

**SELÜLOZ KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIKLARA LAKKAZ  
ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU**

**Aslı BEYLER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ARALIK 2011  
ANKARA**

Aslı BEYLER tarafından hazırlanan “SELÜLOZ KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIKLARA LAKKAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Serpil AKSOY .....  
Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muzaffer TALU .....  
Kimya, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Serpil AKSOY .....  
Kimya, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Nesrin HASIRCI .....  
Kimya, Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Tarih: 29/12/2011

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Aslı BEYLER

**SELÜLOZ KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIKLARA LAKKAZ  
ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Aslı BEYLER**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Aralık 2011**

**ÖZET**

Bu çalışmada, manyetik  $Fe_3O_4$  nanoparçacıkları ters-faz süspansiyon metodu ile selülozla kaplanmıştır. Hazırlanan selüloz kaplı manyetik nanoparçacıkları ( $Fe_3O_4$ -CC), geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), X-ışını kırınımı yöntemi (XRD), termogravimetrik analiz yöntemi (TGA),  $\zeta$  (Zeta)-potansiyel analizi, elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR) ve titreşimli örnek manyetometri (VSM) ile karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan selüloz kaplı manyetik nanoparçacıkların boyutlarının 50 nm' den küçük olduğu,  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarının 4,7-7,0 nm kalınlığında selülozla kaplandıkları,  $Fe_3O_4$  spinel yapısının değişmediği, izoelektrik noktasının 2,71, doyum mıknatıslanmasının 45,2 emu/g olduğu ve süperparamanyetik özellik gösterdikleri belirlenmiştir. *Trametes versicolor* kaynaklı lakkaz enzimi,  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarına adsorpsiyonla ( $Fe_3O_4$ -CC-L) veya iki türlü kovalent bağlanma methodu ile; yükseltgenerek ( $Fe_3O_4$ -CC-Y-L), siyanürik klorürle aktifleştirerek ( $Fe_3O_4$ -CC-SC-L) kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilmiştir. Enzimin varlığı SEM/EDS analizleri ile belirlenmiştir. Immobilize lakkazların aktifliğine pH, sıcaklık, substrat derişimi, depolama süresinin ve tekrar kullanılabilirliğin etkisi

incelenmiştir. İmmobilize lakkazlar için optimum pH 3,5, optimum sıcaklık 40 °C olarak bulunmuş ve 1 gün içerisinde 25 kez kullanıldıklarında başlangıç aktifliklerini yaklaşık %65 korumuşlardır. İmmobilize lakkazların Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L katalitik etkinlikleri 1,35 olan serbest lakkazinkine çok yakın ve sırasıyla 1,28, 1,29 ve 1,30 olarak bulunmuştur.

**Bilim Kodu** : 201.1.117  
**Anahtar Kelimeler** : Manyetit, selüloz, enzim immobilizasyonu, lakkaz  
**Sayfa Adedi** :142  
**Tez Yöneticisi** : Prof. Dr. Serpil AKSOY

**IMMOBILIZATION OF LACCASE ENZYME ONTO CELLULOSE COATED  
MAGNETIC NANOPARTICLES**

**(M. Sc. Thesis)**

**Aslı BEYLER**

**GAZI UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**January 2011**

**ABSTRACT**

In this study,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles were coated with cellulose by reversed-phase suspension method. The prepared cellulose coated magnetic nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$ ) were characterized by transmission electrode microscope (TEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction method (XRD), termogravimetric analysis (TGA),  $\zeta$  (Zeta)-potential analysis, electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) and vibrating sample magnetometry (VSM). It was determined that the particle sizes of cellulose coated magnetic nanoparticles are smaller than 50 nm, the thickness of cellulose on the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles were 4,7-7,0 nm, no change occurred in spinel structure, isoelectronic point was 2,71, the saturation magnetization was 45,2 emu/g and they demonstrate superparamagnetic property. *Trametes versicolor* laccase enzyme, immobilized on to  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparticles by adsorption and by two kind of covalent binding methods; either by oxidation or activation with cyanuric chloride. The presence of enzyme was detected by SEM/EDS analysis.

The effect of pH, temperature, substrate concentration, storage time on the activities of immobilized laccases were investigated. It was obtained

that the optimum pH was 3,5 and optimum temperature 40 °C for all immobilized systems and after using these immobilized systems repeatedly 25 times in a day, they retained 65% of their initial activities. It was obtained that catalytic effect of immobilized laccase Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L was close to free laccase which was 1,35 and the values were determined as, 1,28; 1,29 and 1,30, respectively.

**Science Code : 201.1.117**

**Key Words : Magnetite, cellulose, enzyme immobilization, laccase**

**Page Number : 142**

**Adviser : Prof. Dr. Serpil AKSOY**

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca ortaya çıkan her türlü probleme getirmiş olduğu bakış açısı ve yaklaşımları ile bana yol gösteren, çalışmamın yönlendirilmesi ve yürütülmesinde sonsuz katkıları bulunan, her zaman desteğini hissettiren değerli Hocam Prof. Dr. Serpil AKSOY' a,

Tüm yaşamım boyunca beni hep sevgi ve sabırla destekleyip gözetten, her zaman büyük moral ve destek veren, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ailem Sevim BEYLER, Ali Rıza BEYLER ve Esra CANAT' a,

Çalışmalarımda 2210–Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile maddi, manevi yardım ve destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Dostluklarını ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım, Şeyma Ruhan ŞİMŞEK, Seher MERAL, Nüzhet Ayça KALKAN, Melek BULUT, Filiz KARA ve Elif UZLUK' a,

Analiz aşamasındaki yardımlarından dolayı Dr. Eda Ayşe AKSOY ve Tuğba ENDOĞAN' a,

Her zaman yanımda olan dostluklarını hiç esirgemeyen dostlarım Berrak ÇETİN, Nermin YAĞBASAN, Nilgün UĞURLU ve Serpil EŞSİZ'e,

Her zaman yanımda olan sevgi ve yardımlarını benden hiç esirgemeyen müstakbel eşim Halit ÇİĞİL' e,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xv
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Mıknatıslanma .....	4
2.1.1. Demir oksitler .....	8
2.1.2. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (Manyetit) .....	9
2.1.3. Manyetik parçacıkların uygulama alanları .....	10
2.2. Enzimler.....	12
2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri .....	12
2.2.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması .....	13
2.2.3. Enzim aktivitesine etki eden faktörler .....	15
2.2.4. Enzimatik tepkimeler .....	18
2.3. Enzim İmmobilizasyonu .....	19
2.3.1. Enzim immobilizasyonunda destek materyalinin seçimi .....	21
2.3.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri .....	22
2.4. Bu Çalışmada Hazırlanan Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Selüloz Naoparçacıkları .....	28

	<b>Sayfa</b>
2.4.1. Selüloz .....	28
2.5. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Selüloz Nanoparçacıklarının Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler.....	29
2.5.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) .....	30
2.5.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) .....	30
2.5.3. X-ışını kırınımı yöntemi (XRD).....	30
2.5.4. Termogravimetrik analiz (TGA) .....	31
2.5.5. ζ (Zeta) -potansiyel analizleri.....	31
2.5.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR).....	32
2.5.7. Titreşimli örnek manyetometrisi (VSM).....	34
2.5.8. Enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskopisi (SEM/EDS) .....	37
2.6. Lakkaz Enzimi .....	38
2.7. ABTS Substratı.....	41
2.8. Polimerik Manyetik Mikroküre, Nanoparçacıklar ve Enzim Immobilizasyonuna İlişkin Literatürde Yer Alan Çalışmalar.....	42
3. DENEYSEL KISIM.....	49
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	49
3.2. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Selüloz Nanoparçacıklarının Sentezi .....	52
3.3. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Selüloz Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu .....	53
3.3.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) .....	53
3.3.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) .....	53
3.3.3. X-ışını kırınımı yöntemi (XRD).....	54
3.3.4. Termogravimetrik analiz (TGA) .....	54
3.3.5. ζ-(Zeta) potansiyel ölçümleri.....	54

	<b>Sayfa</b>
3.3.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR).....	54
3.3.7. Titreşimli örnek manyetometrisi (VSM).....	55
3.4. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Selüloz Nanoparçacıklarına Lakkaz İmmobilizasyonu .....	55
3.4.1. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıklarına adsorpsiyonla lakkaz immobilizasyonu .....	55
3.4.2. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıklarının yükseltgenmesi ve kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu .....	56
3.4.3. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıklarının siyanürle aktifleştirilmesi ve kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu .....	57
3.4.4. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıklarına immobilize edilen enzimlerin enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS) ile tayini .....	59
3.4.5. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıklarına immobilize edilen enzim miktarının Bradford metodu ile tayini .....	59
3.5. İmmobilize Lakkazların Aktiflik Tayini .....	60
3.6. İmmobilize Lakkazların Aktifliğine pH Etkisi.....	62
3.7. İmmobilize Lakkazların Aktifliğine Sıcaklık Etkisi.....	62
3.8. İmmobilize Lakkazların Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi .....	62
3.9. İmmobilize Lakkazların Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi .....	62
3.10. İmmobilize Lakkazların Aktifliğine Kullanım Sayısının Etkisi.....	63
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	64
4.1. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Selüloz Nanoparçacıklarının Sentezi .....	64
4.2. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Selüloz Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu .....	64
4.2.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) .....	64
4.2.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) .....	69
4.2.3. X-ışını kırınımı yöntemi (XRD).....	71

	<b>Sayfa</b>
4.2.4. Termogravimetrik analiz (TGA) .....	72
4.2.5. $\zeta$ -(Zeta) potansiyel analizi.....	75
4.2.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR).....	79
4.2.7. Titreşimli örnek manyetometrisi (VSM).....	80
4.3. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Selüloz Nanoparçacıklarına Lakkaz İmmobilizasyonu .....	83
4.3.1. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıklarına immobilize edilen enzimlerin (SEM/EDS) ile tayini .....	84
4.3.2. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıklarına immobilize edilen enzim miktarının Bradford metodu ile tayini .....	88
4.4. İmmobilize Lakkazın Aktifliğinin Tayini.....	88
4.5. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Etki Eden Parametreler .....	88
4.5.1. İmmobilize lakkaz aktifliğine pH etkisi .....	88
4.5.2. İmmobilize lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi .....	92
4.5.3. İmmobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi .....	96
4.5.4. İmmobilize lakkazların aktifliğine substrat derişiminin etkisi	100
4.5.5. İmmobilize lakkazların aktifliğine kullanım sayısının etkisi ..	104
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	108
KAYNAKLAR .....	110
EKLER.....	120
EK-1 Manyetik terimlerin sembolleri, CGS ve SI sistemindeki birimleri ..... ve çevirme faktörleri.....	121
EK-2 Kullanılan çözeltilerin hazırlanması .....	122
EK-3 BSA kalibrasyon grafiğine ait veriler .....	124
EK-4 ABTS kalibrasyon grafiğine ait veriler .....	125
EK-5 İmmobilize edilen enzim miktarı tayinine ait veriler .....	126
EK-6 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının $\zeta$ -potansiyelinin pH ile değişimine ait veriler .....	127
EK-7 İmmobilize lakkazların aktifliğine pH etkisine ait veriler .....	128
EK-8 İmmobilize lakkazların aktifliğine sıcaklık etkisine ait veriler .....	131

**Sayfa**

EK-9 İmmobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisine ait veriler .....	133
EK-10 İmmobilize lakkazların aktifliğine substrat derişiminin etkisine ait veriler .....	136
EK-11 İmmobilize lakkazların aktifliğine kullanım sayısının etkisine ait veriler .....	138
EK-12 TGA Termogramlarından, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının manyetit yüzdesi.....	141
ÖZGEÇMİŞ.....	142

**ÇİZELGELERİN LİSTESİ**

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4. 1. İmmobilize lakkazların kinetik parametreleri $K_m$ , $V_{mak}$ ve $V_{mak}/K_m$ 'nin değerleri .....	103

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 2. 1. Mıknatıs çevresinde oluşan manyetik alan.....	4
Şekil 2. 2 Atom çekirdeği çevresinde ve kendi etrafında spin hareketi yapan elektronun oluşturduğu manyetik moment.....	5
Şekil 2. 3. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> birim hücresi .....	10
Şekil 2. 4. Enzimatik tepkimenin hızına substrat derişiminin etkisi.....	17
Şekil 2. 5. Enzim ve substrat arasındaki anahtar-kilit uyumu .....	19
Şekil 2. 6. Enzim immobilizasyon yöntemleri .....	23
Şekil 2. 7. Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu .....	24
Şekil 2. 8. Matrikste hapsetme ile enzim immobilizasyonu .....	25
Şekil 2. 9. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu .....	25
Şekil 2. 10. Kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonu .....	27
Şekil 2. 11. Çapraz bağlanma ile enzim immobilizasyonu .....	28
Şekil 2. 12. Selülozun yapısı .....	29
Şekil 2. 13. Uygulanan manyetik alanın elektronların enerji seviyesinde meydana getirdiği değişme .....	33
Şekil 2. 14. Ferromanyetik bir malzemenin manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi [7].....	35
Şekil 2. 15. Birden çok manyetik bölgeden oluşan malzemenin yapısı ve atomik manyetik momentlerin durumu [63] .....	36
Şekil 2. 16. Süperparamanyetik nanoparçacıkların mıknatıslanmasının uygulanan manyetik alanla değişimi [7] .....	37
Şekil 2. 17. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması .....	41
Şekil 2. 18. ABTS ve ABTS <sup>+</sup> .....	42
Şekil 3. 1. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının sentezi .....	53

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 3. 2. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarına lakkaz immobilizasyonu sırasındaki işlem basamakları .....	56
Şekil 3. 3. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının yükseltgenmesi .....	57
Şekil 3. 4. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının siyanürik klorürle aktifleştirilmesi ve lakkaz immobilizasyonu.....	58
Şekil 3. 5. BSA kalibrasyon grafiği .....	60
Şekil 3. 6 ABTS kalibrasyon grafiği .....	61
Şekil 4. 1. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , selüloz, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC ve Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Y-CC' in FT-IR spektrumları a) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> b) selüloz c) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC d) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Y-CC .....	70
Şekil 4. 2. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının X-ışını kırınım deseni .....	71
Şekil 4. 3. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparçacıklarının TGA termogramı.....	72
Şekil 4. 4. Selülozun TGA termogramı.....	73
Şekil 4. 5. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıklarının TGA termogramı .....	73
Şekil 4. 6. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının ζ-potansiyelinin pH ile değişimi ..	75
Şekil 4. 7. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının tanecik boyut dağılımı a) tanecik boyutu-% şiddet grafiği b)tanecik boyutu-% tanecik sayısı grafiği (doğrusal eksen) c) tanecik boyutu-% tanecik sayısı (logaritmik eksen) .....	78
Şekil 4. 8. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının EPR spektrumları .....	79
Şekil 4. 9 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi (-4000 Oe, +4000 Oe) .....	81
Şekil 4. 10. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi (-22000 Oe, +22000 Oe) .....	82
Şekil 4. 11. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-L, ve Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-Y-L Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-SC-L nanoparçacıklarının SEM/EDS spektrumları a) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC b) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-L c) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-Y-L d) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-SC-L .....	86
Şekil 4.12. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-L aktifliğinin pH ile değişimi .....	89
Şekil 4. 13. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Y-CC-L aktifliğinin pH ile değişimi.....	90



<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4. 14. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-SC-L aktifliğinin pH ile değişimi .....	91
Şekil 4. 15. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi .....	93
Şekil 4. 16. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-Y-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi .....	94
Şekil 4. 17. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-SC-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	95
Şekil 4. 18. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi .....	97
Şekil 4. 19. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-Y-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi .....	98
Şekil 4. 20. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-SC-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi .....	99
Şekil 4. 21. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-L için Lineweaver-Burk grafiği .....	101
Şekil 4. 22. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-Y-L için Lineweaver-Burk grafiği.....	102
Şekil 4. 23. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-SC-L için Lineweaver-Burk grafiği .....	103
Şekil 4. 24. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi .....	105
Şekil 4. 25. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-Y-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi .....	106
Şekil 4. 26. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-SC-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi .....	107

**RESİMLERİN LİSTESİ**

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2. 1. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> mineralinin görünümü .....	9
Resim 2. 2. Lakkaz üreten <i>Trametes versicolor</i> mantarı.....	39
Resim 2. 3. <i>Trametes versicolor</i> ' dan elde edilen lakkaz molekülü .....	40
Resim 4. 1. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparçacıklarının TEM görüntüleri .....	65
Resim 4.2. Resim 4.1. a' daki Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparçacıklarının boyutlarını gösteren.....	66
Resim 4. 4. Resim 4.3. a ve b' deki Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC nanoparçacıklarının boyutlarını gösteren TEM görüntüleri bar uzunluğu: a) 50 nm b) 100 nm.....	68

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>M</b>	Mıknatıslanma
<b><i>m</i></b>	Manyetik moment
<b>M</b>	Kütle
<b><math>\sigma</math></b>	Kütle mıknatıslanması
<b><math>\chi</math></b>	Manyetik duyarlılık
<b>H</b>	Manyetik alan
<b>B</b>	Manyetik indüksiyon
<b>T<sub>C</sub></b>	Curie sıcaklığı
<b>T<sub>N</sub></b>	Néel sıcaklığı
<b>M<sub>S</sub></b>	Doyum mıknatıslanması
<b><math>\sigma_s</math></b>	Kütleye bağlı doyum mıknatıslanması
<b>M<sub>r</sub></b>	Kalıcı mıknatıslanma (remanans)
<b>H<sub>C</sub></b>	Zorlayıcı alan (koersivite)
<b>V<sub>mak</sub></b>	Maksimum hız
<b>K<sub>m</sub></b>	Michaelis-Menten sabiti
<b>S</b>	Substrat
<b>pl</b>	İzoelektronik nokta
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>CC</b>	Selüloz
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC</b>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıkları
<b>rpm</b>	Dakikadaki dönüş sayısı
<b>TEM</b>	Geçirimli elektron mikroskopisi

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>FT-IR</b>	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
<b>XRD</b>	X-ışınları kırınımı yöntemi
<b>TGA</b>	Termogravimetrik analiz yöntemi
<b>EPR</b>	Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi
<b>VSM</b>	Titreşimli örnek manyetometrisi
<b>FT</b>	Fosfat tamponu
<b>FST</b>	Fosfat-sitrat tamponu
<b>L</b>	Lakkaz
<b>SC</b>	Siyanürik klorür
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC</b>	Siyanürik klorürle aktifleştirilen Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıkları
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y</b>	Yükseltgenmiş Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıkları
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L</b>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L</b>	Siyanürik klorürle aktifleştirilen Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L</b>	Yükseltgenmiş Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -selüloz nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz
<b>BSA</b>	Sığır serum albümini
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit)

## 1. GİRİŞ

Son yılların en çok ilgi çeken konularından biri nano malzemelerdir. “Nano” sözcüğü, herhangi bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri anlamına gelmektedir. Nanoyapılar, yaklaşık 10-100 atomluk sistemlerden ( $10^{-9}$  metre) oluşmaktadır. Bu boyutlarda sistemlerin fiziksel davranışları normal sistemlere kıyasla farklı özellikler göstermektedir. “Nanobilim” ve “nanoteknoloji” sözcükleri altında toplanabilecek bu farklılıklar, yaklaşık 10 yıldan beri dünya ülkelerinin sivil-askeri teknoloji stratejilerini belirlemektedir. Nano-elektronik ve bilgisayar teknolojileri, havacılık, uzay araştırmaları, biyoteknoloji, çevre ve enerji, malzeme ve imalat, tıp ve sağlık, tarım ve savunma sektörlerinde hızla artan kullanım alanları bulmuştur [1].

Son yıllarda, manyetik özellik sergileyen nanoparçacıklar biomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda önemli bir yer edinmiştir. Çeşitli doğal ya da sentetik polimerlerle işlevsel hale getirilen manyetit ( $Fe_3O_4$ ) ya da maghemit ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) gibi manyetik demir oksit nanoparçacıkları; kayıt cihazlarında, özel polimerler tarafından desteklenen ilaçlarda, medikal araştırmalarda, hücre izolasyon cihazlarında, enzim immobilizasyonlarında, kontrollü salım sistemlerinde, biyolojik malzemelerin ayrılmasında, suyun içinde bulunabilecek ağır metal iyonları ve boyar maddeler gibi kirleticilerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır [2-6].

Manyetik destek materyaller, manyetik tanecik içeren ürünün tepkime ortamından santrifüjleme, süzme gibi işlemlere gerek kalmadan, mıknatıs sayesinde hızla ayrılmasını sağlamaktadır. Manyetik polimerik destekler, manyetik nanoparçacıkların biyoyumluluklarının artırılması, bu nanoparçacıkların hormonlar, vitaminler, nükleotitler, ilaçlar ve enzimler gibi kompleks yapılı biyolojik moleküllere fiziksel ya da kimyasal olarak tutunabilmeleri, manyetik özelliğe sahip koloidal sistemin kararlı hale getirilebilmesi, parçacıkların sentezleri sırasında ya da sentezlenmelerinden

sonra orijinal boyutlarının ve manyetik özelliklerinin korunması sebepleriyle önem kazanmıştır [7-9]. Şimdiye kadar, çeşitli polimerler ile kaplanan manyetik mikroküreler ve manyetik nanoparçacıklar, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ilaç taşıma sistemleri, hipertermik uygulamalar (tümörlerin ısıyla bozundurulması), doku onarımı, biyoaktif moleküllerin (enzimlerin, proteinlerin, biyoaktif ajanların) ve de sudaki kirleticilerin (boyarmaddeler ve ağır metal iyonların ) biyolojik ve ekolojik ortamlardan uzaklaştırılmasında kullanılmıştır [10-19].

Enzimler, çoğunluğu protein yapısında olan, doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenebilen biyolojik katalizörlerdir ve pek çok tepkimeyi yüksek spesifikle hızlı ve verimli bir şekilde katalizlerler. Hücre dışında da etkinliklerini koruyan enzimler, endüstriyel ve klinik işlemlerde substrat ile tepkimeye girerek yüksek oranda ürün eldesini sağlarlar. Fakat enzimlerin endüstriyel alanda biyokatalizleyici olarak kullanılabilmesi için enzim kararlılığının, aktifliğinin ve tekrar kullanımının artırılması gerekmektedir ve bu nedenle bilim insanları enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilmesi yönünde yoğun araştırmalar yürütmektedir. Enzimlerin ekonomik ve pratik bir şekilde kullanımlarını sağlamak amacıyla, çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemlerle katı desteklere immobilize edilmiş şekillerinin kullanılması tercih edilir hale gelmiştir. Bu enzimler tepkime ortamından istenilen bir anda ayrılabilir ve katalizledikleri tepkimelerde tekrar tekrar kullanılabilir. Enzimlerin immobilize edilmesi amacıyla, doğal ya da sentetik polimerlerden ve inorganik maddelerden çeşitli biçimlerde ve boyutlarda hazırlanabilen destek materyaller kullanılmaktadır. Enzimlerin katı desteklere immobilize edilmesi, enzim teknolojisinde yoğun araştırılan bir konu olmuştur. Son yıllarda manyetik özellik gösteren destek malzemelerin de enzim immobilizasyonunda kullanılması önem kazanmıştır [20-22].

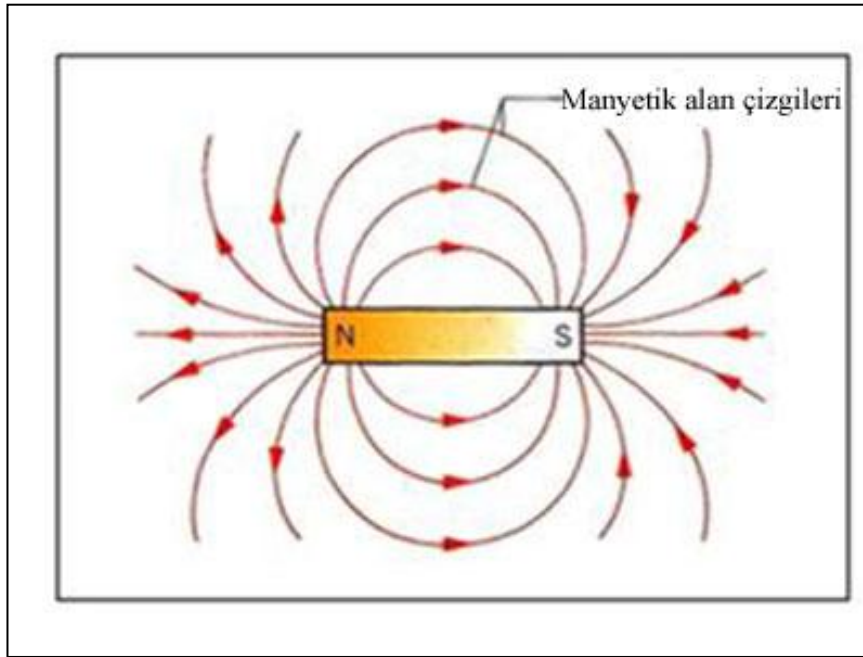
Bu tez çalışmasında, manyetik  $Fe_3O_4$  nanoparçacıkları, doğal bir polimer olan selüloz ile kaplanarak fonksiyonel hale getirilmiş ve selüloz kaplı manyetik nanoparçacıklar ( $Fe_3O_4$ -CC), *Trametes versicolor* lakkaz enziminin

immobilizasyonunda kullanılmıştır.  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının yapısal, morfolojik, manyetik ve ısı özellikleri, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), X-ışınları kırınımı yöntemi (XRD), geçirimli elektron mikroskopisi (TEM),  $\zeta$  (zeta)-potansiyel analizi, elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR), titreşimli örnek manyetometrisi (VSM) ve termogravimetrik analiz yöntemi (TGA) ile incelenmiştir. İlk kez bu kadar çeşitli yöntemlerle selüloz kaplı manyetik nanoparçacıklar karakterize edilmiştir. *Trametes versicolor* lakkaz enzimi  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarına fiziksel adsorpsiyonla ( $Fe_3O_4$ -CC-L) veya iki türlü kimyasal bağlama ile; yükseltgenerek ( $Fe_3O_4$ -CC-Y-L) ve siyanürik klorürle aktifleştirerek ( $Fe_3O_4$ -CC-SC-L) immobilize edilmiştir. Immobilize enzim sistemlerindeki enzimin varlığı, enerji dispersif X-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS) ile belirlenmiştir. Immobilize lakkaz aktifliği, ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit)) substratı kullanılarak tayin edilmiştir. Bu çalışmada selüloz kaplı manyetik nanoparçacıklara yükseltgenerek ve siyanürik klorürle aktifleştirerek kovalent bağlanma yöntemleriyle ilk kez lakkaz enzimi immobilize edilmiştir.  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarından 3 farklı yöntem ile elde edilen immobilize lakkazların optimum pH ve optimum sıcaklıkları belirlenmiş, kinetik parametreleri ( $V_{mak}$  ve  $K_m$ ) hesaplanmış, depolama süresince ve tekrar kullanımda enzim aktifliklerinde meydana gelen değişimler incelenmiş ve birbirleriyle kıyaslanarak en optimum immobilizasyon tekniği saptanmaya çalışılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mıknatıslanma

Elektriksel yüklerin hareketleri sonucunda meydana gelen olaya mıknatıslanma (manyetizasyon) denir. Fe, Ni, Co gibi iletkenler ile genel olarak, kendisinden belirli bir uzaklıkta bulunan bu iletkenlerin alaşımlarını kendine çekebilme özelliği gösteren maddelere “mıknatıs” adı verilir. Her mıknatısın çevresinde “manyetik alanı” vardır. Şekil 2.1.’ de mıknatısın çevresinde oluşan manyetik alan şematik olarak gösterilmiştir.



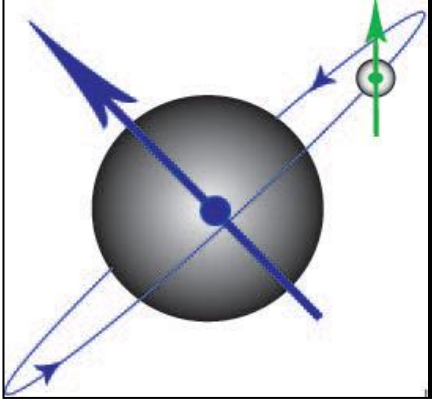
Şekil 2. 1. Mıknatısın çevresinde oluşan manyetik alan

Bir mıknatısın etki alanı içinde kalınca kendileri mıknatıs olmadıkları halde, Fe, Ni, Co gibi iletkenler ve bunların alaşımlarını kendine çekebilme özelliği gösteren maddelere de “manyetik madde” denilir. Mıknatısın etki alanı içinde kaldıkları halde, sözü geçen maddeleri kendisine çekme özelliği göstermeyen maddelere de “manyetik olmayan maddeler” denilir [23].

Manyetik maddelerin atomları, atomun çekirdeği çevresinde bulunan elektronların dönüş (spin) hareketlerinden ve elektronlarının kendi etrafındaki hareketlerinden kaynaklanan bir “manyetik moment”e sahiptir. Şekil 2.2.’ de



atom çekirdeği çevresinde ve kendi etrafında dönen elektronun oluşturduğu manyetik moment şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. 2 Atom çekirdeği çevresinde ve kendi etrafında spin hareketi yapan elektronun oluşturduğu manyetik moment

Manyetik özellikler, tamamen cismi oluşturan atomların elektronlarının kendi manyetik momentlerinin (spin açısal momentumlarının), yörünge hareketlerinin (yörünge açısal momentumlarının) veya buldukları enerji düzeylerinin ne kadar dolu olduğunun bir sonucu olarak ortaya çıkar.

Bir maddenin mıknatıslanma değeri ( $M$ ), dışarıdan uygulanan manyetik alana bağlıdır ve katı maddenin birim hacmindeki ( $V$ ) manyetik moment ( $m$ ) miktarına eşittir (Eş. 2.1) [24,25]:

$$M = m / V \quad (2.1)$$

Maddenin birim kütledeki mıknatıslanma ( $\sigma$ ) ise, manyetik momentin, maddenin kütlelerine ( $m$ ) oranı ile hesaplanır (Eş. 2.2) [26]:

$$\sigma = m / m \quad (2.2)$$

Manyetik alan şiddeti ( $H$ ) ve mıknatıslanma değeri arasındaki ilişki de, Eş. 2.3' te verildiği gibidir [24,25]:

$$M = \chi \times H \quad (2.3)$$

Bu bağıntıda,  $\chi$ , malzemenin uygulanan manyetik alana karşı duyarlılığını gösteren ve SI birim sisteminde birimsiz bir büyüklük olan “manyetik duyarlılık” tır.

Maddeler, elektronlarının atom çekirdeği çevresindeki spin hareketlerine ve bunların birbirleriyle etkileşimlerine bağlı olarak belirli bir manyetik davranış sergiler. Bu davranışlar, diyamanyetizma, paramanyetizma, ferromanyetizma, antiferromanyetizma ve ferrimanyetizma olmak üzere beş sınıfta incelenebilir.

Diyamanyetik maddeler, manyetik alan içinde alana zıt yönde zayıf mıknatıslanırlar ve alanın zayıf tarafına doğru itilirler. Bu maddelerin atomları, net bir manyetik momente sahip değildir. Radyum, potasyum, hidrojen, bakır, gümüş ve altın diyamanyetik gruba girerler. Manyetik alana maruz bırakıldıklarında, manyetik alan tarafından zayıfça itildikleri için, mıknatıslanmaları negatif yönde artar. Bu maddelerin  $\chi$  değeri negatif olup, yaklaşık  $-10^{-5}$  civarındadır [24].

Paramanyetik maddeler, eşleşmemiş elektron içermeleri nedeniyle, manyetik momente sahip olan ve manyetik alan içine yerleştirildikleri zaman, manyetik alan tarafından çekilen maddelerdir. Hava, alüminyum ve silisyum paramanyetik gruba girer. Bu maddelerin  $\chi$  değerleri yaklaşık  $10^{-3}$  ile  $10^{-5}$  civarındadır ve dış manyetik alan sıfır olduğunda bu maddelerin mıknatıslanması sıfırdır. Maddeye dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında ise, rastgele yönlenmiş manyetik momentler, manyetik alanla aynı doğrultuda yönlenir ve maddenin mıknatıslanması artar [24].

Ferromanyetik maddeler, manyetik alan içinde kalınca çok iyi mıknatıslanma özelliği gösteren ve  $\chi$  değerleri  $50-10^4$  dolaylarında olan maddelerdir. Fe, Ni, Co ferromanyetik özellik gösterir. Ferromanyetik maddelerin atomları net bir manyetik momente sahiptir ve bu manyetik momentler birbirlerinin etkisini

artıracak şekilde aynı yönlü düzenlenmiştir. Bu maddelere dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında, manyetik momentlerin daha da düzenli hale geçmesiyle, maddenin toplam mıknatıslanması artar ve bir süre sonra, düzenlenecek manyetik moment kalmadığı için mıknatıslanma doygunluğa ulaşır. Bu andaki mıknatıslanma, “doyum mıknatıslanması” olarak tanımlanır ve “ $M_s$ ” ile gösterilir (Eğer doyum mıknatıslanması kütle mıknatıslanması olarak veriliyorsa,  $\sigma_s$  olarak gösterilir). Doyum mıknatıslanmasının büyüklüğü, maddenin birim hacmindeki manyetik moment miktarına bağlıdır. Ayrıca sıcaklık, bu maddelerin mıknatıslanması üzerinde etkilidir. Ferromanyetik maddeler, “Curie sıcaklığı” olarak bilinen ve “ $T_C$ ” ile simgelenen belirli bir sıcaklığın üzerinde, manyetik momentlerinin düzenlenmelerini kaybetmesiyle paramanyetik davranış gösterirler. Fe için  $T_C$  değeri 1043 K’ dir. Ferromanyetik maddeler teknolojik yönden çok büyük önem arz etmektedir; transformatörler, ses düzenekleri, video, teyp, disketler bu maddelerden yapılmaktadır [23,24].

Antiferromanyetik maddelerde, birbirine komşu olan eşit büyüklükteki manyetik momentler, birbirlerinin etkisini yok edecek şekilde ters yönlü düzenlenmiştir. Bu nedenle, dış manyetik alan sıfır olduğunda, maddenin net manyetik momenti sıfırdır. Bu durum, kristal örgü içerisinde, birbirine zıt yönlü manyetik momentlere sahip iki ayrı alt örgünün bulunmasından kaynaklanmaktadır. Maddeye dışarıdan manyetik alan uygulandığında ise, manyetik alana zıt yönlü olan manyetik momentler, manyetik alanla aynı yöne doğru yönlenmeye başlar ve maddenin mıknatıslanması artar. Antiferromanyetik maddelerin manyetik özelliği de sıcaklığa önemli ölçüde bağlıdır ve bu maddeler, “Néel sıcaklığı” olarak bilinen ve “ $T_N$ ” ile simgelenen belirli bir sıcaklıkta, sahip oldukları düzenlenmeyi kaybederek paramanyetik davranış sergiler. FeO, 198 K altındaki sıcaklıklarda antiferromanyetik özellik gösterir. Antiferromanyetik maddelerin büyük bir kısmı, iyonik bileşiklerdir; oksitler, sülfidler, kloritler v.b. Bu maddeler ticari öneme pek sahip değildirler; daha ziyade bilimsel yönden ilginçtirler [24].

Ferrimanyetik davranış, antiferromanyetik davranışı da içeren bir manyetik davranış türüdür. Ferrimanyetik maddeler, antiferromanyetik maddelerde olduğu gibi, birbirine zıt yönlü manyetik momentler içeren iki ayrı kristal alt örgüden oluşmuşlardır. Ancak, bu iki alt örgüdeki manyetik momentler, birbirine eşit büyüklükte değildir. En çok bilinen ferrimanyetik maddelerden birisi,  $Fe_3O_4$  (manyetit)' tür. Bu maddelere, dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında, manyetik momentlerin manyetik alanla aynı doğrultuda yönlenmesiyle, maddenin mıknatıslanması artmaya başlar. Manyetik alan şiddeti belirli bir değere ulaştığında ise, manyetik momentlerin tümü, manyetik alanla aynı doğrultuda yönlendiği için, maddenin mıknatıslanması, ferromanyetik maddelerde olduğu gibi doygunluğa ulaşır. Ancak, bu maddelerin mıknatıslanması, ferromanyetik maddelere göre daha düşük değerlerdedir. Ayrıca,  $T_C$  üzerindeki sıcaklıklarda ferrimanyetik maddeler, manyetik momentlerinin düzenlenmesini yitirmesiyle, paramanyetik hale dönüşürler [24,27].

### 2.1.1. Demir oksitler

Demir oksitler, demir ve oksijenin birleşmesiyle oluşan, doğada yaygın olarak bulunabilen ve laboratuvarında kolaylıkla sentezlenebilen kimyasal bileşiklerdir. Demir oksit bileşikleri,  $MO.Fe_2O_3$  olarak gösterilen kimyasal yapı içerisinde,  $M=Co, Zn, Cu, Ni$  metal oksitleri ile birarada bulunurlar. Ferrimanyetik demir oksitler, ferromanyetik maddelere göre daha az manyetizasyon göstermelerine rağmen oksidasyona karşı dayanıklı olduklarından daha çok uygulama alanı bulurlar.  $\gamma-Fe_2O_3$  (maghemit) ve  $Fe_3O_4$  (manyetit) en genel ve en çok araştırılan demir oksitlerdir [7]. Manyetik nanoparçacıklar, pek çok disiplinde incelendiği için sanayi, bilim ve tıp uygulamalarında geniş bir yelpazede kullanılır. Özellikle, veri depolama, MRI (manyetik rezonans görüntüleme) kontrast arttırıcı ve ilaç salınımında kullanılır [28].

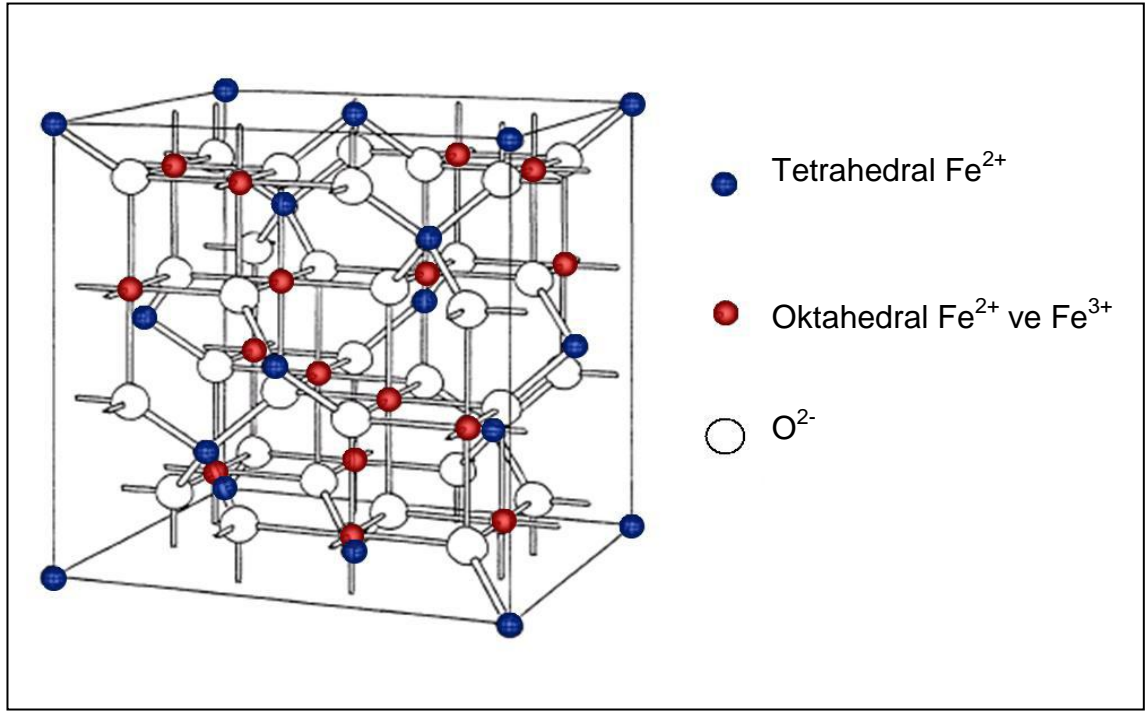
### 2.1.2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Manyetit)

A(B<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) standart formülüne sahip manyetit spinel grubun bir üyesidir. Kristal yapıda spesifik yerlerde bulunan A ve B farklı metal iyonlarını temsil eder. Bu durumda Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> kimyasal formülüne sahip olan manyetit, Fe<sup>2+</sup> olan A metali ve Fe<sup>3+</sup> olan B metali, iki spesifik yerdeki iki farklı metal iyonudur ve ferrimanyetik bir mineraldir (Resim 2.1). Ferro-ferrik oksit olarak bilinen manyetit ayrıca demir 2-3 oksit olarak da adlandırılır. Bu gösterim demirin iki farklı değerliğe aynı anda (<sup>2+</sup> ve <sup>3+</sup>) sahip olduğunu göstermektedir. Doğal bir mıknatıstır. Bu düzenleme yapılandırılmış bir yol veya vektörde farklı demir iyonları arasında elektron transferine neden olur. Bu elektrik vektörü manyetik bir alan üretir.



