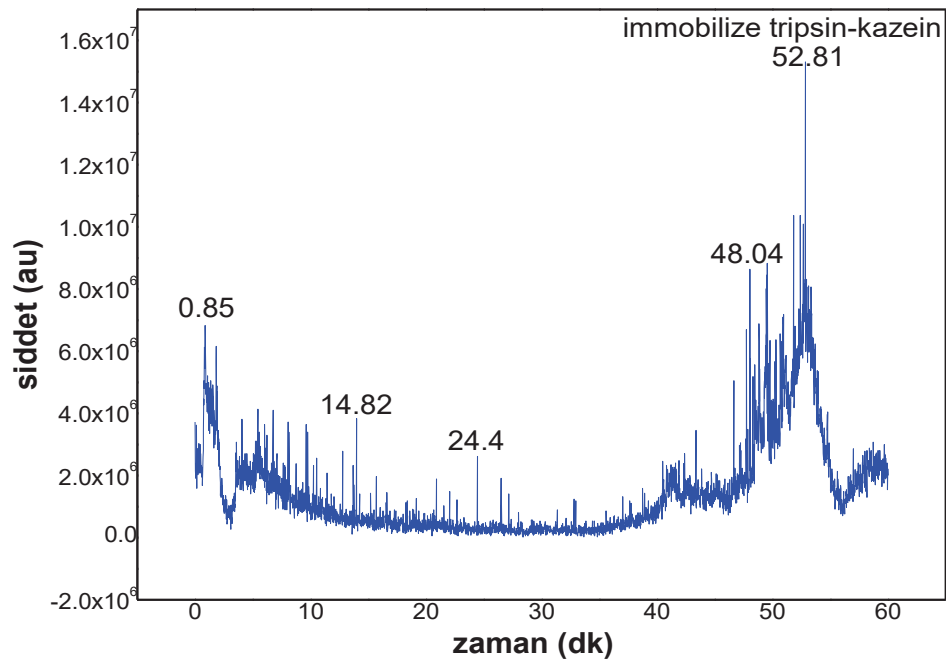
Şekil 5.34. İmmobilize tripsinin (MNP-GA-TR) 0,1 M pH=7,5 fosfat tamponunda tekrarlanabilirliği



## 5.5. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Gallik Asit-Tripsin İmmobilizasyonu İçin LC-MS/MS Çalışmaları

### 5.5.1. Kazein proteini hidrolizinden sonra LC-MS/MS çalışmaları

Kazeinin immobilize tripsin tarafından sindirimi toplam iyon LC-MS kromatogramları Şekil 5.35.'te verilmiştir. Kazein çok yavaş sindirildiği için serbest tripsin sindirimi durumunda pikler immobilize tripsin piklerinden daha yoğundur. Fakat immobilize tripsindeki fonksiyonel gruplardan dolayı özellikle gallik asitin tannik asit gibi çok büyük yapısı olmamasına bağlı olarak immobilize tripsinin kazeini peptit parçalarına serbest tripsine yakın bir şekilde etkili olarak hidroliz ettiği görülmektedir. Kazein hidrolizinin uzun sürdüğü daha önce yapılan çalışmalarda Bayramoğlu ve ark. tarafından da tespit edilmiştir [168].

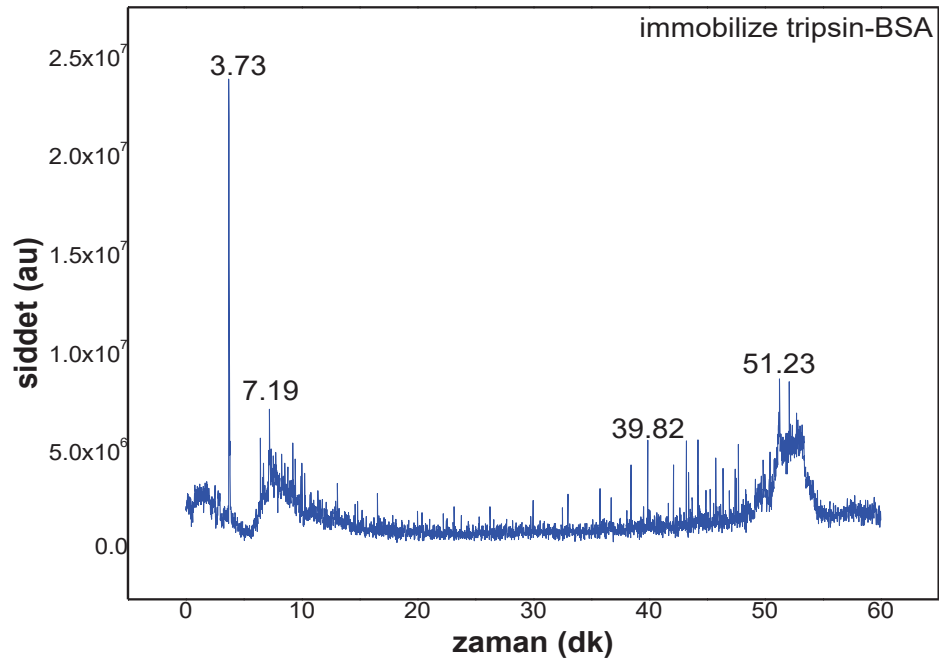


Şekil 5.35. İmmobilize tripsin (MNP-GA-TR) için kazein proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi

### 5.5.2. BSA proteini hidrolizinden sonra LC-MS/MS çalışmaları

BSA proteinin immobilize tripsin tarafından sindirimi toplam iyon LC-MS kromatogramları Şekil 5.36.'da gösterilmiştir. Kromatogramda piklerin en önemli çoğunluğunun gerçekte aynı olduğu, BSA sindirim mekanizmasının aynı şekilde

basit olarak çalıştığını göstermektedir [171, 172]. Ancak, immobilize tripsinin BSA'yı sindirimi durumunda pikler serbest tripsin piklerinden daha yoğundur. İmmobilize tripsin daha kısa sürede BSA proteini daha iyi hidroliz etmiştir. Aynı zamanda, bazı pikler serbest tripsinin hidroliz kromatogramlarında gözlemlenmemiştir. Serbest tripsinin, düşük molekül ağırlıklı peptidlere, BSA'nın peptit parçalarını hidroliz etmeye başladığı ileri sürülmektedir. İmmobilize tripsin ile gerçekleştirilen hidroliz serbest tripsin ile karşılaştırıldığında zaman ve peptid verimi göz önüne alındığında, enzimler için immobilizasyon işleminin ne kadar önemli olduğu görülmektedir [112]. Tannik asit ile immobilize edilen tripsin daha fazla pik yoğunluğuna sahip olmasına rağmen gallik asit ile immobilize edilen tripsin daha az pik yoğunluğuna sahiptir. Bunun nedeni ise büyük bir molekül olan tannik asite bağlı ve tripsin enzimine bağlı bazı fonksiyonel uçlarında sindirime katılmış olabileceği düşünülmektedir.

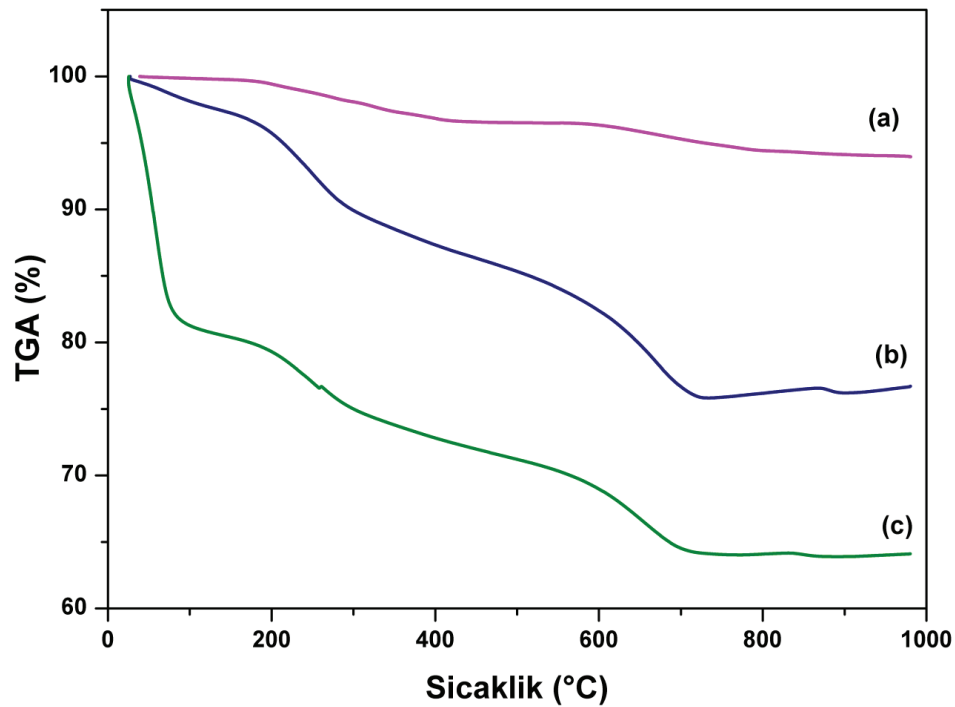


Şekil 5.36. İmmobilize tripsin (MNP-GA-TR) için BSA proteini hidrolizinin LC-MS kromatografisi

## 5.6. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Tanin-Tripsin İmmobilizasyonu İçin Karakterizasyon

### 5.6.1. Termal analiz çalışmaları

Şekil 5.37.'de MNP, MNP-T ve MNP-T-TR için ağırlık kayıplarının karşılaştırmaları TGA yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülleri toplamda %5,8 ağırlık kaybetmiştir. Bu, nanopartikül üzerinde fiziksel olarak adsorblanan suyun kaybedilmesidir [115,124,129,187]. Sahoo ve ark. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülleri üzerine 3-(merkaptopropil) trimetoksisilan (MPTS) molekülü kaplayıp sonrasında bu molekülün üzerini altın nanopartikülleri ile kaplamışlar ve buradaki Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> için fiziksel su kaybını %5 olarak bulmuşlardır [124]. MNP-T için 1000 °C'ye kadar çıkıldığında yaklaşık %23 bir ağırlık kaybı söz konusu olmaktadır. 350 °C üzerinde önemli ağırlık kaybı kimyasal olarak bağlanan tanin molekülünün bozunması olarak değerlendirilmiştir. MNP-T-TR için yüksek sıcaklıklarda enzimin denatüre olmasına bağlı olarak yaklaşık %33,5 bir ağırlık kaybı vardır. Bunun sonucu olarak tripsin enziminin ilk denatüre sıcaklığı 65,6 °C olarak gözlenmiştir.