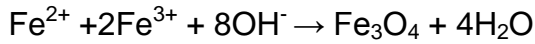
Resim 2. 1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> mineralinin görünümü

Siyah veya kahverengimsi siyah bir metalik parlaklığa sahiptir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> birim hücresi (Şekil 2.3), 32 O<sup>2-</sup> anyonu, 16 Fe<sup>3+</sup> ve 8 Fe<sup>2+</sup> katyonu olmak üzere 56 iyondan oluşur. Birim hücrede O<sup>2-</sup>, kübik sık istiflenmiş yapıdadır. Fe<sup>2+</sup> ve Fe<sup>3+</sup>, tetrahedral (dört yüzlü) bölgelerde 4 adet, oktahedral (sekiz yüzlü) bölgelerde ise 6 adet O<sup>2-</sup> tarafından koordine olmuştur.



Şekil 2. 3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> birim hücresi

Manyetit, aşağıdaki tepkimede gösterildiği gibi, 1:2 mol oranındaki Fe<sup>2+</sup>:Fe<sup>3+</sup> kationlarının sulu ortamda kuvvetli bir bazla çöktürülmesi ile elde edilir [7].



Tepkime sırasındaki Fe<sup>2+</sup>:Fe<sup>3+</sup> mol oranı ve sentez ortamının koşulları (ortamın sıcaklık ve pH değeri), oluşan demir oksitin türünü, boyutunu ve manyetik özelliklerini etkilemektedir [3,7].

### 2.1.3. Manyetik parçacıkların uygulama alanları

Son yıllarda, manyetik alan tarafından yönlendirilebilir olmaları, fiziksel özelliklerinin manyetik alanla değişebilir olması sebebiyle demir çözeltileri; küçük boyutları, karakteristik özellikleri ve düşük toksiklikleri ile de süperparamanyetik demir oksitler çok ilgi çeken ve üzerinde araştırma yapılan malzemelerdir [2,19]. Nano boyuttaki malzemelerin kendilerine özgü

boyut ve fiziksel özellikleri nedeniyle birçok avantajı vardır ancak nanoparçacıkları çözelti ortamından ayırmak zordur ve yüksek hızda santrifuj kullanılması gerekmektedir. Manyetik özelliklere sahip nanoparçacıklar kullanılarak bu sorun kolayca çözülür. Süreden ve maliyetten tasarruf sağlanır [19].

Demir oksit nanoparçacıkları manyetik özellikleri sayesinde ayırma işlemlerinde, biyoteknoloji alanında, ilaç salım sistemlerinde, adsorpsiyon uygulamalarında, özellikle iyon değişimlerinde, enzim veya diğer proteinlerin, nükleik asitlerin izolasyonu ve analizinde, protein saflaştırılmasında, patojenik bakteri ve virüslerin belirlenmesinde ve gen aktarımında, sanayi atıklarında boyaların renginin giderilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [5]. Ayrıca, yüzeylerine çeşitli fonksiyonel gruplar eklenmiş manyetik nanoparçacıklar ve manyetik mikroküreler; biyolojik ve ekolojik ortamlardan toksik iyonların, proteinlerin, enzimlerin ve mikroorganizmaların bu manyetik parçacıklara tutunarak, manyetik ayırma tekniği ile uzaklaştırılmasında, manyetik taşıyıcı görevinde kullanılmaktadır. Polimer malzemelerin gözeneklerine gömülü bu manyetik nanoparçacıklar elektrostatik etkileşimi geliştirmesi nedeniyle adsorpsiyon kapasitesini genişletir [29]. Manyetik taşıyıcı parçacıkların bu uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılması için dışarıdan uygulanan manyetik alana iyi bir cevap verebilmesi, boyutlarının küçük olması (böylelikle, yüzey alanının fazla oluşundan dolayı, daha fazla biyomolekül ve iyon yüzeye tutuklanarak ortamdan ayrılabilir), farklı ortam şartlarında kimyasal olarak kararlı olması ve mikrobiyal bozunmalara karşı dirençli olması, ortamdan ayrılmak ya da tutuklanmak istenen belirli bir bileşene karşı seçici olması (yani elektrostatik adsorpsiyon yapabilmesi ya da yüzeylerinde fonksiyonel gruplar taşıması), bazı uygulamalarda geri kazanılabilir ve tekrar kullanılabilir olması, yüzeysel ve manyetik özellikleri nedeniyle bir araya gelme eğilimlerinin en aza indirgenmiş olması ve üretimlerinin kolay ve ekonomik olması önemlidir.  $Fe_3O_4$  nanoparçacıkları aralarındaki güçlü manyetik dipol-dipol çekimler nedeniyle toplanma eğilimindedirler. Bunu önlemek için nişasta, selüloz, dekstan ve kitosan gibi hidrofilik polimerler ile

yüzeyleri kaplanmış olarak manyetik nanoparçacıkların sulu dispersiyonu elde edilir [28]. Aynı zamanda manyetik nanoparçacıkların biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalardaki biyobozunurluklarını kolaylaştırmak, bu nanoparçacıkları fizyolojik ortamda toksik etki göstermeyecek hale getirmek ve bu nanoparçacıkların hormonlar, vitaminler, ilaçlar ve enzimler gibi kompleks yapılı biyomoleküllere bağlanmalarını sağlamak amacıyla, yüzeyleri kimyasal işlemlerle modifiye edilir [7,8]. Bu amaçla, bir polimerle kaplanmış, bir polimerik ya da inorganik matriks içine hapsedilmiş ya da polimerik ya da inorganik bir kabuğun üzerine çöktürülmüş manyetik kompozit parçacıklar hazırlanabilir [8,30].

Son zamanlarda, farklı polimerler (örneğin, agaroz) ile kaplı manyetik parçacıklar moleküler biyoloji ve biyomedikal gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır [31].

## **2.2. Enzimler**

### **2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri**

Canlı organizma içinde olan çoğu tepkimeler, enzim adı verilen makromoleküller tarafından katalizlenir. Enzimlerin kendilerine özgü bazı özellikleri aşağıda verilmiştir.

*Çok yüksek katalitik etkinliğe sahiptir:* Enzimlerin katalitik etkinliği, kimyasal katalizörlerinkinden binlerce kat daha yüksektir.

*Etki alanları dardır:* Enzimlerin optimum etkinlikleri ortam koşullarının (pH, iyon şiddeti, sıcaklık, basınç v.b.) dar sınırları içindedir; bu sınırların dışına çıkıldığında enzim etkinliği hızla düşer.



*Yan ürün meydana gelmez:* Enzim tepkimelerinde yan ürün meydana gelmez, yani substratın tamamı ürüne dönüştürülür; oysa tüm kimyasal tepkimelerde yan ürün meydana gelir.

*Özgüldür (spesifiklik) ve enzim türü çoktur:* Özgüllük, her substrat veya substrat grubunun özel bir enzimi olması demektir. Hücre içinde çok sayıda biyokimyasal tepkime meydana geldiği için buna çok sayıda enzim karşılık gelir. Oysa çok sayıda kimyasal tepkimenin oldukça az kimyasal katalizörü vardır. Bazı enzimler yalnızca bir tepkimeyi, bazıları ise esterlerin hidrolizi gibi yalnızca bir grup tepkimeyi katalizlemektedir. Enzimler genellikle yüksek özgüllüğü nedeniyle biyosensör gelişimi için kullanılır [32].

*Enzim ve substrat moleküllerinin büyüklüğü bellidir:* Enzimler substratlara göre binlerce kat daha büyük moleküllerdir. Birer protein olan enzimlerin molar kütleleri  $10^4$ - $10^6$  g/mol aralığında değişmektedir.

*Aktif merkez ve bağlanma yeri önemlidir:* Enzim çok büyük bir molekül olmakla birlikte aktif merkezi yani asıl tepkimeyi yürüten kısmı oldukça küçük bir bölgedir; bu bölge, substratın aktif grubuna bağlanarak tepkime meydana gelir.

### **2.2.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması**

Enzimler aktif ya da inaktif (etkisiz) durumda olmalarına göre adlandırılır. Enzim inaktif durumda ise substratının sonuna "jen" eki getirilerek adlandırılır. Enzim aktif durumda ise etki ettikleri maddenin sonuna "ase=az" eki getirilerek ve etki ettiği reaksiyonun çeşidine göre adlandırılır. Uluslararası Biyokimya Birliğinin (IUB) düzenlemesine göre enzimlerin katalizlediği kimyasal tepkime tipine ve tepkime metabolizmasına dayanılarak adlandırılması ve sınıflandırılması yapılmaktadır.

IUB sisteminin özellikleri şunlardır:

- 1 - Tepkimeler ve onları katalizleyen enzimler 6 sınıfa bölünürler; bunların her birinin 4-13 alt sınıfı vardır.
- 2 - Enzim adının iki kısmı vardır. İlki substrat veya substrat grubunun adıdır; ikincisi katalize olunan tepkime tipini gösterir.
- 3 - Söz konusu tepkimenin doğasını aydınlatmak için eğer ek bilgi gerekli ise, parantez içinde verilebilir. Bu numaralandırma sistemine göre, her bir enzim, enzim kodu (EC) kısaltmasıyla başlayan ve sırasıyla 4 sayı içeren bir kod numarasına sahiptir.

EC kısaltmasından sonraki ilk numara enzimin katalizlediği tepkimenin türüne göre ait olduğu sınıfı gösterir ve bu düzenlemeye göre enzimler, katalizlediği tepkimenin türüne göre aşağıda verilen 6 sınıfa ayrılmışlardır.

1. *Oksidoredüktazlar*: Oksidasyon-redüksiyon yani yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Oksidoredüktazlar kiral bileşiklerin organik sentez sürecinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve ilaç, zirai ilaç ve gıda endüstrisi için gerekli olan ketonlar, aldehitler ve alkollerini değiştirmek için kullanılmaktadır [33].
2. *Transferazlar*: Hidrojen dışında bir atomun veya atom grubunun bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar.
3. *Hidrolazlar*: Kimyasal tepkimede büyük moleküllerin yıkılması için kimyasal bağa su eklemek yoluyla veya başka bir grubu suya çevirerek kolay kullanılabilir hale getiren enzimlerdir.
4. *Liyazlar*: Su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzimlerdir.
5. *İzomerazlar*: Molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir.
6. *Ligazlar (Sentetazlar)*: Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını sağlayan enzimlerdir.

Her enzimin bir kod numarası (EC) vardır; bu numarada tepkime tipini 1. sayı, vericinin etkilediği grubu 2. sayı, alıcı olarak yararlanılan grubu 3. sayı ve adlandırılan enzimi 4. sayı belirlemektedir [33].

### **2.2.3. Enzim aktivitesine etki eden faktörler**

Enzimler biyolojik sistemlerde çok az miktarlarda bulunurlar. Bu nedenle proteinin miktarından ziyade biyolojik sistemde gösterdiği aktiflik ölçülür [34]. Bir ünite enzim: Standart koşullarda 1 mikromol ( $\mu\text{mol}$ ) substratı ürüne çeviren enzim miktarı olarak kabul edilmektedir.

Enzimler tarafından katalizlenen tepkimelerin hızını etkileyen faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

#### Ortam pH' sı

Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu derişimine bağılı olarak aktiflikleri değışmektedir. Bazı enzimler düşük pH seviyelerinde (asidik ortamda) daha aktif olmakla beraber, bazıları yüksek pH' lı ortamlarda (bazik ortamda) aktiftirler. Fakat çoğunlukla enzim aktifliğı nötral ortamlarda en fazla olmaktadır. Enzimin maksimum aktiflik gösterdiği pH' ya o enzimin optimum pH 'sı adı verilir.

Enzimatik çalışmalarda pH' yı optimumda sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu derişimini elverişli durumda tutmak için tamponlar kullanılır. Optimum pH, kullanılan tamponun cinsine, özel substratın yapısına ve enzimin elde edildiğı kaynağıba bağılıdır.

#### Sıcaklık

Sıcaklık enzimatik tepkimeleri de diğere tepkimelerde olduğı gibi hızlandırır. Her 10 °C sıcaklık artmasına karşılık enzimatik tepkimenin hızı 2 kat kadar

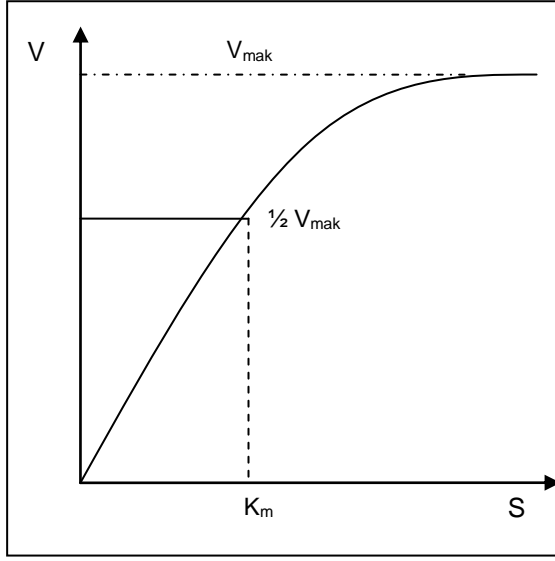
artmaktadır. Ancak enzimler protein yapılı olduklarından belli bir sıcaklığın üzerinde dayanıklılığını yitirerek denatüre olurlar. Enzimin maksimum aktiflik gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilir.

### Enzim derişimi

Enzimatik tepkimenin hızı, enzimin substratına doygun olduğu koşullarda enzim derişimine bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar çok ise tepkime o kadar hızlı yürür. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterince substrat bulunmadığı için tepkime o derece yüksek düzeyde meydana gelmez. Substratın bol olduğu koşullarda enzim derişimi tepkime hızı ile doğru orantılıdır.

### Substrat derişimi

Substrat derişimi, tepkime hızını belli bir süre lineer olarak artırmaktadır. Enzim substratına karşı doygunluğa ulaştığında tepkime hızı değişmeden devam eder (şekil 2.4). Bu durumda enzim maksimum hız ile çalışıyor demektir. Maksimum hız  $V_{mak}$  ile gösterilir. Enzim maksimum hız ile çalışırken enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat derişimine Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) denilmektedir. Enzimin substratına ilgisi ne kadar fazla ise  $K_m$  değeri o kadar küçüktür.



Şekil 2. 4. Enzimatik tepkimenin hızına substrat derişiminin etkisi

### Zamanın etkisi

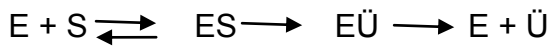
Bir enzimatik tepkimenin hızı belirli bir zamanda üretilen ürünün miktarı ile belirlenmektedir. Bir enzim tarafından katalize edilen tepkime sürerken tepkimenin hızı giderek düşer. Bunun nedeni, tepkime devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir tepkime oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, tepkimeyi önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık % 10' unun sarf edildiği tepkimenin başlangıç aşamasında gerçekleştirilir.

### İnhibitör

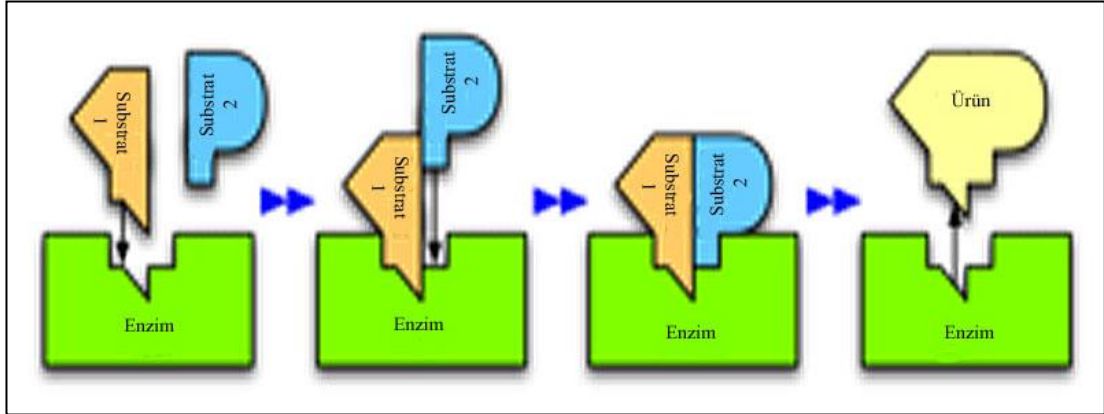
İnhibitörler, enzimatik tepkimelerin hızını azaltan maddelerdir. İnhibitörler, substratın enzimin aktif merkezine bağlanmasını ve böylece enzim-substrat kompleksinin oluşmasını önlerler. Bu maddeler istenmeyen enzim aktivitesinin önlenmesi veya kontrol altında tutulmasında aracı olarak kullanılır [33].

#### 2.2.4. Enzimatik tepkimeler

Enzimin işlevi, hücrelerde gerçekleşen çoğu kimyasal tepkimeyi kolaylaştırmak veya hızlandırmaktır. Moleküllerin birbirleri ile tepkimeye girebilmeleri için dışarıdan enerji almaları gereklidir. Bütün kimyasal tepkimelerde aktivasyon enerjisi olarak bir enerji engelinin aşılması gerekmektedir. Tepkimenin hızını belirleyen en önemli faktör, aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) denilen bu enerji ihtiyacının büyüklüğüdür. Enerji engeli ne kadar yüksek olursa, birim zaman içerisinde bu engeli aşan moleküllerin sayısı da o oranda az olacaktır. Tepkime hızını artırabilmek için sisteme kimyasal veya biyolojik bir katalizör ilave edilebilir. Bu durumda katalizör ile substrat bir kompleks yaparak aktivasyon enerjisini aşağılara çekebilir. Bu kompleksin oluşması ile daha çok substrat aktivasyon enerji engelini aşabilmekte, tepkime hızı artmakta ve birim zamanda oluşan ürün miktarı artmaktadır. Hücresel koşullarda enzimler daha düşük aktivasyon enerjisi gerektiren alternatif yollar oluşturarak tepkimelerin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Enzim substrat etkileşiminde, substrat [S] molekülü, enzimin [E] aktif merkezine bağlanarak “enzim-substrat kompleksi” [ES] olarak adlandırılan kararsız bir bileşik oluşturur. Tepkime “enzim-ürün kompleksi” [EÜ] ne dönüşerek sonuçlanır. Son olarak ürün [Ü], enzimin aktif merkezinden ayrılır. Serbest kalan enzim yeniden kullanılabilir ve bir ürün oluşturmak için başka bir substratla tepkimeye girebilir.



Aktif merkez ile substrat, anahtar ile kilit gibi birbirine uygunluk gösterir. Bu şekil Emil-Fischer' in tarif ettiği “anahtar ve kilit” durumuna uyar (Şekil 2.5). Ancak substrat ile buluştuktan sonra enzim özel yapısını almakta ve substrat aktif bölgeye bağlanmaktadır.



Şekil 2. 5. Enzim ve substrat arasındaki anahtar-kilit uyumu

### 2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimlerin, tepkimeleri çok spesifik ve yüksek hızla katalizlemelerinden faydalanmak amacıyla onları canlı organizma dışında kullanabilmek düşüncesi bilim adamlarını bu konuda çalışmalar yapmaya yönlendirmiştir.

Enzim saflaştırılması özel teknikler gerektirdiğinden maliyeti oldukça yüksektir. Bunun yanı sıra, serbest enzimin aktifliğini kaybetmeden istenildiği anda tepkime ortamından uzaklaştırılması da çok güçtür. Bu durum pahalı olan enzimlerin tekrar tekrar kullanılmasına engel olur. Tepkimenin istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması durumunda ise zaten enzim tarafından kirletilmiş olan tepkime ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürünlerin bu kirlilikten arıtılması için karışık ayırma işlemlerine gerek vardır ki bu da maliyeti bir kat daha artırır. Yukarıda sayılan teknik ve ekonomik problemlerden dolayı serbest enzim yerine tutuklanmış enzim kullanılmasının daha uygun olabileceği düşünülmüş ve bu amaçla tutuklanmış enzim sistemlerinin hazırlanması ve teknolojiye kullanımı son senelerde büyük önem kazanmıştır [35].

İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, "tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış, çözünmez hale getirilmiş" demektir. Enzimlerin ya da mikroorganizmaların fiziksel ve / veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar

tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla bir destek malzemeye tutturulmasıdır [35,36]. Enzimler suda çözünmeyen bir matrikse bağlandıklarında, matriksin içinde tutuklandıklarında veya katalitik etkileri kaybolmadan birbirlerine bağlandıklarında immobilize olurlar. İmmobilizasyon işlemi ile immobilize enzimin optimum pH' sı değişebilir,  $K_m$  değeri etkilenebilir, enzimin optimum sıcaklığında artışlar olabilir, enzimin aktif bölgesi değişikliğe uğrayabilir veya matriks substratın hareketini engelleyebilir [37]. Enzimlerin immobilizasyonu, biyokimyasal tanıma özelliğinden dolayı pratik süreçleri nedeniyle ve analitik uygulamalardaki rahat kullanımı nedeniyle önemlidir.

Enzim moleküllerinin tutuklanma işlemleri aşağıda verildiği gibi olabilir:

1. Enzimin suda çözünmeyen polimere kovalent olarak bağlanması
2. Suda çözünmeyen organik veya inorganik desteklerde adsorpsiyonu
3. Suda çözünmeyen jel matriksler veya yarı geçirgen mikrokapsüller içinde tutulması suretiyle yapılmaktadır. Her durumda enzimin yerleşmesi için suda çözünmeyen bir materyal gereklidir [37].

İmmobilize enzimlerin en önemli avantajları şu şekilde sıralanabilir [37,38]:

1. Tepkime ortamından kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme gibi ) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
2. Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı dayanıklıdır.
3. Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
4. Serbest enzime göre daha kararlıdır.
5. Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
6. Birbirini izleyen çok adımlı tepkimeler için uygundur.
7. Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktiflik gösterebilirler.
8. Kendi kendini parçalama olasılığı azdır.

Enzimin immobilize edilmesinin bazı dezavantajları da vardır. Bunların bazıları aşağıda verilmiştir [39].



- İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir veya kaybolabilir.
- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
- Enzim destek materyalinin maliyeti yüksektir.

### **2.3.1. Enzim immobilizasyonunda destek materyalinin seçimi**

Enzim immobilizasyonunda destek materyalinin seçimi çok önemlidir. Destek materyalinin seçiminde partikül büyüklüğü, toplam yüzey, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve desteğin kimyasal bileşimi kriterleri esas alınır. Bağlanmış enzim miktarı ve enzimin immobilizasyon sonrasındaki aktifliği destek materyalinin yapısına bağlıdır. Genel olarak desteğin hidrofil karakteri ve yüzeyi arttıkça birim destek başına bağlı enzimin miktarı da artar.

Enzim immobilizasyonunda dikkat edilmesi gereken hususlar söz konusudur. Enzim immobilize edilirken, aktif merkezin bu işlemlerden kesinlikle etkilenmemesi gerekir. Aktif merkezde iki bölge vardır. Bunlardan biri katalitik merkez diğeri ise substrat spesifikliğini sağlayan merkezdir. Aktif merkezdeki amino asitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değişirse katalitik aktiflik düşer ve substrat spesifikliği değişir. İmmobilizasyonun sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir. Enzim ile destek arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise, bu bağlanmanın aktif merkez üzerinde gerçekleşmeyeceği destekler seçilmeli veya immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Bu koruma görevi bazen kompetitif inhibitör tarafından sağlanır.

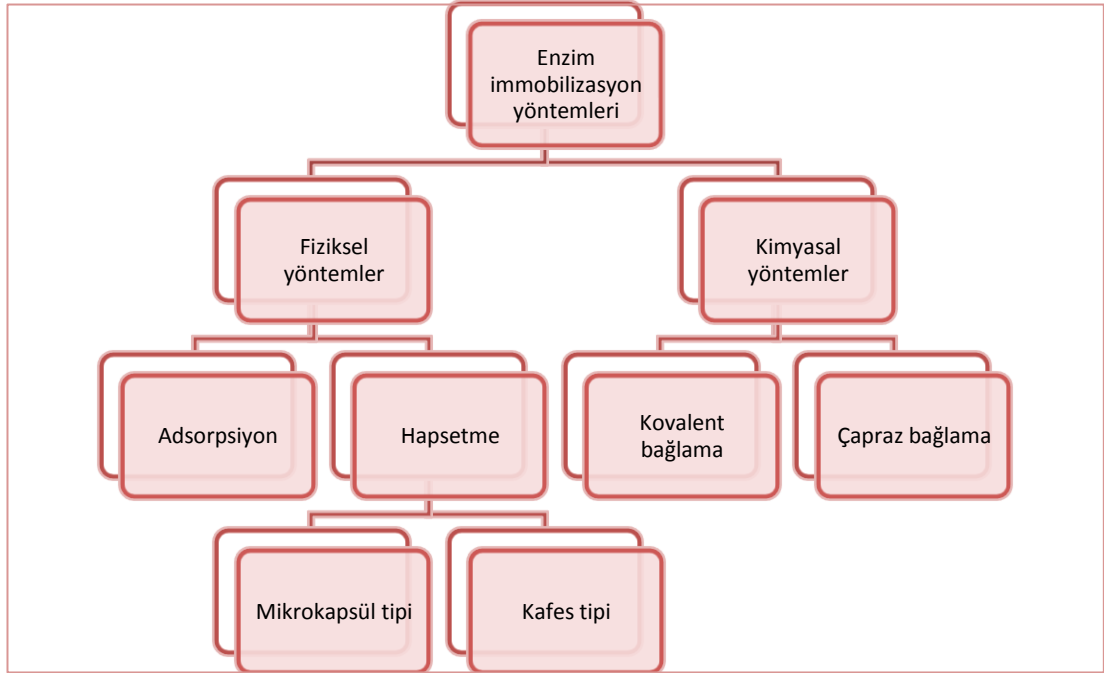
Genelde enzimler cam, silika, polimer ve manyetik parçacıklar gibi sert yüzeylere immobilize edilirler. Ancak enzim immobilizasyonunda en önemli sorun gerekli kimyasal işlemde sonra özgün konformasyonu ve aktifliği korumaktır. Polimerlerin biyouyumluluğu nedeniyle destek olarak kullanılmaları büyük ilgi görmektedir. Hidrojel yapılar, jelatin, kitosan, selüloz ve aljinat gibi doğal polimerler ıslak ve kuru her iki durumda da rahatlıkla

kullanılmaktadır. Destek materyalde olması gereken özellikler aşağıda verilmiştir [38,40]:

- Hidrofil karakter
- Suda çözünmeme
- Gözenekli (poröz) yapı
- Mekanik kararlılık ve uygun partikül formu
- Kimyasal ve termal kararlılık
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik
- Zehirsizlik
- Rejenere olabilme

### **2.3.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri**

İmmobilizasyon işlemi ılıman koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yüksek basınç, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözücüler veya yüksek tuz derişimi ile muamele, enzim yapısında denatürasyona dolayısıyla aktiflik kaybına neden olur [37]. Enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.6' da gösterildiği gibi, fiziksel ve kimyasal yöntemler olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir.



Şekil 2. 6. Enzim immobilizasyon yöntemleri

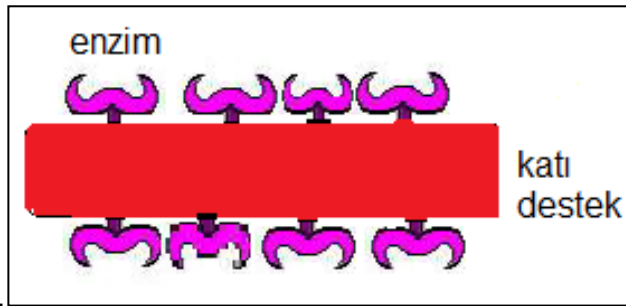
### Fiziksel yöntemler

Fiziksel immobilizasyon yöntemleri, enzimin bir destek materyal üzerinde ya da polimerik bir matriks içerisinde kovalent bağ oluşmadan tutuklanması esasına dayanır.

#### *Adsorpsiyon*

Adsorpsiyon yöntemi en eski ve basit immobilizasyon yöntemidir [41,42]. Adsorpsiyon yöntemi ile enzimin immobilizasyonu katı matriks üzerinde enzimin fiziksel adsorpsiyonuna veya iyonik bağlanmasına dayanır (Şekil 2.7). Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyondan sorumlu kuvvetler hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir [43]. Enzimin suda çözünmeyen materyallerde adsorpsiyonu, pH, çözücü karakteri, iyonik kuvvet, protein ve adsorbanın derişimi, sıcaklık gibi deney koşullarına bağlıdır. Adsorpsiyonla immobilizasyon yöntemi basit olduğu, çeşitli yüklü taşıyıcılar seçilebildiği ve taşıyıcılar farklı fiziksel şekillerde kullanılabildiği için

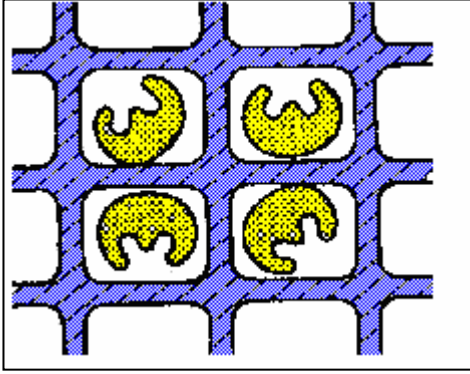
avantajlıdır. Ayrıca bu yöntemde enzim, aktifliğini büyük ölçüde veya tamamıyla korur. Bu yöntem tersinirdir ve bu da destek maddesinin ve enzimin başka amaçlarda tekrar kullanımını sağlar [44]. Çeşitli aktif yüzeyli malzemeler enzim-adsorpsiyon komplekslerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. En çok kullanılanlardan bazıları anyon ve katyon değiştircili reçineler, sentetik polimerler, aktif karbon, silika jel, killer ve seramiklerdir [45]. Yöntemin dezavantajı ise enzim ile destek arasındaki zayıf bağlardan dolayı, adsorplanan enzimin kullanım esnasında taşıyıcıdan uzaklaşabilmesidir.



Şekil 2. 7. Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu

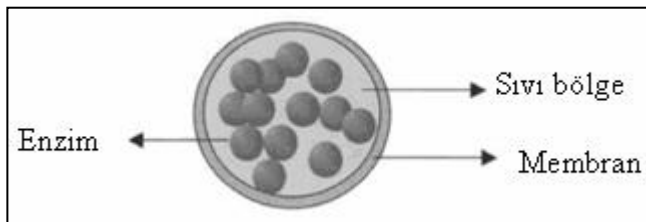
### *Hapsetme*

Prensip olarak immobilizasyon enzim molekülünü belli bir ortamda durmaya zorlamaktır (Şekil 2.8). Enzim bulunduğu çevreden dışarı çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Polimer matrikse hapsetme yönteminde, suda çözünmeyen çapraz bağlı polimerlerin boşlukları içinde enzimin tutulması esasına dayanır. Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisinde tutulur ve jel matriksin dışına çıkamaz, fakat substrat ve ürün bu aę içerisine sürekli olarak girip çıkabilir [46].



Şekil 2. 8. Matrikste hapsetme ile enzim immobilizasyonu

Mikrokapsülleme yönteminde, enzim molekülleri 10-1000  $\mu\text{m}$  çaplı küçük yarı geçirgen membranlara hapsedilir (Şekil 2.9). Yarı geçirgen membran, büyük protein veya enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürün moleküllerinin serbestçe giriş-çıkışına izin verir. Mikrokapsülleme yönteminde herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktivitesi serbest enzim aktivitesine yakındır. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır [47]. Bu oranının büyük olması da mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat tepkimesinin olasılığını artırır. Bu yöntemde mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein derişimine ihtiyaç duyulması ve küçük molekül ağırlıklı substrat ve ürünler gerektirmesi gibi dezavantajlar söz konusudur.



Şekil 2. 9. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu

### Kimyasal yöntemler

Kimyasal immobilizasyon yöntemleri, enzim ile destek materyal arasında kovalent bağ oluşumuna ya da birden fazla enzim molekülünün çapraz bağlayıcı moleküllerle birbirlerine bağlanmasına dayalıdır. Bu yöntemlerin çoğunlukla tersinmez olması nedeniyle, serbest enzimin geri kazanılması mümkün olamamaktadır [35,48]. Bu yöntemlerle immobilize edilen enzimler, çok kararlı olma ve ortam koşullarına dayanıklılık gösterme gibi üstün özelliklere sahip olabilmektedir. Bunun yanı sıra, immobilizasyon sırasında meydana gelen kimyasal tepkimeler, enzimde yapısal değişikliklere neden olarak katalitik etkinliğinde değişmelere yol açabilir. Immobilizasyon veriminin sınırlı olması, destek materyalin ve yöntemin maliyetli olabilmesi ve enzimin desteğe bağlanma tepkimesinin özel şartlar gerektirmesi yöntemin bazı dezavantajları arasındadır [22,48].

#### *Kovalent bağlanma*

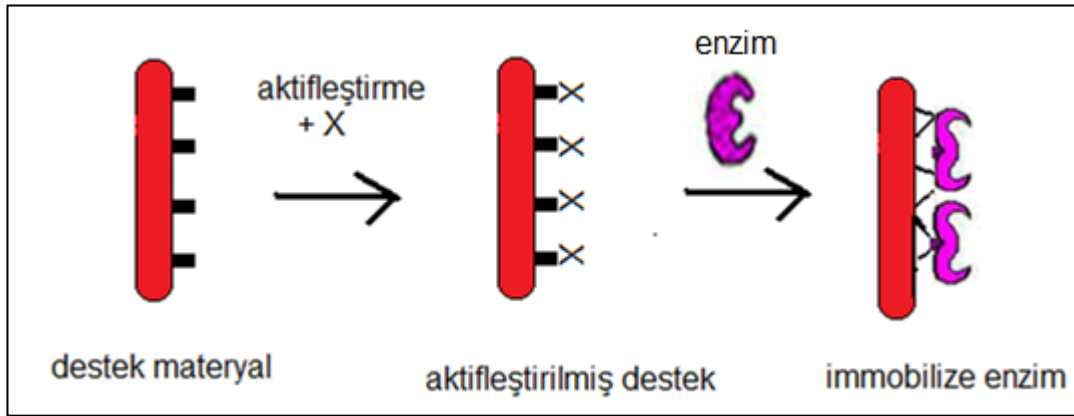
Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Bu teknik enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiye geçmesini engeller [49]. Kovalent bağlanma, genellikle enzimin aminoasit kalıntılarındaki reaktif gruplar ile destek materyaldeki fonksiyonel grupların tepkimesi sonucunda gerçekleşir. Enzim immobilizasyonunda, enzimin özellikleri, aktif ucunun yapısı, pH, sıcaklık ve organik çözücüler gibi faktörlerden dolayı sınırlı sayıda yöntem kullanılabilir [50,51].

Kovalent bağ enzimi tutmada çok etkilidir ve immobilizasyondan sonra enzimin aktifliği, serbest enzimin aktifliğinden farklı olabilir. Bu fark destek materyalin yapısal özelliklerine, enzim-destek materyal arasındaki etkileşimlere, enzimin yapısına ve enzim-substrat arasındaki tepkime şartlarına bağlıdır. Kovalent bağ ile bağlanan enzim immobilizasyonu aşağıdaki avantajları sağlar:

1. Enzimler güçlü bağlarla desteğe bağlı olduğu için kopmaz.

2. İmmobilize edilmiş enzim substrat ile kolayca temas edebilir.
3. Enzim ve destek materyali ile güçlü etkileşim nedeniyle sıcaklık kararlılığında bir artış gözlenir.

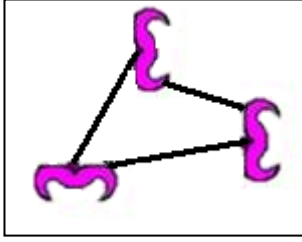
Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak destek maddesinin aktive edilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir (Şekil 2.10). Destek maddesi; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar taşımaktadır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak siyanojen bromür, epiklorhidrin, glutaraldehit, karbodiimit, siyanürik klorür gibi çeşitli aktifleyici maddeler kullanılabilir.



Şekil 2. 10. Kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonu

### Çapraz bağlama

Bu yöntem destek materyal kullanılmadan, enzim moleküllerinin büyük ve üç boyutlu kompleks bir yapı halinde bir araya getirilmesi ile gerçekleşir. Bu yöntemde enzim çok güçlü bağlandığından dolayı desorpsiyon olma ihtimali çok düşüktür. Bu amaçla, glutaraldehit ve toluen diizosiyanat gibi bi- veya multi- fonksiyonel moleküller kullanıldığında enzim moleküllerini birbirine bağlayarak, çapraz bağlı ve suda çözünmeyen enzim kompleksleri oluştururlar (Şekil 2.11) [35].



Şekil 2. 11. Çapraz bağlanma ile enzim immobilizasyonu

#### 2.4. Bu Çalışmada Hazırlanan Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Selüloz Nanoparçacıkları

Bu çalışmada, lakkaz enziminin immobilizasyonunda kullanılmak üzere, yüzeyi selülozla (CC) fonksiyonelleştirilmiş Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıkları hazırlanmıştır. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-selüloz nanoparçacıkları geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), X-ışını kırınımı yöntemi (XRD), termogravimetrik analiz yöntemi (TGA), ζ (Zeta)-potansiyel analizi, elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR) ve titreşimli örnek manyetometrisi (VSM) ile karakterize edilmiş ve 3 farklı yöntemle enzim immobilize edilmiştir. Immobilize lakkazların aktifliğine pH, sıcaklık, substrat derişimi, depolama süresi ve tekrar kullanılabilirliğin etkisi incelenmiştir.

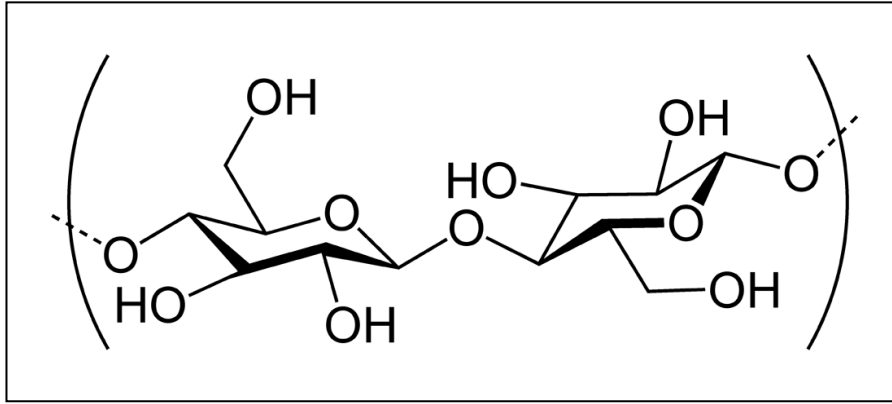
##### 2.4.1. Selüloz

Selüloz, anhidroglikoz birimlerinden (glukoz kalıntısı) oluşan, yüksek mol kütleli bir polimerdir. Bitki ve ağaçların temel yapısını oluşturan selüloz, doğada en bol bulunan önemli bir doğal polimerdir. Pamuktaki selüloz miktarı %94 düzeyindedir. Bazı uygulamalarda doğal polimerlerin kimyasal yapıları değiştirilir ve başka özelliklere sahip polimerler hazırlanabilir. Şekil 2.12' de yapısı verilen selüloz, ana zincirinde bulunan hidroksil grupları nedeniyle suda çözünmesi beklenen bir polimer olmakla birlikte, selüloz zincirleri arasındaki yoğun hidrojen bağları su, diğer çözücü ve çözücü karışımlarının polimer içyapısına girmesine izin vermez ve çözünmeyi engeller. Ancak son yıllarda selülozun çözünmesi için NaOH/üre çözücü karışımları



kullanılmaktadır [52]. Ayrıca selülozdaki hidroksil grupları başka gruplara çevrilerek (hidrojen bağlarının tamamen kaldırılması veya azaltılması) çözülebilir selüloz türevleri elde edilir. Selüloz asetatlar ve selüloz nitratlar, hidroksil gruplarının değişik oranlarda asetillenmesi ve nitrolanması ile elde edilmiş önemli iki selüloz türevi polimerdir. Selülozun türevleri, uygun işlemlerle yeniden selüloz yapısına dönüştürülürse, rejenere grubuna girer. Aynı zamanda selüloz bitkisel liflerin temel bileşenidir ve yarı yapay lif üretiminde kullanılmaktadır [53,54].

Günümüzde selüloz esas olarak bitki kaynaklarından elde edilmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, selüloz üretebilen bakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bakteriyel selüloz daha saf olması, daha yüksek su tutma kapasitesine sahip olması, üretim sırasında meydana gelen değişimlere uygunluğu ile bitkisel selülozdan ayrılmaktadır.



Şekil 2. 12. Selülozun yapısı

## 2.5. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Selüloz Nanoparçacıklarının Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

Bu çalışmada selüloz ile kaplanmış manyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının yapısal, morfolojik, manyetik ve ısıl özellikleri, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), X-ışınları kırınımı yöntemi (XRD), geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), ζ (zeta)-potansiyel analizi, elektron paramanyetik

rezonans spektroskopisi (EPR), titreşimli örnek manyetometrisi (VSM) ve termogravimetrik analiz yöntemi (TGA) ile incelenmiştir. Ayrıca, lakkaz immobilize edilen  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının atomik bileşimi, enerji dispersif X-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS) ile araştırılmıştır. Bu bölümde, her bir karakterizasyon yönteminin temel prensipleri ile ilgili kısa bilgi verilmiştir.

### **2.5.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)**

Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), atomik seviyede görüntü elde etmeye imkan veren ve nanoteknoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılan hassas bir mikroskopik tekniktir. Bu yöntemde yüksek enerjili elektron demeti (100-500 kV), malzemeye gönderilir ve elektronlar malzeme içerisinden geçerek yol alırlar. Malzemedan geçen elektronlar bir mercek sistemini takip ederek malzemenin yapısını gösteren görüntüyü mikroskobun ekranında oluşturur. TEM ile görüntü alabilmek için elektron demetinin mutlaka malzeme içerisinden geçmesi ve bunun için de malzemenin kalınlığının birkaç yüz nanometreyi geçmemesi gereklidir [55].

### **2.5.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)**

FT-IR spektroskopisi, elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinde, örnekteki atom gruplarının ve fonksiyonel grupların kendilerine özgü dalga boylarında absorpsiyon yaparak, bir titreşim veya dönme enerji seviyesinden diğerine geçişleri vasıtasıyla belirlenmelerini sağlayan bir yöntemdir [56].

### **2.5.3. X-ışını kırınımı yöntemi (XRD)**

X-ışını kırınımı yöntemi, her bir kristal maddenin kendine özgü olan X-ışını kırınım modeline göre, kristal yapıların analiz edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Tabiatta bulunan metaller genellikle kristal yapıya sahip oldukları için, kristal örgüleri içerisinde simetrik ve periyodik olarak dizilmiş

elementlerden oluşmuşlardır ve karakteristik bir kırınım desenine sahiptirler. İncelenen örneğin kırınım desenindeki X-ışını kırılma açılarının, literatürde o kristal yapı için verilen kırınım desenlerindeki kırılma açılarıyla karşılaştırılması ve aynı bulunması yoluyla, örneğin kimyasal yapısı belirlenebilir [56-58]. Ayrıca malzemenin parçacık boyutu, Eş. 2.4' de verilen Debye-Schrerer eşitliği kullanılarak, X-ışını kırınım desenindeki pikler yardımıyla hesaplanabilir [59]:

$$d = k\lambda / \beta \cos\theta \quad (2.4)$$

Bu bağıntıda, d, parçacık boyutunu,  $k=0,89$  olan Debye-Schrerer sabitini;  $\lambda$ , Cu K $\alpha$  ışınının dalga boyunu (0,15406 nm);  $\beta$ , radyan cinsinden pik yarı genişliğini ve  $\theta$ , kırılma açısını göstermektedir.

#### **2.5.4. Termogravimetrik analiz (TGA)**

Termogravimetrik analiz yöntemiyle, kontrol edilen bir atmosferde, sıcaklığın programlı olarak artırılması ya da azaltılmasıyla maddenin kütlesinde meydana gelen değişiklik sıcaklığın ya da zamanın fonksiyonu olarak incelenir. Örneğin, sıcaklığa karşı maddenin kütlesinde meydana gelen azalmayı gösteren termogramlardan, maddenin yapısal özellikleri ve içerdiği su miktarı konusunda bilgi edinilebilir [56,60].

#### **2.5.5. $\zeta$ (Zeta)-potansiyel analizleri**

$\zeta$ -potansiyel, kolloidal çözelti içerisindeki katı taneciklerin yüzeyinin ölçülebilen potansiyel değeridir. Sıvı veya çözelti içerisindeki kolloidal tanecikler, yüzey kompozisyonları nedeniyle bir elektriksel yüke sahiptirler. Bu elektriksel yükten dolayı taneciklerin çevrelerinde, bu yüke zıt yüklü iyonlar birikir ve karşıt yüklü iki iyon tabakası "elektriksel çift tabaka" oluşturur. Taneciğin yüzeyindeki iyon tabakası, yüzeye sıkıca tutunmuş halde iken, bunu çevreleyen zıt yüklü iyon tabakası daha gevşek halde

tutulmaktadır. Yüklü tanecik ve etrafını saran iyonlar, “kayma yüzeyi” olarak tanımlanan bir sınıra kadar tek bir parça halinde hareket ederler. Kayma yüzeyindeki potansiyel farkına  $\zeta$ -potansiyel, kayma yüzeyi üzerindeki net yükün 0 olduğu pH değerine izoelektronik nokta (pI) adı verilmektedir.  $\zeta$ -potansiyeli, sistem içindeki katı taneciğe, bu taneciğin dağıtıldığı ortama ve bu ortamın pH' sına bağlıdır [61,62].

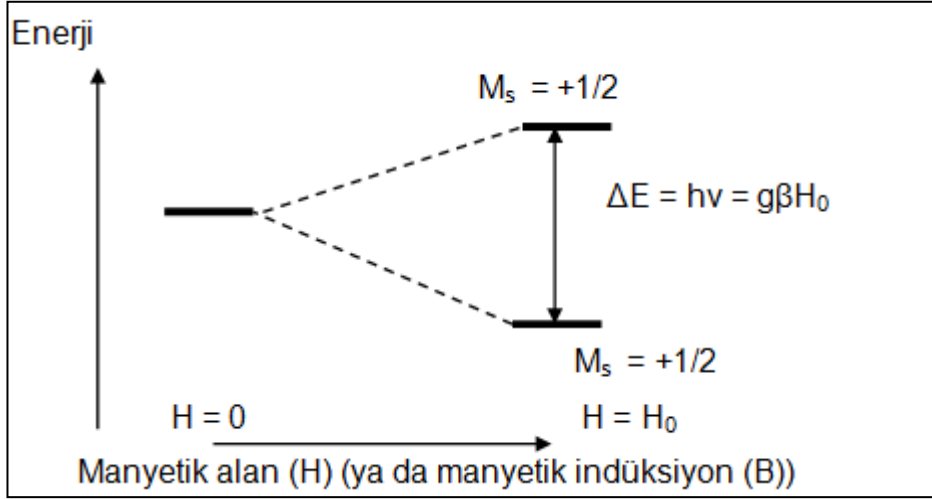
### 2.5.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR)

EPR spektroskopisinin temeli, atomik ya da moleküler orbitallerinde eşleşmemiş en az bir elektron içeren, net manyetik momenti sıfırdan farklı olan bir maddenin, bu manyetik momentlere bağlantılı enerji düzeylerinin manyetik alan altında yaratılması ve bu enerji düzeyleri arasında geçişler oluşturulması esasına dayanır. EPR yönteminde incelenecek atom ya da molekülün paramanyetik özellik göstermesi gerekmektedir. Maddedeki eşleşmemiş elektronlar ile ilgili, bu elektronların lokalize olduğu çekirdek, komşu çekirdek ile etkileşimleri ve eşleşmemiş komşu elektronlar arasındaki etkileşimler EPR spektroskopisi ile belirlenir.

Serbest elektron, bir manyetik alanın etkisinde değilse, rastgele yönelir. Bununla beraber, kuvvetli bir manyetik alan etkisinde, spin ekseninin alabileceği yönelme doğrultuları sınırlıdır. Çünkü spin hareketi yapan bir tanecik, küçük bir mıknatıs gibi davranır ve kuvvetli manyetik alandan etkilenir. Bu alanla etkileşmesi neticesinde alana paralel veya antiparalel olarak yönelirler.

Serbest elektron, kendi eksenini etrafında dönmesinden dolayı bir manyetik momente sahiptir ve spin kuantum sayısı  $1/2$ ' dir. Yapısında eşleşmemiş elektronlar içeren bir maddeye dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında, bu manyetik alan, maddenin elektronlarının enerji seviyelerinde  $\Delta E$  ile temsil edilen büyüklükte bir fark meydana getirir [60]. Şekil 2.13' te uygulanan

manyetik alanın, elektronların enerji seviyelerinde meydana getirdiği değişme gösterilmiştir.



Şekil 2. 13. Uygulanan manyetik alanın elektronların enerji seviyesinde meydana getirdiği değişme

Elektronun bulunacağı bu iki enerji seviyesi arasındaki fark,

$$\Delta E = g\beta H \quad (2.5)$$

bağıntısı ile verilmektedir. Bu eşitlikte  $g$ , her maddeye özgü bir değer olan “spektroskopik yarıлма çarpanı” ve  $\beta$ , elektronun yükünü ve kütesini içeren evrensel bir büyüklük olan ve değeri  $9,273 \times 10^{-24}$  J/T olan “Bohr magnetonu”  $\mu_B$ ;  $H$ , ise manyetik alanı göstermektedir. Elektronlar bir de,  $\Delta E$  enerji farkına eşit olacak şekilde bir mikrodalga enerjisi ile etkileştiğinde, mikrodalga enerjisini Eş. 2.5’ te verilen enerjiye sahip bir ışıma ile soğurur.

$$\Delta E = hv \quad (2.6)$$

Bu bağıntıda  $h$ , Planck sabitini ( $6,63 \times 10^{-34}$  Js) ve  $v$ , mikrodalga frekansını gösterir. Bu ışımanın enerjisi, manyetik alan etkisi altındaki elektronun bulunabileceği iki enerji seviyesi arasındaki farka eşit olduğunda, elektronun

spin hareketleri manyetik alanla rezonansa gelir ve rezonans koşulu Eş. 2.7 ile sağlanmaktadır.

$$\Delta E = hv = g\beta H_0 \quad (2.7)$$

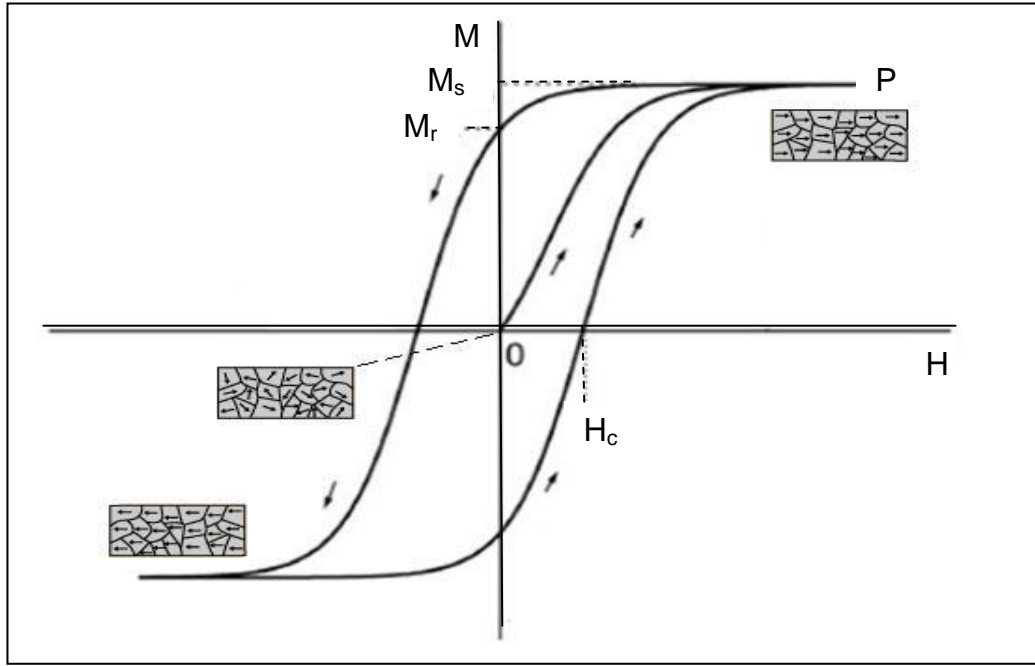
Bu eşitlikteki  $H_0$ , rezonans koşulunun sağlandığı manyetik alanı gösterir ve “rezonans alan” olarak tanımlanır. EPR analizlerinde elde edilen spektrumlar, mikrodalga frekansı sabit tutulup, manyetik alan değiştirilerek; manyetik alana karşı mikrodalga enerjisini soğurma eğrisinin birinci türevi olarak çizilir.

### 2.5.7. Titreşimli örnek manyetometrisi (VSM)

1955 yılında ilk kez Foner tarafından geliştirilen titreşimli örnek manyetometresi (VSM), bir malzemenin mıknatıslanmasının ölçülmesini ve doyum mıknatıslanmasının belirlenebilmesini sağlayan bir cihazdır [24]. VSM ile ölçüm yapılırken, mıknatıslanması ölçülmek istenen örnek, bir ucunda titreştirici bulunan uzun bir çubuğun diğer ucuna yerleştirilir. Örneğin titreşimi nedeniyle meydana gelen manyetik alan, cihazın bobinlerinin sarımlarında bir elektromanyetik kuvvet meydana getirir. Bu sırada, çubuğun üst ucunun olduğu taraftaki sarımlar, referans uzayın titreşiminden meydana gelen elektromanyetik kuvveti de kayıt eder. Örnekten gelen ve referanstan gelen elektromanyetik kuvvet arasındaki potansiyel fark, örneğin manyetik momenti ile ilişkili bir değerdir [58]. Aşağıda ferromanyetik bir malzemenin manyetik alana karşı mıknatıslanmasının değişimini gösteren VSM eğrileri ve bu eğrilerin karakteristik özelliklerine ilişkin bilgi verilmiştir.

#### Ferromanyetik malzemelerin ve manyetik nanoparçacıkların manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrileri

Ferromanyetik bir malzemenin dışarıdan uygulanan manyetik alana karşı mıknatıslanmasını gösteren tipik bir eğri Şekil 2.14’ te gösterilmiştir.

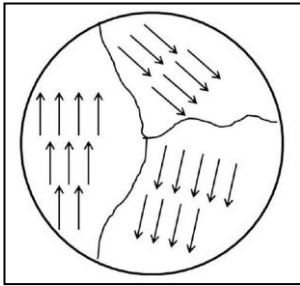


Şekil 2. 14. Ferromanyetik bir malzemenin manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi [7]

Ferromanyetik bir malzemeye sıfırdan başlayarak dışarıdan manyetik alan uygulandığında, OP eğrisi boyunca, manyetik alan ( $H$ ) arttıkça mıknatıslanma ( $M$ ) artış gösterir ve manyetik alan belirli bir değere ulaştıktan sonra, maddenin tüm manyetik momentleri manyetik alanla aynı doğrultuda yönlendiği için maddenin mıknatıslanması,  $M_s$  ile gösterilen doygunluk değerine ulaşır. Mıknatıslanma,  $M_s$  değerine ulaştığında, uygulanan manyetik alan şiddeti azaltılmaya başlanırsa, malzemenin mıknatıslanması yavaş yavaş azalmaya başlar. Fakat, mıknatıslanma eğrisi aynı rotayı (OP eğrisini) takip etmez ve manyetik alan sıfıra düşürülse bile, malzemenin mıknatıslanması sıfıra inemez, yani madde mıknatıslanmayı hafızasında tutar. Bu davranışa “manyetik histerisis” denilmektedir [24,58]. Eğri üzerinde “ $M_r$ ” ile gösterilen noktadaki mıknatıslanma “remenans” ya da “kalıcı mıknatıslanma” olarak tanımlanır ve  $M_r$  değeri, malzemenin manyetik alan sıfırken sahip olduğu mıknatıslanmayı gösterir. Malzemenin manyetik alan sıfır iken, sıfır mıknatıslanmaya sahip olacak duruma geri döndürülebilmesi için, eğri üzerinde “ $H_c$ ” ile gösterilen ve “koersivite” ya da “zorlayıcı alan”

olarak tanımlanan manyetik alan değeri kadar ters yönde bir manyetik alan uygulanması gereklidir [24,58].

Manyetik histerisisin nedeni, ferromanyetik malzemenin pek çok manyetik bölgeden (magnetic domain) meydana gelmesi temeline dayanır. Manyetik bölgeler, çok sayıda spinleri aynı yönlü atomik manyetik momentin (yaklaşık  $10^{15}$ ) bir araya gelmesiyle oluşmuş ve birbirinden “bölge duvarı” denilen sınırlarla ayrılmış kısımlar olarak tanımlanabilir [23,57]. Şekil 2.15’ te birden çok manyetik bölgeden oluşan bir malzemenin yapısı ve manyetik momentlerin durumu gösterilmiştir.

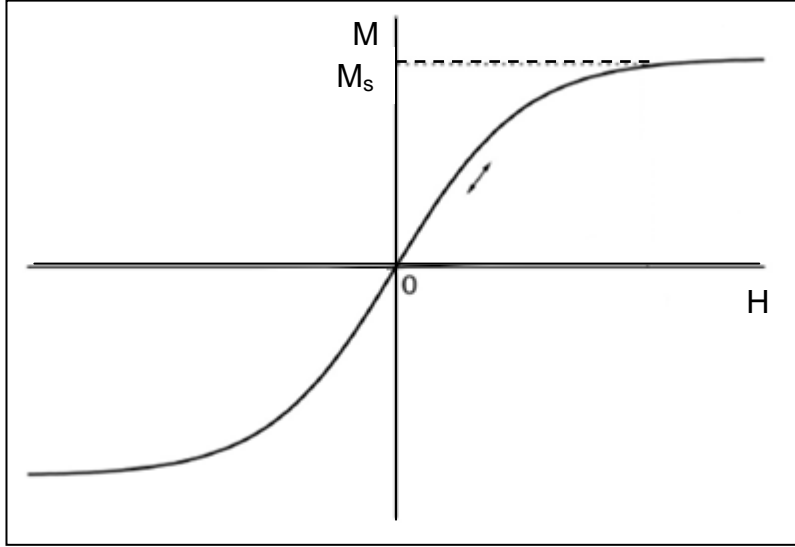


Şekil 2. 15. Birden çok manyetik bölgeden oluşan malzemenin yapısı ve atomik manyetik momentlerin durumu [63]

Malzeme yığın halde iken, manyetik bölgeler yüzeysel olarak birbirini etkiledikleri için, ferromanyetik malzemelerin mıknatıslanması çabucak eski haline dönemez. Malzeme boyutlarının yığın halden nanoboyuta inmesiyle, malzeme yüksek bir yüzey/hacim oranına sahip olur ve buna bağlı olarak yüzey atomlarının kesrinin yığın haldeki duruma göre artması ile parçacıklar arası etkileşimler, yapıda yeni fiziksel özelliklerin ortaya çıkmasını sağlar [58]. Parçacık boyutunun nanoboyuta inmesiyle, aynı değişimler manyetik özellikler için de meydana gelir ve parçacıkların boyutu birkaç 10 nm’ nin altına düştüğünde, ferromanyetik maddeler sadece tek manyetik bölge içeren hale dönüşür ve malzemedeki “süperparamanyetizma” olarak tanımlanan üstün bir manyetik özellik ortaya çıkar. Süperparamanyetik nanoparçacıklar, tek bir manyetik bölge içeren halde oldukları ve kendi aralarında manyetik



etkileşimler bulunmadığı için durgunluk mıknatıslanması ( $M_r$ ) göstermezler. Buna bağlı olarak da koersivite ( $H_c$ ) sıfırdır [7,64]. Şekil 2.16' da süperparamanyetik malzemenin mıknatıslanmasının manyetik alana değişimi gösterilmiştir.



Şekil 2. 16. Süperparamanyetik nanoparçacıkların mıknatıslanmasının uygulanan manyetik alanla değişimi [7]

Süperparamanyetik nanoparçacıkların mıknatıslanması paramanyetik maddelerde olduğu gibi  $T_c$  altındaki sıcaklıklarda manyetik alan arttıkça lineer olarak artar fakat  $M_s$  değerine ulaşıldığında mıknatıslanma sabit kalır [7].

### 2.5.8. Enerji dispersif X-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskopisi (SEM/EDS)

Enerji dispersif X-ışını analizi (EDS), taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile bağlantılı olan bir X-ışını dedektörü vasıtasıyla, örneğin atomik kompozisyonunun belirlenmesini sağlayan spektroskopik bir tekniktir. SEM ile bir elektron demeti örnek yüzeyini boydan boya tarar, elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli etkileşimler sonucunda çeşitli sinyaller meydana gelir ve bu özel sinyallerle örneğin ana bileşeni ve görüntüsü tespit edilir. Elektron demeti malzemeye çarptığı zaman, bir takım elektronlar ve

ışınlar (radyasyon) yayılır. Bunlar, X-ışını, katot ışınması, Auger elektronları, birincil ve ikincil geri saçılan elektronlardır. Bunlardan X-ışını, incelenen maddenin atomlarının iç kabuk elektronlarının geçişleri sonucunda oluşan ve her yöne doğru hareket eden ışınlardır ve atomların cinsleri hakkında bilgi verirler [55].

## 2.6. Lakkaz Enzimi

Lakkaz (benzen diol: oksijen oksidoredüktaz, E.C.1.10.3.2.) enzimi, her molekülü dört bakır iyonu taşıyan bir oksidoredüktazdır. Lakkaz redoks enzimlerinin bir alt sınıfıdır. Karbohidraz ve proteazlar gibi hidrolitik enzimlerinin substrat özgünlüğünün aksine redoks enzimlerinin substrat özgünlüğü oldukça azdır [65].

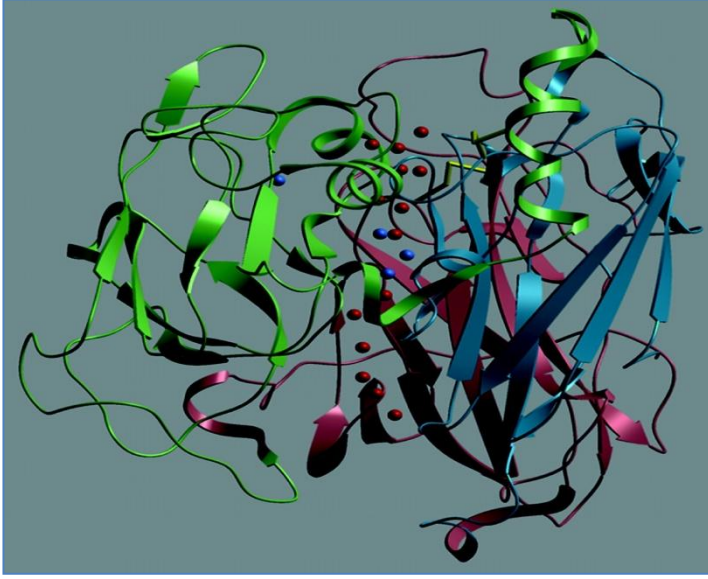
Lakkazlar ilk olarak 1883' te Japon lake ağacı *Rhus vernicifera*' dan izole edilmiş olup molekül kütleleri 45 ile 110 kDa arasında değişmektedir [66,67]. Lakkaz enzimleri bakteriler, böcekler, yüksek yapıllı bitkiler ve mantarlar olmak üzere 4 canlı grubundan üretilmektedir [68]. Lakkaz kaynağı olan mantarlara, *Trametes versicolor*, *Rhus vernicifera*, *Trametes hirsuta*, *Panus tigrinus*, *Flavodon flavus*, *Agaricus bisporus* örnek olarak verilebilir. Bunlardan beyaz çürükçül mantarlar daha çok kullanılmaktadır. Resim 2.2' de beyaz çürükçül mantarlardan biri olan *Trametes versicolor* görülmektedir.



Resim 2. 2. Lakkaz üreten *Trametes versicolor* mantarı

Son yıllarda lakkaz enzimleri tarafından oksitlenen substratların listesi oldukça artmıştır: metokis- veya amino-monofenoller ve aromatik diaminler, ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenziltiazolin-6-sulfonik asit)], 1-naftol, hidroksiindoller ve şiringaldazin gibi fenolik olmayan bileşikler, lakkazlar için substrat olarak kullanılmaktadırlar [69].

Lakkaz enzimlerinin moleküler yapısı genellikle funguslardan izole edilen enzimlerden elde edilmiştir. Fungal lakkazlar, multimerik kompleksler oluşturacak şekilde oligomerize olan izoenzimlerden meydana gelmektedirler. Lakkaz enzimlerinin önemli bir özelliği ise protein kısmına kovalent olarak bağlanmış olan ve proteinin toplam kütesinin %10-45' ini oluşturan bir karbonhidrat kısmının da bulunmasıdır. Karbonhidrat kısım enzimin yüksek kararlılık göstermesine katkıda bulunmaktadır [70].



Resim 2. 3. *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz molekülü

*Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz molekülü Resim 2.3' te görülmektedir ve lakkazın aktif merkezinde 4 mavi kürecik halinde temsil edilen 4 bakır iyonu bulunmaktadır. Lakkaz enzimlerinde bulunan bakır iyonları spektroskopik özelliklerine bağlı olarak üç ana sınıfta gruplandırılırlar. Lakkaz proteinlerinde bulunan bakır iyonlarından bir tanesi Tip1 veya “mavi bölge” olarak adlandırılan bölgeye bağlı iken, Tip2 ve Tip3 olarak adlandırılan bölgelerin oluşturduğu trinuklear kümeye bağlı olarak ise 3 bakır iyonu daha bulunmaktadır [71].

Lakkaz enzimi, Tip1 bakır (mavi bakır) aracılığı ile her defasında 1 elektron transferiyle dört-basamakta substrat moleküllerini oksitler. Lakkaz molekülünün yeniden oksidasyonu (yükseltgenmesi) ise diamanyetik Tip3 bakır çifti tarafından iki basamaklı olarak dört elektronun, moleküler oksijene ( $O_2$ ) transferi ile sağlanır. Şekil 2.17' de lakkazın indirgenme yükseltgenme mekanizması gösterilmiştir.

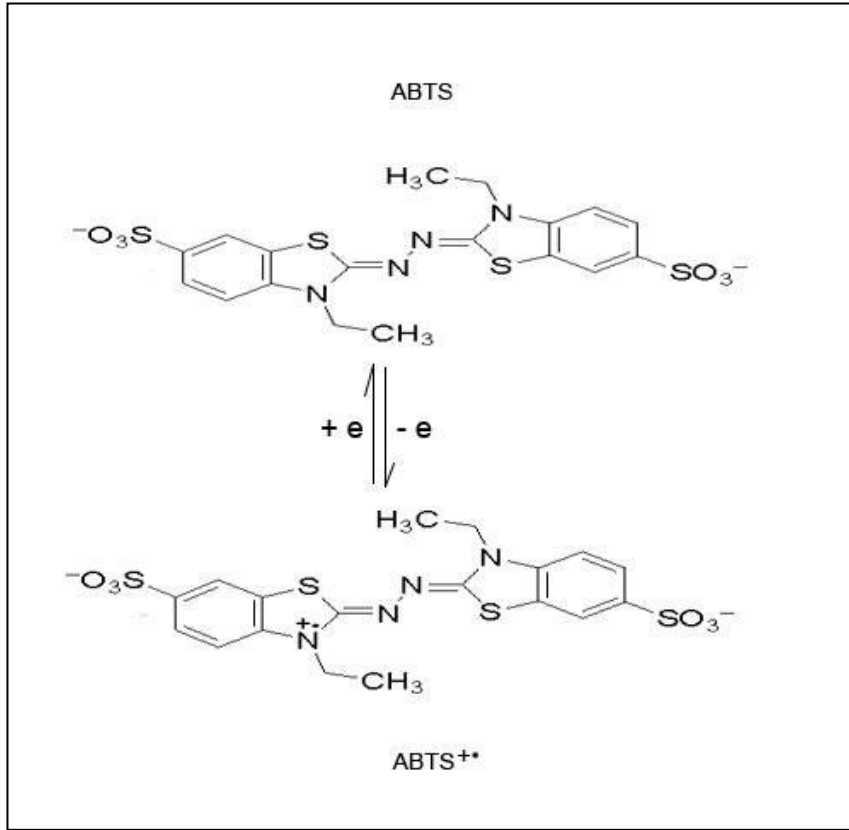


Şekil 2. 17. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması

Lakkaz enzimleri, oksidatif enzimlerin bir grubu olup, son yıllarda, büyük oranda parçalanmayan çevresel kirliliklerin yanı sıra hem fenolik hem de fenolik olmayan lignin esaslı bileşenleri yükseltgeyebilme yetenekleri nedeniyle oldukça ilgi çekmekte ve bu avantajları sayesinde pek çok biyoteknolojik işlem uygulamasında kullanılabilmektedirler. Bu uygulamaların başlıcaları kağıt, meşrubatların stabilizasyonunun sağlanması, zeytinyağı endüstrisi atıklarının bozundurulması, selüloz, tekstil ve petrokimya sanayilerinin neden olduğu atıkların detoksifikasyonu, nanobiyoteknoloji, medikal teşhisler ve topraktaki herbisit, pestisit ve bazı maddelerin temizlenmesidir. Tekstil sanayisindeki uygulamaları açısından bakıldığında ise, en eski ve en yaygın uygulama tekstil atık sularındaki boyarmaddelerin renklerinin giderilmesidir [72-75].

## 2.7. ABTS substratı

ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit)) substratı, lakkaz aktifliğinin hızlıca tayin edilmesine imkan vermesinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. ABTS, fosfat ve fosfat-sitrat tamponu gibi çözeltilerde hazırlandığında renksiz bir çözelti oluşturur. Bu renksiz çözeltiliye lakkazla müdahale edildiğinde, ABTS lakkaz tarafından yükseltgenerek mavi-yeşil renkli ABTS kation radikali (ABTS<sup>•+</sup>) dönüştürülür (Şekil 2.18). Literatürde, ABTS<sup>•+</sup>'nin maksimum absorban dalga boyu için 405-420 nm arasında değişim gösteren değerler verilmektedir [76].



Şekil 2. 18. ABTS ve ABTS<sup>+•</sup>

## 2.8. Polimerik Manyetik Mikroküre, Nanoparçacıklar ve Enzim İmmobilizasyonuna İlişkin Literatürde Yer Alan Çalışmalar

Shinkai ve arkadaşları 1991 yılında 3-aminopropiltrietoksisilan ile aktifleştirdikleri Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile β-glukosidoz, α-amilaz, alkoldehidrojenaz, glukoz oksidaz, termolizin ve BSA immobilize etmişlerdir. Enzim immobilize edilmiş manyetik nanoparçacıkların boyutlarının 4-70 nm arasında değiştiğini ve manyetik nanoparçacıkların 1 gramına, bu enzim ve proteinlerin 70-200 mg arasında değişen miktarlarda immobilize olduğunu belirlemişlerdir [77].

Tanyolaç ve arkadaşları 2000 yılında modifiye edilmiş çözücü buharlaştırma metodu ile boyutları 125-250 µm arasında olan manyetik nitroselüloz mikroküreler sentezlemişlerdir. VSM analizi ile bu mikrokürelerdeki doyum

mıknatıslanmasının artan manyetit miktarı ile arttığını belirtmişlerdir. Daha sonra bu mikrokürelerin hidroksil gruplarını glutaraldehitte aktifleştirmiş ve glukoamilaz enzimini immobilize etmişlerdir. 1 gram manyetik mikroküre başına 17 mg glukoamilazın immobilize olduğunu belirlemişlerdir [11].

Guo ve arkadaşları 2003 yılında oleik asitle stabilize edilmiş  $Fe_3O_4$  çekirdekleri kullanarak, vinil asetat ve divinil benzenin kopolimerleşmesi ile hazırladıkları manyetik poli(vinil asetat-ko-divinil benzen) mikrokürelerine *Candida cylindracea*' dan elde edilen lipaz enzimini immobilize etmişler ve immobilize lipazın serbest lipaza göre sıcaklık değişimlerine karşı daha dayanıklı olduğunu ve 6 kullanım sonunda başlangıç aktifliğinin %74' ünü koruduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca manyetik mikroküreler, manyetik ayırma ile 3 dakika içinde ortamdan ayrılabilmiş ve bu ayırmanın çökeltme ile ayırmaya göre 300 kat daha hızlı gerçekleştiği bildirmişlerdir [78].

Liu ve arkadaşları 2005 yılında modifiye edilmiş süspansiyon polimerleşmesi ile hazırladıkları boyutları 8  $\mu m$ ' den küçük süperparamanyetik poli(metakrilat-divinil benzen) mikrokürelerine *Candida cylindracea*' dan elde edilen lipaz enzimini kovalent bağlanma ile immobilize etmişler ve 1 gram manyetik mikroküre başına 34 mg lipaz immobilize olduğunu ve immobilize lipazın manyetik ayırma ile 20 saniye içerisinde ortamdan ayrılabilmediğini belirlemişlerdir [13].

Zhu ve arkadaşları 2007 yılında *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz enzimini boyutları 2  $\mu m$  olan manyetik mezogözenekli silika küreciklerine adsorpsiyonla ve bu kürecikleri 3-aminopropiltrioksosilan ve glutaraldehitte aktifleştirerek kovalent bağlama yöntemleri ile immobilize etmişlerdir. Kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkazın, adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaza göre pH ve sıcaklık değişimlerine karşı başlangıç aktifliğini daha fazla koruduğunu bildirmişlerdir [79].

Zhou ve arkadaşları 2008 yılında rejenere selüloz filmleri kullanarak,  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  çözeltilerinden yüksek oranda  $Fe_3O_4$  içeren selüloz nanokompozit

filmleri sentezlemiş, özelliklerini XRD, SEM, TEM ve VSM analizleri ile incelemişlerdir. İçerdiği manyetit miktarına bağlı olarak manyetit %12' den %39' a çıkarken boyutun 32 nm' den 64 nm' ye arttığını bildirmişlerdir. Manyetik selüloz nanokompozit filmlerin süperparamanyetik özellik göstermekte olduğunu ve içerdiği manyetite bağlı olarak yaklaşık 4,2-21,2 emu/g doyum mıknatıslanması gösterdiğini belirtmişlerdir [80].

Yong ve arkadaşları 2008 yılında vinil-trietoksisilikanla fonksiyonel hale getirdikleri boyutları yaklaşık 20 nm olan  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarının yüzeyinde glisidil metakrilatı ve metakriloksietil trimetil amonyum klorürü poli(GMA-MATAC) polimerleştirmişlerdir. VSM analizi ile  $Fe_3O_4$  nanoparçacıkları ve poli(GMA-MATAC) için doyum mıknatıslanmalarını sırasıyla 58,9 emu/g ve 27,3 emu/g olarak bulmuşlar ve süperparamanyetik özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Hazırladıkları manyetik polimerik nanoparçacıklara lipaz enzimini adsorpsiyon ve kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. Kovalent bağlanma ile elde edilen immobilize lipazın optimum sıcaklığının serbest lipaza göre 5°C daha arttığını ve immobilize lipazın 5 kez kullanımından sonra başlangıç aktifliğinin %70' ini koruduğunu bildirmişlerdir [81].

Luo ve Zhang 2009 yılında Fe (II) ve Fe (III) iyonlarının çözeltilerinden bazik ortamda  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarını çöktürerek, bunları asidik ortamda yükseltgeyerek  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  nanoparçacıklarını sentezlemişlerdir.  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  nanoparçacıkları, selüloz ve aktif karbonla tepkimeye sokulmuş ve manyetik karbonla aktiflenmiş selüloz küreleri (MCB-AC) elde etmişlerdir.  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  içeren selüloz kürelerin manyetik alan uygulandığında manyetik tepki gösterdiğini belirtmişlerdir. XRD analizi ile  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  nanoparçacık boyutunu 10,2 nm civarında bulmuş ve sonuçların TEM analizi ile uyduğunu bildirmişlerdir. Dijital fotoğraflardan (MCB-AC) boyutlarının 2,2 mm olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, organik boyalar olan metil oranj ve metilen mavisinin renginin giderilmesinde kullanmışlar, adsorpsiyon kinetiğini



incelemiş hız bağıntısının yalancı ikinci derece modeline uyduğunu bildirmişlerdir [29].

Small ve Johnston 2009 yılında *Pinus radiata* kaynaklı ağartılmış Kraft liflerini manyetik nanoparçacıklarla kaplayarak manyetik selüloz liflerini hazırlamış ve liflerin doğal özelliklerinin (örneğin çekme dayanımı ve esnekliği) korunduğunu ve kaplama ile manyetik özellik kazandırıldığını belirtmişlerdir. Ardışık yıkama ve sonikleme sonrasında  $Fe_3O_4$  parçacıkların lif yüzeyine yapıştığını ve liflerin kağıt yaprağı haline geldiğini bildirmişlerdir.  $Fe_3O_4$  kaplı selüloz lifleri, SEM, EDS, XRF (X-ışınları floresans spektroskopisi), XRD, XPS (X-ışınları fotoelektron spektroskopisi) gibi yöntemlerle karakterize edilmiştir. SEM ile lif yüzeylerinin tamamen  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarıyla kaplandığını göstermişler ve EDS ile bunu teyit etmişlerdir. XRD analizleri ile nanoparçacıkların ortalama tanecik boyutunun Debye-Scherrer eşitliği ile 12-26 nm olduğunu hesaplamışlar, VSM ile  $Fe_3O_4$  kaplı selüloz liflerinin doyum mıknatıslanmasını 65 emu/g bulmuşlardır [82].