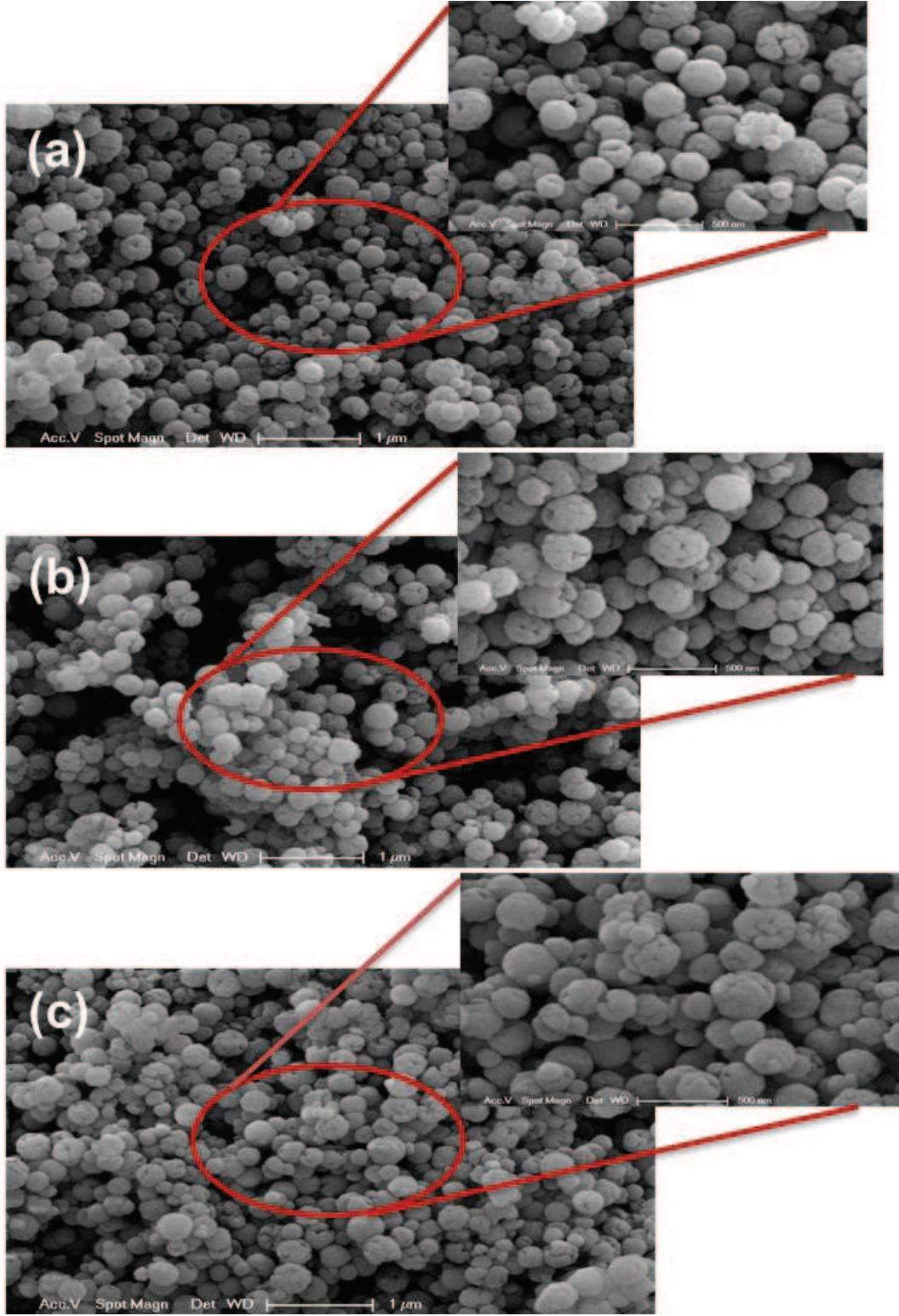
Şekil 5.37. TGA görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-T, (c) MNP-T-TR

### 5.6.2. Taramalı elektron mikroskobu çalışmaları

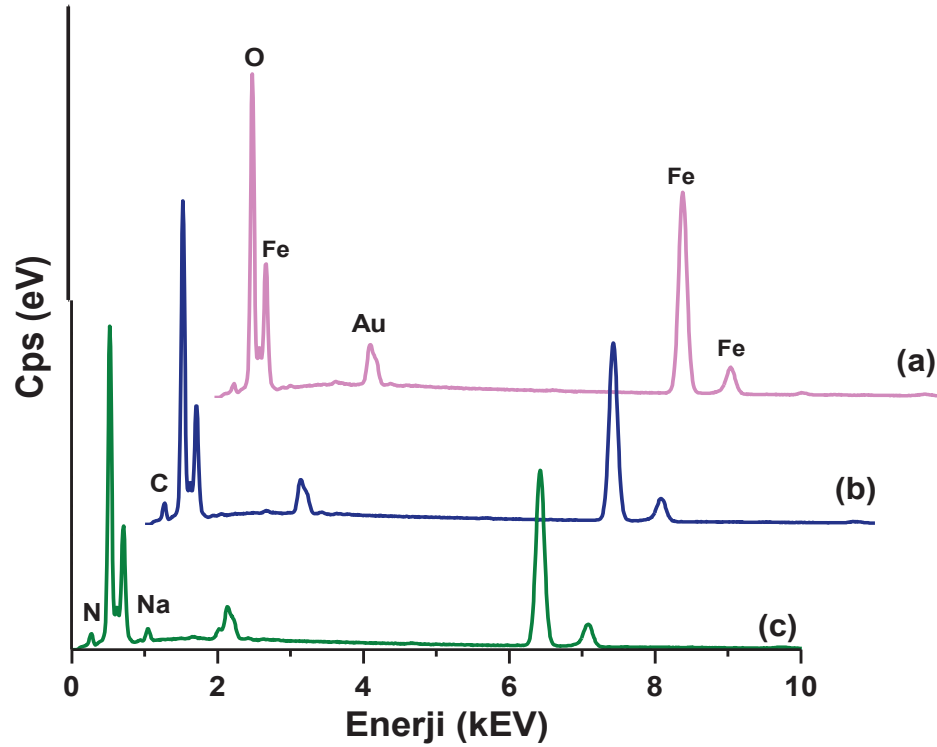
Şekil 5.38.(a)'da 100 nm'den daha küçük  $Fe_3O_4$  nanopartikülleri kümelenmeler sonucu ortalama 200 nm ve daha düşük nanometre boyutlarda küresel şekilde ve yığılmış, toplanmış bir yüzeye sahip yapılar olduğu gösterilmiştir [116,117]. MNP çok farklı boyutlarda üretilebilmektedir, bu nanopatiküllerin çoklu kabuk veya dış yapısından kaynaklanabilmektedir [127,139]. Tanin molekülü modifiye edildikten sonra elde edilen nanopartiküller (b), daha pürüzlü ve küçük boyuttadırlar çünkü yüzeye bağlanan tanin molekülü yüzey alanını genişleterek dağınık yapıları daha da yığılmış bir yapı haline getirmektedir [188]. Tripsin enzimi bağlandıktan sonra da (c), nanopartiküllerin boyutu azalmıştır ve nanopartiküller daha gözenekli ve pürüzlü bir yapı haline dönüşmüştür [138]. Bu nedenle (b) ve (c) yapıları birbirine benzemektedir.

### 5.6.3. Enerji dağılım spektroskopisi çalışmaları

$Fe_3O_4$  nanopartikülleri, tanin ile fonksiyonelleştirilmesi ve tripsin immobilizasyonundan sonraki enerji dağılım spektroskopisi (EDS) görüntüleri (Şekil 5.39.) ve elementel bileşimlerinin yüzdeleri (Tablo 5.4) verilmiştir.  $Fe_3O_4$  (a) spektrumu Fe ve O elementinin bileşimidir [117]. MNP ve MNP-T arasındaki EDS spektrumlarından, MNP-T (b) spektrumundaki C'nun varlığı ve O miktarındaki artış ise tanin molekülünün  $Fe_3O_4$  üzerine bağlandığını göstermektedir. Tanin modifikasyonundan sonra Fe miktarında azalma meydana gelmiştir. MNP-T-TR (c) spektrumunda N elementinin varlığı tripsin enziminin varlığını göstermektedir [116]. Na elementi ise tripsin enzimini çözme ve yıkama çözeltisi olarak kullanılan sodyum fosfat tampon çözeltisinden kaynaklanmaktadır. MNP-T-TR (c) spektrumu yüzdesi, enzim ve fonksiyonel gruplara bağlı olarak aynı zamanda kullanılan tampon çözeltisinden de kaynaklanabilecek fosfor elementi veya diğer elemental kalıntılardan kaynaklı yüzdesi 96,5 olarak görünmektedir. Çözeltilerden kaynaklı çok az miktarda sapmalar söz konusu olabilmektedir.



Şekil 5.38. SEM görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-T, (c) MNP-T-TR



Şekil 5.39. EDS görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-T, (c) MNP-T-TR

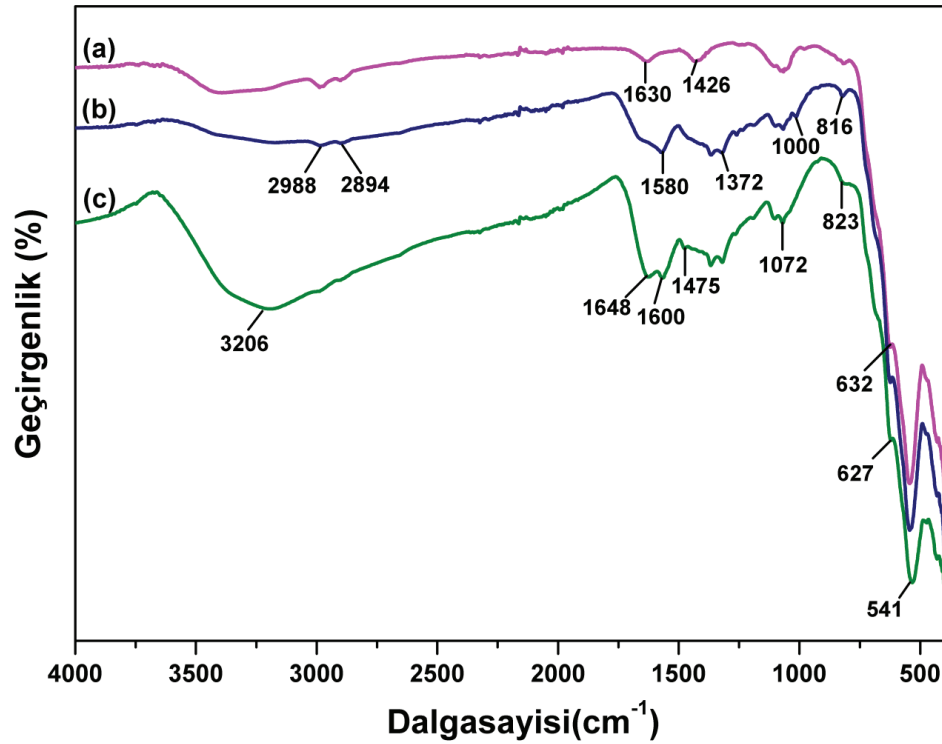
Tablo 5.4. EDS analizlerinin elementel bileşim yüzdeleri

Elements (wt.%)	MNP	MNP-T	MNP-T-TR
Fe	81,4	73,7	68,9
O	18,6	20,8	20,3
C	-	5,5	2,4
N	-	-	2,5
Na	-	-	2,4

#### 5.6.4. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi çalışmaları

MNP, MNP-T ve MNP-T-TR için FTIR görüntüleri Şekil 5.40.'ta değerlendirilmiştir. MNP'lerin Fe–O titreşiminden kaynaklı pikleri  $541$  ve  $632$   $\text{cm}^{-1}$  dalga boylarında görülmektedir (Şekil 5.40.(a)) [116]. Tanin modifiye edildikten sonra,  $1000$  ve  $1500$   $\text{cm}^{-1}$  arasındaki yeni absorpsiyon pikleri başarılı bir şekilde modifikasyonun gerçekleştiğini doğrulamaktadır (Şekil 5.40.(b)).  $1600$  ve  $1372$   $\text{cm}^{-1}$  dalga boyundaki karakteristik pikler sırasıyla aromatik halkaya ve fenol bileşiğinin C–O gerilimine aitken,  $3206$   $\text{cm}^{-1}$  dalga boyundaki pik N–H gerilimine aittir [189-191]. Tripsin immobilizasyonundan sonra organik grupların birçok karakteristik

pikleri görülürken ve buna bağlı olarak Fe–O titreşimlerinin de azaldığı görülmektedir (Şekil 5.40.(c)) [117]. MNP-T-TR'in  $1648\text{ cm}^{-1}$  karakteristik piki tripsin enzimi üzerindeki karboksilik asitin titreşiminden kaynaklı C=O grubuna karşılık gelmektedir. Bu aynı zamanda  $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  arasında yer alan amit I bağını da göstermektedir [78]. Ek olarak,  $3206\text{ cm}^{-1}$  dalga boyundaki geniş pik ise immobilize enzim yüzeyinin üzerinde N–H bağının varlığını göstermektedir.