Namdeo ve Bajpai 2009 yılında Fe(II) ve Fe(III)'ü belirli oranda asidik ortamda çözdükten sonra 40°C ve pH 10,4 şartları altındaki çözeltiye damla damla NaOH çözeltisi ilave ederek manyetik nanoparçacıkları sentezlemişlerdir. Bu manyetik nanoparçacıkları NaOH/üre içinde çözünmüş selüloz çözeltisine ekledikten sonra, karışıma amonyum sülfat ilave ederek farklı yüzdelerde selüloz (%16 ve % 28) içeren selüloz kaplı manyetik nanoparçacıkları (CCM) elde etmişler, TEM analizi ile tanecik boyutunun 2,5-22,5 nm olduğunu, TGA analizi ile 30-600 °C aralığında saf selüloz ve CCM için kütle kaybının sırasıyla %48 ve %38 olduğunu, XRD analizi ile CCM nanoparçacıklarının spinel yapısının  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarına benzer olduğunu belirtmişlerdir. Daha sonra selüloz kaplı manyetik nanoparçacıkları yükseltgeyerek kovalent bağlanma yöntemiyle  $\alpha$ -amilaz enzimini immobilize etmişler ve nişastanın bozunmasını incelemişlerdir. Bozunma kinetiğinin Michaelis Menten bağıntısıyla uyumlu olduğunu,  $K_m$  ve  $V_{mak}$  değerlerinin

sırasıyla  $7,5 \times 10^{-7}$   $\mu\text{mol/mL}$  ve  $0,04 \times 10^{-6}$   $\mu\text{mol/g}$  olduğunu rapor etmişlerdir [52].

Wu ve arkadaşları 2009 yılında sodyum tripolifosfatla çapraz bağlayarak  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -kitosan nanoparçacıklarını sentezlemişlerdir.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -kitosan nanoparçacıklarının TEM görüntüleriyle boyutlarını sırasıyla 10-20 nm aralığında ve 50-80 nm aralığında, VSM analizi ile doyum mıknatıslanmasını 53,03 emu/g ve 28,18 emu/g olarak bulmuşlardır.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -kitosan nanoparçacıklarına lipaz enzimini adsorpsiyon yöntemiyle immobilize etmişler ve immobilize lipazın 5 kullanım sonunda başlangıç aktifliğinin %88' ini koruduğunu bildirmişlerdir [19].

Rotkova ve arkadaşları 2009 yılında boyutları 125-250  $\mu\text{m}$  arasında olan selüloz kaplı manyetik mikrokürelere kovalent bağlanma ile *Pycnoporus cinnabarinus* (*P.c.*) ve *Trametes versicolor* (*T.v.*)' dan elde edilen lakkaz enzimini yönlenmiş ve yönlenmemiş olmak üzere iki şekilde immobilize etmişler ve lakkaz enzimi aktifliğini iki farklı substrat (şiringaldezin (SGZ) ve 2,2'-Azino-bis (3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)) kullanarak tayin etmişlerdir. *T.v.* ve *P.c.* kaynaklı lakkazlar için deneysel  $K_m$  ve  $V_{\text{mak}}$  değerlerini sırasıyla 0,0337 mM; 0,0508 mM ve  $1,98 \times 10^{-4}$  mM/s;  $7,47 \times 10^{-5}$  mM/s olarak hesaplamışlardır. Farklı substratlar için gözlenen optimum pH değerlerinin farklı olduğu *T.v.* ve *P.c.* kaynaklı lakkaz için SGZ ve ABTS substratları kullanıldığında optimum pH değerinin sırasıyla 5,0-5,5 ve 3,5-4,0 olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *T.v.* kaynaklı lakkazın azo boyaların renginin giderilmesi üzerine farklı pH etkisini incelemişlerdir [83].

Liao ve arkadaşları 2010 yılında  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ /polivinil alkol (PVA) manyetik nanoparçacıklarına mikroemülsiyon sistemi altında donma-erime döngü sürecine göre selülazı immobilize etmişler ve TEM analizi ile  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  nanoparçacıklarının 10 nm ve küresel olduğunu, FTIR analizi ile selülazın protein zinciri üzerindeki karbonil grubunun PVA zincirindeki hidroksil grubu ile etkileştiğini ve zeta potansiyel ölçümlerine göre  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ /polivinil alkol (PVA)

manyetik nanoparçacıklarının boyutunu 270 nm olduğunu bulmuşlardır. İmmobilize selülazın dört kullanım sonunda spesifik aktifliğinin 40%' ını koruduğunu rapor etmişlerdir [84] .

Correa ve arkadaşları 2010 yılında toplam demir derişimi 0,04 ve 0,8 mol/L olan demir (II) ve demir (III) çözeltilerini amonyak ile karıştırarak 25 ve 70 C° de altı farklı süperparamanyetik manyetit nanoparçacıkları oluşturmuş, viskozdan elde ettikleri rejenere selüloza manyetitlerin gömülü olduğu manyetik selüloz kürelerini sentezlemişlerdir. Elde edilen bu küreleri XRD, FTIR, SEM ve TEM ile karakterize etmişlerdir. X-ışını kırınım deseni ile daha yüksek demir derişiminde Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacık boyutunun arttığını bildirmişlerdir. Oda sıcaklığında manyetit nanoparçacıkların yarıçapının iyon derişimi ile bağlantılı olduğunu molaritenin 0,04' ten 0,8 mol/L' ye artmasıyla parçacık boyutunun 6,5' tan 12,5 nm' ye arttığını rapor etmişlerdir. Manyetit gömülü selüloz kürelerinin manyetit kadar iyi süperparamanyetik özellik gösterdiğini belirtmişlerdir [2].

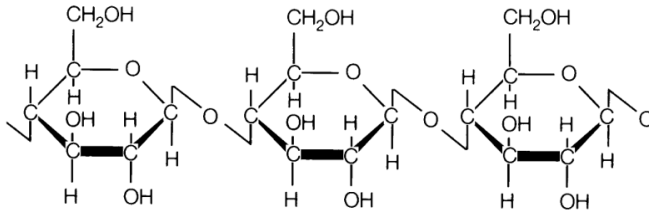
Nkansah ve arkadaşları 2011 yılında rejenere selüloz ve poli(laktit-ko-glikolit) (PLGA)' nın biyobozunabilir süperparamanyetik mikroparçacık ve nanoparçacıklarını, yağ-su emülsiyon tekniği ile monodispers nanokristal manyetitleri PLGA ve selüloz nanoparçacık ve mikroparçacıkları kullanılarak sentezlemişlerdir. Süperparamanyetik çekirdeğin doyum mıknatıslanmasını 72,1 emu/g, manyetik selülozunkini 34 emu/g olarak bulmuşlardır. Sentezlenen manyetik parçacıkların pürüzsüz bir yüzey morfolojisine ve yüksek manyetit içeriğine (%43-%69) sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Sentezlenen PLGA manyetik nanoparçacığı, PLGA manyetik mikroparçacığı ve manyetik selüloz nanoparçacıklarının tanecik boyutlarını TEM görüntüleri yardımıyla sırasıyla 105,3 nm, 2,1 µm, 413,5 nm olarak rapor etmişlerdir. Sentezlenen bu parçacıkları manyetik hücre etiketleme yöntemi ile biyolojik uygulamalarda kullanmışlardır [85].

Katepetch ve Rujiravanit 2011 yılında farklı  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  derişimlerindeki çözeltilerine bakteriyel selüloz yapraklarını daldırarak çökelme metoduyla oksijensiz kapalı bir sistemde manyetik duyarlı bakteriyel selüloz yapraklarını sentezlemişlerdir. Oksijensiz ortamda sentezlenen  $Fe_3O_4$ ' ün manyetit yapısında olduğunu belirtmişlerdir. Bakteriyel selüloz yaprağı içinde manyetik nanoparçacık oluşumunu SEM analizi ile incelemişlerdir. Manyetik nanoparçacıkların ortalama boyutunun TEM analizi ile sentez sırasında 0,1 M ve 0,01 M demir iyon çözeltisi kullanılmasına göre sırasıyla 38,9 nm ve 19,6 nm olarak tespit etmişlerdir. Bakteriyel selüloz yaprakların kesit alanı boyunca manyetik nanoparçacıkların homojen dağıldığını SEM ve TEM görüntüleri ile kanıtlamışlardır. Manyetik parçacık boyutu ve parçacık boyut dağılımının demir iyon çözeltisinin derişimleri değiştirilerek ayarlanabileceğini belirtmişlerdir. VSM analizi ile manyetik nanoparçacık içeren bakteriyel selüloz yaprakları için doyum mıknatıslanmalarının 0,1 M ve 0,01 M demir iyon çözeltisinin kullanılmasına göre sırasıyla 300 K' de 26,20 emu/g ile 1,92 emu/g, 100 K' de 28,10 emu/g ile 2,96 emu/g olarak değiştüğünü belirtmişlerdir. [86].

### 3. DENEYSEL KISIM

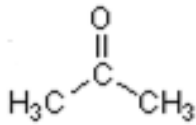
#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

*α-Selüloz*: Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.



*Asetik asit*: (CH<sub>3</sub>COOH, MA: 60,05 g/mol) Sigma (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

*Aseton*: (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, MA: 58,08 g/mol) Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.



*Bradford reaktif*, *BSA çözeltisi* (0,5 mg/mL) ve *NaCl çözeltisi* (0,15 M) Amresco (Ohio, ABD) firmasından temin edilmiştir.

*Demir (II,III) oksit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nano tozu*: (50 nm'den küçük boyutta (TEM)) Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

*Etil alkol (Mutlak)*: (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, MA: 46,06 g/mol) Riedel-de Haen (Seelze, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

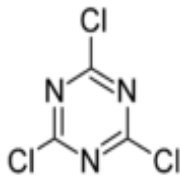
*Fosforik asit:* ( $H_3PO_4$ , MA: 98,0 g/mol) Riedel-de Haen (Seelze, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

*Lakkaz Enzimi:* (E.C. 1.10.3.2. 22,4 U/mg, *Trametes Versicolor*' dan elde edilen): Fluka (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

*Mineral yağı:* (ağır, 25°C'deki yoğunluğu 0,862 g/L) Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

*Sitrik asit monohidrat:* ( $C_6H_8O_7$ , MA: 192,13 g/mol) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

*Siyanürük klorür:* ( $C_3Cl_3N_3$ , MA: 184,41 g/mol) Merck (Schuchardt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.



*Sodyum hidrojen fosfat heptahidrat:* ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ , MA: 268,07 g/mol) Riedel de Häen (Seelze, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

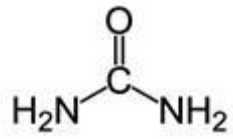
*Sodyum hidroksit:* (NaOH, MA: 40,00 g/mol) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

*Sodyum meta periyodat:* ( $NaIO_4$ , MA: 213,89 g/mol) Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

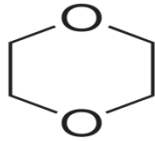
*Sülfürik asit:* ( $H_2SO_4$ , MA: 98,08 g/mol) Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

*Tween 80*: Across Organics (New Jersey, ABD) firmasından temin edilmiştir.

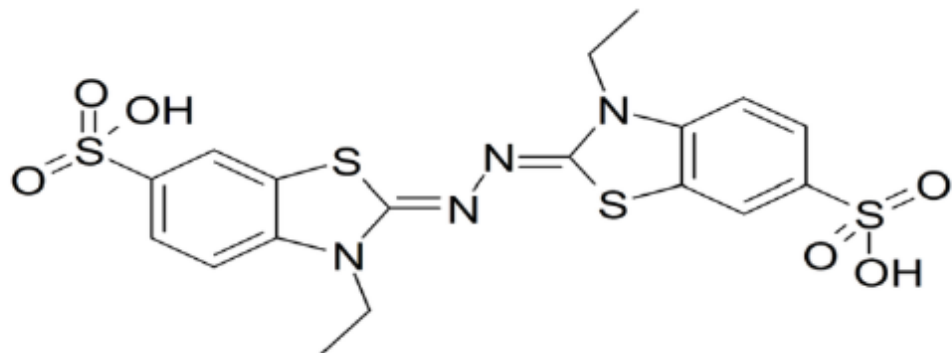
*Üre*: ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ , MA: 60,06 g/mol) Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.



*1,4-Dioksan*: ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ , MA: 88,11 g/mol) Carlo Erba (Rodano, İtalya) firmasından temin edilmiştir.



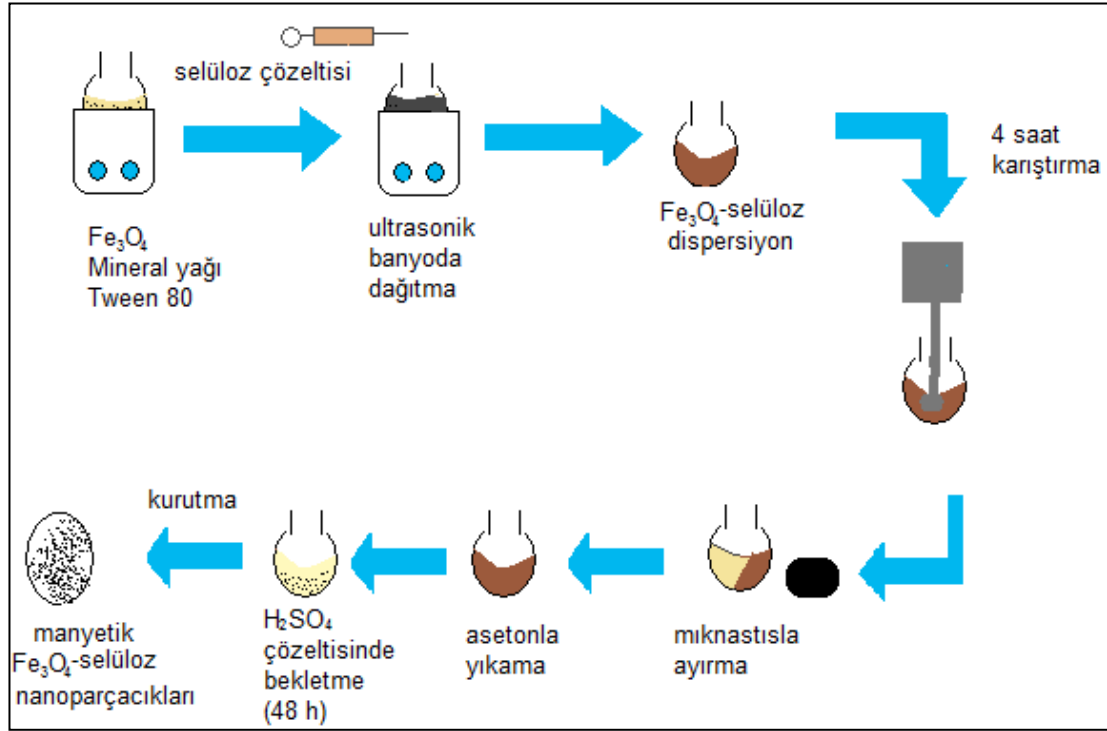
*2,2'-Azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit) diammonyum tuzu (ABTS)*: ( $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 2\text{H}_3\text{N}$ , MA: 548,68 g/mol) Sigma (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.



### 3.2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Selüloz Nanoparçacıklarının Sentezi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-selüloz (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC) nanoparçacıkları, ters-faz süspansiyon metodu ile Kalkan ve arkadaşları tarafından önerilen yöntemle göre sentezlenmiştir [87]. Bu amaçla, 200 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıkları etanolle yıkanarak vakum etüvünde kurutulduktan sonra, 50,0 mL mineral yağı ve 0,5 mL Tween 80 karışımına eklenmiş ve ultrasonik banyoda (Bandelin Sonorex RK 100 H (Berlin, Almanya)) dağıtılmıştır. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> dispersiyonu üzerine, 15,0 mL selüloz çözeltisi (%2,5 w/v) damlalar halinde ilave edilerek, sistem ultrasonik banyoda tutulmaya devam edilmiştir. Elde edilen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-selüloz dispersiyonu mekanik karıştırıcı (Heidolph RZR 2021 (Schwabach, Almanya)) ile 1900 rpm' de 4 saat karıştırılmıştır. Bu süre sonunda, elde edilen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıkları neodyum mıknatısla toplanarak, yağ fazının tamamen uzaklaştırılması amacıyla asetonla defalarca yıkanmış, kaplanmayan Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>'lerin uzaklaştırılması için 48 saat 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisinde bekletilmiştir [88], 3 defa saf su ile yıkanmıştır. Sonra vakum etüvünde (Nüve EV 018 (Akyurt, Türkiye)) 24 saat süresince kurutulmuş ve lakkaz immobilizasyonunda kullanılmıştır. Şekil 3.1' de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının sentez basamakları şematik olarak gösterilmiştir.





Şekil 3. 1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının sentezi

### 3.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Selüloz Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

#### 3.3.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıkları etanolle karıştırılarak ultrasonik banyoda dağıtılmış ve elde edilen dispersiyon karbon kaplı gridlere damlatılmıştır. Gridler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, örneğin TEM görüntüleri, geçirimli elektron mikroskobu (Technai™ G2 F30 (Hillsboro, ABD)) ile 100 kV' da alınmıştır.

#### 3.3.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Spektrumu alınacak örnekler (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, selüloz, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC ve yükseltgenmiş manyetik selüloz (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y)); KBr içerisinde, örnek/KBr: 1/150 w/w olacak şekilde dağıtılmış ve her bir örneğin FT-IR spektrumları, FT-IR

spektrofotometresi (Perkin Elmer PE 1600 (Massachusetts, ABD)) ile 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında alınmıştır.

### 3.3.3. X-ışını kırınımı yöntemi (XRD)

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CC nanoparçacıklarının X-ışını kırınım deseni, Cu  $K\alpha$  ışını ( $\lambda = 0,15406$  nm) ile,  $2\theta = 10^\circ - 90^\circ$  arasında ve  $4^\circ/\text{dakika}$  tarama hızı ile X-ışını kırınım cihazı (Rigaku Ultima-IV (Tokyo, Japonya)) ile alınmıştır.

### 3.3.4. Termogravimetrik analiz (TGA)

Selüloz ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CC nanoparçacıklarının termogramları, TGA cihazı (Perkin Elmer Pyris 1 TGA (Massachusetts, ABD)) ile  $25-900^\circ\text{C}$  aralığında ve  $\text{N}_2$  ortamında,  $10^\circ\text{C}/\text{dakika}$  ısıtma hızı ile alınmıştır.

### 3.3.5. $\zeta$ (Zeta)-potansiyel ölçümleri

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CC nanoparçacıklarının %2,5' lik (w/v) sulu dispersiyonlarının  $\zeta$  potansiyelleri, pH 2,0-9,5 aralığında, ortamın pH' sı  $1 \times 10^{-2}$  M HCl ya da NaOH ile ayarlanarak ve parçacık boyut dağılımı pH 5,0' te  $\zeta$  -potansiyel ölçüm cihazı (Malvern Nano ZS90 (Worcestershire, İngiltere)) ile oda sıcaklığında ölçülmüştür.

### 3.3.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR)

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CC nanoparçacıklarının EPR spektrumları, manyetik nanoparçacıklar 4 mm çapındaki kuvarz EPR analiz tüplerine eşit miktarda (~40 mg) alındıktan sonra, elektron paramanyetik rezonans spektrometresi (Bruker ELEXSYS E 580 FT-EPR (Rheinsteffen, Almanya)) ile oda sıcaklığında, sürekli dalga modunda, standart X-band kavitesinde, 9,85 GHz frekansta; 100 kHz manyetik alan modülasyon frekansı, 99 mW mikrodalga ışınlaması ve 1 G genlik modülasyonu uygulaması altında alınmıştır.

Analizler, tek tarama sayısında 1024 noktadan veri toplanarak gerçekleştirilmiştir. Manyetik alan DPPH (difenil pikril hidrazil,  $g = 2,0036$ ) standardı kullanılarak kalibre edilmiştir. Örneğin EPR spektrumu, nanoparçacıkların mikrodalga enerjisini absorpsiyonunun birinci türevinin manyetik indüksiyonun (B) bir fonksiyonu olarak çizdirilmesiyle elde edilmiştir.

### 3.3.7. Titreşimli örnek manyetometrisi (VSM)

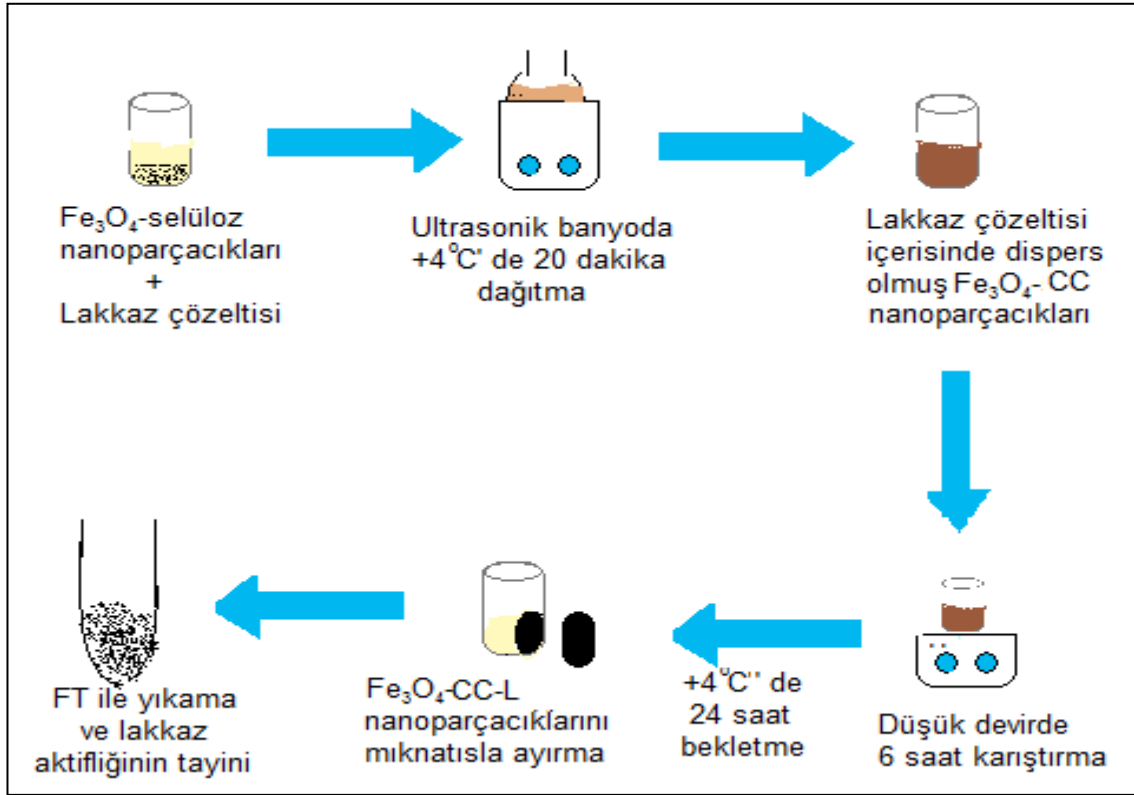
$Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının -4000 Oe ile +4000 Oe arasında ve -22000 Oe ile +22000 Oe arasında uygulanan manyetik alandaki mıknatıslanmaları, titreşimli örnek manyetometresi (ADE Magnetics Model EV9 VSM (Westwood, ABD)) ile oda sıcaklığında ölçülmüştür.

## 3.4. $Fe_3O_4$ -Selüloz Nanoparçacıklarına Lakkaz İmmobilizasyonu

### 3.4.1. $Fe_3O_4$ -selüloz nanoparçacıklarına adsorpsiyonla lakkaz immobilizasyonu

50 mg  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıkları üzerine 2,0 mL fosfat tamponu (FT) (0,04 M, pH = 6,0) eklenerek, sistem 30 dakika ultrasonik banyoda dağıtılmıştır. Karışım, manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm' de 6 saat karıştırılmış ve 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda, dispersiyon ortamındaki  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıkları mıknatısla toplanmış ve 2,0 mL lakkaz çözeltisi (1,0 mg/mL, pH = 6,0) eklenerek, sistem su-buz içeren ultrasonik banyoda 20 dakika dağıtılmıştır. Bu işlem sonrasında, karışım manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001 (Schwabach, Almanya)) ile 4°C' de düşük devirde 6 saat karıştırılmış ve yine aynı sıcaklıkta 24 saat bekletilmiştir. Son işlem olarak,  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz ( $Fe_3O_4$ -CC-L), mıknatısla toplanmış ve FT (0,04 M, pH = 6,0) ile 4-5 kez yıkanmış, 4°C' de buzdolabında saklanmıştır.  $Fe_3O_4$ -CC-L üzerindeki lakkaz çözeltisi ve yıkama suyu birleştirilmiş ve immobilize edilen enzim miktarının tayininde

kullanılmıştır.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarına lakkaz immobilizasyonu sırasındaki işlem basamakları Şekil 3.2' de gösterilmiştir.



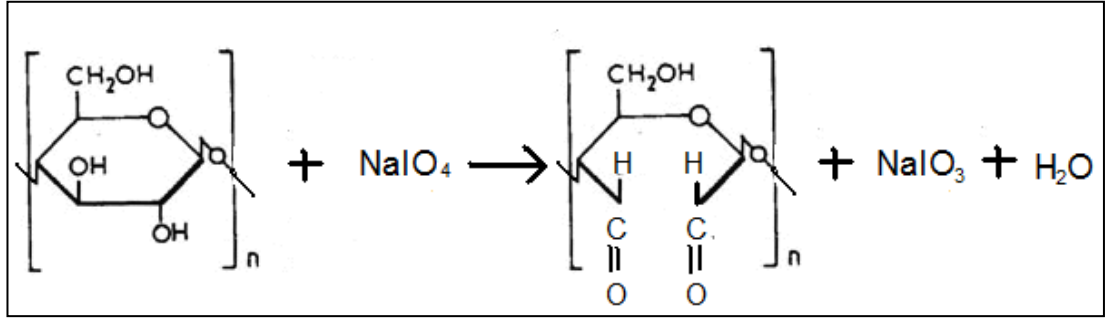
Şekil 3. 2.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarına lakkaz immobilizasyonu sırasındaki işlem basamakları

### 3.4.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-selüloz}$ nanoparçacıklarının yükseltgenmesi ve kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu

#### $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$ nanoparçacıklarının yükseltgenmesi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarındaki selülozun sodyum meta periyodat ile yükseltgenmesi Şekil 3.3' te verilmiştir. Bu amaçla 520 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıkları 10 mL su ve 800 mg  $\text{NaIO}_4$  eklenmiş ve 0,1 M NaOH ile pH değeri 4'e ayarlanmıştır. Sistem mekanik karıştırıcı ile düşük devirde (200 rpm)  $50^\circ\text{C}$  sıcaklıkta 5 saat karıştırılmıştır. Yükseltgenmiş  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıkları ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-Y}$ ), mıknatısla toplanarak saf su ile yıkanmış ve

40° de 24 saat vakum etüvünde (Nüve EV 018 (Akyurt, Türkiye)) kurutulmuştur [52].



Şekil 3. 3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının yükseltgenmesi

### Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu

50 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y nanoparçacıkları üzerine 2,0 mL lakkaz çözeltisi (1,0 mg/mL, pH = 6,0) eklenerek, sistem ultrasonik banyoda 20 dakika dağıtılmıştır. Karışım, manyetik karıştırıcı ile düşük devirde ve 4°C' de 6 saat karıştırılmış ve yine aynı sıcaklıkta 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L), mıknatısla toplanarak FT (0,04 M, pH = 6,0) ile 4-5 defa yıkanmıştır. Immobilize enzim 4°C' de buzdolabında saklanmıştır.

### **3.4.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-selüloz nanoparçacıklarının siyanürik klorürle aktifleştirilmesi ve kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu**

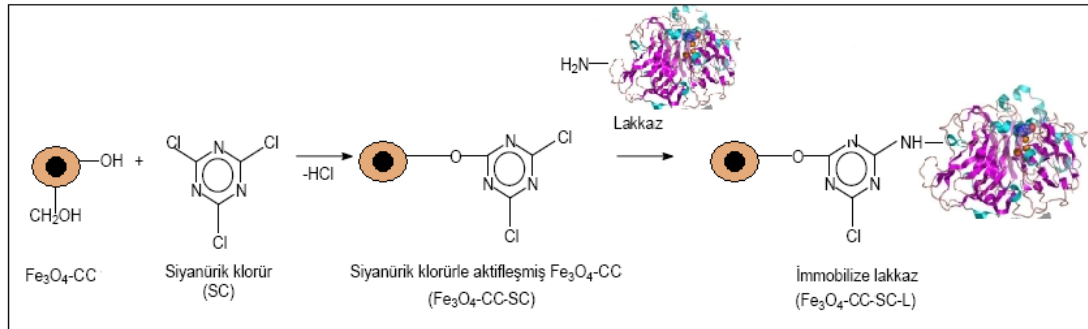
#### Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının siyanürik klorürle aktifleştirilmesi

50 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına 2,5 mL siyanürik klorür (SC) çözeltisi (%0,5 w/v) eklenerek, sistem ultrasonik banyoda 30 dakika dağıtılmış ve manyetik karıştırıcı ile düşük devirde ve oda sıcaklığında 6 saat karıştırılmıştır. Sistem 24 saat bekletildikten sonra, siyanürik klorürle

aktifleştirilmiş  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıkları ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-SC}$ ), mıknatısla toplanarak 3 kez 2,0 mL aseton ve 3 kez 2,0 mL FT (0,04 M, pH = 6,0) ile yıkanmıştır.

### $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-SC}$ nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-SC}$  nanoparçacıkları üzerine 2,0 mL lakkaz çözeltisi (1,0 mg/mL, pH = 6,0) eklenerek, sistem ultrasonik banyoda 20 dakika dağıtılmıştır. Karışım, manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm' de ve  $4^\circ\text{C}$ ' de 6 saat karıştırılmış ve yine aynı sıcaklıkta 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda, siyanürik klorürle aktifleştirilmiş  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-SC-L}$ ), mıknatısla toplanarak FT (0,04 M, pH = 6,0) ile 4-5 defa yıkanmıştır. Immobilize enzim  $4^\circ\text{C}$ ' de buzdolabında saklanmıştır.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının siyanürik klorürle aktifleştirilmesi ve lakkaz immobilizasyonu Şekil 3.4' te gösterilmiştir.



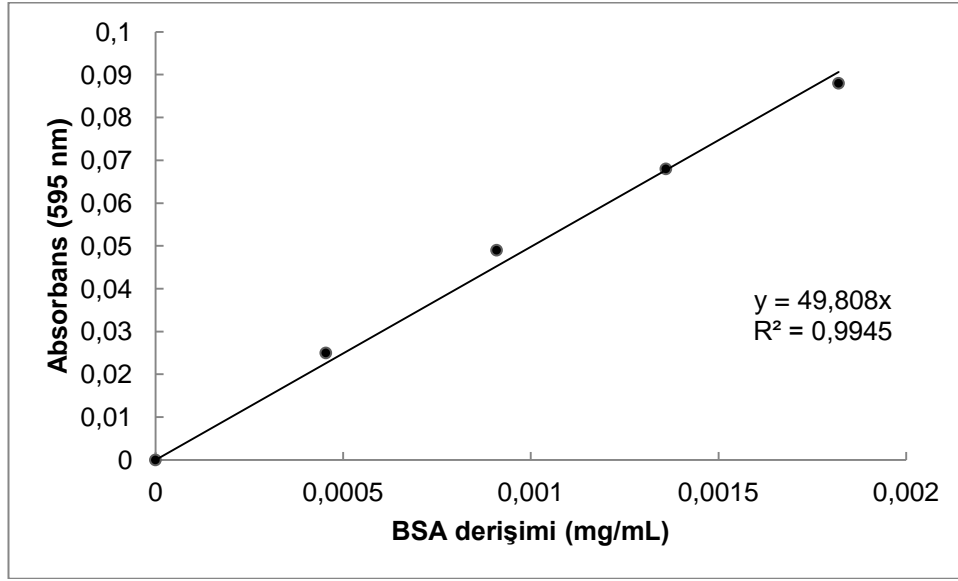
Şekil 3. 4.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının siyanürik klorürle aktifleştirilmesi ve lakkaz immobilizasyonu

#### **3.4.4. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-selüloz nanoparçacıklarına immobilize edilen enzimlerin enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS) ile tayini**

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına, adsorpsiyon ve kovalent bağlama yöntemleri ile sentezlenen immobilize enzimler (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L) oda sıcaklığında kurutulduktan sonra atomik bileşimini yüzde olarak gösteren SEM/EDS spektrumları enerji dispersif X-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (Quanta 400F Field Emission SEM (Eindhoven, Hollanda)) ile elde edilmiştir.

#### **3.4.5. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-selüloz nanoparçacıklarına immobilize edilen enzim miktarının Bradford metodu ile tayini**

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L immobilize enzim sistemlerine tutuklanan lakkaz miktarı, Bradford metoduna göre tayin edilmiştir [89]. Önce BSA (Sığır Serum Albümin) kalibrasyon eğrisi hazırlamak amacıyla, mikroküvetlere 1, 2, 3 ve 4 µL BSA çözeltisi (0,5 mg/mL) alınmış ve üzerlerine sırasıyla 99, 98, 97 ve 96 µL NaCl çözeltisi (0,15 M) eklenerek, hacimleri 100 µL' ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilere 1000 µL Bradford reaktifi eklendikten 2 dakika sonra, çözeltilerin absorpsiyonu UV-vis spektrofotometresi (Hitachi U-1800, (Tokyo, Japonya)) ile 595 nm' de okunmuştur. BSA derişimine karşı absorpsiyon değerleri grafiğe geçirilerek, kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve Şekil 3.5' te gösterilmiştir.



Şekil 3. 5. BSA kalibrasyon grafiği

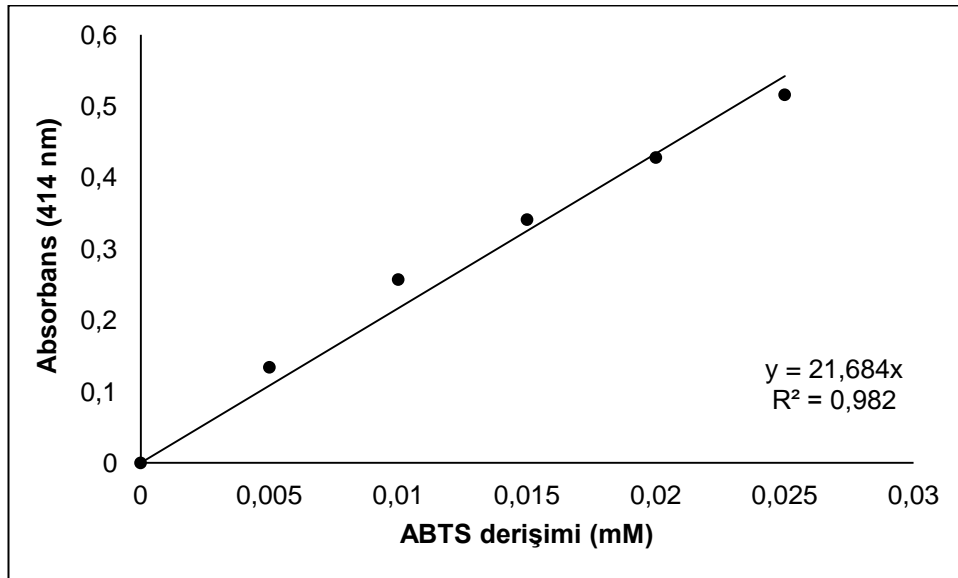
İmmobilize edilen lakkaz miktarlarının tayini için, lakkaz immobilizasyonunda kullanılan lakkaz süzüntüleri ve yıkama suları birleştirilerek hacimleri 10 mL' ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden 100 µL alınarak, üzerine 100 µL NaCl (0,15 M) ve 1000 µL Bradford reaktifi eklendikten 2 dakika sonra, çözeltilerin absorbansı 595 nm' de okunmuş ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz miktarları BSA kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır.

### 3.5. İmmobilize Lakkazların Aktiflik Tayini

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına adsorpsiyonla, yükseltgeyerek kovalent bağlanma ve siyanürik klorürle aktifleştirilerek kovalent bağlanma yöntemleri ile immobilize edilen lakkazlardan (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L) 50 şer mg santrifüj tüpüne alınarak, 25°C' de 5 dakika bekletilmiş ve üzerlerine 9,0 mL FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat, pH = 5,0) eklenerek, tüp çalkalayıcısında 1 dakika karıştırılmış ve tampon çözelti ortamında termal dengeye getirilmiştir. Bu süre sonunda tampon çözelti uzaklaştırılmıştır.



İmmobilize lakkaz aktivliğinin tayini için, her bir örnek üzerine 9,0 mL FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat, pH = 5,0) ve 1,0 mL ABTS çözeltisi (0,25 mM) eklenerek tepkime başlatılmıştır. 1 dakika süresince tüp çalkalayıcısında karıştırıldıktan sonra, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L immobilize sistemleri mıknatısla toplanarak ayrılmış ve oluşan yeşil renkli çözeltinin absorbanı UV-vis spektrofotometresi ile 414 nm' de ölçülmüştür. Farklı ABTS derişimlerine karşılık gelen absorban değerleri grafiğe geçirilerek elde edilen ABTS kalibrasyon eğrisi Şekil 3.6' da gösterilmiştir.



Şekil 3. 6 ABTS kalibrasyon grafiği

Tepkime hızı yani aktiflik; ölçülen absorban değerleri ve ABTS kalibrasyon eğrisinin eğiminin tersi ( $\Delta C/\Delta A_{414}$ ) kullanılarak; Eş. 3.1' e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Tepkime hızı (V)} = \Delta C/\Delta t = (\Delta A_{414}/\Delta t) \times (\Delta C/(\Delta A_{414})) \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte  $\Delta C$ , ABTS derişimindeki değışimi (mM);  $\Delta A_{414}$ , absorbanstaki değışmeyi ve  $\Delta t$ , süreyi göstermektedir. 1 ünite lakkaz, 25°C ve pH 5,0' te, 1 dakika içerisinde, 1  $\mu\text{mol}$  ABTS' yi ABTS<sup>•+</sup> ne oksitleyen enzim miktarıdır.

Bütün aktiflik tayinlerinde, üç kez gerçekleştirilen deney sonuçlarının ortalaması verilmiştir.

### **3.6. İmmobilize Lakkazların Aktifliğine pH Etkisi**

$Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L immobilize enzim aktifliğine pH etkisi, pH 2,5- 6,5 aralığında incelenmiştir. Ortam pH' sının pH = 2,5' e ayarlanması için 0,1 M fosfat tamponu, pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 ve 6,5' e ayarlanması için 0,1 M fosfat/0,2 M sitrat tampon çözeltileri kullanılmış ve immobilize lakkaz aktifliği tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 25°C' de sabit tutulmuştur.

### **3.7. İmmobilize Lakkazların Aktifliğine Sıcaklık Etkisi**

$Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L immobilize enzim aktifliğinin sıcaklıkla değişimi; farklı sıcaklıklarda (10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C ve 65°C) tayin edilmiştir. Tepkime süresince ortamın pH' sı, FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) ile pH = 5,0' te sabit tutulmuştur.