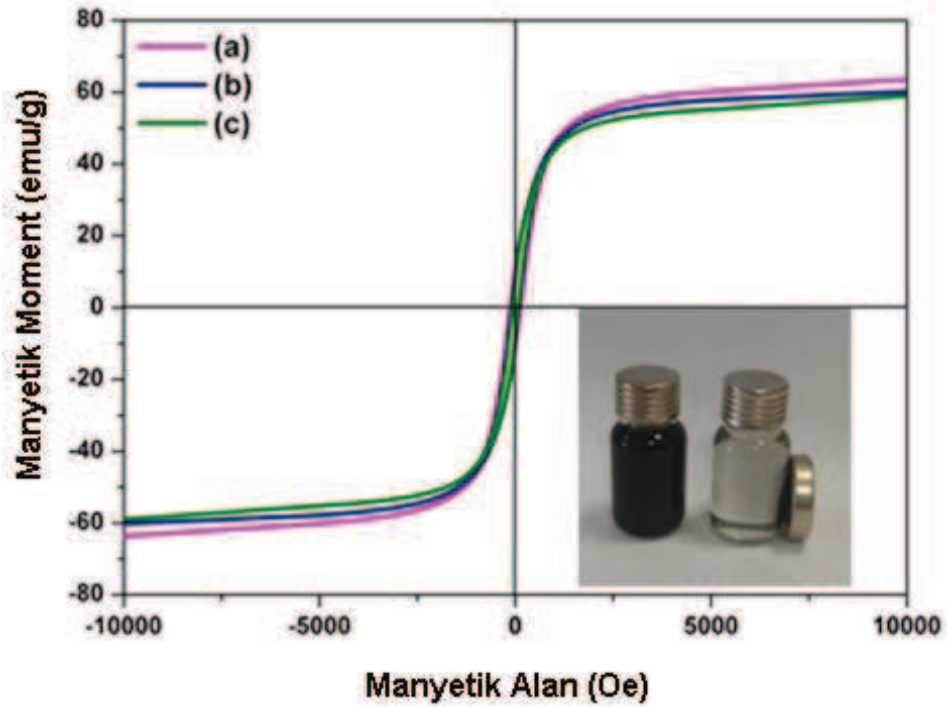
Şekil 5.40. FTIR görüntüleri (a) MNP, (b) MNP-T, (c) MNP-T-TR

### 5.6.5. Titreşen örnek magnetometresi çalışmaları

Şekil 5.41.'de MNP, MNP-T ve MNP-T-TR için oda sıcaklığında VSM cihazından elde edilen histerisiz eğrileri yer almaktadır.

Şekil 5.41.'de MNP için doymuş manyetiklik  $60,18\text{ emu/g}$  iken, MNP-T için doymuş manyetiklik  $57,82\text{ emu/g}$  değerindedir [116,120]. MNP-T-TR için doymuş manyetiklik diğer iki değerden daha düşük bir şekilde  $55,16\text{ emu/g}$ 'dır. Bu farklılık,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  çekirdeğinin indirgenmesinden dolayı manyetik olmayan türlerin ağırlık kaybına atfedilebilir [117]. Şekil 5.41.'de ekli küçük resim,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

nanopartiküllerinin dağılmış hali ve bir magnet yardımı ile 60 saniyeden daha kısa sürede manyetik olarak ayrıldığıının resmini göstermektedir.



Şekil 5.41. VSM histerisiz eğrileri (a) MNP, (b) MNP-T, (c) MNP-T-TR

### 5.7. Protein Sindirimi için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez Çalışmaları

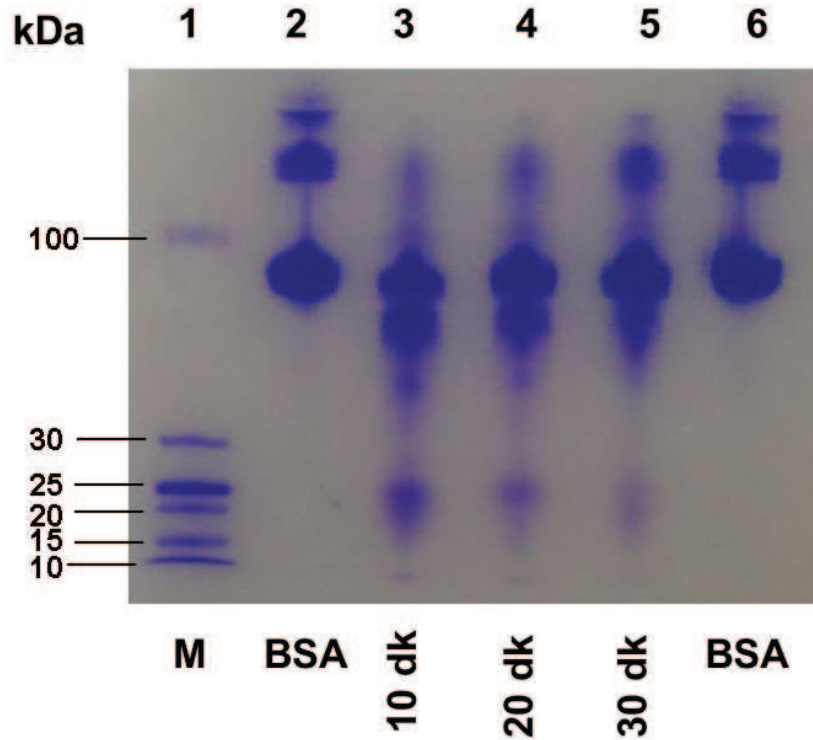
Elektroferez günümüzde saflaştırılmış bir protein örneğinin saflığının kontrolünde, küçük miktarlarda proteinin elde edilmesinde, bir örnekteki proteinlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde kullanılmaktadır. Günümüzde proteinlerin analitik tayinleri için en çok kullanılan yöntem sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroferezidir. Bu yöntemde destek maddesi olarak poliakrilamid polimerinden yararlanılır. Bu çalışmada BSA ve kazein proteinlerinin saf yapılarının ve immobilize tripsin tarafından sindirimi sonucunda meydana gelen değişimlerinin farklılıkları SDS-PAGE yöntemi ile aydınlatılmaya çalışılmıştır.



### 5.7.1. BSA sindirimi için sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforez çalışması

BSA proteinin ve immobilize tripsin (MNP-T-TR) tarafından BSA sindiriminin elektroferogramları Şekil 5.42.'de verilmiştir. Markır (belirteç) proteinleri belirlemede kullanılan bir protein karışımı olup, belli bir kDa değerine sahip malzemelerdir. Şekil 5.42.'de 1 numaralı çizgisel alan belirteçe aittir. Standart olarak kullandığımız belirtecin kDa değerleri standartta verilmiştir. BSA proteini çok büyük molekül ağırlıklıdır ve yüksek molekül ağırlıklı olduğundan dolayı peptitlere 100 kDa ve üzerinde ayrılmıştır (2 ve 6 numaralı bölge). İmmobilize tripsin tarafından BSA proteinin sindirimi sonucunda daha küçük peptitlere ayrılmıştır.

İmmobilize tripsinin BSA proteini sindirimi 3, 4 ve 5 numaralı çizgisel alanlarda süreye karşı gösterilmiştir. Zaman arttıkça yani 30 dakikada immobilize tripsin tarafından sindirilen BSA, 10 dk ve 20 dk sürelerine göre daha fazladır [150]. Bu Şekil 5.42.'deki renk soluklaşmasından anlaşılmaktadır.

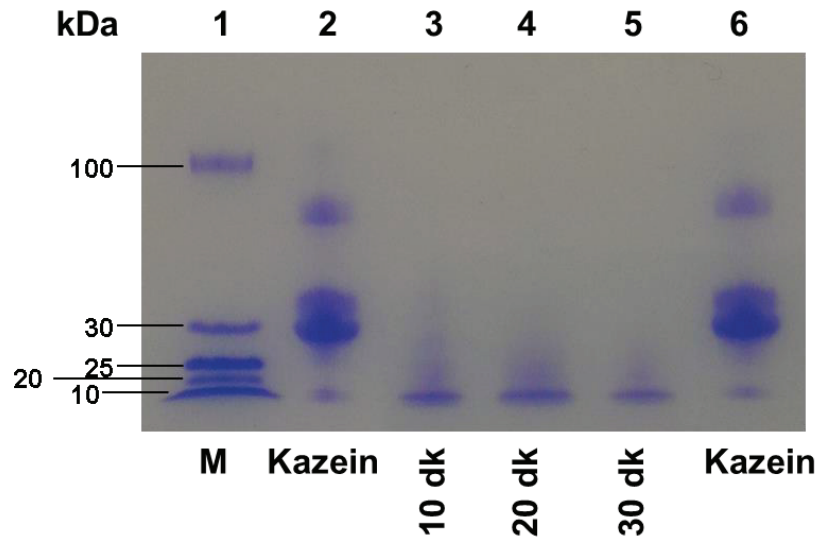


Şekil 5.42. SDS-PAGE elektroferogramları marker (1), BSA (2 ve 6), ve immobilize tripsin tarafından sindirilen BSA'nın oluşan peptitleri 10 dk (3), 20 dk (4), ve 30 dk (5) (M: Markır, BSA: Bovine serum albumin)

### 5.7.2. Kazein sindirimi için sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforez çalışması

Kazein proteinin ve immobilize tripsin ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Tanin-Tripsin) tarafından kazein sindiriminin elektroferogramları Şekil 5.43.'te verilmiştir. Şekil 5.43.'te 1 numaralı çizgisel alan belirteçe aittir. Kazein proteini inek sütünden elde edilen bir protein standardı olduğu için içerisinde saf kazein değil aslında  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\kappa$  gibi kazeinin türleri bulunmaktadır [184]. Kazein proteini çok küçük peptitlere ayrılmıştır. 2 ve 6 numaralı bölgelerde 100 kDa ve üzerinde peptit görünmemektedir. Fakat 30 kDa ve 100 kDa arasında peptitler görünmektedir.

İmmobilize tripsinin kazein proteini sindirimi 3, 4 ve 5 numaralı çizgisel alanlarda süreye karşı gösterilmiştir. Zaman arttıkça yani 30 dakikada immobilize tripsin tarafından sindirilen kazein, 10 dk ve 20 dk sürelerine göre daha fazladır [150, 192]. 25 kDa ve üzerinde hiçbir peptit fragmentine rastlanmamıştır. Bu, immobilize tripsinin kazeini çok iyi bir şekilde peptitlere ayırdığını göstermektedir.

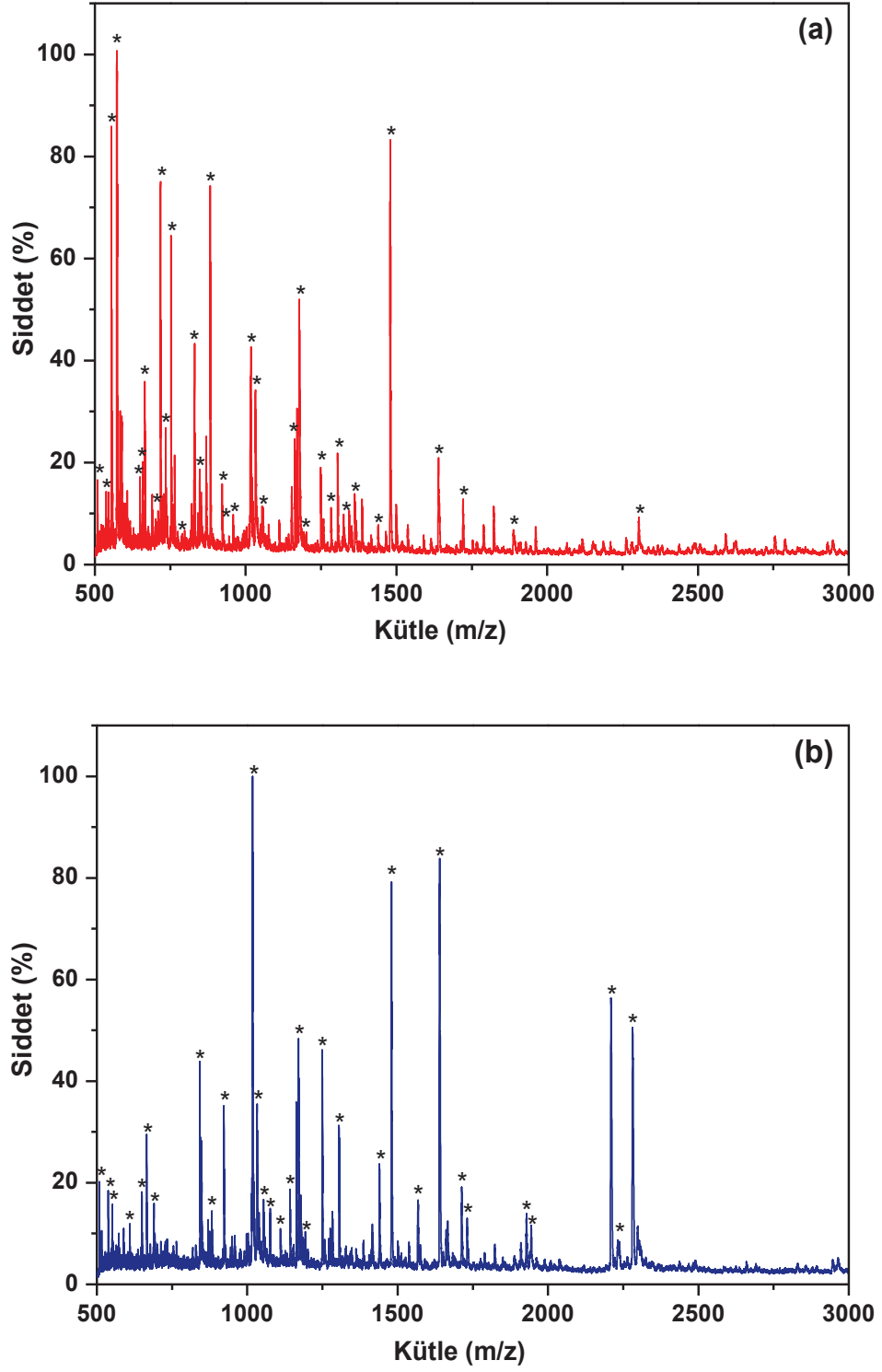


Şekil 5.43. SDS-PAGE elektroferogramları marker (1), kazein (2 ve 6) ve immobilize tripsin tarafından sindirilen kazein'in oluşan peptitleri 10 dk (3), 20 dk (4), ve 30 dk (5) (M: Markır)

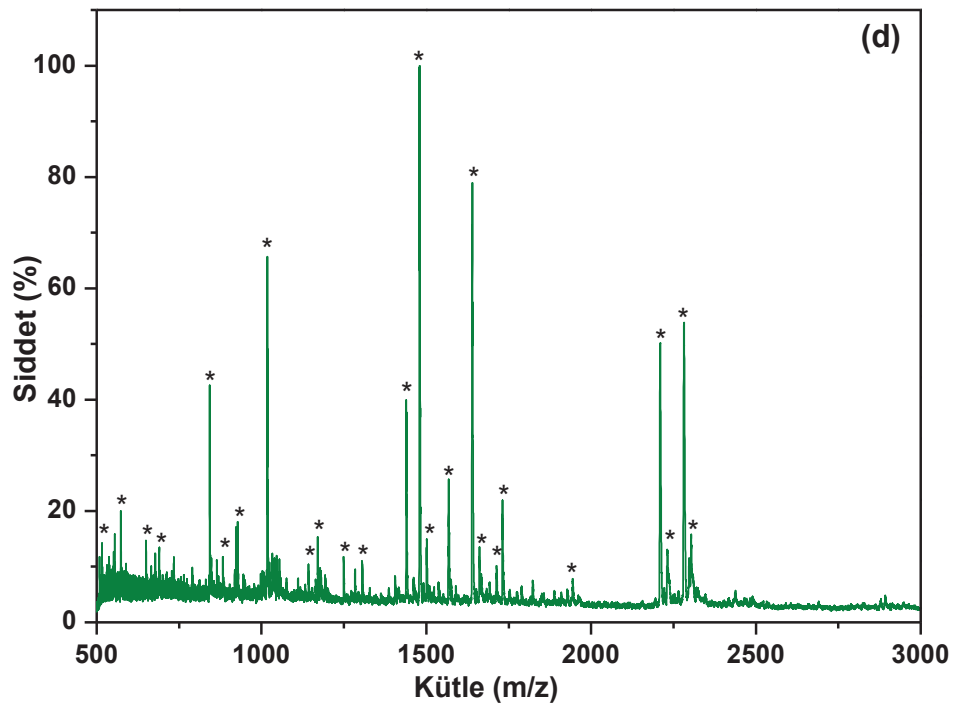
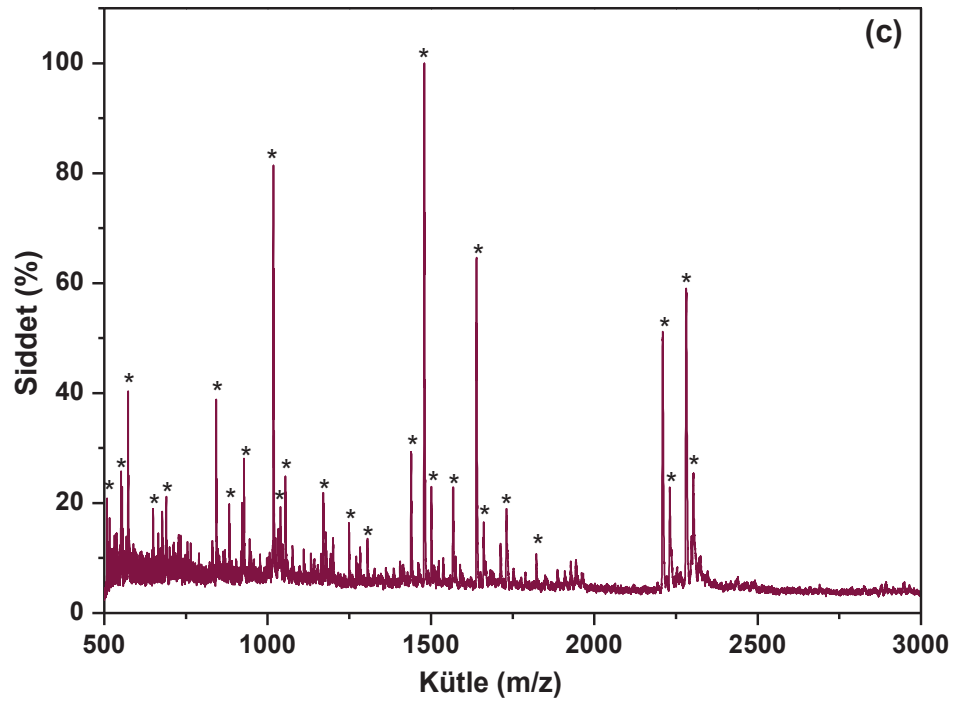
### 5.8. BSA Sindirimi için Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi Çalışmaları

MALDI TOF MS biyomoleküllerin (protein, peptit, şeker gibi) ve büyük organik (polimer, dendrimer, makromolekül) moleküllerin yapı aydınlatılmasında kullanılan bir cihazdır. Kütle spektrometresi verileri kolayca m/z oranına dönüştürülebilir. Lazer vuruşları ile oluşan dijitalize veriler TOF kütle spektrumu oluşturacak şekilde toplanır. Bu çalışmada, BSA proteininin immobilize tripsin enzimiyle enzimatik sindirimi sonucu oluşan peptitlerin analizleri yapılmıştır. Peptitler kütlelerine göre uçuş tüpünün içinden geçerler ve farklı zaman aralıklarında dedektöre çarparlar. Böylece veriler kolayca m/z şeklinde kaydedilir.

İmmobilize tripsinin BSA proteinini sindirim etkisini incelemek için 3 farklı süredeki sindirimi ve serbest tripsinin BSA sindirimi Şekil 5.44.'te MALDI-TOF MS görüntüleri olarak verilmiştir. BSA molekül ağırlığı 66,5 kDa olan yüksek büyük bir moleküldür. Serbest tripsinin BSA proteinini 16 saat gibi uzun bir süre sindiriminden sonra MALDI-TOF MS sonuçları Şekil 5.44.(a)'da verilmiştir. Buna göre 700-1780 m/z arasında pik şiddetleri oldukça yüksek ve pikler daha fazladır. Serbest tripsinin BSA proteinini sindirirken kendi otokatalizinden dolayı birçok ürün meydana gelmiştir [193]. Bunlar daha küçük fragmentler şeklinde görülmektedir. İmmobilize tripsinin BSA proteinini sindirirken otokataliz olayına rastlanılmamıştır. Bu sonuç; 1 dk, 5 dk ve 15 dk da alınan sonuçların pik yerlerinin aynı olmasından anlaşılmaktadır. Sindirim süresi 1 dk ve 5 dk arasında karşılaştırılırsa, 5 dk da fragmentlerin şiddetlerinin azaldığı ve yüzdelerinin küçüldüğü görülmektedir. 15 dk da ise pik şiddetleri tekrardan artmaya başlamaktadır. Sonuç olarak, sindirimin 5 dk zaman diliminde daha iyi gerçekleştiği ve BSA proteinin peptit fragmentlerine daha iyi ayrıldığı şekillerden görülmektedir [194].