### **3.8. İmmobilize Lakkazların Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi**

$Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L immobilize enzimlerin aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla; immobilize lakkazlar, 21 gün boyunca 4°C' de saklanmış ve aktiflikleri belirli aralıklarla tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 25°C' de ve ortam pH' sı FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) ile pH = 5,0' te sabit tutulmuştur.

### **3.9. İmmobilize Lakkazların Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi**

$Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L immobilize enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla, 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 ve 0,25 mM ABTS çözeltileri hazırlanmış ve lakkaz aktifliği tayin edilmiştir.

Tepkime süresince sıcaklık 25°C' de ve ortam pH'sı FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) ile pH = 5,0' te sabit tutulmuştur.

### **3.10. İmmobilize Lakkazların Aktifliğine Kullanım Sayısının Etkisi**

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L immobilize enzim aktifliğine kullanım sayısının etkisinin incelenmesi amacıyla, immobilize lakkazlar aynı gün içerisinde art arda 25 kez ABTS substratına karşı kullanılmış ve lakkaz aktifliği tayin edilmiştir. Her bir aktiflik tayini sonrasında immobilize lakkazlar FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat, pH 5,0) ile yıkanmıştır. Tepkime süresince sıcaklık 25°C' de ve ortam pH'sı FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) ile pH = 5,0' te sabit tutulmuştur.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Selüloz Nanoparçacıklarının Sentezi

Bu çalışmada; manyetik özellik gösteren Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının, enzim immobilizasyonunda etkili bir şekilde kullanılmalarını sağlamak amacıyla, bu nanoparçacıkların yüzeyi selüloz kaplanarak fonksiyonel hale getirilmiştir.

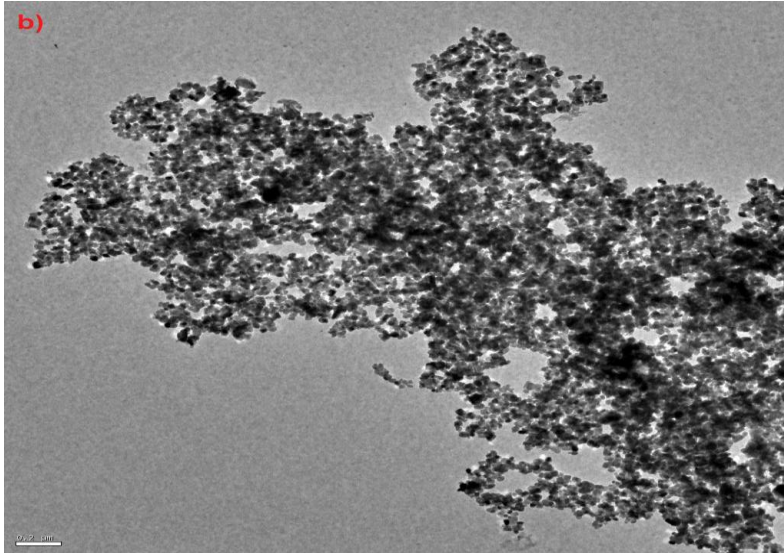
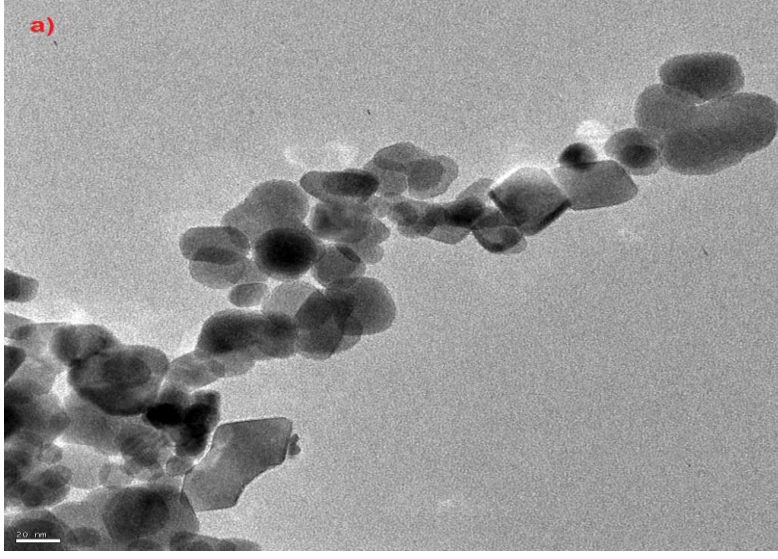
### 4.2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Selüloz Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

#### 4.2.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)

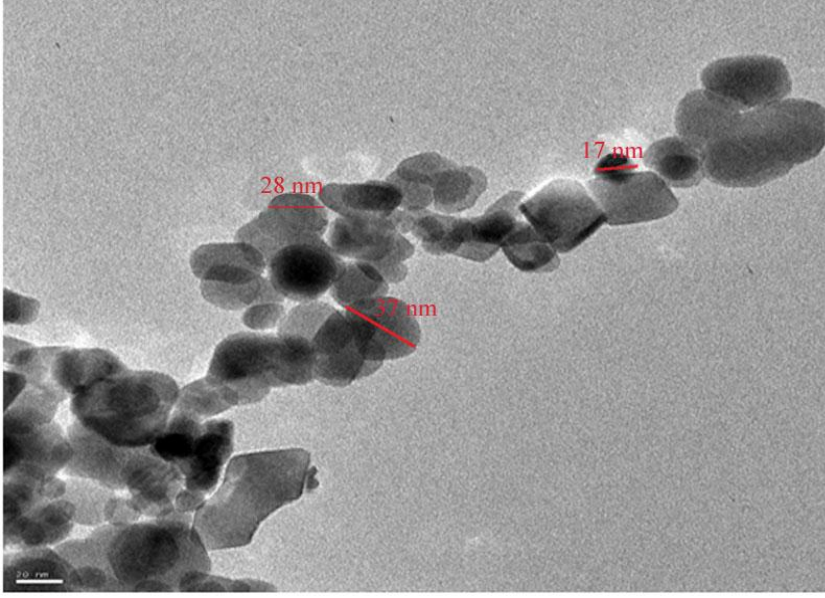
Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının TEM görüntüleri Resim 4.1 ve Resim 4.2 grubumuzda daha önce yapılan çalışmadan alınmıştır [87]; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının TEM görüntüleri ise Resim 4.3 ve Resim 4.4' te gösterilmiştir.

Resim 4.2.' de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının 20 nm skalasında çekilmiş TEM görüntüsünden bu nanoparçacıkların boyutunun 50 nm'den küçük, örneğin 3 farklı Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacığının boyutunun 17 nm, 28 nm ve 37 nm olduğu görülmüştür. Resim 4.1. b' de görülen 0,2 µm skalasında TEM görüntüsünde, bu manyetik nanoparçacıkların biraraya gelmiş halde oldukları görülmektedir. Parçacıkların biraraya gelmelerinin, birbirleri arasındaki manyetik-dipol etkileşimlerden ve parçacık boyutlarının çok küçük, yüzey enerjilerinin çok büyük olmasından kaynaklandığı söylenebilir [19,90].

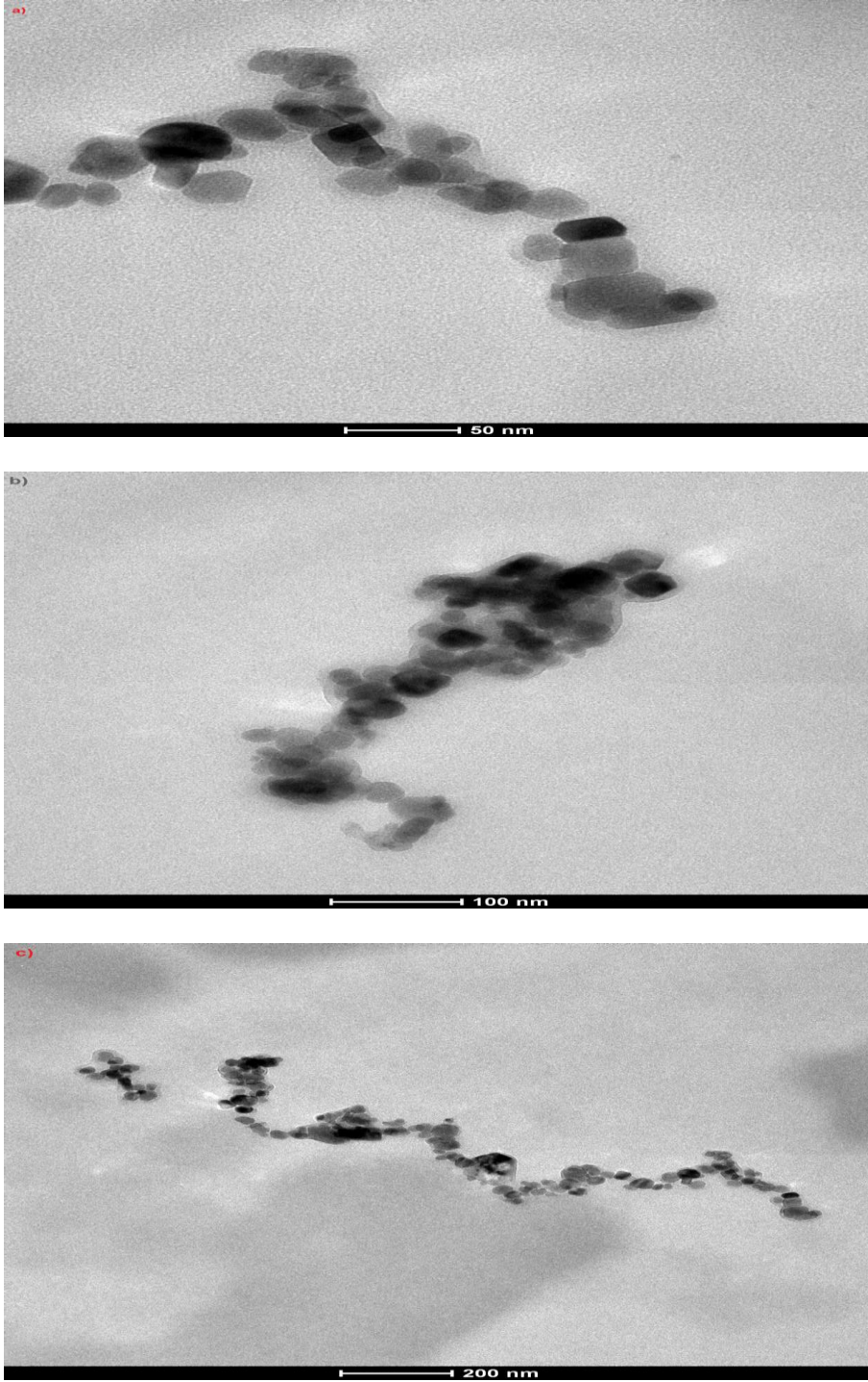
Resim 4.4. a ve Resim 4.4. b' den Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının TEM görüntüsünden, kaplama kalınlığının 5-8 nm aralığında olduğu görülmüştür. Resim 4.3' te Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına ait farklı skalalardaki TEM görüntülerinde, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC parçacıklarının boyutlarının 50 nm' den daha küçük olduğu görülmektedir.



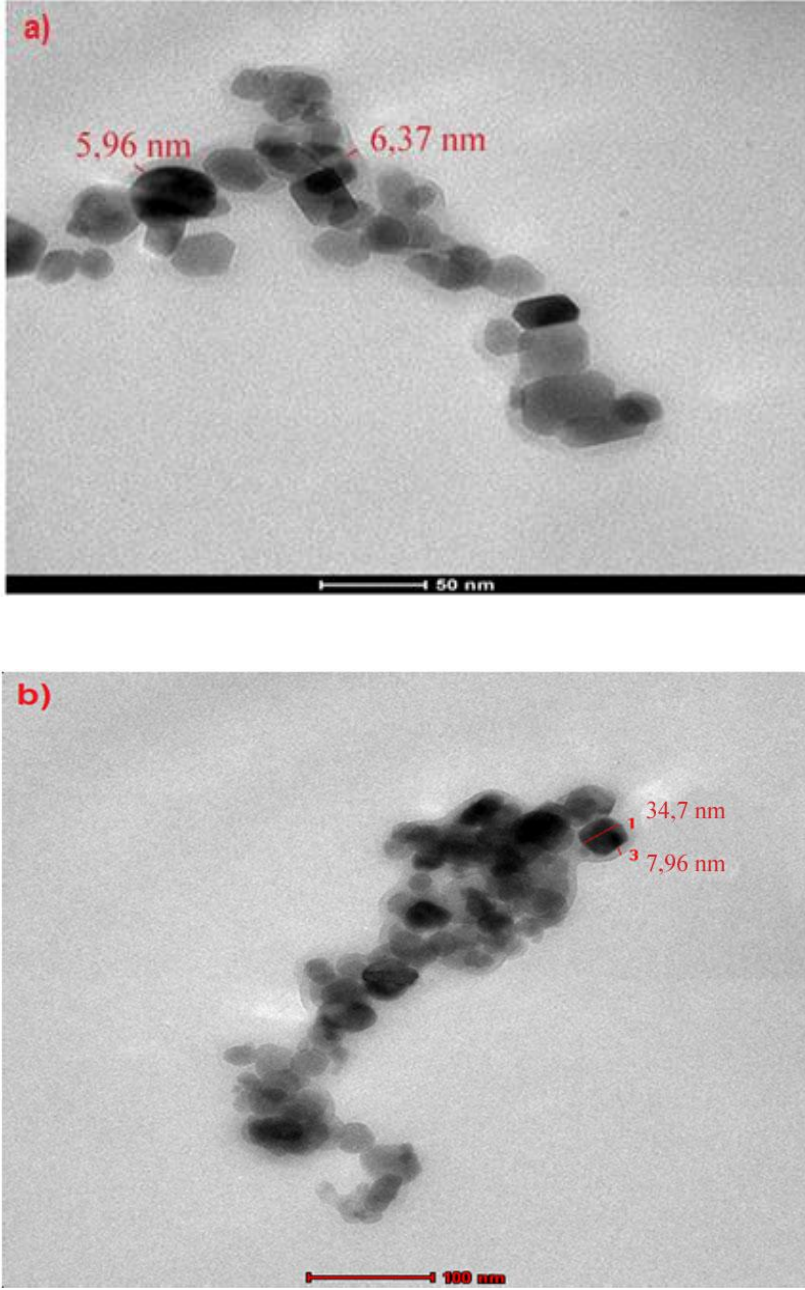
Resim 4. 1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının TEM görüntüleri  
Bar uzunluğu: a) 20 nm b) 0,2 μm



Resim 4.2. Resim 4.1. a' daki  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının boyutlarını gösteren TEM görüntüsü bar uzunluğu: 20 nm



Resim 4.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının TEM görüntüleri  
Bar uzunluğu: a) 50 nm b) 100 nm c) 0,2 µm



Resim 4. 3. Resim 4.3. a ve b' deki Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının boyutlarını gösteren TEM görüntüleri bar uzunluğu: a) 50 nm b) 100 nm



#### 4.2.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

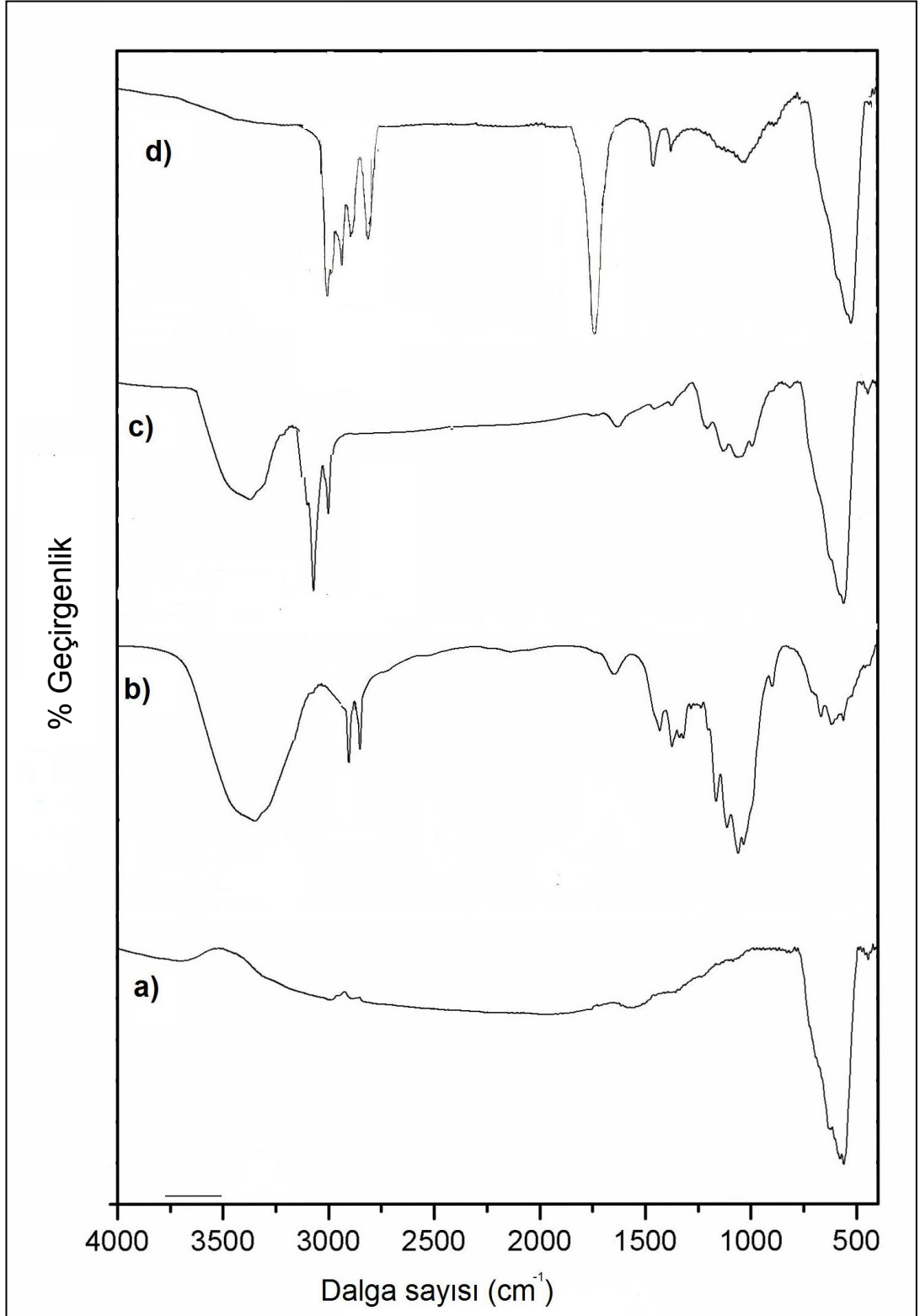
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ , selüloz (CC),  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Y-CC}$ ' in FT-IR spektrumları Şekil 4.1' de gösterilmiştir.

$\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının Şekil 4.1. a' da verilen FT-IR spektrumunda,  $550\text{ cm}^{-1}$  de Fe-O bağına ait gerilme titreşimi gözlenmiştir.

Selülozun Şekil 4.1. b' de gösterilen FT-IR spektrumunda,  $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  bölgesinde O-H,  $2700\text{-}2893\text{ cm}^{-1}$  de C-H,  $1000\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  de C-O gerilme titreşim bandları ortaya çıkmıştır.

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının Şekil 4.1. c' de gösterilen FT-IR spektrumunda,  $566\text{ cm}^{-1}$  de ortaya çıkan Fe-O gerilme titreşimi, manyetik bileşenin yapıdaki varlığını göstermiştir. Ayrıca  $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  de O-H,  $3100\text{ cm}^{-1}$  ve  $2850\text{ cm}^{-1}$  de C-H ve  $1450\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  de C-O gerilme titreşim bandları, manyetik nanoparçacıkların yapısında selülozun bulunduğunu göstermiştir.

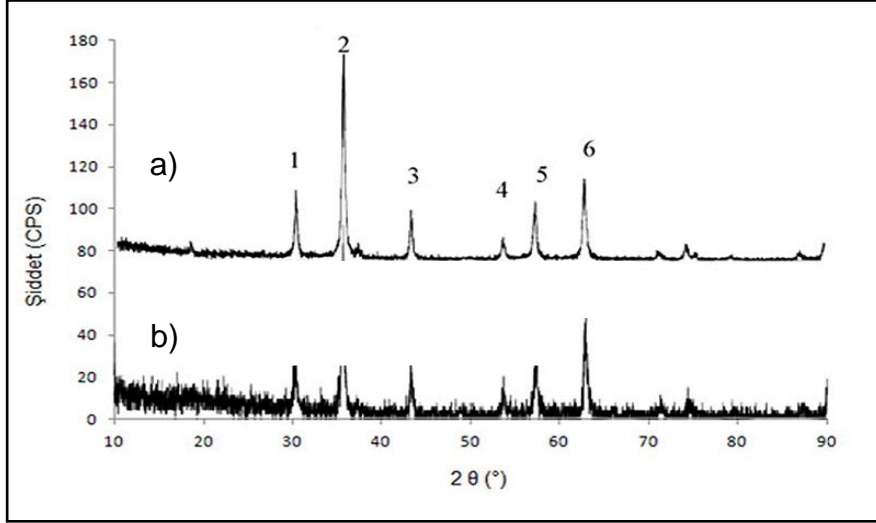
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-Y}$  nanoparçacıklarının Şekil 4.1. d' de gösterilen FT-IR spektrumunda,  $550\text{ cm}^{-1}$  de ortaya çıkan Fe-O gerilme titreşimi, manyetik bileşenin yapıdaki varlığını göstermiştir. Ayrıca aldehite ait  $2700\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$  de C-H ve  $1750\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  de C=O gerilme titreşim bandları, manyetik nanoparçacıkların yapısında bulunan selülozun yükseltgendiğini göstermiştir.



Şekil 4. 1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, selüloz, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Y-CC' in FT-IR spektrumları  
a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> b) selüloz c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC d) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Y-CC

### 4.2.3. X-ışını kırınımı yöntemi (XRD)

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının X-ışını kırınım deseni Şekil 4.2' de gösterilmiştir.



Şekil 4. 2.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının X-ışını kırınım deseni  
a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$

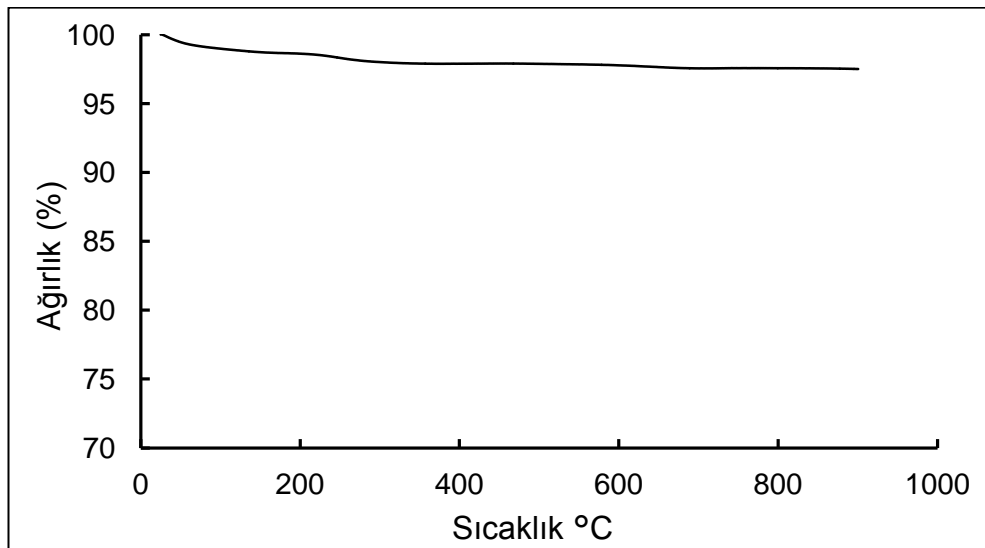
$\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının X-ışını kırınım deseninde,  $2\theta = 30,18^\circ(1)$ ,  $35,47^\circ(2)$ ,  $43,30^\circ(3)$ ,  $53,42^\circ(4)$ ,  $57,18^\circ(5)$  ve  $62,70^\circ(6)$ ' de 6 adet pik gözlenmiştir. Cihazının veri tabanında bulunan ICDD veri kartlarının taratılması ile,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının kırılma açılarının, kart numarası 65-3107 olan  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının kırınım desenindeki açılara uyduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının selülozla kaplanmasının  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ' in kristalin yapısını değişime uğratmadığını, dolayısıyla  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ' in spinel yapısını değiştirmedğini göstermiştir. X-ışını toz kırınımı ile incelenen bir örneğin parçacık boyutu, kırınım desenindeki en şiddetli pikin yarı genişliği kullanılarak hesaplanabilir [91].  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının parçacık boyutu, bu nanoparçacıkların kırınım deseninde şiddeti maksimum olan  $2\theta=35,60^\circ$  de gözlenen pik kullanılarak (2 numaralı pik yarı genişliği (FWHM)= $8,20 \times 10^{-3}$  radyan), Eş 2.4' e göre 21 nm olarak hesaplanmıştır. Grubumuzda yapılan çalışmada  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının parçacık boyutu ise, yine bu nanoparçacıkların kırınım deseninde şiddeti

maksimum olan, ve  $2\theta = 35,47^\circ$  de gözlenen pik kullanılarak (2 numaralı pik, pik yarı genişliği ( $\beta$ ) =  $9,07 \times 10^{-3}$  radyan), Eş. 2.4' te verilen Debye-Scherrer eşitliğinden, 16 nm olarak hesaplanmıştır [92]. Bu durumda, yüzeydeki selüloz kaplama kalınlığı 4,7 nm olarak bulunmuştur. XRD analizleri ve TEM görüntülerinden hesaplanan parçacık boyutlarından, yüzeyin yaklaşık 5-8 nm kalınlıkta selülozla kaplandığı belirlenmiştir.

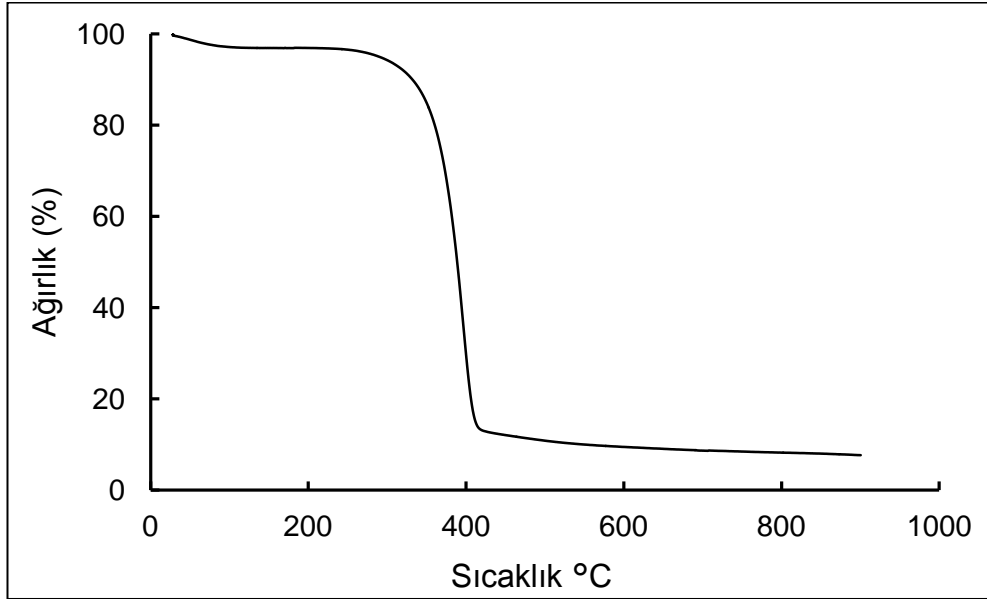
Literatürde de benzer sonuçlara rastlanmış ve farklı demir derişimlerinde sentezlenen manyetik nanotanecikler kullanılarak hazırlanan selüloz nanokompozit filmlerin [80] ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /selüloz nanoparçacıklarının kristal yapısının, saf  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarıninkine göre değişmediği tespit edilmiştir [84].

#### 4.2.4. Termogravimetrik analiz (TGA)

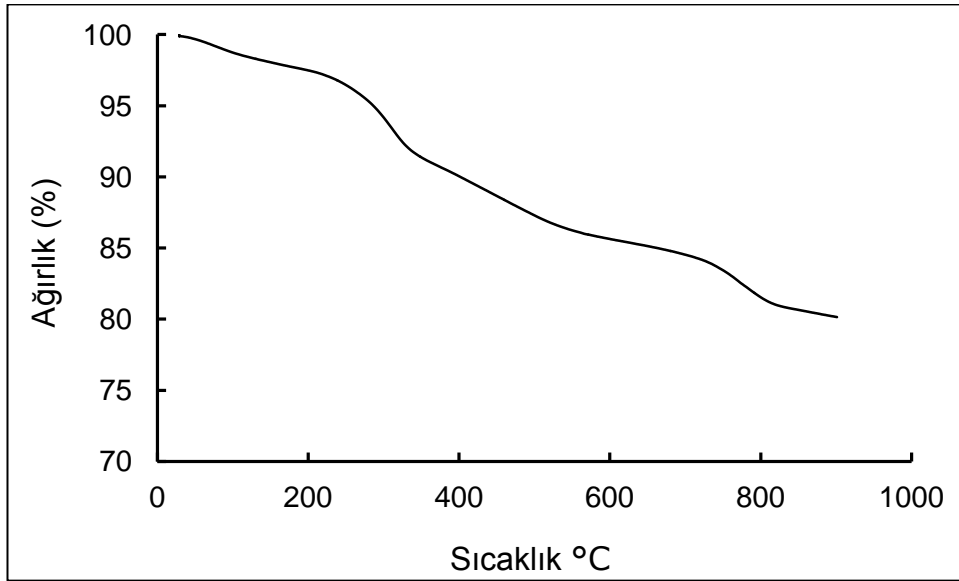
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ , selüloz ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -selüloz nanoparçacıklarının ısı bozunmaları termogravimetrik analiz (TGA) yöntemi ile incelenmiş ve elde edilen termogramlar Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5' te verilmiştir.



Şekil 4. 3.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının TGA termogramı



Şekil 4. 4. Selülozun TGA termogramı



Şekil 4. 5. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-selüloz nanoparçacıklarının TGA termogramı

Şekil 4.3' de, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarına ait termogramda görüldüğü gibi sıcaklık 200°C olduğunda başlangıç ağırlığında %0,8' lik kayıp meydana gelmiş ve sıcaklığın 900°C' ye ulaşması sonucunda, ağırlıkta dikkate değer bir değişme olmamıştır. 200°C' ye kadar olan ısıtma neticesinde ağırlıkta meydana gelen kaybın, nanoparçacıklara adsorplanan suyun uzaklaşmasından kaynaklandığı söylenebilir [88].

Şekil 4.4' de selüloz örneği 200°C' ye ısıtıldığında, başlangıç ağırlığında % 3' lük bir kayıp meydana gelmiştir. Ağırlıktaki bu azalmanın, bu yapıya adsorplanan suyun uzaklaşması nedeniyle meydana geldiği ve selülozun hidrofilik özelliği nedeniyle adsorplanan su miktarının fazla olduğu söylenebilir. 200-550°C arasında gözlenen ağırlık kaybı, selülozun bozunmasından kaynaklanmaktadır. Sıcaklık 900°C' ye ulaştığında, selülozun başlangıç ağırlığının % 92' sini kaybettiği gözlenmiştir.

Şekil 4.5' de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıkları 200°C' ye ısıtıldığında, ağırlıkta % 2,52' lik bir kayıp meydana gelmiştir. Ağırlıktaki bu azalmanın da, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına adsorplanan suyun uzaklaşması nedeniyle meydana geldiği söylenebilir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının termogramında Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarında gözlenmeyen ve 250°C' den 900°C' lere kadar süren ağırlık kaybının, selülozun bu sıcaklık aralığında bozunmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Sıcaklık 900°C' ye ulaştığında ise, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının başlangıç ağırlığının % 20' sini kaybettiği gözlenmiştir.

TGA termogramı alınan selüloz kaplı manyetik nanoparçacıktaki % manyetit ağırlığı (M), 900°C' de kalan selüloz miktarı (R<sub>q</sub>), 250-550°C arasında kaybolan selüloz miktarı (ΔW<sub>q</sub>), 250-550°C arasında kaybolan manyetit ve selüloz miktarı (ΔW<sub>m</sub>) ve 900°C' de kalan manyetit nanoparçacıkları ile bağlantılıdır (Eş. 4.1) [93]:

$$\frac{R_q}{\Delta W_q} \times \Delta W_m + M = R \quad (4.1)$$

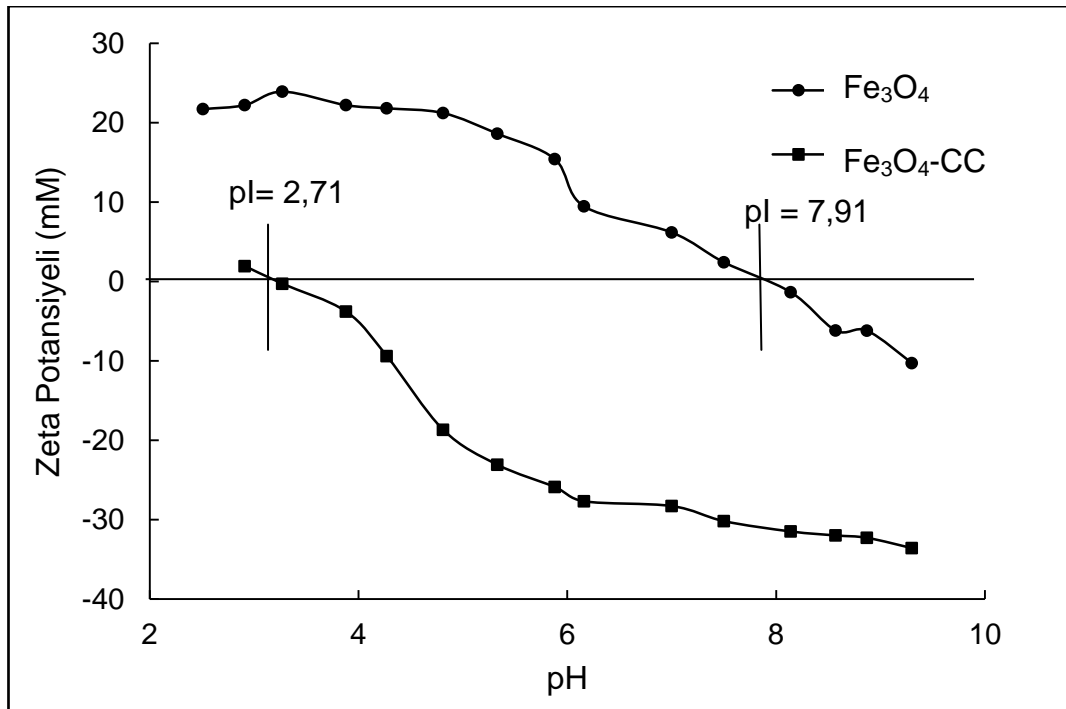
Eş. 4.1'e göre Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının yaklaşık %77 manyetit içerdiği hesaplanmıştır.

Saf selüloza ait termogramdan maksimum bozunma sıcaklığı 400°C bulunmuş iken Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıkları için bu sıcaklığın 320°C' ye yani

daha düşük sıcaklığa kaydığı görülmüştür. Literatürde, 30°C' den 800°C' ye kadar TGA termogramı alınan selüloz/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanokompozit filmlerinin ısı kararlılığının azaldığını ve başlangıç ağırlığının % 39' unu kaybettiğini bildirmişlerdir [80].

#### 4.2.5. ζ (Zeta)-potansiyel analizi

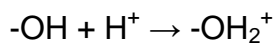
Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının farklı pH' lardaki yüzey potansiyelinin ve yükünün belirlenebilmesi için, bu nanoparçacığın ζ-potansiyeli pH 2,31-9,64 aralığında ölçülmüş ve pH' ya karşı ζ-potansiyeli değişim grafiği Şekil 4.6' da gösterilmiştir.



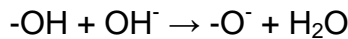
Şekil 4. 6. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının ζ-potansiyelinin pH ile değişimi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının üzerindeki net yükün sıfır olduğu pH değeri olan izoelektronik nokta (pI) değeri 2,71 olarak bulunmuştur. Grubumuzda daha önce yapılan bir çalışmada Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının pI değeri 7,91 olarak tespit edilmiştir [87]. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının pI değeri Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

nanoparçacıklarınıninkine göre 5,2 birim azalmıştır.  $\zeta$ -potansiyelinin, pl değerinin altındaki pH' larda pozitif, üzerindeki pH' larda ise negatif değerlerde olması nedeniyle, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının yüzeyi pH<7,91 olduğunda pozitif, pH>7,91 olduğunda ise negatif yüklüdür. Ortam pH 'sı 2,71' den küçük olduğunda, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıkları yüzeyindeki selülozun -OH gruplarının protonlanması nedeniyle, aşağıda gösterildiği gibi pozitif yük kazandığı düşünülmektedir.



pH = 2,71 olduğunda, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC yüzeyindeki pozitif ve negatif yük yoğunluğunun birbirine eşitlenmesi nedeniyle, bu nanoparçacıkların yüzey potansiyeli 0' a düşmüştür. pH>2,71 olduğunda ise, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC yüzeyindeki -OH grupları ile ortamdaki OH<sup>-</sup> iyonları arasındaki aşağıda gösterilen etkileşim nedeniyle, bu nanoparçacıkların yüzeyinin negatif yüklü hale geldiği söylenebilir.



Literatürde de, pl değeri 7,30 olarak belirlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıkları sodyum oleatla modifiye edildiğinde bu nanoparçacıkların pl değerinin 4,00' e düştüğü bildirilmiştir [94]. Grubumuzda yapılan bir çalışmada Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-kitosan nanoparçacıkları ters-faz süspansiyon metoduyla sentezlenmiş ve pl değeri 6,86 olarak bildirilmiştir [87].