Şekil 5.44. Serbest tripsin (a) ve immobilize tripsin tarafından sindirilen BSA proteinin (b) 1 dk, (c) 5 dk ve (d) 15 dk için MALDI-TOF MS spektrumları



Şekil 5.44. (Devamı)

## BÖLÜM 6. GENEL DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kimyasal çöktürme ve solvotermal yöntem ile  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartikülleri sentezlenerek, organik polifenolik maddelerle fonksiyonelleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında bir hidroliz enzimi olan tripsin enziminin tannik asit, gallik asit ve tanin ile fonksiyonelleştirilmiş  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartiküller üzerine immobilizasyonu sağlanmıştır. Uygulama olarak, BSA ve kazein proteinlerinin enzimatik sindirimi immobilize tripsin enzimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızdan elde edilen genel değerlendirme şu şekilde özetlenebilir:

- a.  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartikülleri kimyasal çöktürme yöntemi ile solvotermal yöntemle göre daha basit ve çabuk elde edilir. Fakat solvotermal yöntem ile elde edilen partiküllerin boyutları kontrollü elde edilebildiğinden daha belirgin ve boyutları birbirine yakındır.
- b. Tripsinin immobilizasyonu için tannik asit ile fonksiyonelleştirilen  $Fe_3O_4$  yüzeyi üzerine bağlanması, gallik asit ile fonksiyonelleştirilen  $Fe_3O_4$  yüzeyi üzerine bağlanmasından daha zordur. Çünkü tannik asit molekülü gallik asitten daha büyük yapıda olduğundan ve enzimlerde büyük yapıda olduğundan bir sterik engel oluşması ve enzimin aktif bölgeyi seçmesi zordur. Tripsin immobilizasyonu tannik asit ile fonksiyonelleştirilen  $Fe_3O_4$  yüzeyi üzerine uygulandığında verim %81,1 iken, gallik asit ile fonksiyonelleştirilen  $Fe_3O_4$  yüzeyi üzerine uygulandığında %98 olarak bulunmuştur. Dağlıoğlu ve ark. silika yüzeyi üzerine çeşitli modifikasyonlar yaparak tripsin immobilize etmişler ve verimi %63 olarak bulmuşlardır [112].
- c. Enzim immobilizasyonu çalışmalarında en önemli özellik immobilize enzimin tekrar tekrar kullanımının olmasıdır. Yapılan bu çalışmalarda

enzimin tekrar tekrar kullanımı literatürdeki çalışmalara benzerlik göstermektedir [8,127]. Literatürde genellikle 5 kez yapılan tekrarlanabilirlik çalışmaları, bu çalışmada 8 kez yapılarak %40 oranında enzimin aktivitesini koruduğu gözlenmiştir.

- d. Enzim aktivite çalışmaları, serbest enzim ve immobilize enzim ile paralel olarak yürütülmüştür. Bunun sonucunda da immobilize enzim türlerinin aktiviteleri serbest enzime göre çok çok yüksektir. Immobilize enzimlerin bazı durumlarda (yüksek sıcaklık, daha yüksek basınç ve bazik ya da asidik pH) serbest enzimden daha kararlı olduğunu Wang ve ark. çalışmalarında göstermiştir [78].
- e. BSA ve kazein proteinlerinin farklı immobilize tripsin enzimleriyle sindirimleri LC-MS/MS, SDS-PAGE ve MALDI-TOF MS yöntemleri ile incelenmiştir. LC-MS/MS sonuçlarına göre kazein, BSA proteinine göre daha geç sindirilmektedir. BSA proteini kazeinden daha büyük ve karmaşık yapıda olduğundan dolayı SDS-PAGE’de daha yüksek molekül ağırlıklı peptitler görülmüştür.

Bundan sonra bu çalışmanın gelecek çalışmalara ışık tutması amacı ile öneriler şu şekilde özetlenebilir:

- a.  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartikülleri kimyasal çöktürme yöntemi ile sentezlemek için karışımın pH’ı önemlidir. Baz ilavesi sonunda pH kontrolü yapılması daha iyi çöktürme sağlayarak daha fazla partikül elde etmeyi sağlayabilir.  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartikülleri solvotermal yöntem ile sentezlemek için çalışma esnasında yüksek sıcaklık gereklidir. Bu yöntemlere ek olarak diğer yöntemler denenerek farklılıkları görülebilir.
- b. Tannik asit ve türevlerinin toksik etki göstermemesi fakat molekülün büyük olması bu çalışmada hem avantaj hemde dezavantaj oluşturmuştur. Bu ve benzeri çalışma yapacaklar için toksik etki göstermeyen ve daha küçük farklı moleküller organik fonksiyonel grup olarak kullanılabilir.
- f. Sindirim veya hidroliz çalışılacak ise tripsin enzimine alternatif diğer hidroliz enzimleri çalışılabilir. Böylelikle karşılaştırma yapılabilir.

- g. Enzim immobilizasyonu çalışmaları için ortam şartlarının oluşturulması (sıcaklık, pH, süre) çok önemlidir. Bunun için enzimin nasıl ve hangi şartlarda çalıştığını bilmek için enzim ve yapıları hakkında öncesinden araştırma yapılabilir.
- h. Sağlık alanında yapılan çalışmaların günümüz ve gelecek için önemi büyük olduğundan enzim immobilizasyonunun biyosensör veya biyomedikal amaçlı kullanımına yönelik çalışmalar yapılabilir.



## KAYNAKLAR

- [1] Aktaş Uygun, D., Protein saflaştırılması için manyetik nanoyapıların hazırlanması ve karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Doktora Tezi, 2008.
- [2] Ni, Y., Cao, X., Wu, G., Hu, G., Yang, Z., Wei, X., Preparation, characterization and property study of zinc oxide nanoparticles via a simple solution-combusting method. *Nanotechnology*, 18:155-161, 2007.
- [3] Ali, M., Winterer, M., ZnO nanocrystals: Surprisingly 'alive'. *Chem. Mater.*, 22:85-91, 2010.
- [4] Bai, H., Ge, S.J., Zhang, L.X., Total hydrolysis of food proteins by the combined use of soluble and immobilized protease. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 34(1):95–99, 1999.
- [5] Shakeel, A.A., Qayyum, H., Potential applications of enzymes immobilized on/in nanomaterials: a review. *Biotechnol. Adv.*, 30(3): 512–523, 2012.
- [6] Schuler, C., Caruso, F., Preparation of enzyme multilayers on colloids for biocatalysis. *Macromol. Rapid Commun.*, 21(11):750–753, 2000.
- [7] Willner, I., Baron, R., Willner, B., Growing metal nanoparticles by enzymes. *Adv. Mater.*, 18:1109–1120, 2006.
- [8] Bayramoğlu, G., Yılmaz, M., Senel, A.U., Arıca, M.Y., Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption. *Biochem. Eng. J.*, 40(2):262–274, 2008.
- [9] Gupta, A.K., Gupta, M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18):3995–4021, 2005.
- [10] Kuroiwa, T., Noguchi, Y., Nakajima, M., Sato, S., Mukataka, S., Ichikawa, S., Production of chitosan oligosaccharides using chitosanase immobilized on amylose-coated magnetic nanoparticles. *Process Biochem.*, 43:62–69, 2008.

- [11] Pimentel, M.C.B., Leao, A.B.F., Melo, E.H.M., Ledingham, W.M., LIMA-Filho, J.L., Sivewright, M., Immobilization of *candida rugosa* lipase on magnetized dacron: Kinetic study. *Art. Cell. Blood Substit. Biotechnol.*, 35:221–235, 2007.
- [12] Kamruzzaman Selim, K.M., Ha, Y.S., Kim, S.J., Chang, Y., Kim, T.J., Ho Lee, G., Kang, I.K., Surface modification of magnetite nanoparticles using lactobionic acid and their interaction with hepatocytes. *Biomaterials.*, 28:710–716, 2007.
- [13] Johnson, A.K., Zawadzka, A.M., Deobald, L.A., Crawford, R.L., Paszczyński, A.J., Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles. *J. Nanopart Res.*, 10:1009–1025, 2008.
- [14] Konwarh, R., Karak, N., Rai, S.K., Mukherjee, A.K., Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase. *Nanotechnology*, 20(22):225107, 2009.
- [15] Bruno, L.M., Coelho, J.S., Melo, E.H.M., Lima-Filho, J.L., Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. *World J. Microb. Biotechnol.*, 21(2):189–192, 2005.
- [16] Ansari, S.A., Husain, Q., Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnol. Adv.*, 30(3):512–523, 2012.
- [17] Banalata, S., Sumanta, K.S., Panchanan, P., A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 69:95–102, 2011.
- [18] Yan, J.M., Zhang, X.B., Han, S., Shioyama, H., Xu, Q., Iron-nanoparticle-catalyzed hydrolytic dehydrogenation of ammonia borane for chemical hydrogen storage. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47(12):2287–2289, 2008.
- [19] Umegaki, T., Yan, J.M., Zhang, X.B., Shioyama, H., Kuriyama, N., Xu, Q., Preparation and catalysis of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) stabilized nickel catalyst for hydrolytic dehydrogenation of ammonia borane. *Int. J. Hydrogen Energy*, 34:3816–3822, 2009.
- [20] Yan, J.M., Zhang, X.B., Han, S., Shioyama, H., Xu, Q., Synthesis of longtime water/air-stable Ni nanoparticles and their high catalytic activity for hydrolysis of ammonia-borane for hydrogen generation. *Inorg. Chem.*, 48(15):7389–7393, 2009.
- [21] Metin, O., Mazumder, V., Ozkar, S., Sun, S.H., Monodisperse nickel nanoparticles and their catalysis in hydrolytic dehydrogenation of ammonia borane. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(5):1468–1469, 2010.

- [22] Metin, O., Ozkar, S., Sun, S.H., Monodisperse nickel nanoparticles supported on SiO<sub>2</sub> as an effective catalysts for the hydrolysis of ammonia-borane. *Nano. Res.*, 3(9):676–684, 2010.
- [23] Umegaki, T., Yan, J.M., Zhang, X.B., Shioyama, H., Kuriyama, N., Xu, Q., Hollow Ni–SiO<sub>2</sub> nanosphere-catalyzed hydrolytic dehydrogenation of ammonia borane for chemical hydrogen storage. *J. Power Sources*, 191:209–216, 2009.
- [24] Metin, O., Ozkar, S., Hydrogen generation from the hydrolysis of ammonia-borane and sodium borohydride using water-soluble polymer-stabilized cobalt(0) nanoclusters catalyst. *Energy Fuels*, 23:3517–3526, 2009.
- [25] Yan, J.M., Zhang, X.B., Shioyama, H., Xu, Q., Room temperature hydrolytic dehydrogenation of ammonia borane catalyzed by Co nanoparticles. *J. Power Sources*, 195(4):1091–1094, 2010.
- [26] Metin, O., Ozkar, S., Water soluble Nickel(0) and Cobalt(0) nanoclusters stabilized by poly(4-styrenesulfonic acid-Co-maleic acid): Highly active, durable and cost effective catalysts in hydrogen generation from the hydrolysis of ammonia borane. *Int. J. Hydrogen Energy*, 36:1424–1432, 2011.
- [27] Sun, D., Mazunder, V., Metin, O., and Sun, S., Catalytic hydrolysis of ammonia borane via cobalt palladium nanoparticles. *Am. Chem. Soc.*, 5(8):6458–6464, 2011.
- [28] Pham, T.T., Cao, C., Sim, S.J., Application of citrate-stabilized gold-coated ferric oxide composite nanoparticles for biological separations. *J. Magn. Mater.*, 320:2049–2055, 2008.
- [29] Haratifar, E., Shahverdi, H.R., Shakibaie, M. Shahverdi, A.R., Mollazadeh, M.K., Amini, M., Montazeri, H., Semi-biosynthesis of magnetite-gold composite nanoparticles using an ethanol extract of *Eucalyptus camaldulensis* and study of the surface chemistry. *J. Nanomaterials*, 2009:23, 2009.
- [30] Wang, X.X., Huang, S., Shan, Z., Yang, W.S., Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nano-composites by self-assembly technique for immobilization of glucose oxidase. *Chin. Sci. Bull.*, 54:1176–1181, 2009.
- [31] Klabunde, K.J., Stark, J., Koper, O., Mohs, C., Park, D.G., Decker, S., Jiang, Y., Lagadic, I., ve Zhang, D., Nanocrystals as stoichiometric reagents with unique surface chemistry. *J. Phys. Chem.*, 100:12142–12153, 1996.
- [32] Li, L., Fan, M., Brown, R.C., Leeuwen, J.V., Wang, J., Wang, W., Song, Y. ve Zhang, P., Synthesis, properties, and environmental applications of nanoscale iron-based materials: a review. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, 36(5):405–431, 2006.