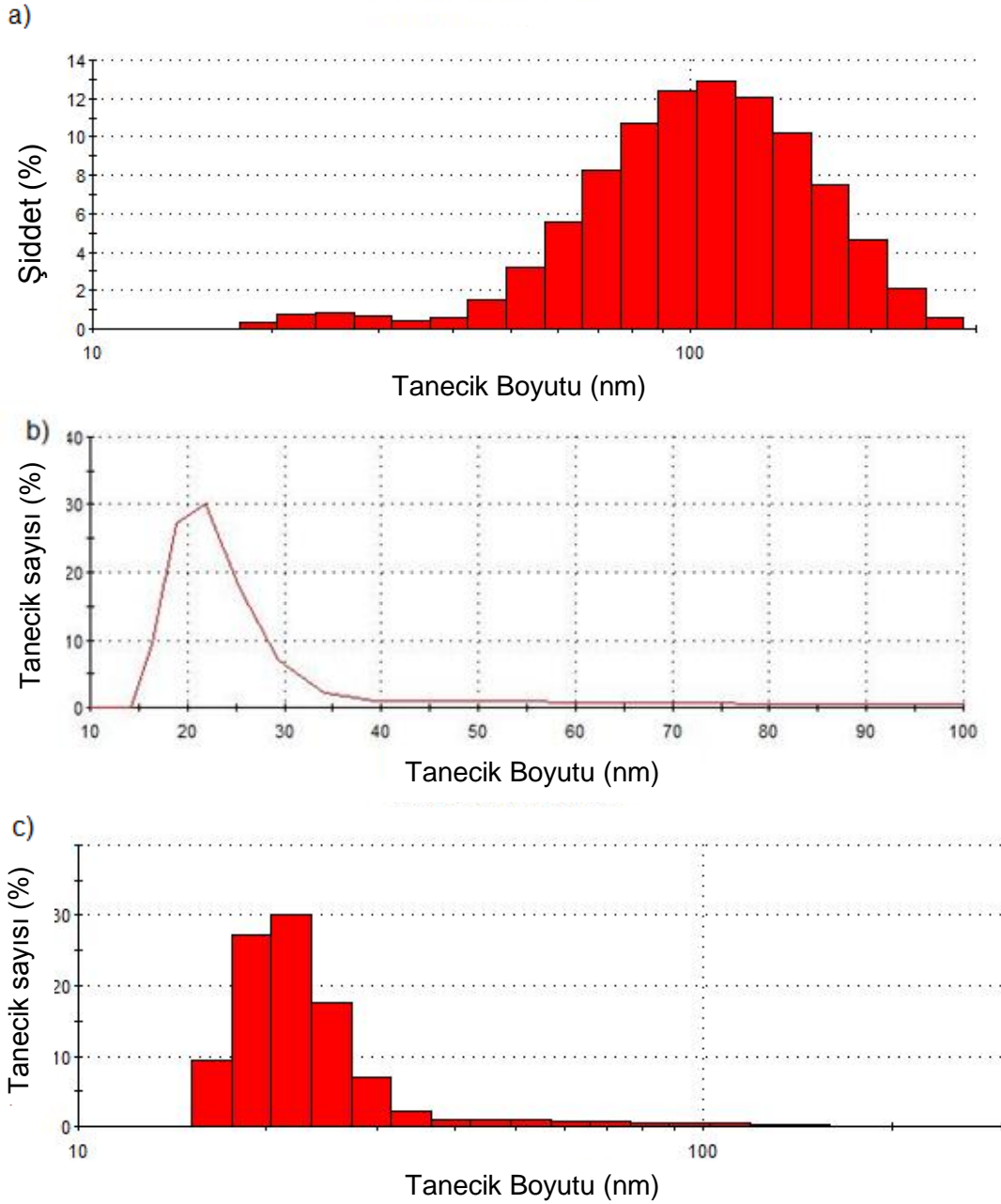
Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- selüloz nanoparçacıklarının TEM analizleriyle boyutlarının 50 nm' nin altında olduğu belirlenmiştir ve pH 7,0' de zeta potansiyel ölçümü -17,6 mV olarak bulunmuştur. Farklı bir çalışmada, yaklaşık parçacık boyutu 413,5 nm olan selüloz kaplı manyetik nanoparçacıklarının zeta potansiyeli pH 7,0' de ölçülmüş ve -11,4 mV olarak belirtilmiştir [85].



$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının tanecik boyut dağılımının şiddet yüzdesine ve tanecik sayısı yüzdesine karşı grafikleri Şekil 4.7' de a) tanecik boyutu-% şiddet grafiği b)tanecik boyutu-% tanecik sayısı grafiği (doğrusal eksen) c) tanecik boyutu-% tanecik sayısı (logaritmik eksen) olarak verilmiştir.

Şekil 4.7. a' ya göre tanecik boyut dağılımı % şiddete karşı çizilirken  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının yaklaşık %6' sı 53 nm' in üzerinde olmasına rağmen büyük boyutlu taneciklerin % şiddeti sayıca daha çok olan fakat boyutu küçük taneciklerden çok daha yüksek görülmektedir.

Şekil 4.7. b' ye göre  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının %36' sı 18 nm' nin altında; %31' i 18-22 nm arasında, %24' ü 22-30 nm arasında ve %3' ü 30-53 nm arasında bulunmuştur.

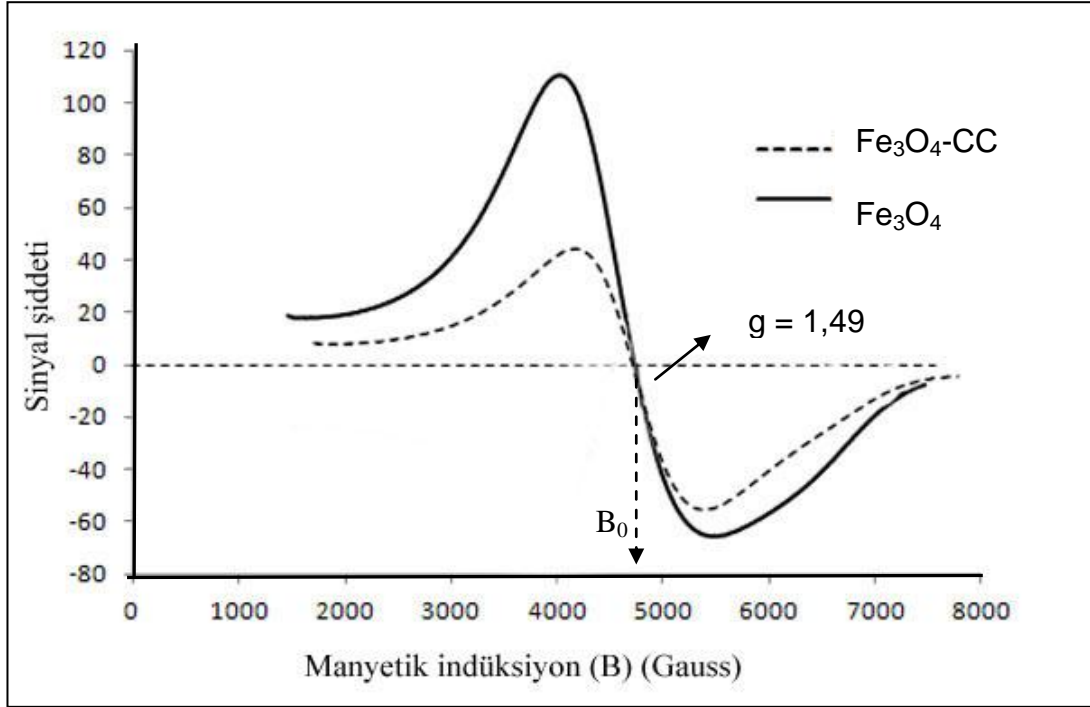


Şekil 4. 7.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının tanecik boyut dağılımı a) tanecik boyutu-% şiddet grafiği b) tanecik boyutu-% tanecik sayısı grafiği (doğrusal eksen) c) tanecik boyutu-% tanecik sayısı (logaritmik eksen)

Buna göre zeta-sizer dan elde edilen tanecik boyut dağılımı, TEM görüntüleri ve XRD analiz sonucu ile uyum sağlamaktadır. Sentezlenen  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının ortalama parçacık boyutunun 50 nm' nin altında olduğu düşünülmektedir.

#### 4.2.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR)

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CC nanoparçacıklarının 9,854136 GHz sabit frekansta elde edilen EPR spektrumu Şekil 4.8' de gösterilmiştir.



Şekil 4. 8.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CC nanoparçacıklarının EPR spektrumları

Şekil 4.8' de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CC nanoparçacıklarının 4018 G değerinde uygulanan manyetik alanda verdiği sinyal şiddeti 42' dir. Grubumuzda daha önce  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının EPR spektrumu alınmış ve 4003 G civarında uygulanan manyetik alana karşı 110 değerinde sinyal şiddeti verdiği görülmüştür [92].  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CC ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının soğurma spektrumlarında geniş ve asimetric bir eğri gözlenmiştir. Selülozun yapıya dahil olması nedeniyle,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CC nanoparçacıklarının gösterdiği sinyal şiddetinin,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarınıninkine göre azaldığı gözlenmiştir.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının manyetik açıdan inaktif olan selülozla kaplanmasıyla,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CC nanoparçacıklarının birim hacimdeki etkin manyetik moment sayısının azalmasından kaynaklandığı söylenebilir [95,96].  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarının ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CC nanoparçacıklarının EPR spektrumlarında,

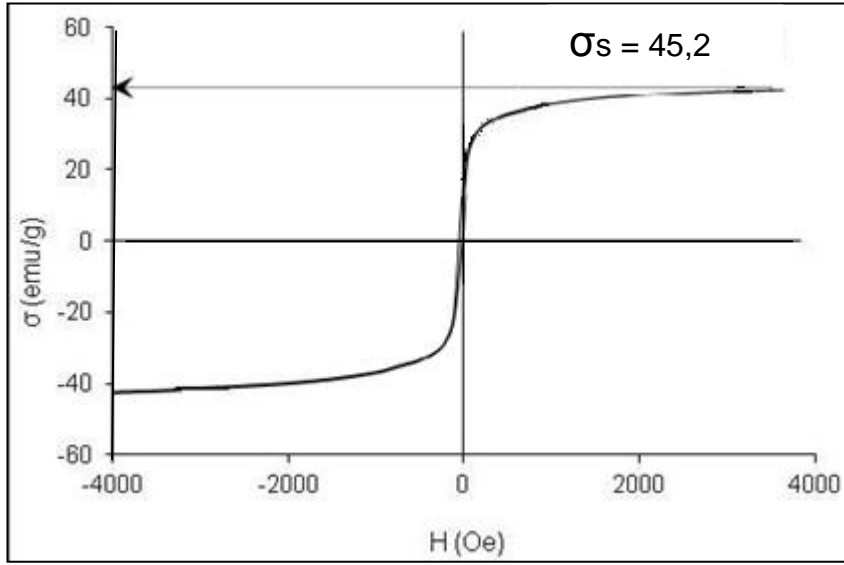
belirli bir sinyal şiddetine sahip olan soğurma eğrilerinin gözlenmesi, bunların paramanyetik özelliğe sahip olduklarını göstermiştir. Literatürde de, poli(metilmetakrilat-ko-akrilik asit) içine hapsedilmiş  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarının EPR spektrumundaki sinyal şiddetinin,  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarının sinyal şiddetine göre daha düşük değerde olduğunu gösteren bulgular yer almıştır [97].

EPR spektrumunda sinyal şiddetinin sıfır olduğu, yani parçacıkların mikrodalga enerjisini maksimum olarak soğurduğu manyetik alan, rezonans alan olarak tanımlanır [98].  $Fe_3O_4$  ve  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının EPR spektrumlarında rezonans alan,  $B_0 = 4735$  G olarak tespit edilmiştir<sup>1</sup>. Bu  $B_0$  değeri kullanılarak, Eş 2.7 ' ye göre, her iki nanoparçacığın g değeri 1,49 olarak hesaplanmıştır. g, değeri, her madde için karakteristik bir değer olan spektroskopik yarıma çarpanıdır. Literatürde,  $Fe^{3+}$  katyonu için g değerleri,  $Fe^{3+}$  düşük spin kompleksi için 1,4-3,1 aralığında, yüksek spin kompleksi için 2,0-9,7 aralığında verilmektedir [99,100]. Dolayısıyla, bu çalışmada,  $Fe_3O_4$  ve  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıkları için belirlenen g değerinin, düşük spin  $Fe^{3+}$  kompleksi için verilen aralığa girdiği belirlenmiştir. Ayrıca,  $Fe_3O_4$  yüklenmiş manyetik polimerik nanoparçacıkların ve mikrokürelerin EPR spektroskopisi ile incelendiği bazı çalışmalarda da, g değerleri 1,90-2,10 arasında bulunmuştur [98,99].

#### 4.2.7. Titreşimli örnek manyetometrisi (VSM)

$Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının manyetik alana (H) karşı kütle mıknatıslanmalarını ( $\sigma$ ) gösteren mıknatıslanma eğrisi, Şekil 4.9' da -4000 Oe, + 4000 Oe aralığında ve Şekil 4.10' da -22000 Oe, +22000 Oe aralığında gösterilmiştir.

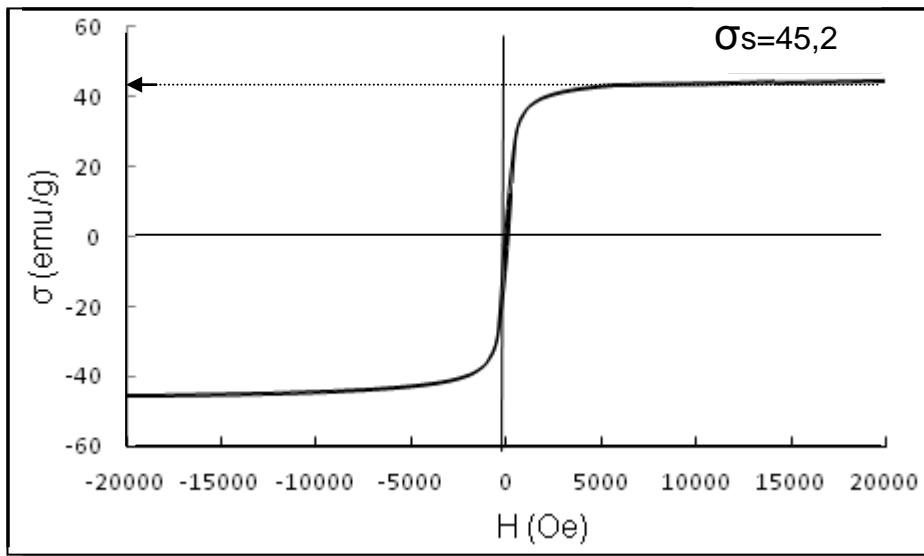
<sup>1</sup> Bu çalışmada kullanılan EPR cihazından manyetik indüksiyon cinsinden veri elde edilmektedir. Manyetik alan ve manyetik indüksiyon arasında,  $B = \mu_0(H + M)$  ilişkisi vardır. ( $\mu_0$ =manyetik geçirgenlik)



Şekil 4. 9 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi (-4000 Oe, +4000 Oe)

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi, bu nanoparçacıkların, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının mıknatıslanma eğrisinde olduğu gibi, sürekli ve düzgün bir döngüye sahip olduğunu ve manyetik alana verdikleri tepkinin sürekli ve kararlı olduğunu göstermiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının mıknatıslanma eğrisinden, bu nanoparçacıkların  $\sigma_s$  değerinin 45,2 emu/g olduğu belirlenmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının  $\sigma_s$  değerlerinin büyüklüğünün, bu nanoparçacıkların yüzeyini saran selüloz tabakasının kalınlığına, selülozun bazı özelliklerine, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının  $\sigma_s$  değerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Grubumuzda daha önce yapılan çalışmada Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının manyetik doyum mıknatıslanması,  $\sigma_s=74,1$  emu/g olarak belirlenmiştir [87].  $\sigma_s$  değerinin büyüklüğü, nanoparçacıkların birim hacimdeki ya da kütledeki manyetik moment sayısına bağlıdır. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının selülozla kaplanması, bu nanoparçacıkların birim kütledeki manyetik moment sayısının azalmasına ve  $\sigma_s$  değerinin 74,1 emu/g' dan 45,2 emu/g' a düşmesine neden olmuştur. Benzer şekilde, EPR analizlerinin sonuçlarında da, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıkların manyetik alana verdikleri tepkinin Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarına göre azaldığı tespit edilmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının

yüzeyine selüloz kaplanmasıyla,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarındaki manyetik bölgelerin  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıklarınıninkilere göre birbirinden uzaklaşması ve böylelikle, manyetik parçacıkların birbirlerine karşı uyguladıkları mıknatıslanmanın azalmasından kaynaklanmaktadır.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının mıknatıslanma eğrisine bakıldığında eğrinin orijine yaklaştığı, yani kalıcı mıknatıslanma ( $M_r$ ) ve zorlayıcı alan ( $H_c$ ) değerlerinin hemen hemen sıfır olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 2.14). Mıknatıslanma eğrisinde bu değişimin gözlenmesi nedeniyle,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının süperparamanyetik özellik gösterdikleri sonucuna varılmıştır. Benzer sonuçlara literatürde de rastlanılmıştır [59].



Şekil 4. 10.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarının manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi (-22000 Oe, +22000 Oe)

Literatürde yer almış çalışmalarda, çeşitli yöntemlerle sentezlenen farklı boyutlardaki  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıkları için  $\sigma_s$  değerleri, 42 emu/g ile 83,2 emu/g arasında değişmektedir [16,19,29,59,84,91].

Literatürdeki bir çalışmada, maghemit ile manyetik selüloz küreleri oluşturulmuş paramanyetik özellik içerdiği bildirilmiş ve doyum mıknatıslanması,  $\sigma_s = 42,2$  emu/g olarak bildirilmiştir [29]. Bir diğer çalışmada 300 K' de, 0,1 M, 0,05M ve 0,01M demir iyon derişimi içeren manyetik

bakteriyel selüloz yaprakları için doyum mıknatıslanması sırasıyla 26,2 emu/g, 15,8 emu/g, 1,9 emu/g olarak bulunmuş ve sıcaklık 100 K' e indirildiğinde değerlerin sırasıyla 28,1 emu/g, 17,7 emu/g ve 2,9 emu/g olarak değiştiği yani sıcaklığa bağlı olduğu bildirilmiştir [86]. Ayrıca literatürde, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-kaplı selüloz lif örneklerinin doyum mıknatıslanması,  $\sigma_s = 65,5$  emu/g olarak bulunmuştur [82]. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/selüloz kompozit filmlerin süperparamanyetik özellik gösterdiği,  $\sigma_s$  değerlerinin yaklaşık 4,2-21,2 emu/g civarında olduğu ve içerdiği demir miktarına göre değiştiği bildirilmiştir [80]. Poli(akrilik asit) bağlanan Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıkları için  $\sigma_s = 61,7$  emu/g [15] ve yüzeyi 3-(aminopropil) trietoksisisilan ile silanlanmış Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıkları için  $\sigma_s = 62$  emu/g olarak bildirilmiştir [91]. Farklı polimerler ve modifiye edici bileşiklerle hazırlanan Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının  $\sigma_s$  değerlerinin büyüklüğünün, bu nanoparçacıkların yüzeyini saran polimerlere ya da yüzey modifikasyonunda kullanılan maddelere bağlı olduğu söylenilebilir.

Yüzeyi çeşitli polimerlerle modifiye edilen manyetik nanoparçacıkların çeşitli uygulamalarda kullanılmalarının en önemli nedenlerinden birisi de, bu manyetik nanoparçacıkların hemen hemen aynı manyetik alan varlığındaki mıknatıslanmalarının, manyetik polimerik mikrokürelere göre daha fazla olmasıdır. Bu özellikleri nedeniyle, enzim ve protein immobilizasyonu gibi uygulamalarda kullanılan manyetik nanoparçacıklar, manyetik ayırma ile daha kolay bir şekilde ortamdan ayrılabilirler.

### 4.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Selüloz Nanoparçacıklarına Lakkaz İmmobilizasyonu

Lakkaz enzimi, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına adsorpsiyonla, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının -OH grupları siyanürik klorür (SC) ile aktifleştirildikten ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarındaki selüloz yükseltgendikten sonra kovalent bağlama yöntemi ile immobilize edilmiştir. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyon, pH = 6,0' da gerçekleştirilmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz enziminin adsorpsiyonunda H-bağlarının ve çok az da olsa dağılma kuvvetlerinin etkili

olduğunu söyleyebiliriz.  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının -OH grupları, Şekil 3.4' te gösterilen tepkimeye göre siyanürik klorürle aktifleştirilmiş ve lakkaz enzimi  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir.  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarındaki selülozun -OH grupları, Şekil 3.3' te gösterilen tepkimeye göre yükseltgenerek aldehit grupları oluşturulmuş ve lakkaz enzimi  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklara kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalarda selüloz kaplı manyetik mikrokürelerin ya da nanoparçacıkların siyanürik klorür ile aktifleştirilmesi ve enzim immobilizasyonuna, aynı zamanda yükseltgenmiş selüloz kaplı manyetik mikrokürelere ya da nanoparçacıklara lakkaz enzimi immobilizasyonuna rastlanılmamıştır.

#### **4.3.1. $Fe_3O_4$ -selüloz nanoparçacıklarına immobilize edilen enzimlerin enerji dispersif X-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS) ile tayini**

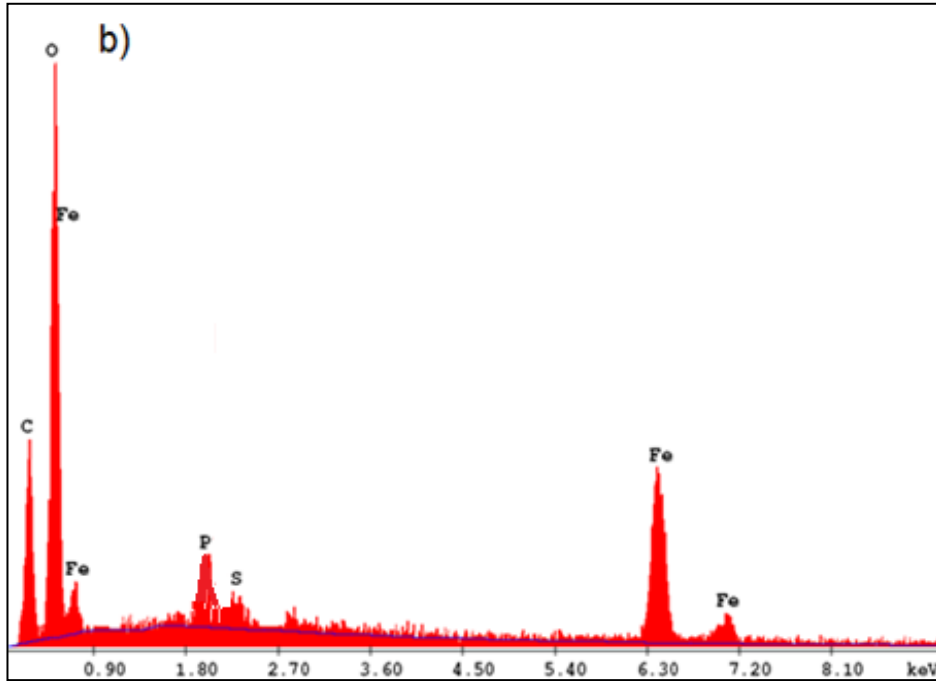
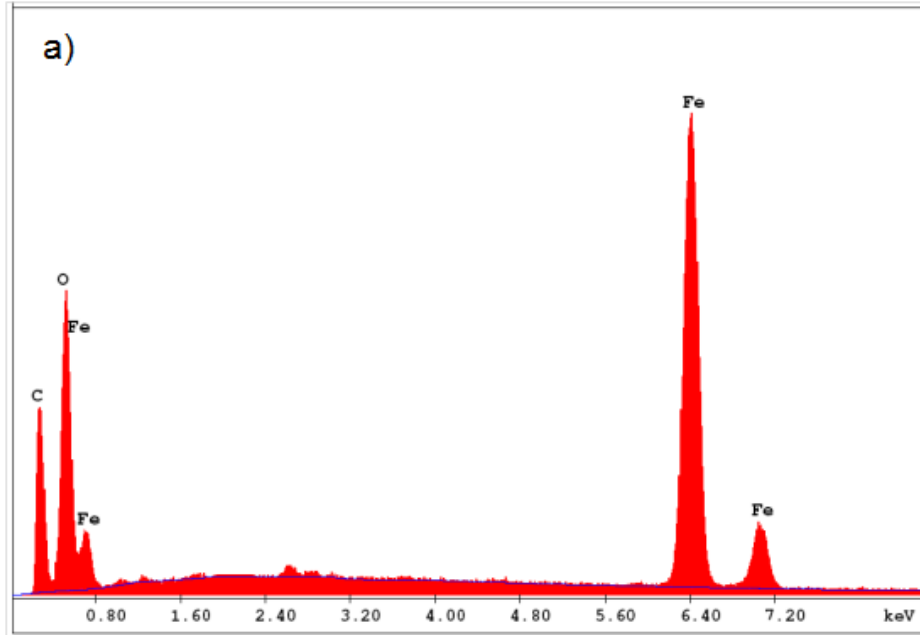
$Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarına adsorpsiyonla, yükseltgeyerek kovalent bağlanma ve siyanürik klorürle aktifleştirilerek kovalent bağlanma yöntemleri ile enzim immobilize edildiği ( $Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L), SEM/EDS analizleri ile araştırılmış ve örnekler için X-ışını enerjisine (keV) karşı X-ışını sayısını gösteren SEM/EDS spektrumları Şekil 4.11' de gösterilmiştir.

$Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının SEM/EDS spektrumunda, selülozun ve  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarının varlığını gösteren C, O ve Fe atomları tespit edilmiştir (Şekil 4.11.a).

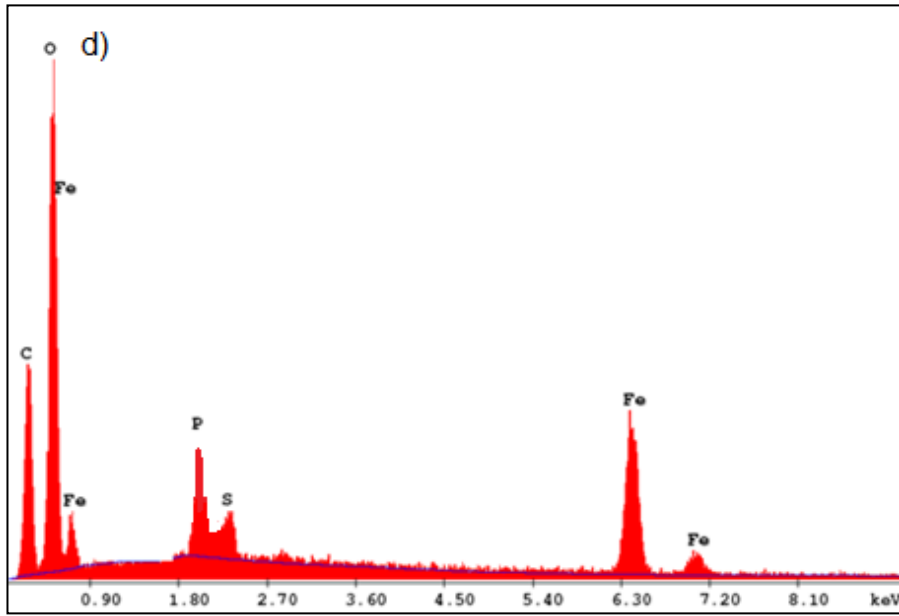
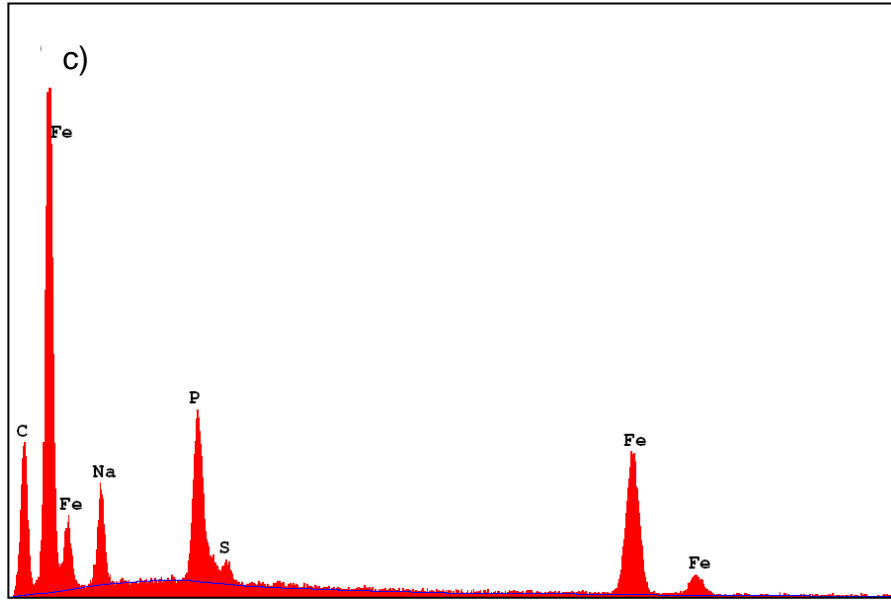
$Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L örneklerinin sırasıyla Şekil 4.11.b, 4.11.c, 4.11.d' de görülen SEM/EDS spektrumunda ise, C,O ve Fe atomlarının yanında, S atomuna ait sinyaller gözlenmiştir. Immobilize lakkaz örneklerinin spektrumunda yer alan S atomuna ait sinyaller, lakkaz



molekülündeki sistein kalıntılarında ileri gelmektedir ve dolayısıyla, lakkazın bu sistemler içerisinde bulunduğunu göstermiştir [101]. İmmobilize lakkazlara ait spektrumlarda gözlenen P atomuna ait sinyalin fosfat tamponu içerisindeki, fosfor atomlarından kaynaklandığı, ayrıca  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L' a ait spektrumda gözlenen Na atomunun ise, yükseltgeme esnasında kullanılan sodyum periyodattan geldiği düşünülmektedir.



Şekil 4. 11.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-L}$ , ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-Y-L}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-SC-L}$  nanoparçacıklarının SEM/EDS spektrumları a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-L}$  c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-Y-L}$  d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-SC-L}$



Şekil 4.11. (Devam)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-L}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-Y-L}$  ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-SC-L}$  nanoparçacıklarının SEM/EDS spektrumları  
a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-L}$  c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-Y-L}$  d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-SC-L}$

### 4.3.2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-selüloz nanoparçacıklarına immobilize edilen enzim miktarının Bradford metodu ile tayini

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L immobilize sistemlerindeki lakkaz miktarı Bradford metoduna göre tayin edilmiş ve BSA kalibrasyon eğrisinden (Şekil 3.5), bu sistemlere immobilize edilen enzim yüzdeleri sırasıyla %81, %88 ve %84 olarak bulunmuştur. Değerlerin %80' den büyük olması, lakkazın Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına adsorpsiyonla ve kovalent bağlanma ile yüksek bir oranda immobilize olduğunu göstermiştir.

### 4.4. Immobilize Lakkazın Aktifliğinin Tayini

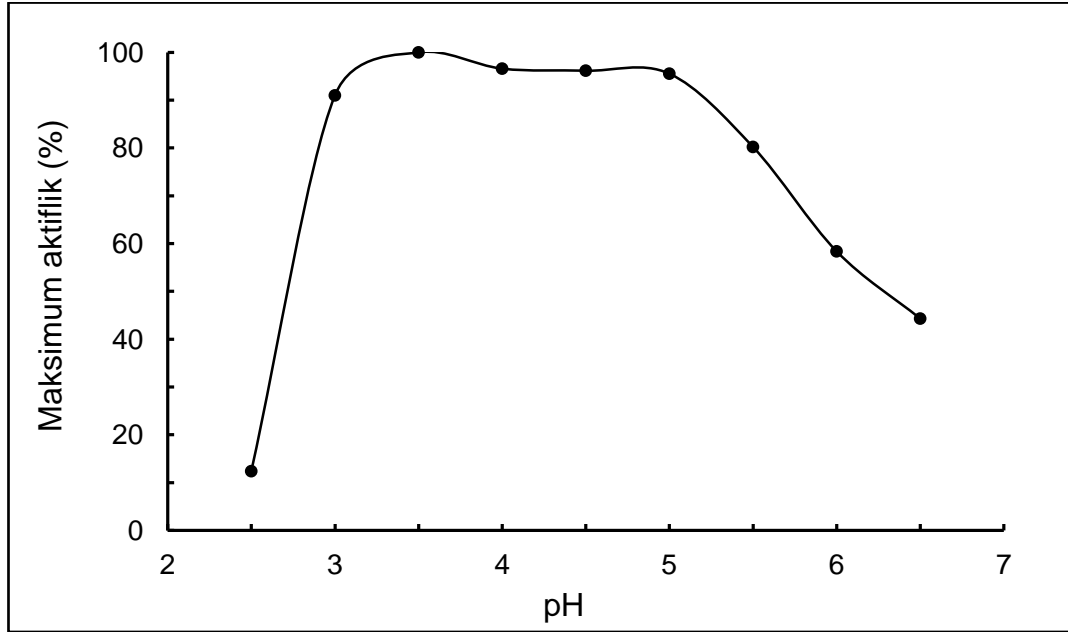
İmmobilize lakkazın aktifliği, lakkaz aktifliğinin hızlıca tayin edilmesine imkan veren ABTS substratı ile tayin edilmiştir. İmmobilize lakkaz aktifliği, 0-0,025 mM ABTS derişimi aralığında doğrusal olan ABTS kalibrasyon eğrisinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.6). 0,025 mM' dan daha yüksek ABTS derişimlerinde, enziminin substratı ile doygun hale gelmesinden dolayı, ABTS derişimi ile enzimatik tepkime hızının değişimi doğrusallıktan sapmaya başlamıştır. Bu nedenle 0-0,025 mM ABTS derişimi aralığında oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğimi kullanılarak lakkaz aktifliği tayin edilmiştir.

### 4.5. Immobilize Lakkaz Aktifliğine Etki Eden Parametreler

#### 4.5.1. İmmobilize lakkaz aktifliğine pH etkisi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH etkisi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L aktifliğinin pH 2,5-6,5 aralığındaki değişimi Şekil 4.12' de gösterilmiştir.

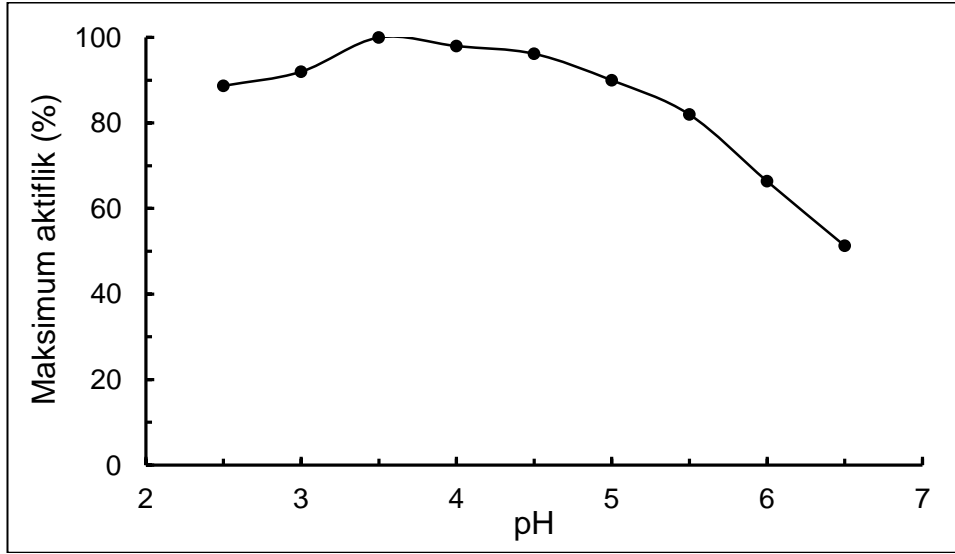


Şekil 4.12.  $Fe_3O_4$ -CC-L aktifliğinin pH ile değişimi

$Fe_3O_4$ -CC-L için optimum pH değeri 3,5 bulunmuştur ve bu immobilize lakkaz pH 3,0-5,0 aralığında maksimum aktifliğini %91' in üzerinde ve pH 6,5' te %44 oranında korumuştur.

Yükseltgenen  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH etkisi

$Fe_3O_4$ -CC-Y-L aktifliğinin pH 2,5-6,5 aralığındaki değişimi Şekil 4.13' te gösterilmiştir.

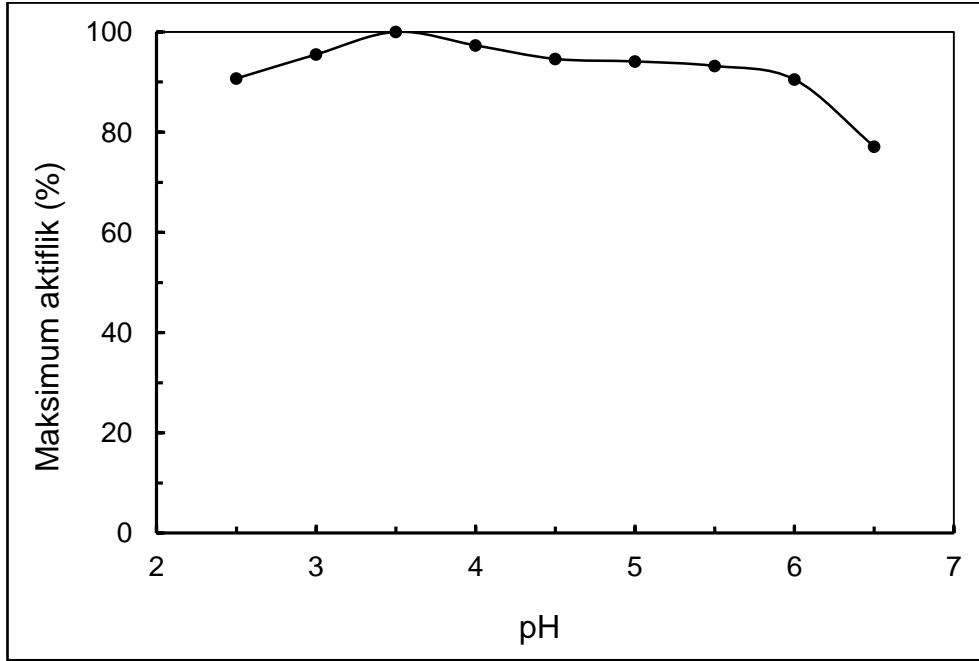


Şekil 4. 13. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Y-CC-L aktifliğinin pH ile değişimi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L için optimum pH değeri 3,5 bulunmuş ve bu immobilize lakkaz, pH 3,0-5,0 aralığında maksimum aktifliğini %90' ın üzerinde ve pH 6,5' te %51 oranında korumuştur.

Siyanürik klorürle aktifleştirilen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH etkisi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L aktifliğinin pH 2,5-6,5 aralığındaki değişimi Şekil 4.14' te gösterilmiştir.



Şekil 4. 14.  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L aktifliğinin pH ile değişimi

$Fe_3O_4$ -CC-SC-L için optimum pH değeri 3,5 bulunmuş ve bu immobilize lakkaz, pH 3,0-5,0 aralığında maksimum aktifliğini %94' ün üzerinde ve pH 6,5' te %77 oranında korumuştur.

Grubumuzda daha önce *Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın ABTS substratına karşı optimum pH' ı 3,0 olarak bulunmuştur [87]. Serbest lakkaz pH 3,0-5,0 aralığında maksimum aktifliğini %55 ve pH 6,5' te maksimum aktifliğini %6,0 oranında korumuştur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, üç immobilize lakkazın da serbest lakkaza göre pH 3,0-6,5 aralığında çok daha yüksek bir aktiflikle kullanılabilir olduklarını göstermiştir. Dolayısıyla,  $Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L' in asidik ve nötrale yakın pH değerlerinde yürütülen endüstriyel uygulamalarda, serbest lakkaza göre daha verimli bir şekilde kullanılabilceği düşünülmektedir.

Literatürde, küspeden alınan selüloz lifleri sodyum periyodat ile sülfürik asit içerisinde yükseltgemiş, selüloz dialdehit oluşturulmuş ve selülozdaki aldehit gruplarına glukozaminin amino gruplarının kovalent olarak bağlanarak

immobilize edildiği bildirilmiştir. İmmobilize enzimin ve serbest enzimin maksimum aktiflik gösterdikleri pH' lar sırasıyla 3,0-5,0 ve 3,5-5,0 olarak bildirilmiş ayrıca pH 2,5-7,0 aralığında immobilize enzimin serbest enzime göre yüksek aktiflik gösterdiği rapor edilmiştir [102]. Yine literatürde, selüloz kaplı manyetik mikro kürelere *Trametes versicolor'* dan elde edilen lakkaz kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş ve ABTS substratına karşı aktifliğine bakıldığında optimum pH değeri 3,5 olarak bulunmuştur [83].