- [33] Gürbüz, A.A., Manyetik nanopartiküller ile sulu çözeltilerden krom giderilmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2007.
- [34] Signoretti, S., Del Bianco, L., Pasquini, L., Matteucci, G., Beeli, C. ve Bonetti, E., Electron holography of gas-phase condensed Fe nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.*, 262:142–145, 2003.
- [35] Liu, Z.L., Wang, H.B., Lu, Q.H., Du, G.H., Peng, L., Du, Y.Q., Zhang, S.M. ve Yao, K.L., Synthesis and characterization of ultrafine well-dispersed magnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.*, 283:258–262, 2004.
- [36] He, F. ve Zhao, D., Preparation and characterization of a new class of starch-stabilized bimetallic nanoparticles for degradation of chlorinated hydrocarbons in water. *Environ. Sci. Technol.*, 39:3314–3320, 2005.
- [37] Carpenter, E.E., Iron nanoparticles as potential magnetic carriers. *J. Magn. Magn. Mater.*, 225:17–20, 2001.
- [38] Li, F., Vipulanandan, C. ve Mohanty, K.K., Microemulsion and solution approaches to nanoparticle iron production for degradation of trichloroethylene. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects*, 223:103–112, 2003.
- [39] Song, G., Bo, J. ve Guo, R., The characterization and property of polystyrene compounding of  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in the nano-scale. *Colloid Polym. Sci.*, 282:656–660, 2004.
- [40] Jiang, W., Yang, H.C., Yang, S.Y., Horng, H.E., Hung, J.C., Chen, Y.C. ve Hong, C.Y., Preparation and properties of superparamagnetic nanoparticles with narrow size distribution and biocompatible. *J. Magn. Magn. Mater.*, 283:210–214, 2004.
- [41] Kim, D.K., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K.V., Kehr, J., Bjelke, B. ve Muhammed, M., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bio-medical applications. *Scripta Mater.*, 44:1713–1717, 2001.
- [42] Wang, Z.H., Choi, C.J., Kim, B.K., Kim, J.C. ve Zhang, Z.D., Microstructure and magnetic property of Fe–Co nanoparticles prepared by chemical vapor condensation process. *J. Alloys Compd.*, 351:319–323, 2003.
- [43] Choi, C.J., Dong, X.L. ve Kim, B.K., Characterization of Fe and Co nanoparticles synthesized by chemical vapor condensation. *Scripta Mater.*, 44:2225–2229, 2001.

- [44] Natter, H., Schmelzer, M., Löffler, M.S., Krill, C.E., Fitch, A. ve Hempelmann, R., Grain-growth kinetics of nanocrystalline iron studied in situ by synchrotron real-time X-ray diffraction. *J. Phys. Chem. B*, 104:2467-2476, 2000.
- [45] Makela, J.M., Keskinen, H., Forsblom, T. ve Keskinen, J., Generation of metal and metal oxide nanoparticles by liquid flame spray process. *J. Mater. Sci.*, 39:2783 – 2788, 2004.
- [46] Glavee, G.N., Klabunde, K.J., Sorensen, C.M. ve Hadjipanayis, G.C., Chemistry of borohydride reduction of iron(II) and iron(III) ions in aqueous and nonaqueous media. formation of nanoscale Fe, FeB, and Fe<sub>2</sub>B powders. *Inorg. Chem.*, 34:28-35, 1995.
- [47] Nurmi, J.T., Tratnyek, P.G., Sarathy, V., Baer, D.R., Amonette, J.E., Pecher, K., Wang, C., Linehan, J.C., Matson, D.W., Penn, R.L. ve Driessen, M.D., Characterization and properties of metallic iron nanoparticles: Spectroscopy, electrochemistry, and kinetics. *Environ. Sci. Technol.*, 39:1221-1230, 2005.
- [48] Zhang, W., Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *J. Nanopart. Res.*, 5:323–332, 2003.
- [49] Güven, G., Eş boyutlu, katyonik, fonksiyonel grup içeren/içermeyen, manyetik yüklü nanopatiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve nükleik asit uygulamaları. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2005.
- [50] Cornell, R.M., Schertmann, U., Iron oxides in the laboratory; preparation and characterization. VCH, Weinheim, 1991.
- [51] [http://www.tmmndt.com/content\\_images/Manyetik%20Partikül%20Test%20ve%20Demagnetizasyon.pdf](http://www.tmmndt.com/content_images/Manyetik%20Partikül%20Test%20ve%20Demagnetizasyon.pdf), Erişim Tarihi: 25.12.2015.
- [52] Uludağ, Y.B., İmmobilize glukomilaz ile maltodekstrinden glukoz üretimi. Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2000.
- [53] Kırkköprü, İ. ve Alpaslan, S.C., Proteaz enziminin değişik taşıyıcılarda immobilizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Bitirme Tezi, 2004.
- [54] Krajewska, B., Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Technol.*, 35:126–139, 2004.
- [55] Kasavi, C., Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorpsiyon metodları ile proteaz enziminin immobilizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, 2006.

- [56] Mosbach, K., Immobilised enzymes, biochemical division. Chemical Center, P.O. Box 740, S- 220 07 Lund, 1976.
- [57] Miletic, N., Nastasovic, A., Loos, K., Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresour. Technol.*, 115:126–135, 2012.
- [58] Huang, X.L., Catignani, G.L., Swaisgood, H.E., Modification of rheological properties of whey protein isolates by limited proteolysis. *Nahrung-Food*, 43(2):79–85, 1999.
- [59] Krogh, T.N., Berg, T., Hojrup, P., Protein analysis using enzymes immobilized to paramagnetic beads. *Anal Biochem.*, 274, 153–162, 1999.
- [60] [http://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/1008/mod\\_resource/content/1/12.%20Enzimler.pdf](http://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/1008/mod_resource/content/1/12.%20Enzimler.pdf), Erişim Tarihi: 11.03.2015.
- [61] <http://www.kozanbilgi.net/enzimlerin-gorevleri-ve-calismasi.html>, Erişim Tarihi: 28.07.2016.
- [62] Park, H.J., Enzyme-magnetic nanoparticle bioconjugates. Wyoming Üniversitesi, Kimya ve Petrol Mühendisliği Bölümü, Doktora tezi, 2011.
- [63] Veum, L., Hanefeld, U., Carrier enabled catalytic reaction cascades. *Chem. Commun.*, 7:825–831, 2006.
- [64] Sheldon, R.A., Arends, I., Hanefeld, U., *Green Chemistry and Catalysis*. Wiley-VCH, 448 pp:ISBN 978-3-527-30715-9, 2007.
- [65] Pierre, A.C., The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatal. Biotransform.*, 22:145–170, 2004.
- [66] Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E., Understanding enzyme immobilization. *Chem. Soc. Rev.*, 38:453–468, 2009.
- [67] Tutar, H., *Candida rugosa* lipaz enziminin sporopollenin üzerine adsorbsiyonu ve karakterizasyonu. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği, Yüksek lisans tezi, 2009.
- [68] Karchalski-Katzir, E., Kraemer, D.M., A carrier for immobilization of enzymes of industrial of potential. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 10:157–176, 2000.
- [69] D'souza, S.F., Immobilized enzymes in bioprocess. *Curr. Sci.*, 77:69–79, 1999.
- [70] Taylor, R.F. (Ed.), *Protein Immobilization. Fundamentals and Applications*. Marcel Decker, Inc., New York, 1991.

- [71] Godfrey, T., West, S. (Eds.), *Industrial Enzymology*, 2nd ed., Macmillan Press Ltd., London, Chapter 7, 1996.
- [72] Husain, Q., Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 30(1):41–62, 2010.
- [73] Lei, C., Shin, Y., Liu, J., Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(38):11242–11243, 2002.
- [74] Wang, P., Nanoscale biocatalyst systems. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17(6):574–579, 2006.
- [75] Tischer, W., Wedekind, F., Immobilized enzymes: Methods and applications. *Top. Curr. Chem.*, 200:95–126, 1999.
- [76] Kouassi, G.K., Irudayaraj, J., Mccarty, G., Activity of glucose oxidase functionalized onto magnetic nanoparticles. *Biomagn. Res. Technol.*, 3:1–10, 2005.
- [77] Telefoncu, A., *Enzimoloji*. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, İzmir, 1-305, 1997.
- [78] Wang, S., Bao, H., Yang, P., Chen, G., Immobilization of trypsin in polyaniline-coated nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/carbon nanotube composite for protein digestion. *Anal. Chim. Acta*, 612:182–189, 2008.
- [79] Özmen, Ö., Terpenlerin enzimatik polimerizasyonu ve reaksiyon kinetiğinin modellenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
- [80] Kargi, F., ve Shuler, M.L., *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. New Jersey, Prentice Hall, 1992.
- [81] Şengör, M., Fenol'ün enzimatik oksidatif polimerizasyonu ve reaksiyon kinetiğinin modellenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi, 2006.
- [82] <http://jamesmalone93.blogspot.com.tr/>, Erişim Tarihi: 08.01.2016.
- [83] <http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/Peptidase1.html>, Erişim Tarihi: 08.01.2016.
- [84] Wang, Y., Luo, W., Reiser, G., Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65:237–253, 2008.
- [85] Nikolic, T., Kostic, M., Praskalo, J., Pejic, B., Petronijevic, Z., Skundric, P., Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin. *Carbohydr. Polym.*, 82:976–981, 2010.

- [86] Polgar, L., The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62:2161–2172, 2005.
- [87] Alistair, C.R., George, B., Halling, P.J., Effect of pH on rate of interfacial inactivation of serine proteases in aqueous–organic systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 67(4):498–503, 2000.
- [88] Rawling, N.D., Barret, A.J., Families of serine peptidases. *Meth. Enzymol.*, 244:19–61, 1994.
- [89] Dağlıoğlu, C., Tripsin enziminin immobilizasyonu ve protein fragmentasyonunda kullanım potansiyelinin araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 2010.
- [90] Richard, C.F., Theodore, P.J., *Biochem.*, 159:529–533, 1976.
- [91] Sun, L., Li, Y., Yang, P., Zhu, G., Dovichi, N.J., High efficiency and quantitatively reproducible protein digestion by trypsin-immobilized magnetic microspheres. *J. Chromatogr. A*, 1220:68–74, 2012.
- [92] Krogh, T.N., Berg, T., Hqjrup, P., Protein analysis using enzymes immobilized to paramagnetic beads. *Anal. Biochem.*, 274:153–162, 1999.
- [93] Li, Y., Yan, B., Deng, C., Tang, J., Liu, J., Zhang, X., On-plate digestion of proteins using novel trypsin-immobilized magnetic nanospheres for MALDI-TOF-MS analysis. *Proteomics*, 7:3661–3671, 2007.
- [94] Saito, M., Chicunui, K., Monma, M., Shimizu, M., Emulsifying and oil-binding properties of bovine serum albumin and its enzymatic hydrolyzate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57:952–956, 1993.
- [95] Gomez, J.M., Deere, J., Goradia, D., Cooney, J., Magner, E., Hodnett, B.K., Transesterification catalyzed by trypsin supported on MCM-41. *Catal. Lett.*, 88(3):183–186, 2003.
- [96] Marrakchi, M., Dzyadevych, S.V., Biloivan, O.A., Martelet, C., Temple, P., Jaffrezic-Renault, N., Development of trypsin biosensor based on ion sensitive field-effect transistors for proteins determination. *Mater. Sci. Eng. C*, 26(2):369–373, 2006.
- [97] Bryjak, M., Bryjak, J., Purification of soybean trypsin inhibitors by means of chromatographic methods. *Angew. Makromol. Chem.*, 226:197–204, 1995.
- [98] Kasai, K., Trypsin and affinity chromatography. *J. Chromatogr.*, 597:3–18, 1992.



- [99] Bongers, J., Heimer, E.P., Recent applications of enzymatic peptides synthesis. *Peptides*, 15:183–193, 1994.
- [100] Blanco, R.M., Alvaro, G., Guisan, J.M., Enzyme reaction engineering: design of peptide synthesis by stabilized trypsin. *Enzyme Microb. Technol.*, 13(7):573–583, 1991.
- [101] Aso, K., Kodaka, H., Fukushi, K., Lee, H.H., Trypsin-catalyzed synthesis of the arginyl- arginine dipeptide from L-arginine ethyl ester. *Biotechnol. Lett.*, 14(6), 451–454, 1992.
- [102] Blanco, R.M., Calvete, J.J., Guisan, J.M, Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. *Enzyme Microb. Technol.*, 11(6):353–359, 1989.
- [103] Habib, Ö., Tripsin immobilizasyonu ve karakterizasyonu, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2007.
- [104] Calleri, E., Temporini, C., Perani, E., Stella, C., Rudaz, S., Lubda, S., Mellerio, G., Veuthey, J.L., Caccialanza, G., Massolini, G., Development of a bioreactor based on trypsin immobilized on monolithic support for the on-line digestion and identification of proteins. *J. Chromatogr. A*, 1045:99–109, 2004.
- [105] Zhang, K., Wu, S., Tang, X., Kaiser, N.K., Bruce, J.E., A bifunctional monolithic column for combined protein preconcentration and digestion for high throughput proteomics research. *J. Chromatogr. B*, 849(1):223–230, 2007.
- [106] Kang, K., Kan, C., Yeung, A., Liu, D., The immobilization of trypsin on soap-free P(MMA-EA-AA) latex particles. *Mater. Sci. Eng. C*, 26:664–669, 2006.
- [107] Amankwa, L.N., Kuhr, W.G., On-line peptide mapping by capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.*, 65:2693–2697, 1993.
- [108] Qu, H.Y., Wang, H.T., Huang, Y., Zhong, W., Lu, H.J., Kong, J.L., Yang, P.Y., Liu, B.H., Stable microstructured network for protein patterning on a plastic microfluidic channel: strategy and characterization of on-chip enzyme microreactors. *Anal. Chem.*, 76:6426–6433, 2004.
- [109] Fan, H.Z., Chen, G., Fiber-packed channel bioreactor for microfluidic protein digestion. *Proteomics*, 7:3445–3449, 2007.
- [110] Liu, Y., Lu, H.J., Zhong, W., Song, P.Y., Kong, J.L., Yang, P.Y., Girault, H.H., Liu, B.H., Multilayer-assembled microchip for enzyme immobilization as reactor toward low-level protein identification. *Anal. Chem.*, 78:801–808, 2006.

- [111] Pritchett, D.W., Young, S.Y., ve Geren, C.R., Proteolytic activity in the digestive fluid in larvae of *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem.*, 11:523–526, 1981.
- [112] Dağlıoğlu, C., Zihnioğlu, F., Covalent immobilization of trypsin on glutaraldehyde-activated silica for protein fragmentation. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, 40:378–384, 2012.
- [113] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254, 1976.
- [114] Lu, A.H., Salabas, E.L., Schuth, F., Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46:1222–1244, 2007.
- [115] Can, K., Ozmen, M., Ersoz, M., Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 71:154–159, 2009.
- [116] Cheng, G., Wang, Z.G., Liu, Y.L., Zhang, J.L., Sun, D.H., and Ni, J.Z., Magnetic affinity microspheres with meso-/macroporous shells for selective enrichment and fast separation of phosphorylated biomolecules. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 5:3182–3190, 2013.
- [117] Cheng, G., Zhou, M.D., and Zheng, S.Y., Facile synthesis of magnetic mesoporous hollow carbon microspheres for rapid capture of low-concentration peptides. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6:12719–12728, 2014.
- [118] Hagerman, E.A., Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts, *J. Chemistry Ecol.*, 13(3):437–449, 1987.
- [119] Çelen, G., Tanenlerin biyopolimerik biyomalzemelerde kullanımının araştırılması, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
- [120] Atacan, K., Özacar, M., Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 128:227–236, 2015.
- [121] Cao, Y., Wen, L., Svec, F., Tan, T., Lv, Y., Magnetic AuNP@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as reusable carriers for reversible enzyme immobilization. *Chem. Eng. J.*, 286:272–281, 2016.
- [122] Deng, Y.H., Wang, C.C., Hu, J.H., Yang, W.L., Fu, S.K., Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol-gel approach. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 262:87–93, 2005.

- [123] Güden, F., Ferrosıvı nanoparçacıkların manyetik yakalama metodu ile depolanması ve karakterizasyonu. Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi, 2013.
- [124] Sahoo, B., Sahu, K.S., Bhattacharya, D., Dhara, D., Pramanik, P., A novel approach for efficient immobilization and stabilization of papain on magnetic gold nanocomposites. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 101:280–289, 2013.
- [125] Kalska-Szostko, B., Rogowska, M., Dubis, A., Szymanski, K., Enzymes immobilization on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-gold nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.*, 258:2783–2787, 2012.
- [126] Chen, J.C., Hu, C.C., Quantitative analysis of YIG, YFeO<sub>3</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> in LHPG- grown YIG rods. *J. Cryst. Growth.*, 249:245–250, 2003.
- [127] Maciel, J.C., Andrad, P.L., Neri, D.F.M., Carvalhojr, L.B., Cardoso, C.A., Calazans, G.M.T., Aguiar, J.A., Silva, M.P.C., Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. *J. Magn. Magn. Mater.*, 324:1312–1316, 2012.
- [128] Mote, V.D., Purushotham, Y. and Dole, B.N., Williamson-Hall analysis in estimation of lattice strain in nanometer-sized ZnO particles. *J. Theor. Appl. Phys.*, 6:6, 2012.
- [129] Qin, W., Song, Z., Fan, C., Zhang, W., Cai, Y., Zhang, Y., and Oian, X., Trypsin immobilization on hairy polymer chains hybrid magnetic nanoparticles for ultra fast, highly efficient proteome digestion, facile 18O labeling and absolute protein quantification. *Anal. Chem.*, 84:3138–3144, 2012.
- [130] Waldron, R.D., Infrared spectra of ferrites. *Phys. Rev.*, 99:1727, 1995.
- [131] Ma, M., Zhang, Y., Yu, W., Shen, H.Y., Zhang, H.G., Gu, N., Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids Surf.: A: Physicochem. Eng. Aspects*, 212:219–226, 2003.
- [132] Barilaro, D., Barone, G., Crupi, V., Donato, M.G., Majolino, D., Messina, G., Ponterio, R., Spectroscopic techniques applied to the characterization of decorated potteries from Caltagirone (Sicily, Italy). *J. Mol. Struct.* 744–747:827–831, 2005.
- [133] Kim, S., Kim, H.J., Curing behavior and viscoelastic properties of pine and wattle tannin-based adhesives studied by dynamic mechanical thermal analysis and FT-IR-ATR spectroscopy. *J. Adhes. Sci. Technol.*, 17:1369–1383, 2003.
- [134] Silverstein, R.M., Webster, F.X., Spectrometric identification of organic compounds. 6th ed., JohnWiley & Sons Inc., New York, pp. 90–91, 1998.

- [135] Özacar, M., Şengil, I.A., Türkmenler, H., Equilibrium and kinetic data, and adsorption mechanism for adsorption of lead onto valonia tannin resin. *Chem. Eng. J.*, 143:32–42, 2008.
- [136] Garro-Galvez, J.M., Fechtal, M., Riedl, B., Gallic acid a model of tannins in condensation with formaldehyde. *Thermochim. Acta*, 274:149–163, 1996.
- [137] Holopainen, T., Alvila, L., Rainio, J., Pakkanen, T.T., IR spectroscopy as a quantitative and predictive analysis method of phenol-formaldehyde resins. *J. Appl. Polym. Sci.*, 69:2175–2185, 1998.
- [138] Li, D.F., Ding, H.C., Zhou, T., Covalent immobilization of mixed proteases, trypsin and chymotrypsin, onto modified polyvinyl chloride microspheres. *J. Agric. Food Chem.*, 61:10447–10453, 2013.
- [139] Silva, A.K.A., Silva, E.L., Oliveria, E.E., Nagashimajr, T., Soares, L.A.L., Medeiros, A.C., Araujo, J.H., Araujo, I.B., Carrico, A.S., Egito, E.S.T., Synthesis and characterization of xylan-coated magnetite microparticles. *Int. J. Pharm.*, 334:42–47, 2007.
- [140] Cullity, B.D., Introduction to magnetic materials. 67-68, 1972.
- [141] Çöktüren, E., Ferromanyetik filmlerde oluşan yüzey manyetik anizotropisinin numerik çözümlenmesi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
- [142] <http://www.universetoday.com/56469/atom-diagram%20>, Erişim Tarihi: 15.09.2015.
- [143] Tacer, E., Elektromekanik enerji dönüşümü ders notları. İ.T.Ü Elektrik Elektronik Fakültesi, İstanbul, 2004.
- [144] Turci, F., Ghibaudi, E., Colanna, M., Boscolo, B., Fenoglio, I., Fubini, B., An integrated approach to the study of the interaction between proteins and nanoparticles. *Langmuir*, 26:8336–8346, 2010.
- [145] Lei, C., Soares, T.A., Shin, Y., Liu, J., Ackerman, E.J., Enzyme specific activity in functionalized nanoporous supports. *Nanotechnology*, 19:125102, 2008.
- [146] Vasudevan, P.T., Lopez-Cortes, N., Caswell, H., Reyes-Duarte, D., Plou, F.J., Balles-Teros, A., Como, K., Thomson, T., Immobilized lipase on CoFoam™ hydrophilic polyurethane composite. *Biotechnol. Lett.* 26:473–477, 2004.
- [147] Kishimura, H., Hayashi, K., Isolation and characteristics of trypsin from pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132:485–490, 2002.

- [148] Fengna, X., Jianmin, W., Zhishen, J., Xianfu, L., Preparation and characterization of trypsin on silica gel supported macroporous chitosan bead. *Process Biochem.*, 40:2833–2840, 2004.
- [149] Peng, G., Zhao, C., Liu, B., Ye, F., Jiang, H., Immobilized trypsin onto chitosan modified monodisperse microspheres: A different way for improving carrier's surface biocompatibility. *Appl. Surf. Sci.* 258:5543–5552, 2012.
- [150] Purcena, L.L.A., Caramori, S.S., Mitidieri, S., and Fernandes, K.F., The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion. *Mater. Sci. Eng. C*, 29:1077–1081, 2009.
- [151] Manrich, A., Galvao, C.M.A., Jesus, C.D.F., Giordano, R.C., Giordano, R.L.C., Immobilization of trypsin on chitosan gels: use of different activation protocols and comparison with other supports. *Int. J. Biol. Macromol.* 43:54–61, 2008.
- [152] Rocha, C., Goncalves, M.P., Teixeira, J.A., Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis. *Process Biochem.* 46:505–511, 2011.
- [153] Caramori, S.S., Faria, F.N., Viana, M.P., Fernandes, K.F., Carvalhojr, L.B., Trypsin immobilization on discs of polyvinyl alcohol glutaraldehyde/polyaniline composite. *Mater. Sci. Eng. C*, 31:252–257, 2011.
- [154] Lin, Z., Xiao, Y., Wang, L., Yin, Y., Zheng, J., Yang, H., Chen, G., Facile synthesis of enzyme–inorganic hybrid nanoflowers and their application as an immobilized trypsin reactor for highly efficient protein digestion. *RSC Adv.*, 4:13888–13891, 2014.
- [155] Kim, B.C., Lopez-Ferrer, D., Lee, S.M., Ahn, H.K., Nair, S., Kim, S.H., Kim, B.S., Petritis, K., Camp, D.G., Grate, J.W., Smith, R.D., Koo, Y.M., Gu, M.B., Kim, J., Highly stable trypsin-aggregate coatings on polymer nanofibers for repeated protein digestion. *Proteomics*, 9:1893–1900, 2009.
- [156] Khangembam, B.K., Yvr, K.S., Chakrabarti, R., Purification and characterization of trypsin from the digestive system of carp *Catla catla* (Hamilton). *Int. Aquatic Res.*, 4:9, 2012.
- [157] Guyonnet, V., Tluscik, F., Long, P.L., Polanowski, A., Travis, J., Purification and partial characterization of the pancreatic proteolytic enzymes trypsin, chymotrypsin, and elastase from the chicken. *J. Chromatogr. A*, 852(1):217–225, 1999.

- [158] Ahsan, M.N., Watabe, S., Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy, *engraulis japonicus*. *J. Protein Chem.* 20:49–58, 2001.
- [159] Venkatesh, R., Sundaram, P. V., Modulation of stability properties of bovine trypsin after in vitro structural changes with a variety of chemical modifiers. *Protein Eng.*, 11:691–698, 1998.
- [160] Önal, S., Karpuz (*Citrullus vulgaris*)  $\alpha$ -galaktozidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2000.
- [161] Yamada, K., Nakasone, T., Nagano, R., Hirata, M., Retention and reusability of trypsin activity by covalent immobilization onto grafted polyethylene plates. *J. Appl. Polym. Sci.*, 89:3574–3581, 2003.
- [162] Silva, C.J.S., Zhang, M., Shen, Q., Cavaco-Paulo, J.A., Immobilization of proteases with a water soluble-insoluble reversible polymer for treatment of wool. *Enzyme Microb. Technol.*, 39:634–640, 2006.
- [163] Bahar, T., Tuncel, A., Immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin onto newly produced poly (hydroxypropyl methacrylate-co-methacrylic acid) hydrogel beads. *React. Funct. Polym.*, 44:71–78, 2000.
- [164] Sun, J., Hu, K., Liu, Y., Pan, Y., Yang, Y., Novel superparamagnetic nanoparticles for trypsin immobilization and the application for efficient proteolysis. *J. Chromatogr. B*, 942–943:9–14, 2013.
- [165] Yao, C.H., Qi, L., Hu, W.B., Wang, F.Y., Yang, G.L., Immobilization of trypsin on sub-micron skeletal polymer monolith. *Anal. Chim. Acta*, 692:131–137, 2011.
- [166] Liu, C.G., Desai, K.G.H., Chen, X.G. and Park, H.J., Preparation and characterization of nanoparticles containing trypsin based on hydrophobically modified chitosan. *J. Agric. Food Chem.*, 53:1728–1733, 2005.
- [167] Fernandez, L., Gomez, L., Ramirez, H.L., Villalonga, M.L., Villalonga, R., Thermal stabilization of trypsin with glycol chitosan. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 34:14–17, 2005.
- [168] Montero, F.M.F., Silva, G.M.M., Silva, J.B.R., Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. *Process Biochem.*, 42:884–888, 2007.
- [169] Bayramoğlu, G., Ozalp, V.C., and Arica, Y., Magnetic polymeric beads functionalized with different mixed-mode ligands for reversible immobilization of trypsin. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 53:132–140, 2014.

- [170] <http://www.supplementler.com/bilgi-bankasi/kazein> proteinin faydaları nelerdir, Erişim Tarihi: 08.01.2016.
- [171] Cheng, G., Chen, P., Wang, Z.G., Sui, X.J., Zhang, J.L., Ni, J.Z., Immobilization of trypsin onto multifunctional meso-/macroporous core-shell microspheres: A new platform for rapid enzymatic digestion. *Anal. Chim. Acta*, 812:65–73, 2014.
- [172] Jiang, B., Yang, K., Zhang, L., Liang, Z., Peng, X., Zhang, Y., Dendrimer-grafted graphene oxide nanosheets as novel support for trypsin immobilization to achieve fast on-plate digestion of proteins. *Talanta*, 122:278–284, 2014.
- [173] Barth, A., The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 74:141–173, 2000.
- [174] Özacar, M., Soykan, C., Şengil, I.A., Studies on synthesis, characterization, and metal adsorption of mimosa and valonia tannin resins. *J. Appl. Polymer Sci.*, 102:786–797, 2006.
- [175] Özacar, M., Şengil, I.A., Enhancing phosphate removal from waste water by using polyelectrolytes and clay injection. *J. Hazard. Mater. B*, 100:131–146, 2003.
- [176] Xu, H., Tong, N., Cui, L., Lu, Y., Gu, H., Preparation of hydrophilic magnetic nanospheres with high saturation magnetization. *J. Magn. Magn. Mater.*, 331:125–150, 2007.
- [177] Ramanujan, R.V., Yeow, Y.Y., Synthesis and characterization of polymer-coated metallic magnetic materials. *Mater. Sci. Eng. C*, 25:39–41, 2005.
- [178] Schultz, N., Metreveli, G., Franzreb, M., Frimmel, F.H., Syldatk, C., Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilization. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 66:39–44, 2008.
- [179] Hudson, S., Magner, E., Cooney, J., Hodnett, B.K., Methodology for the Immobilization of enzymes onto mesoporous materials. *J. Phys. Chem. B*, 109:19496–19506, 2005.
- [180] Ossowska, K. K., Mulheran, P.A., What governs protein adsorption and immobilization at a charged solid surface?. *Langmuir*, 26:7690–7694, 2010.
- [181] Abbas, A., Vercaigne-Marko, D., Supiot, P., Bocoquet, B., VIVIEN, C., Guillochon, D., Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 73:315–324, 2009.

- [182] Du, T., Liu, B., Hou, X., Zhang, B., Du, C., Covalent immobilization of glucose oxidase onto Poly(St-GMA-NaSS) monodisperse microspheres via BSA as spacer arm. *Appl. Surf. Sci.*, 255:7937–7941, 2009.
- [183] Bryjak, J., Liesiene, J., Kolarz, B.N., Application and properties of butyl acrylate/pentaerythrite triacrylate copolymers and cellulose-based Granocel as carriers for trypsin immobilization. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 61:66–74, 2008.
- [184] Agyei, D., Tambimuttu, S., Kasargod, B., Gao, Y., He, L., Quick and low cost immobilization of proteinases on polyesters: Comparison of lactobacilli cell-envelope proteinase and trypsin for protein degradation. *J. Biotechnol.*, 188:53–60, 2014.
- [185] David, A.E., Wang, N.S., Yang, V.C., Yang, A.J., Chemically surface modified gel(CSMG): an excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. *J. Biotechnol.*, 125:395–407, 2006.
- [186] Say, R., Şenay, R.H., Biçen, Ö., Ersöz, A., Yılmaz, F.Ş., Akgöl, S., Denizli, A., Polymeric amylase nanoparticles as a new semi-synthetic enzyme system for hydrolysis of starch. *Mater. Sci. Eng. C*, 33:1900–1906, 2013.
- [187] Shawon, Z.B.Z., Synthesis and Characterization of janus magnetic nanoparticles and its application as an adsorbent. *J. Chem. Eng.*, 27:64–68, 2012.
- [188] Augustina, M., Balu, T., Synthesis and characterization of metal (Mn,Zn) ferrite magnetic nanoparticles. *Mater. Today.*, 2:923–927, 2015.
- [189] Martin, M., Salazar Carballo, P.A., Villalonga, R., Campuzano, S., Pingarron, J.M., Gonzalez-Mora, J.L., Preparation of Core–Shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Poly(Dopamine) Magnetic Nanoparticles for Biosensor Construction. *J. Mater. Chem. B*, 2:739–746, 2013.
- [190] Yan, Y., Zheng, Z., Deng, C., Zhang, X., Yang, P., Facile synthesis of Ti<sup>4+</sup>immobilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Polydopamine core-shell microspheres for highly selective enrichment of phosphopeptides. *Chem. Commun.*, 49:5055–5057, 2013.
- [191] Zhang, M., He, X., Chen, L., Zhang, Y., Preparation of Ida-Cu functionalized core–satellite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Polydopamine/Au magnetic nanocomposites and their application for depletion of abundant protein in bovine blood. *J. Mater. Chem.*, 20:10696–10704, 2010.
- [192] Borreani, J., Llorca, E., Larrea, V., Hernando, I., Adding neutral or anionic hydrocolloids to dairy proteins under in vitro gastric digestion conditions. *Food Hydrocoll.*, 57:169–177, 2016.



- [193] Çelikbıçak, Ö., Atakay, M., Güler, Ü., and Salih, B., A trypsin immobilized sol-gel for protein identification in MALDI-MS applications. *Anal. Lett.*, 47:707–719, 2014.
- [194] Bayramoğlu, G., Çelikbıçak, Ö., Arica, M.Y., and Salih, B., Trypsin immobilized on magnetic beads via click chemistry: Fast proteolysis of proteins in a microbioreactor for MALDI-TOF-MS peptide analysis. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 53:4554–4564, 2014.

## ÖZGEÇMİŞ

Keziban Atacan, 12.10.1982 yılında Konya’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Konya da tamamladı. 2002 yılında başladığı Selçuk Üniversitesi Kimya Bölümünü 2006 yılında bölüm birinciliği ile bitirdi. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümünde yüksek lisans eğitimi ve aynı zamanda TÜBİTAK-COST projesinde araştırmacı öğrenci olarak 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Kimya Bölümünde doktora eğitimine başladı ve Kocaeli HABAŞ Sınai ve Tıbbi Gazlar İstihsal Endüstrisi A.Ş de Özel Gazlar Laboratuvar Sorumlusu olarak işe başladı. 2010 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümüne doktora öğrencisi olarak yatay geçiş yaptı. 2016 Mart ayı itibariyle HABAŞ Sınai ve Tıbbi Gazlar İstihsal Endüstrisi A.Ş den ayrılarak, Sakarya Üniversitesi BİMAYAM bünyesinde Uzman olarak görev yapmaktadır.