Literatürde, manyetik poli(stiren-ko-aseto-asetoksietil metakrilat) küreciklerinin  $\beta$ -diketon grubuna kovalent bağlanma ile immobilize edilen *Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın optimum pH değerinin 4,0 olduğu bildirilmiştir [103]. Grubumuzda daha önce  $Fe_3O_4$  nanoparçacıkları kitosanla kaplanmış, *Trametes versicolor* kaynaklı lakkaz bu nanoparçacıklara adsorpsiyonla ve siyanürik klorür ile aktifleştirildikten sonra kovalent bağlanma yöntemleri ile immobilize edilmiş ve sırasıyla optimum pH' ları 3,0 ve 3,5 bulunmuştur [87].

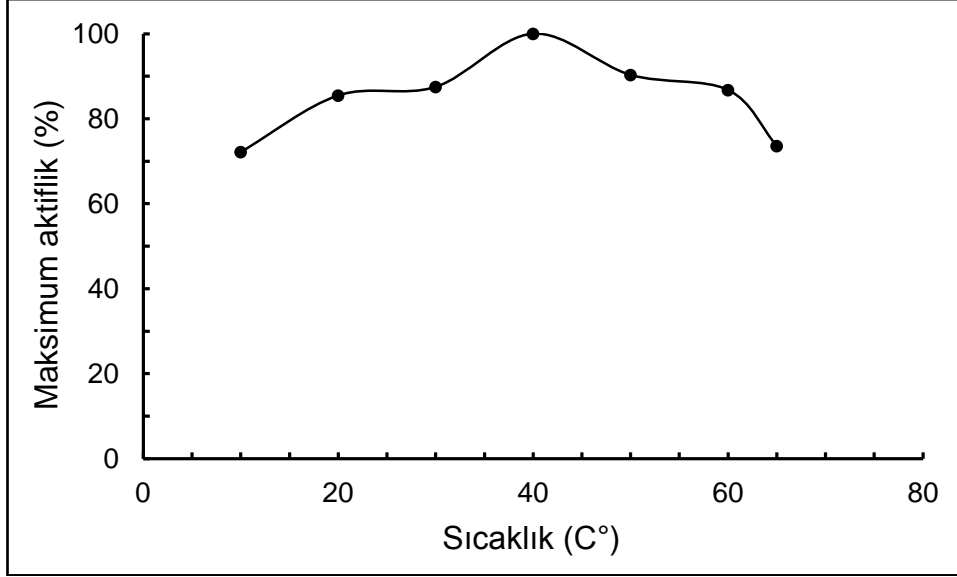
Manyetik olmayan çeşitli destekler üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilen kaynakları farklı lakkazların optimum pH değerleri pH 3,2-4,0 arasında değişim göstermiştir [74,104]. Siyanürik klorürle aktifleştirilmiş poli (2-hidroksietil metakrilat) mikrokürelere immobilize edilen invertazın optimum pH değerinin, serbest invertaza göre 1 birim artarak pH 5,5' e kaydığı bildirilmiştir [105]. Siyanürik klorürle aktifleştirilen selüloz esaslı bir destek materyal üzerine enzim immobilizasyonuna ilişkin bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

#### **4.5.2. İmmobilize lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi**

$Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi



$Fe_3O_4$ -CC-L aktifliğinin 10-65°C aralığındaki değişimi Şekil 4.15' de gösterilmiştir.

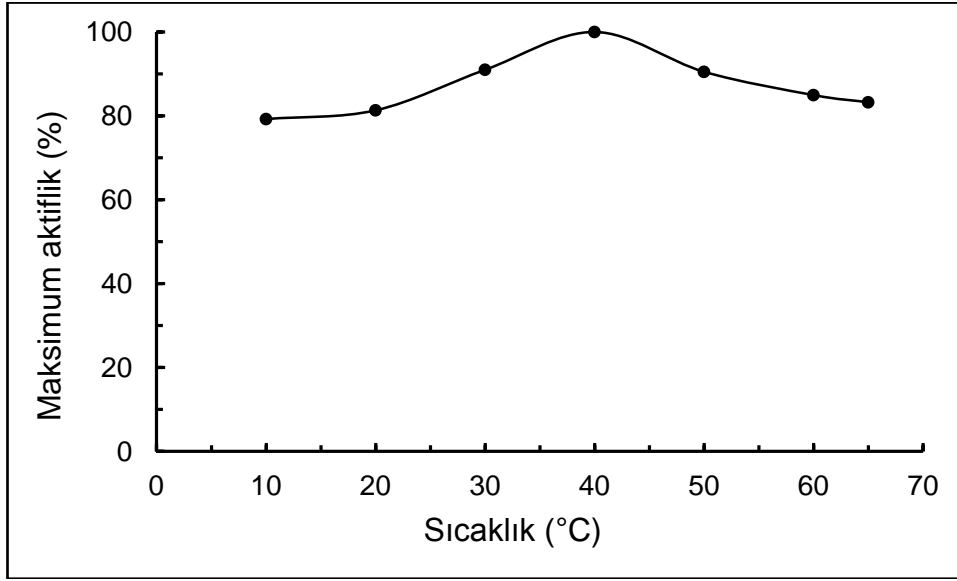


Şekil 4. 15.  $Fe_3O_4$ -CC-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

$Fe_3O_4$ -CC-L için optimum sıcaklık 40°C bulunmuş, 10-65 °C aralığında, maksimum aktifliğini %72' nin üzerinde korumuştur.

#### Yükseltgenen $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi

$Fe_3O_4$ -CC-Y-L aktifliğinin 10-65°C aralığındaki değişimi Şekil 4.16' da gösterilmiştir.

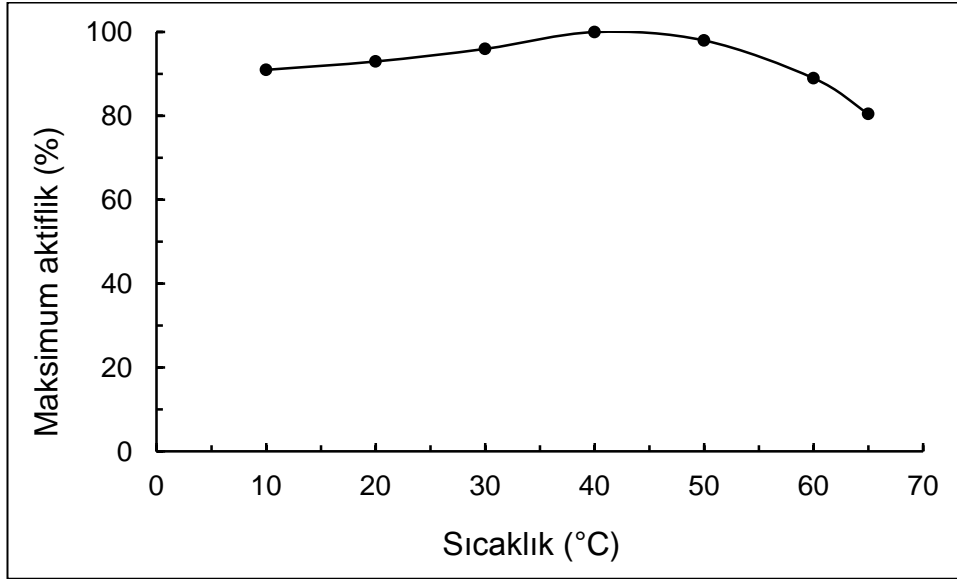


Şekil 4. 16.  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

$Fe_3O_4$ -CC-Y-L için optimum sıcaklık  $40^\circ C$  bulunmuş ve bu immobilize lakkaz,  $10$ - $65^\circ C$  arasında maksimum aktifliğinin %80' inin üzerinde koruyabilmiştir.

Siyanürik klorürle aktifleştirilen  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi

$Fe_3O_4$ -CC-SC-L aktifliğinin  $10$ - $65^\circ C$  aralığındaki değişimi Şekil 4.17' de gösterilmiştir.



Şekil 4. 17. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L için optimum sıcaklık 40°C bulunmuş ve bu immobilize lakkaz, 10-65°C arasında maksimum aktifliğinin %80' in üzerinde korumuştur.

Grubumuzda daha önce *Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın ABTS substratına karşı optimum sıcaklık değeri 40°C olarak belirlenmiş ve 10-65°C arasında maksimum aktifliğini % 53' ün üzerinde koruduğu bildirilmiştir [87]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, üç immobilize lakkazın da serbest lakkaza göre 10-65 °C sıcaklık aralığında daha yüksek bir aktiflikle kullanılabilir olduklarını, bu sıcaklık aralığında serbest lakkaza göre daha verimli bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

Literatürde, küspeden elde edilen selüloz lifleri yükseltgenmiş ve glukoamilaz kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş, serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değerleri 60 ve 65 °C olarak bildirilmiş ayrıca 30-80 °C sıcaklık aralığında immobilize enzimin serbest enzime göre daha yüksek aktiflik gösterdiği rapor edilmiştir [102].

Grubumuzda daha önce Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıkları kitosanla kaplanmış, *Trametes versicolor* kaynaklı lakkaz bu nanoparçacıklara adsorpsiyonla ve

siyanürük klorür ile aktifleştirildikten sonra kovalent bağlanma yöntemleri ile immobilize edilmiş ve optimum sıcaklık ikisi içinde 40°C bulunmuştur [87].

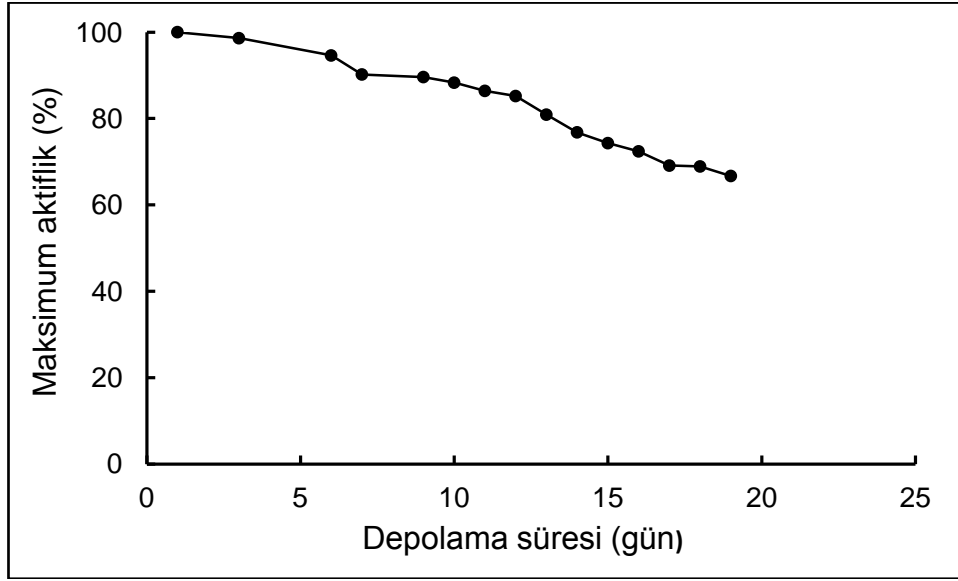
#### **4.5.3. İmmobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi**

Enzim aktifliğinde depolama süresince meydana gelen değişimler, enzimlerin yapısal özelliklerine ve depolama şartlarına (tampon çözelti ortamı, sıcaklık gibi) bağlıdır.

Grubumuzda immobilize lakkazların aktifliklerini en iyi şekilde korudukları depolama koşullarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, 4 farklı depolama koşulu denenmiştir. İlk durumda, immobilize lakkazları pH' sı 5,0 olan FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) içerisinde 4°C' de, ikinci durumda bu tampon çözelti uzaklaştırılarak fakat kurutulmadan 4°C' de, üçüncü durumda pH' sı 5,0 olan 0,1 M Britton-Robinson tampon çözeltisi içerisinde 4°C' de ve son olarak dondurularak kurutulmuş halde 4°C' de saklamışlardır. İmmobilize lakkazlar, aktifliklerini en iyi ikinci durumda belirtildiği gibi, üzerlerindeki tampon çözelti uzaklaştırılarak ve kurutulmadan 4°C' de muhafaza edildikleri durumda korudukları için, depolama işlemi bu koşulda yapılmıştır [106].

#### **Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi**

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L aktifliğinin 21 gün depolama süresi ile değişimi Şekil 4.18' de gösterilmiştir.

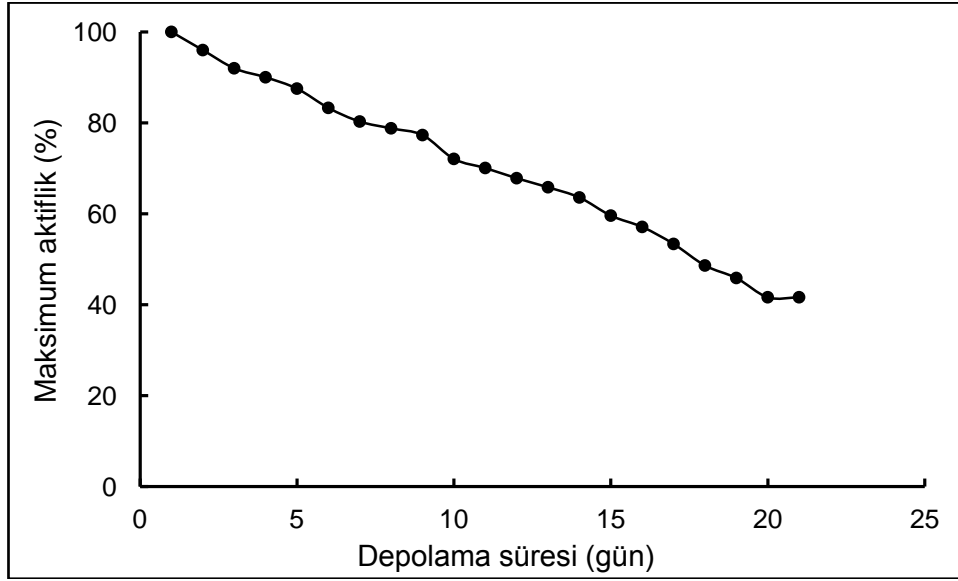


Şekil 4. 18. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L, depolanmasının 7. günü sonunda başlangıç aktifliğinin %90' ını; 14. günü sonunda %76' sını; 21. günü sonunda ise %66' sını korumuştur.

Yükseltgenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L aktifliğinin 21 gün depolama süresi ile değişimi Şekil 4.19' da gösterilmiştir.

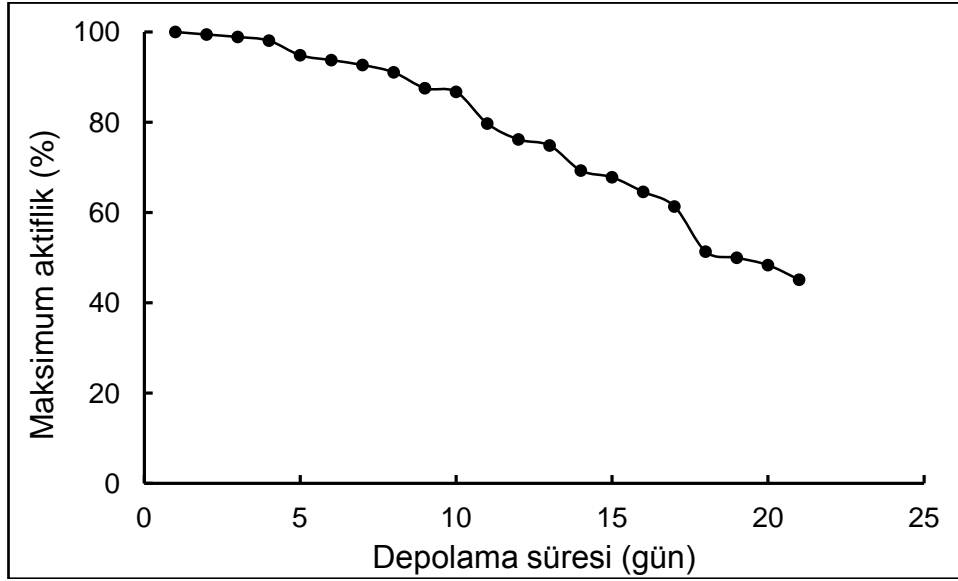


Şekil 4. 19. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Y-CC-L, depolanmasının 7. günü sonunda başlangıç aktifliğinin %80' ini; 14. günü sonunda %64' ünü ve 21. günü sonunda %41' ini korumuştur.

Siyanürik klorürle aktiveleştirilen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L aktifliğinin 21 gün depolama süresi ile değişimi Şekil 4.20' de gösterilmiştir.



Şekil 4. 20. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L, depolanmasının 7. günü sonunda başlangıç aktifliğinin %92' sini; 14. günü sonunda %70' ini ve 21. günü sonunda %45' ini korumuştur.

Grubumuzda daha önce *Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın 4°C' de depolanarak 7. günün sonunda başlangıç aktifliğinin %97' sini; 14. günün sonunda %95' ini; 21. günün sonunda %89' unu koruduğu bildirilmiştir [88]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, üç immobilize lakkazın da 21 gün depolanması süresince serbest lakkaza göre daha düşük aktivite gösterdiklerini göstermiştir. Immobilize lakkazların aktifliklerini depolama süresince daha hızlı kaybetmeleri üzerinde, selülozun manyetik çekirdeklerinin ve enzim yapısının etkili olmuş olabileceği düşünülmektedir. Analitik ve endüstriyel uygulamalarda, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L' in 1 hafta içerisinde kullanılmasının daha uygun olabileceği söylenebilir.

Literatürde, manyetik selülozik mikrokürelere kovalent bağlanma ile galaktoz oksidaz ve nörominidaz enzimlerinin immobilize edildiği bir çalışmada, immobilize enzimlerin depolanmasının 21. günü sonucunda, immobilize galaktoz oksidazın başlangıç aktifliğinin %89' unu, immobilize noraminidazın

ise başlangıç aktifliğinin ancak %2' sini koruduğu bildirilmiştir. Manyetik selülozik destek üzerine immobilize olan nöronaminidazın aktiflik kaybının, manyetik çekirdeklerin toksik etki yaratmasından kaynaklandığı ancak farklı enzimler için bu etkinin aynı olmadığı belirtilmiştir [12]. Grubumuzda daha önce  $Fe_3O_4$  nanoparçacıkları kitosanla kaplanmış *Trametes versicolor* kaynaklı lakkaz bu nanoparçacıklara adsorpsiyonla ve siyanürük klorür ile aktifleştirildikten sonra kovalent bağlanma yöntemleri ile immobilize edilmiş ve immobilize lakkazlar için depolanmalarının 7. günü sonunda başlangıç aktifliklerini sırasıyla %98 ve %87' sini koruduğu bulunmuştur [87].

#### 4.5.4. İmmobilize lakkazların aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Enzim ile substrat arasındaki tepkime aşağıdaki gibidir:



Burada, E, enzim; S, substrat; ES, enzim-substrat kompleksi ve  $\ddot{U}$ , ürünü göstermektedir.

Enzimatik bir tepkimenin hızı, aşağıda gösterilen Michaelis-Menten eşitliği ile verilir:

$$V = (V_{\text{mak}} \times [S]) / K_m + [S] \quad (4.3)$$

Bu eşitlikte, V, tepkimenin başlangıç hızını;  $V_{\text{mak}}$ , maksimum hızı;  $K_m$ , Michaelis-Menten sabitini; [S], substrat derişimini göstermektedir. Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ), aşağıda verilmiştir:

$$K_m = (k_2 + k_3) / k_1 \quad (4.4)$$



Michaelis-Menten eşitliğinin (Eş. 4.3) düzenlenmesi ile aşağıdaki Lineweaver-Burk eşitliği elde edilir:

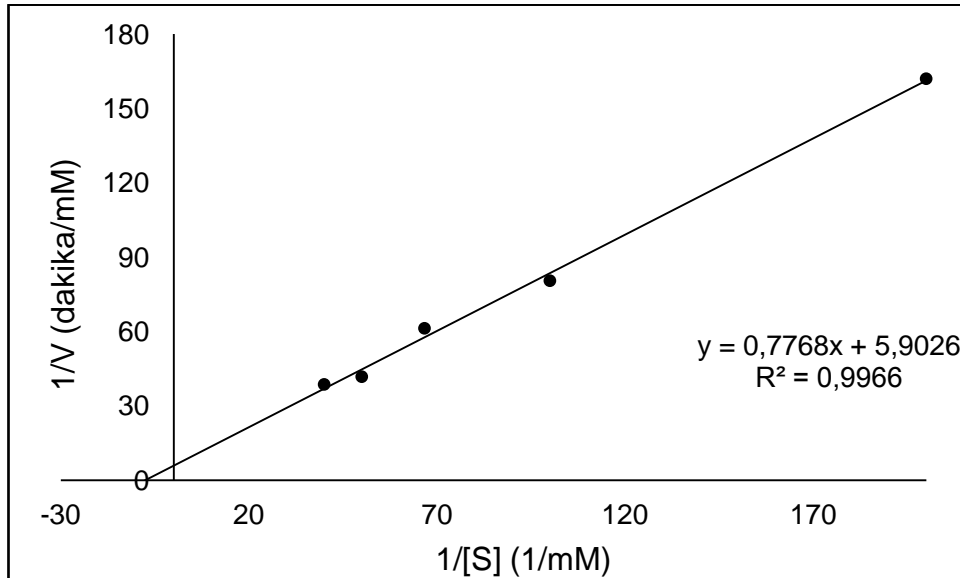
$$1/V = (K_m / V_{\text{mak}}) \times 1/[S] + 1/V_{\text{mak}} \quad (4.5)$$

Bu eşitliğe göre,  $1/[S]$  değerlerine karşı,  $1/V$  değerleri grafiğe geçirildiğinde, bir doğru elde edilir. Doğrunun y eksenini kestiği nokta  $1/V_{\text{mak}}$  değerine; eğimi  $K_m / V_{\text{mak}}$  değerine eşittir.

Bu çalışmada, immobilize lakkazların aktifliğine substrat derişiminin etkisi, 0,005-0,025 mM ABTS derişimi aralığında incelenmiş ve  $1/[S]$  değerlerine karşı  $1/V$  değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile her bir enzim için Lineweaver-Burk grafiğı oluşturulmuştur. Bu grafiklerden immobilize lakkazların  $V_{\text{mak}}$ ,  $K_m$  ve katalitik etkinlik ( $V_{\text{mak}}/K_m$ ) değerleri hesaplanmıştır.

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz aktifliğinin substrat derişimi ile değışimi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L için Lineweaver-Burk grafiğı Şekil 4.21' de gösterilmiştir.

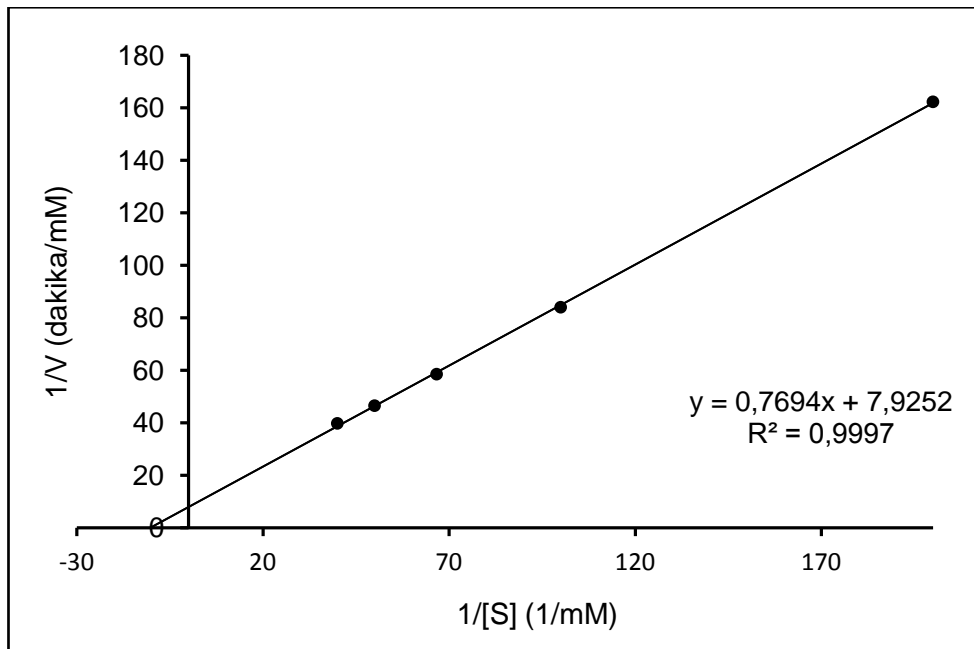


Şekil 4. 21. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L için Lineweaver-Burk grafiğı

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-L}$  için  $K_m = 13,10 \times 10^{-2}$  mM,  $V_{\text{mak}} = 16,90 \times 10^{-2}$  mM/dakika bulunmuş ve  $V_{\text{mak}}/K_m = 1,28$  dakika<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.

Yükseltgenen  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz aktifliğinin substrat derişimi ile değişimi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-Y-L}$ ' in Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.22' de gösterilmiştir.

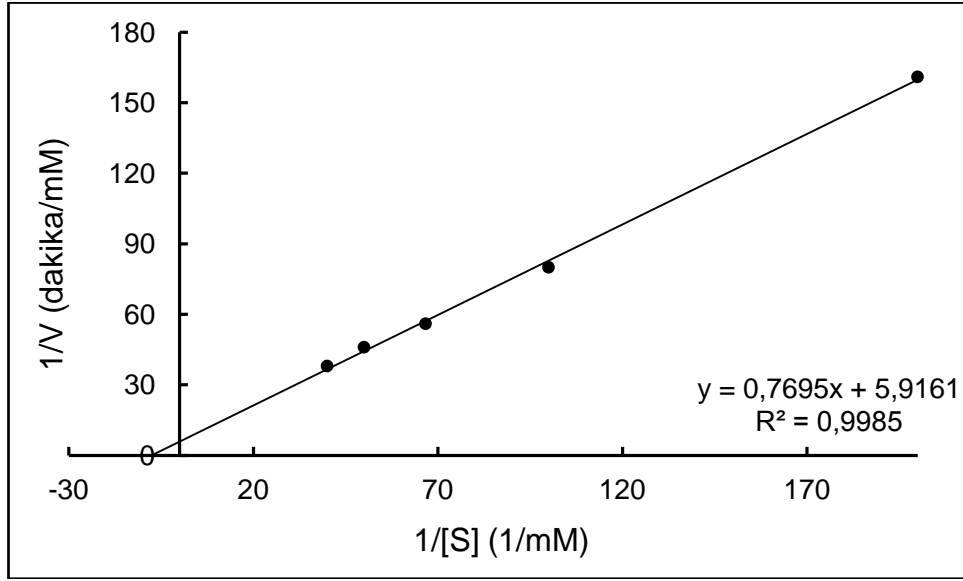


Şekil 4. 22.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-Y-L}$  için Lineweaver-Burk grafiği

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Y-CC-L}$  için  $K_m = 9,71 \times 10^{-2}$  mM ve  $V_{\text{mak}} = 12,61 \times 10^{-2}$  mM/dakika ve  $V_{\text{mak}}/K_m = 1,29$  dakika<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.

Siyanürik klorürle aktifleştirilen  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz aktifliğinin substrat derişimi ile değişimi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-SC-L}$ ' in Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.23' te gösterilmiştir.



Şekil 4. 23. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L için Lineweaver-Burk grafiği

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L için  $K_m = 13,00 \times 10^{-2}$  mM ve  $V_{\text{mak}} = 16,90 \times 10^{-2}$  mM/dakika ve  $V_{\text{mak}}/K_m = 1,3$  dakika<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.

#### İmmobilize lakkazların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi

Çizelge 4. 1. İmmobilize lakkazların kinetik parametreleri  $K_m$ ,  $V_{\text{mak}}$  ve  $V_{\text{mak}}/K_m$ ' nin değerleri

	$K_m$ (mM)	$V_{\text{mak}}$ (mM/dakika)	$V_{\text{mak}}/K_m$ (dakika <sup>-1</sup> )
Serbest lakkaz, L	$5,69 \times 10^{-2}$	$7,70 \times 10^{-2}$	1,35
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-L	$13,10 \times 10^{-2}$	$16,90 \times 10^{-2}$	1,28
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-Y-L	$9,71 \times 10^{-2}$	$12,61 \times 10^{-2}$	1,29
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-SC-L	$13,00 \times 10^{-2}$	$16,90 \times 10^{-2}$	1,3

Michaelis-Menten sabiti,  $K_m$ , enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür.  $K_m$ , enzimin elde edildiği kaynağa, çalışılan substrat derişim aralığına ve sıcaklığa bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Enzim immobilize edildiğinde,  $K_m$  değeri artabilir ya da azalabilir. İmmobilize enzimin  $K_m$  değerinin serbest enzime göre azalması, serbest enzime göre daha hızlı

tepkime verme eğiliminde olduğunu; artması ise, serbest enzimle aynı reaksiyon hızına sahip olması için daha fazla miktarda substrata ihtiyacı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada  $Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L için  $K_m$  değerleri serbest lakkaza göre sırasıyla, 2,19, 1,70 ve 2,18 kat artmıştır.  $K_m$ ' nin artması üzerinde, immobilize enzim-substrat kompleksinin oluşma ihtimalini düşüren protein molekülündeki konformasyonel değişimler ve sterik engellemeler rol oynamaktadır [107].

$Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L' in katalitik etkinlik değerleri 1,28, 1,29 ve 1,3 olarak bulunmuştur. Immobilize sistemlerin katalitik etkinliğinin serbest lakkaza göre az da olsa azalış göstermesi, immobilize enzimlerin substratı katalizleme etkinliğinin enzimin 3-boyutlu yapısında meydana gelen değişimler nedeniyle olduğu şeklinde yorumlanabilir. Grubumuzda daha önce  $Fe_3O_4$  nanoparçacıkları kitosanla kaplanmış, *Trametes versicolor* kaynaklı lakkaz bu nanoparçacıklara adsorpsiyonla ve siyanürik klorür ile aktiveleştirildikten sonra kovalent bağlanma yöntemleri ile immobilize edilmiş ve sırasıyla katalitik etkinlikleri 1,31 ve 1,24 olarak bulunmuştur [87].

Literatürde, *Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın selüloz kaplı manyetik mikrokürelere kovalent bağ ile immobilizasyonunda ABTS substratına karşı  $K_m = 0,0337$  mM ve  $V_{mak} = 1,98 \times 10^{-4}$  mM/dakika olarak bildirilmiştir [83]. Literatürde bir başka çalışmada, *Cerrena unicolor*, *Trametes hirsuta* ve *Pycnoporus sanguineus*' dan elde edilen serbest lakkazların ABTS substratına karşı farklı deney koşullarındaki  $K_m$  değerleri sırasıyla 0,183 mM [108],  $7,5 \times 10^{-2}$  mM (75  $\mu$ M) [109] ve  $3,68 \times 10^{-2}$  mM (36,8  $\mu$ M) olarak bildirilmiştir [110].

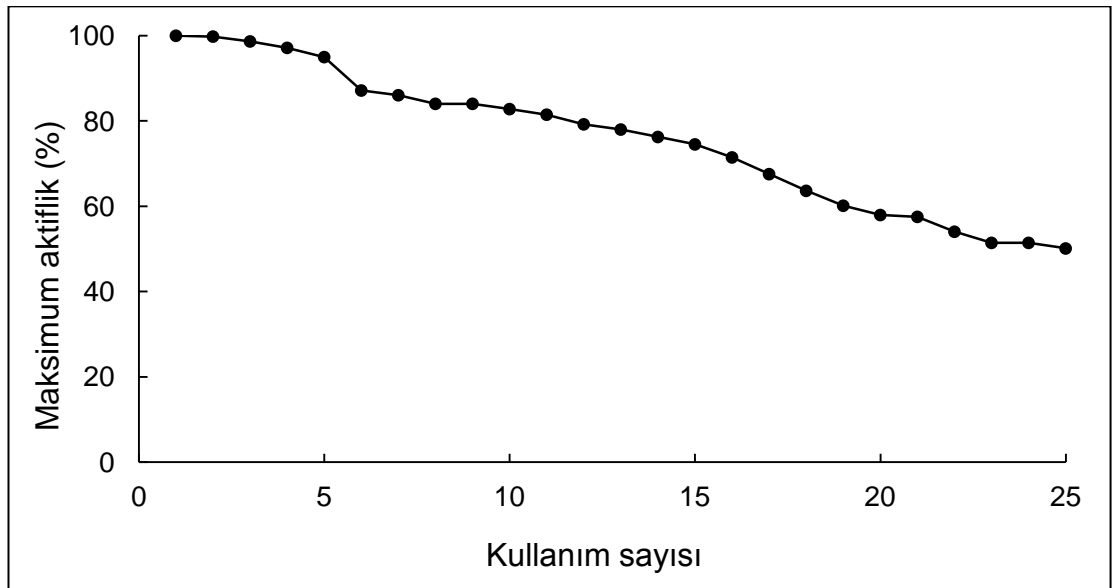
#### 4.5.5. Immobilize lakkazların aktifliğine kullanım sayısının etkisi

Immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarda tekrar tekrar kullanıldıklarında aktifliklerini yitirmemeleri, en fazla aranan

özelliklerindedir.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarına adsorpsiyonla, yükseltgenerek kovalent bağlanma ve siyanürik klorürle aktifleştirerek kovalent bağlanma yöntemleri ile elde edilen immobilize lakkazların aktifliğine, kullanım sayısının etkisinin incelenmesi için, immobilize enzimler 1 gün içerisinde art arda 25 kez ABTS substratına karşı kullanılmış ve enzim aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi incelenmiştir.

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-L}$  aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Şekil 4.24' te gösterilmiştir.

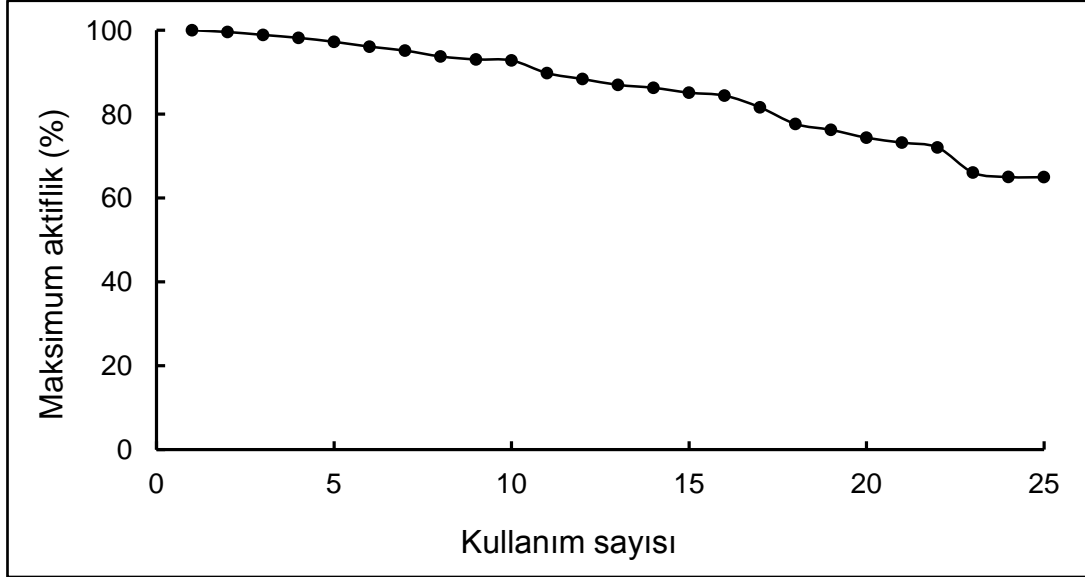


Şekil 4. 24.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-L}$  aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-L}$ , 1 gün içerisinde ABTS substratına karşı 10. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %81' ini, 20. kez kullanıldığında %58' ini, 25. kez kullanıldığında ise %50' sini koruyarak, tekrar tekrar kullanılabilmiştir.

Yükseltgenen  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-Y-L}$  aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Şekil 4.25' de gösterilmiştir.

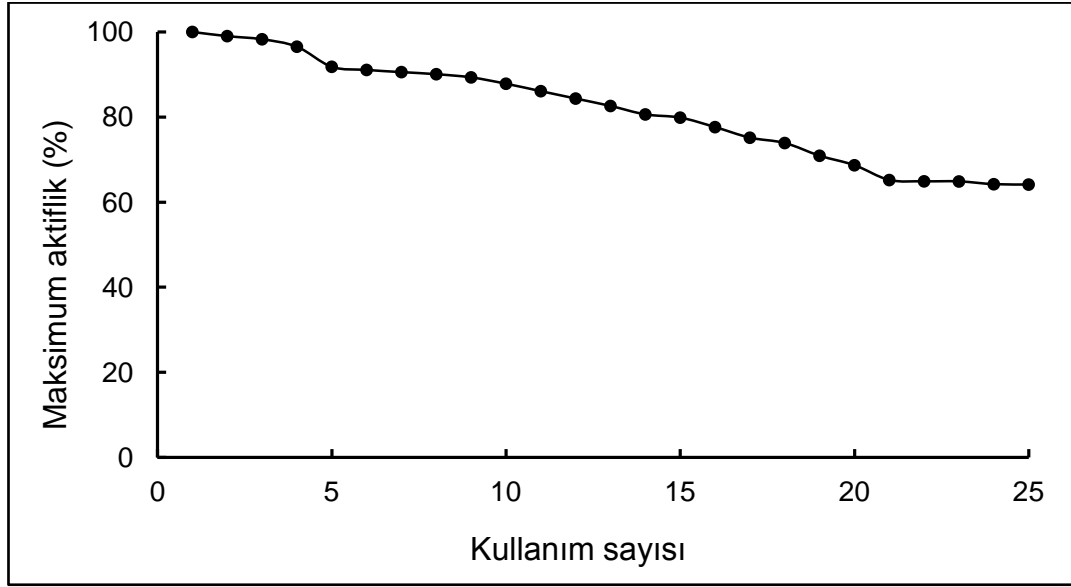


Şekil 4. 25.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-Y-L}$  aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-Y-L}$ , 10. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %92' sini 20. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %75' ini, 25. kullanımda ise %65' ini korumuştur.

Siyanürük klorürle aktifleştirilen  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC}$  nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CC-SC-L}$  aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Şekil 4.26' da gösterilmiştir.



Şekil 4. 26. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L, 10. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %87' sini 20. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %68' ini, 25. kullanımda ise %64' ünü korumuştur.

Literatürde, küspeden elde edilen selüloz lifleri sodyum periyodat ile yükseltgenmiş ve glukoamilaz kovalent bağlama ile immobilize edilmiştir. Immobilize lakkazın 30. kullanımda başlangıç aktifliğinin %65' ini koruduğunu bildirmişlerdir [102].

Grubumuzda daha önce, manyetik kitosan nanoparçacıklarına adsorpsiyon ile immobilize edilen lakkazın, 1 gün içerisinde ABTS substratına karşı 10. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %85' ini, 20. kez kullanıldığında %76' sını, 25. kez kullanıldığında ise %71' ini koruduğunu bildirmişlerdir. Kitosan kaplı manyetik nanoparçacıklara siyanürik klorürle aktiveleştirildikten sonra kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkazın, 10. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %86' sını, 20. kez kullanıldığında %86' sını, 25. kez kullanıldığında %85 koruduğunu belirtmişlerdir [87].

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ters-faz süspansiyon metodu ile manyetit  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarının yüzeyi selülozla kaplanmıştır.

$Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının TEM görüntüleri, XRD sonuçları ve  $\zeta$ -potansiyel analizleri ile boyutlarının 50 nm' nin altında olduğu ve  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının 5,0-7,0 nm kalınlığında selüloz tabakasıyla kaplandığı belirlenmiştir. FT-IR analizleri, selülozun bu nanoparçacıkların yapısına katıldığını; XRD analizleri  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarının selülozla kaplandıktan sonra spinel yapısının değişmediğini;  $\zeta$ -potansiyel analizleri  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının pl değerinin 2,71 olduğunu göstermiştir. EPR analizi ile,  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının paramanyetik özellikte olduğu ve  $Fe^{3+}$  kationunun düşük spin kompleksine uyduğu belirlenmiştir.  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının VSM sonuçlarından  $\sigma_s$  değeri 45 emu/g bulunmuş ve  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarının süperparamanyetik özellik gösterdikleri belirlenmiştir.

Lakkaz enzimi,  $Fe_3O_4$ -CC nanoparçacıklarına adsorpsiyonla, yükseltgenerek ve siyanürik klorürle aktifleştirerek kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilmiştir. SEM/EDS analizleri,  $Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L sistemlerinin lakkaz enzimini içerdiğini göstermiştir.

$Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L için optimum pH 3,5 ve optimum sıcaklık 40°C bulunmuştur.

$Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L 10-65 °C sıcaklık aralığında endüstriyel ve analitik uygulamalarda serbest lakkaza göre çok daha yüksek bir aktiflikle kullanılabilir oldukları belirlenmiştir.

$Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L' in depolanmalarının 7. günü sonunda başlangıç aktifliklerinin %90, %80 ve %92' sini korumuşlardır.



İmmobilize enzim sistemleri yaklaşık 1 hafta içerisinde, yüksek bir aktiflikle kullanılabilir oldukları belirlenmiştir.

$Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L için katalitik etkinlikler serbest lakkazinkine çok yakın ve sırasıyla 1,28, 1,29, 1,30 olarak bulunmuştur.

$Fe_3O_4$ -CC-L,  $Fe_3O_4$ -CC-Y-L ve  $Fe_3O_4$ -CC-SC-L' in, ABTS substratına karşı 1 gün içerisinde 25 kez kullanıldıklarında başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %50, %65 ve %64' ünü korudukları gözlenmiştir. Dolayısıyla, hazırlanan immobilize lakkaz sistemleri, yüksek bir aktiflikle tekrar tekrar kullanılabileceği yorumu yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. İnternet : Bilişim 2023 Derneği “Türkiye’ de Nanoteknoloji” [http://bilisim2023.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=66:nano-teknoloj&catid=7:goerueler&Itemid=18](http://bilisim2023.org/index.php?option=com_content&view=article&id=66:nano-teknoloj&catid=7:goerueler&Itemid=18) (2005).
2. Correa, J. R., Bordallo, E., Canetti, D., León, V., Otero-Diaz, L. C., Negro, C., Gómez, A., Sáez-Puche, R., "Structure and superparamagnetic behaviour of magnetite nanoparticles in cellulose beads", **Materials Research Bulletin**, 45: 946-953 (2010).
3. Gupta, A. K., Gupta, M., "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications", **Biomaterials**, 26: 3995-4021 (2005).
4. Salata, O. V., "Applications of nanoparticles in biology and medicine", **Journal of Nanobiotechnology**, 2: 3-8 (2004).
5. Safarik, I., Safarikova, M., "Magnetic nanoparticles in biosciences", **Monatshefte für Chemie**, 133: 737-759 (2002).
6. Liu, X., Qiyang, H., Zhen, F., Xiaojun, Z., Beibei, Z., "Magnetic chitosan nanocomposites: A useful recyclable tool for heavy metal ion removal", **Langmuir**, 25: 3-8 (2009).
7. Horak, D., Babic, M., Mackova, H., Banes, M. J., "Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations", **Journal of Separation Science**, 30: 1751-1772 (2007).
8. Tartaj, P., del Puerto Morales, M., Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzalez-Carreno, T., Serna C. J., "The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine", **Journal of Physics D: Applied Physics**, 36: 182-189 (2003).
9. Selim, K. M. K., Ha, Y.-S., Kim S.-J., Chang, Y., Kim, T.-J., Lee, G. H., Kang, I.-K., "Surface modification of magnetite nanoparticles using lactobionic acid and their interaction with hepatocytes", **Biomaterials**, 28: 710-716 (2007).
10. İman, A., Çelebi, S. S., Özdural, A. R., "Preparation of photooxidized magnetic polystyrene beads for enzyme immobilization", **Reactive Polymers**, 17: 325-330 (1992).
11. Tanyolaç, D., Özdural, A. R., "Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads", **Reactive & Functional Polymers**, 45: 235-242 (2000).

12. Bilkova, Z., Slov kov , M., Hor k, D., Lenfeld, J., Churayek, J., "Enzymes immobilized on magnetic carriers: efficient and selective system for protein modification", *Journal of Chromatography B*, 770: 177-181 (2002).
13. Liu, X., Guan, Y., Shen, R., Liu, H., "Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads", *Journal of Chromatography B*, 822: 91-97 (2005).
14. Zhang, S., Gao, S., Gao, G., "Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase onto magnetic beads", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160 (5):1386-1393 (2009).
15. Liao, M.-H., Chen, D.-H., "Fast and efficient adsorption/desorption of protein by a novel magnetic nano-adsorbent", *Biotechnology Letters*, 24: 1913-1917 (2002).
16. Zhao, M., Wang, W., Yang, C., "Immobilization of laccase by surface modified magnetic nanoparticles", *Journal of Biotechnology*, 136: S435 (2008).
17. Yong, Y., Bai, Y., Yanfeng, L., Lin, L., Cui, Y., Xia, C., "Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilization", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 320: 2350-2355 (2008).
18. Konwarh, R., Karak, N., Rai, S. K., Mukherjee, A. K., "Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase", *Nanotechnology*, 20: 1-10 (2009).
19. Wu, Y., Wang, Y., Luo, G., Dai, Y., "In situ preparation of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution", *Bioresource Technology*, 100: 3459-3464 (2009).
20. Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U. T., "Biocatalysis and Enzyme Technology", *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim, 2,30, 197-227,243-275 (2005).
21. Worsfold, P. J., "Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes" (Technical report), *Pure Applied Chemistry*, 67: 597-600 (1995).
22. Sheldon, R. A., "Enzyme immobilization: The quest for optimum performance", *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349: 1289-1307 (2007).

23. Bayrak, M., "Temel Elektrik ve Mağnetizma", **Atlas Yayın Dağıtım**, İstanbul, 13-15 (2002).
24. Jiles, D., "Introduction to Magnetism and Magnetic Materials 2nd ed.", **Taylor & Francis**, Boca Raton, 44, 86, 68-71, 94, 95, 228, 234-237, 376 (1997).
25. Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., Dobson, J., "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine", **Journal of Physics D: Applied Physics**, 36: 167-181 (2003).
26. Bushcow, K. J. H., "Physics of Magnetism and Magnetic Materials", **Kluwer Academic /Plenum Publishers**, New York, 77 (2003).
27. Emen, F., "+3 Değerli Demir ve Nikel İyonları İçeren  $\text{LiFe}^{1-x}\text{Ni}_x\text{O}_2$  Bileşiklerinin Manyetik Özellikleri", Doktora Tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Fizik Anabilim Dalı, 59 (2005).
28. Sivudu, K. S., Rhee, K. Y., "Preparation and characterization of pH-responsive hydrogel magnetite nanocomposite", **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 349: 29–34 (2009).
29. Luo, X., Zhang, L., "High effective adsorption of organic dyes on magnetic cellulose beads entrapping activated carbon", **Journal of Hazardous Materials**, 171: 340-347 (2009).
30. Yuan, Q., Williams, R. A., "Large scale manufacture of magnetic polymer particles using membranes and microfluidic devices", **China Particuology**, 5: 26-42 (2007).
31. Gao, Z., Zhang, Q., Cao, Y., Pan, P., Bai, F., Bai G., "Preparation of novel magnetic cellulose microsphere via cellulose binding domain-streptavidin linkage and use for mRNA isolation from eukaryotic cells and tissues", **Journal of Chromatography A**, 1216: 7670-7676 (2009).
32. Tüzün, C., "Enzimler", Biyokimya, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 81-82 (2002).
33. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Menteş, G., Ersöz, B., "Harper'ın Biyokimyası", **Barış Kitabevi**, 73-74, 341-349 (1993).
34. Öztan, D., "Tirozinaz enziminin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve fenollerin gideriminde kullanımı", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 11-14 (2007).
35. Bickerstaff, G. F., "Immobilization of enzymes and cells", **Humana Press**, Totowa, New Jersey, 33 : 5-9, 199-205 (1997).

36. Zaborsky, O., "Immobilized enzymes", **1-3 CRC Pres**, Ohio, 58 : 287- 292 (1974).
37. Telefoncu, A., "İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri", **Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu**, İzmir, 193-249 (1986).
38. Shan, Y., Shan, D., "Immobilized enzymes; industrial biocatalysts", **Indian Journal of Hospital Pharmacy**, 29 (2) : 51-58 (1992).
39. Trevon, M. D., "Tecniques of Immobilization in Immobilized Enzyme", **John Wiley and Sons**, New York, 1-11 (1985).
40. Monsan, P., Combes, D., "Enzyme Stabilization by Immobilization, Methods in Enzymology", **Academic Press**, New York, 137 (1988).
41. Kaetsu, I., Kumakura, M., Yoshida, M., "Enzyme immobilization by radiation Induced polymerization of HEMA at low temperature", **Biotechnology and Bioengineering**, 21: 847-849 (1979).
42. Yıldız, H. B., Kıralp, S., Toppare, L., Yağcı, Y., " Immobilization of invertase in conducting polypyrrole/PMMA-co-PMTM graft copolymers", **Journal of Applied Polymer Science**, 96: 502-507 (2005).
43. Chen, S., Liu, Y., Yu, P., "Study on column reactor of chitosan immobilized", **Chemical Abstracts**, 127 (4): 127-129 (1996).
44. Zaborsky, O., "Adsorption Immobilized Enzyme", Ed. by Weast, R. C., **CRC Press**, Ohio, 75-78 (1973).
45. Bachman, S., Gebicka, M. L., Gasyna, Z., " Some properties of whole-cell glucose isomerase immobilized in polyacrylamide gel by radiation", **Inter Science**, 33 (11): 366 – 369 (2006).
46. Kara, F., "Üreazın aljinat/kitosan polielektrolit ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/K-karragenan interpolimer komplekslerine immobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 16 (2006).
47. İnam, R., Çaykara, T. and Özyürek, C., "Polarographic determination of uranyl ion adsorption on poly(2-hydroxyethyl methacrylate-itaconic acid) hydrogels", **Separation Science and Technology**, 36 (7) : 1451-1461 (2001).
48. Şahin, E., "Poli(metil metakrilat-2-hidroksietilmetakrilat) mikroboncuklarına kovalent bağlanma ile glukoz izomerazın immobilizasyonu", **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, 15-22, (2007).

49. Carr, P. W., Bowers, L. D., "Support considerations in chemical analysis", Enzymes, **Academic Press**, New York, 56: 167-170 (1980).
50. Glick, D., "Methods of biochemical analysis", Enzyme Immobilization, **Academic Press**, New York, 25: 135-201 (1979).
51. Srere, P. A., Uyeda, K., "Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices", Methods in Enzymology, (Edited by Mosbach, K.), **Academic Press Inc.**, New York, 44: 11-19 (1976).
52. Namdeo, M., Bajpai, S. K., "Immobilization of  $\alpha$ -amylase onto cellulose-coated magnetite (CCM) nanoparticles and preliminary starch degradation study", **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 59: 134-139 (2009).
53. Saçak, M., "Lif ve Elyaf Kimyası", **Gazi Kitabevi**, Ankara, 106-120 (2002).
54. Saçak, M., "Polimer Teknolojisi", **Gazi Kitabevi**, Ankara, 10-11 (2005).
55. Erkoç, Ş., "Nanobilim ve Nanoteknoloji", **ODTÜ Yayıncılık**, Ankara, 72-77 (2008).
56. Skoog, D. A., Holler, J. F., Nieman, T. A., Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., "Enstrümantal Analiz İlkeleri", **Bilim Yayıncılık**, Ankara, 272-296 (1998).
57. Tekerek, A. Ş., "LaMnSi<sub>2</sub> alaşımının nanoparçacıklarının manyetik ve yapısal özellikleri", Yüksek Lisans Tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 4,18 (2007).
58. Can, M. M., "Manyetik nanoparçacıkların fiziksel özelliklerinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 36, 39 (2005).
59. Li, G., Huang, K., Jiang, Y., Ding, P., Yang, D., "Preparation and characterization of carboxyl functionalization of chitosan derivative magnetic nanoparticles", **Biochemical Engineering Journal**, 40: 408-414 (2008).
60. Gündüz, T., "Enstrümantal Analiz", **Gazi Kitabevi**, Ankara, 509 (2004).
61. Demirbaş, Ö., "Kil mineralleri yüzeyine bazı biyomoleküllerin immobilizasyonu ve elektrokinetik özellikleri", Doktora Tezi, **Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Balıkesir, 38-40 (2006).

62. Korkmaz, E., "Eskişehir yöresi sepiyoliti' nin zeta potansiyellerinin tayini", Yüksek Lisans Tezi, **Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Eskişehir, 28-32 (2008).
63. Teja, A. S., Koh, P. Y., "Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles", **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, 55: 22-45 (2009).
64. Suh, W. H., Suslick, K. S., Stucky, G. D., Suh, Y. H., "Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience", **Progress in Neurobiology**, 87: 133-170 (2009).
65. Taylor, P. B., Ashman, S., Baddeley, M. S., Bartram, L. S., "Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases", **Journal of Biomolecular Screening**, 7 : 537-543 (2002).
66. Ikehata, K., Buchanan, I. D., Smith D. W., "Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment", **Journal of Environmental Engineering and Science**, 3: 1-19 (2004).
67. Delanoy, G., Li, Q. X., Yu, J., "Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan.", **International Journal of Biological Macromolecules**, 35: 89-95 (2005).
68. Birhanlı, E., "Mikroorganizmaların lakkaz üretimine çeşitli faktörlerin etkisi", Yüksek Lisans Tezi, **İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Malatya, 37- 44 (2003).
69. Cai, W., Martin, R., Lemaure, B., Leuba, J. L., Petiard, V., "Hydroxy-indoles: a new class of laccase substrates", **Plant Physiology and Biochemistry**, 31: 441–445 (1993).
70. Tuncer, M., "Lakkaz, Kısım 1: Yapısı, Katalitik Özellikleri ve Dağılımları", **Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 22:19-63 (2009).
71. Claus, H., "Laccases and their occurrence in prokaryotes", **Archives of Microbiology**, 179:145–150 (2003).
72. Bourbonnais, R., Paice, M. G., "Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2' azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)", **Applied Microbiology and Biotechnology**, 36: 823-827 (1992).
73. Minnussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, L., Pastore, G. M., Duran, N., "Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase", **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 45: 102-107 (2007).

74. Berrio, J., Plou, F. J., Ballesteros, A., Martínez, Á. T., Martínez, M. J., "Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit C: Stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters", ***Biocatalysis and Biotransformation***, 25: 130-134 (2007).
75. Arık, B., Ekmekçi Körlü, A., Duran, K., "Lakkaz enzimlerinin tekstilde kullanım alanları", ***Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi***, 2: 17-22 (2008).
76. Solís-Oba, M., Ugalde-Saldívar, V. M., Gonzalez, I., Viniegra González, G., "An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2"-azino-bis-(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase", ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, 579: 59-66 (2005).
77. Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T., "Preparation of fine magnetic particles and application for enzyme immobilization", ***Biocatalysis***, 5: 61-69 (1991).
78. Guo, Z., Bai, S., "Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres", ***Enzyme and Microbial Technology***, 32: 776-782 (2003).
79. Zhu, Y., Kaskel, S., Shi, J., Wage, T., van Pée, K.-H., "Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetically separable mesoporous silica spheres", ***Chemistry of Materials***, 19: 6408-6413 (2007).
80. Zhou, J., Li, R., Liu, S., Li, Q., Zhang, L., Zhang L., Guan, J., "Structure and magnetic properties of regenerated cellulose/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite films", ***Journal of Applied Polymer Science***, 111: 2477-2484 (2009).
81. Yong, Y., Bai, Y., Yanfeng, L., Lin, L., Cui, Y., Xia, C., "Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilization", ***Journal of Magnetism and Magnetic Materials***, 320: 2350-2355 (2008).
82. Small, A. C., Johnston, J. H., "Novel hybrid materials of magnetic nanoparticles and cellulose fibers", ***Journal of Colloid and Interface Science***, 331: 122-126 (2009).
83. Rotková, J., Šuláková, R., Korecká, L., Zdražilová, P., Jandová, M., Lenferd, J., Horák, D., Bílková, Z., "Laccase immobilized on magnetic carriers for biotechnology applications", ***Journal of Magnetism and Materials***, 321: 1335-1340 (2009).
84. Liao, H., Chen, D., Yuan, L., Zheng, M., Zhu, Y., Liu, X., "Immobilized cellulase by polyvinyl alcohol/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic nanoparticle to degrade



- microcrystalline cellulose", *Carbohydrate Polymers*, 82: 600-6004 (2010).
85. Nkansah, M. K., Thakral, D., Shapiro, E. M., "Magnetic poly(lactide-co-glycolide) and cellulose particles for MRI-Based cell tracking", *Magnetic Resonance in Medicine*, 65: 1776-1785 (2011).
86. Katepetch, C., Rujiravanit, R., "Synthesis of magnetic nanoparticle into bacterial cellulose matrix by ammonia gas-enhancing *in situ* co-precipitation method", *Carbohydrate Polymers*, 86: 162-170 (2011).
87. Kalkan, N. A., Aksoy, S., Aksoy, E.A., Hasirci, N., "Preparation of Chitosan-Coated Magnetite Nanoparticles and Application for Immobilization of Laccase", *Journal of Applied Polymer Science*, 123: 707-716 (2012).
88. Deng, J., Peng, Y., He, C., Long, X., Li, P ve Chan, A., "Magnetic and conducting Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-polypyrrole nanoparticles with core-shell structure", *Polymer International*, 52: 1182-1187 (2003).
89. Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254 (1976).
90. Zhao, D.-L., Wang, X.-X., Zeng, X.-W., Xia, Q.-S., Tang, J.-T., "Preparation and inductive heating property of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan composite nanoparticles in an AC magnetic field for localized hyperthermia", *Journal of Alloys and Compounds*, 477: 739-743 (2009).
91. Yamamura, M., Camilo, R. L., Sampai, L. C., Macedo, M. A., Nakamura, M., Toma, H. E., "Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 279: 210-217 (2004).
92. Kalkan, N. A., Aksoy, S., Aksoy, E. A., Hasirci, N., "Adsorption of Reactive Yellow 145 onto chitosan coated magnetite nanoparticles", *Journal of Applied Polymer Science*, (2011).
93. Peniche, H., Osorio, A., Acosta, N., Campa, A. De la, Peniche, C., "Preparation and Characterization of Superparamagnetic Chitosan Microspheres: Application as a Support for the Immobilization of Tyrosinase", *Journal of Applied Polymer Science*, 98: 651-657 (2005).
94. Pich, A., Bhattacharya, S., Ghosh, A., Adler, H.-J. P., "Composite magnetic particles: 2. Encapsulation of iron oxide by surfactant-free emulsion polymerization", *Polymer*, 46: 4596-4603 (2005).

95. Kang, B., Chang, S., Dai, Y., Chen, D., "Radiation synthesis and magnetic properties of novel Co<sub>0.7</sub>Fe<sub>0.3</sub>/Chitosan compound nanoparticles for targeted drug carrier", *Radiation Physics and Chemistry*, 76: 968-973 (2007).
96. Köseoğlu, Y., "Effect of surfactant coating on magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: ESR study", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 300: 327-330 (2006).
97. Sayar, F., Güven, G., Pişkin, E., "Magnetically loaded poly(methyl methacrylate-co-acrylic acid) nano-particles", *Colloid and Polymer Science*, 284: 965-978 (2006).
98. Güven, G., "Eş boyutlu katyonik fonksiyonel grup içeren/içermeyen manyetik yüklü nanopartiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve nükleik asit uygulamaları", Doktora Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 134-138 (2005).
99. Erdem, Ç., "Enzim immobilizasyonu için manyetik polimerik taşıyıcıların hazırlanması ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 61,62 (2007).
100. Swartz, H. M., Bolton, J. R., Borg, D. C., "Biological Applications of Electron Spin Resonance", *Wiley*, New York, (1972).
101. Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T., "Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers", *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 37663-37669 (2002).
102. Varavinit, S., Chaokasem, N., Shobsngob, S., "Covalent immobilization of a glucoamylase to bagasse dialdehyde cellulose", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(7): 721-725 (2001).
103. Pich, A., Bhattacharya, S., Adler, H.-J. P., Wage, T., Taubenberger, A., Li. Z., van Pee, K.-H., Böhmer, U., Bley, T., "Composite magnetic particles as carriers for laccase from *Trametes versicolor*", *Macromolecular Biosciences*, 6: 301-310 (2006).
104. Yinghui, D., Qiuling, W., Shiyu, F., "Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier", *Letters in Applied Microbiology*, 35: 451-456 (2002).
105. Altinok, H., Aksoy, S., Tümtürk, H., Hasirci, N., "Covalent immobilization of invertase on chemically activated poly(2-hydroxyethyl

- methacrylate) microbeads”, *Russian Chemical Bulletin*, 55: 1860-1864 (2006).
106. Kalkan, N. A., “Kitosan kaplı manyetik nanoparçacıkların lakkaz immobilizasyonunda ve reaktif boyarmadde adsorpsiyonunda kullanılması”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, (2010).
107. Georgieva, S., Godjevargova, T., Portaccio, M., Lepore, M., Mita, D. G., “Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 55: 177-184 (2008).
108. Bryjak, J., Kruczkiewicz, P., Rekúć, A., Peczyńska-Czoch, W., “Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate”, *Biochemical Engineering Journal*, 35: 325-332 (2007).
109. Almansa, E., Kandelbauer, A., Pereira, L., Cavaco-Paulo, A., Guebitz, G. M., “Influence of structure on dye degradation with laccase mediator systems”, *Biocatalysis and Biotransformation*, 22: 315-324 (2004).
110. Jiang, D.-S., Long, S.-Y., Huang, J., Xiao, H.-Y., Zhou, J.-Y., “Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres”, *Biochemical Engineering Journal*, 25: 15-23 (2005).

**EKLER**

EK-1 Manyetik terimlerin sembolleri, CGS ve SI sistemindeki birimleri  
ve çevirme faktörleri

Çizelge. 1.1. Manyetik terimlerin sembolleri, CGS ve SI sistemindeki birimleri  
ve çevirme faktörleri

Manyetik terim	Sembol	SI birimi	CGS birimi	Çevirme faktörü
Mıknatıslanma	M	A/m	emu/cm <sup>3</sup>	1 A/m = 10 <sup>-3</sup> emu/cm <sup>3</sup>
Manyetik moment	<i>m</i>	Am <sup>2</sup>	emu	1 Am <sup>2</sup> = 10 <sup>3</sup> emu
Kütle mıknatıslanması	$\sigma$	Am <sup>2</sup> /kg	emu/g	1 Am <sup>2</sup> /kg = 1 emu/g
Manyetik indüksiyon	B	T	G	1T=10 <sup>4</sup> G
Manyetik alan	H	A/m	Oe	1 A/m = 4 $\pi$ /10 <sup>3</sup> Oe
Boşluğun manyetik geçirgenliği	$\mu_0$	H/m	birimsiz	4 $\pi$ x10 <sup>-7</sup> H/m = 1 (CGS)
A = Amper, emu = elektromanyetik birim, T = Tesla, G = Gauss, H = Henry, Oe = Oersted				

## EK-2 Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

### ABTS çözeltisi

0,0275 g ABTS, 50 mL FST içerisinde çözülmüş (1,0 mM) ve bu çözeltiden 12,5 mL alınarak, FST ile 50 mL' ye tamamlanmıştır (0,25 mM). Çözeltiler 0°C' de buz içerisinde ışıktan korunaklı olarak saklanmış ve 24 saat içerisinde kullanılmıştır.

### Asetik asit çözeltisi

5,0 mL asetik asit saf suyla 100 mL' ye tamamlanmıştır (%5,0 v/v).

### Fosfat tamponu (FT)

0,27 mL fosforik asit alınarak deiyonize suyla hacmi 100 mL' ye tamamlanmıştır. 2,0 M sodyum hidroksit kullanılarak, ortam pH' sı 6,0' ya ayarlanmıştır (0,04 M; pH 6,0).

### Fosfat-sitrat tamponu (FST)

5,2535 g sitrik asit monohidrat; deiyonize suyla 250 mL' ye tamamlanmıştır (0,1 M), (A). 13,4035 g sodyum hidrojen fosfat heptahidrat deiyonize suyla 250 mL' ye tamamlanmıştır (0,2 M), (B).

24,3 mL (A) ve 25,7 mL (B) çözeltilerinden alınarak deiyonize suyla 100 mL ye tamamlanmış ve bu çözeltilerin eklenmesiyle pH değeri 5,0'e ayarlanmıştır (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat; pH 5,0).

## EK-2 (Devam) Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

### Lakkaz çözeltisi

a) 0,1000 g lakkaz enzimi 100 mL FT' da (0,04 M; pH 6,0) çözülmüştür ve lakkaz immobilizasyonunda kullanılmıştır (1,0 mg/mL).

### Selüloz (CC) çözeltisi

0,6 g NaOH ve 0,4 g üre saf su ile 10 mL' ye tamamlanmıştır. NaOH/üre çözücü sisteminde 0,25 g selüloz çözülmüş -10 C°' de 15 saat bekletilmiştir (%1,0 w/v).

### Siyanürik klorür (SC) çözeltisi

0,2500 g siyanürik klorür, 50 mL 1,4-dioksan içerisinde çözülmüştür (%0,5 w/v).

### Sülfürik asit çözeltisi

2,76 mL sülfürik asit alınarak 500 mL' ye saf su ile tamamlanmıştır (0,1 M).

EK-3 BSA kalibrasyon grafiğine ait veriler

Çizelge 3.1. BSA derişimi ile absorbans değişimi

<b>BSA derişimi (mg/mL)</b>	<b>Absorbans (A<sub>595</sub>)</b>
0	0
0,000454	0,025
0,000909	0,049
0,001360	0,068
0,001820	0,088



EK-4 ABTS kalibrasyon grafiğine ait veriler

Çizelge 4.1. ABTS derişimi ile absorbans değişimi

<b>ABTS derişi (mM)</b>	<b>Absorbans (<math>\Delta A_{414}</math>)</b>
0	0
0,005	0,134
0,010	0,257
0,015	0,341
0,020	0,428
0,025	0,516

EK-5 İmmobilize edilen enzim miktarı tayinine ait veriler

Çizelge 5.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz süzüntüleri ve yıkama sularının Bradford yöntemi ile okunan absorbanları

<b>İmmobilize lakkaz</b>	<b>Absorbans (A<sub>595</sub>)</b>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-L	0,154
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CC-SC-L	0,095
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Y-CC-L	0,129

EK-6 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının ζ-potansiyelinin pH ile değişimine ait veriler

Çizelge 6.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının zeta potansiyelinin pH ile Değişimi

<b>pH</b>	<b>Zeta potansiyeli (mV)</b>
2,31	1,91
2,78	-0,307
3,26	-3,81
3,69	-9,42
4,50	-18,7
5,11	-23,1
5,66	-25,9
6,15	-27,7
6,55	-28,3
6,98	-30,2
7,53	-31,5
8,15	-32
8,58	-32,3
9,09	-33,6
9,64	-32,8

EK-7 İmmobilize lakkazların aktifliğine pH etkisine ait veriler

Çizelge 7.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L aktifliğinin pH ile değişimi

<b>pH</b>	<b>Absorbans (A<sub>414</sub>)</b>	<b>Tepkime hızı (Aktiflik) (x10<sup>-2</sup> mM/dakika)</b>	<b>Maksimum aktiflik (%)</b>
2,5	0,128	0,59	12,39
3,0	0,937	4,32	91
3,5	1,029	4,75	100
4,0	0,996	4,6	96,6
4,5	0,991	4,58	96,18
5,0	0,987	4,55	95,55
5,5	0,826	3,82	80,22
6,0	0,603	2,78	58,38
6,5	0,458	2,11	44,31

EK-7 (Devam) İmmobilize lakkazların aktifliğine pH etkisine ait veriler

Çizelge 7.2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L aktifliğinin pH ile değişimi

<b>pH</b>	<b>Absorbans (A<sub>414</sub>)</b>	<b>Tepkime hızı (Aktiflik) (x10<sup>-2</sup> mM/dakika)</b>	<b>Maksimum aktiflik (%)</b>
2,5	0,865	3,99	88,7
3,0	0,903	4,16	92
3,5	0,977	4,5	100
4,0	0,961	4,43	98
4,5	0,94	4,33	96,2
5,0	0,979	4,05	90
5,5	0,801	3,69	82
6,0	0,648	2,99	66,4
6,5	0,502	2,31	51,3

EK-7 (Devam) İmmobilize lakkazların aktifliğine pH etkisine ait veriler

Çizelge 7.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L aktifliğinin pH ile değişimi

<b>pH</b>	<b>Absorbans (A<sub>414</sub>)</b>	<b>Tepkime hızı (Aktiflik) (x10<sup>-2</sup> mM/dakika)</b>	<b>Maksimum aktiflik (%)</b>
2,5	0,869	4	90,7
3,0	0,913	4,21	95,5
3,5	0,956	4,41	100
4,0	0,932	4,29	97,3
4,5	0,905	4,17	94,6
5,0	0,901	4,15	94,1
5,5	0,892	4,11	93,2
6,0	0,866	3,99	90,5
6,5	0,739	3,4	77,1

EK-8 İmmobilize lakkazların aktifliğine sıcaklık etkisine ait veriler

Çizelge 8.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L aktifliğinin sıcaklıkla değişimi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A <sub>414</sub> )	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 <sup>-2</sup> mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
10	0,39	1,79	72,17
20	0,46	2,12	85,47
30	0,472	2,17	87,49
40	0,539	2,48	100
50	0,486	2,24	90,31
60	0,467	2,152	86,76
65	0,396	1,825	73,584

Çizelge 8.2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L aktifliğinin sıcaklıkla değişimi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A <sub>414</sub> )	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 <sup>-2</sup> mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
10	0,901	4,16	79,24
20	0,926	4,27	81,33
30	0,996	4,64	91,43
40	1,139	5,25	100
50	0,983	4,62	90,45
60	0,967	4,46	84,95
65	0,948	4,37	83,24

EK-8 (Devam) İmmobilize lakkazların aktifliğine sıcaklık etkisine ait veriler

Çizelge 8.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L aktifliğinin sıcaklıkla değişimi

<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Absorbans (A<sub>414</sub>)</b>	<b>Tepkime hızı (Aktiflik) (x10<sup>-2</sup> mM/dakika)</b>	<b>Maksimum aktiflik (%)</b>
10	0,912	4,2	91
20	0,93	4,28	93
30	0,962	4,43	96
40	0,998	4,6	100
50	0,979	4,51	98
60	0,89	4,1	89
65	0,804	3,7	80,5



EK-9 İmmobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisine ait veriler

Çizelge 9.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

<b>Depolama süresi (gün)</b>	<b>Absorbans (A<sub>414</sub>)</b>	<b>Tepkime hızı (Aktiflik) (x10<sup>-2</sup> mM/dakika)</b>	<b>Maksimum aktiflik (%)</b>
1	0,987	4,55	100
3	0,976	4,5	98,6
6	0,937	4,31	94,6
7	0,893	4,11	90,2
9	0,887	4,09	89,6
10	0,874	4,03	88,3
11	0,855	3,94	86,4
12	0,843	3,89	85,2
13	0,801	3,69	80,9
14	0,76	3,51	76,8
15	0,735	3,39	74,3
16	0,717	3,31	72,4
17	0,684	3,15	69,1
18	0,682	3,15	68,9
19	0,66	3,045	66,7
20	0,66	3,045	66,7
21	0,66	3,045	66,7

EK-9 (Devam) İmmobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisine ait veriler

Çizelge 9.2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Depolama süresi (gün)	Absorbans (A <sub>414</sub> )	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 <sup>-2</sup> mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
1	0,87	4,01	100
2	0,835	3,85	96
3	0,796	3,67	92
4	0,783	3,61	90,02
5	0,76	3,51	87,53
6	0,725	3,34	83,29
7	0,697	3,22	80,29
8	0,683	3,16	78,8
9	0,67	3,1	77,31
10	0,626	2,89	72,07
11	0,61	2,81	70,07
12	0,59	2,72	67,83
13	0,573	2,64	65,84
14	0,552	2,55	63,59
15	0,52	2,39	59,6
16	0,496	2,28	57,11
17	0,463	2,14	53,37
18	0,421	1,95	48,63
19	0,398	1,84	45,88
20	0,363	1,67	41,65
21	0,363	1,67	41,65

EK-9 (Devam) İmmobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisine ait veriler

Çizelge 9.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Depolama süresi (gün)	Absorbans (A <sub>414</sub> )	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 <sup>-2</sup> mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
1	0,803	3,7	100
2	0,8	3,68	99,43
3	0,796	3,66	98,89
4	0,789	3,63	98,08
5	0,763	3,51	94,84
6	0,754	3,47	93,76
7	0,746	3,43	92,68
8	0,732	3,37	91,06
9	0,703	3,24	87,54
10	0,698	3,21	86,73
11	0,642	2,95	79,71
12	0,625	2,82	76,19
13	0,601	2,77	74,85
14	0,556	2,56	69,3
15	0,544	2,51	67,82
16	0,52	2,39	64,58
17	0,493	2,27	61,33
18	0,413	1,9	51,34
19	0,402	1,85	49,99
20	0,39	1,79	48,36
21	0,39	1,79	48,36

EK-10 İmmobilize lakkazların aktifliğine substrat derişiminin etkisine ait veriler

Çizelge 10.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L Lineweaver-Burk grafiği verileri

<b>ABTS derişimi [S] x 10<sup>-2</sup>mM</b>	<b>1/[S] (1/mM)</b>	<b>Absorbans (A<sub>414</sub>)</b>	<b>Tepkime hızı (V) (x10<sup>-2</sup> mM/dakika)</b>	<b>1/V (dakika/mM)</b>
2,5	40	0,56	2,58	38,67
2,0	50	0,519	2,39	41,78
1,5	66,67	0,354	1,63	61,3
1,0	100	0,269	1,24	80,5
0,5	200	0,132	0,61	162

Çizelge 10.2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L Lineweaver-Burk grafiği verileri

<b>ABTS derişimi [S] x 10<sup>-2</sup>mM</b>	<b>1/[S] (1/mM)</b>	<b>Absorbans (A<sub>414</sub>)</b>	<b>Tepkime hızı (V) (x10<sup>-2</sup> mM/dakika)</b>	<b>1/V (dakika/mM)</b>
2,5	40	0,545	2,51	39,75
2,0	50	0,467	2,15	46,5
1,5	66,67	0,371	1,71	58,5
1,0	100	0,258	1,19	84
0,5	200	0,132	0,61	162,25

EK-10 (Devam) İmmobilize lakkazların aktifliğine substrat derişiminin etkisine ait veriler

Çizelge 10.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L Lineweaver-Burk grafiği verileri

ABTS derişimi [S] x 10 <sup>-2</sup> mM	1/[S] (1/mM)	Absorbans (A <sub>414</sub> )	Tepkime hızı (V) (x10 <sup>-2</sup> mM/dakika)	1/V (dakika/mM)
2,5	40	0,597	2,63	38,02
2,0	50	0,471	2,17	46,08
1,5	66,67	0,386	1,78	56,18
1,0	100	0,271	1,25	80
0,5	200	0,134	0,62	161,29

EK-11 İmmobilize lakkazların aktifliğine kullanım sayısının etkisine ait veriler

Çizelge 11.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

<b>Kullanım Sayısı</b>	<b>Absorbans (A<sub>414</sub>)</b>	<b>Tepkime hızı (Aktiflik) (x10<sup>-2</sup> mM/dakika)</b>	<b>Maksimum aktiflik (%)</b>
1	0,37	1,70	100
2	0,336	1,55	99,81
3	0,293	1,35	98,67
4	0,23	1,06	97,16
5	0,224	1,03	95
6	0,218	1,00	87,16
7	0,2	0,92	86,05
8	0,193	0,89	84,04
9	0,193	0,89	84,04
10	0,19	0,87	82,8
11	0,187	0,86	81,49
12	0,182	0,84	79,23
13	0,179	0,82	78,01
14	0,175	0,80	76,26
15	0,171	0,79	74,52
16	0,164	0,75	71,47
17	0,155	0,71	67,55
18	0,146	0,67	63,63
19	0,138	0,63	60,14
20	0,133	0,61	57,96
21	0,132	0,60	57,53
22	0,124	0,57	54,04
23	0,118	0,54	51,43
24	0,118	0,54	51,43
25	0,115	0,53	50,12

EK-11 (Devam) İmmobilize lakkazların aktifliğine kullanım sayısının etkisine ait veriler

Çizelge 11.2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-Y-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

<b>Kullanım Sayısı</b>	<b>Absorbans (A<sub>414</sub>)</b>	<b>Tepkime hızı (Aktiflik) (x10<sup>-2</sup> mM/dakika)</b>	<b>Maksimum aktiflik (%)</b>
1	0,932	4,29	100
2	0,927	4,27	99,58
3	0,92	4,24	98,88
4	0,914	4,21	98,18
5	0,905	4,17	97,24
6	0,894	4,12	96,08
7	0,886	4,08	95,15
8	0,873	4,02	93,75
9	0,867	3,99	93,04
10	0,864	3,98	92,81
11	0,836	3,85	89,78
12	0,823	3,79	88,38
13	0,811	3,73	86,98
14	0,803	3,7	86,28
15	0,792	3,65	85,12
16	0,786	3,62	84,42
17	0,76	3,5	81,62
18	0,723	3,33	77,66
19	0,71	3,27	76,26
20	0,694	3,19	74,39
21	0,683	3,14	73,22
22	0,671	3,09	72,06
23	0,58	2,67	66,08
24	0,543	2,5	65,03
25	0,53	2,44	65

EK-11 (Devam) İmmobilize lakkazların aktifliğine kullanım sayısının etkisine ait veriler

Çizelge 11.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC-SC-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

<b>Kullanım Sayısı</b>	<b>Absorbans (A<sub>414</sub>)</b>	<b>Tepkime hızı (Aktiflik) (x10<sup>-2</sup> mM/dakika)</b>	<b>Maksimum aktiflik (%)</b>
1	0,871	4,02	100
2	0,864	3,98	99,02
3	0,857	3,95	98,28
4	0,842	3,88	96,53
5	0,8	3,69	91,81
6	0,794	3,66	91,07
7	0,79	3,64	90,56
8	0,785	3,62	90,07
9	0,779	3,59	89,32
10	0,766	3,53	87,83
11	0,751	3,46	86,08
12	0,736	3,39	84,34
13	0,721	3,32	82,6
14	0,703	3,24	80,61
15	0,695	3,21	79,86
16	0,676	3,12	77,63
17	0,654	3,02	75,14
18	0,645	2,97	73,89
19	0,617	2,85	70,9
20	0,598	2,76	68,67
21	0,567	2,62	65,19
22	0,554	2,55	64,89
23	0,54	2,49	64,86
24	0,524	2,42	64,21
25	0,508	2,34	64,13



EK-12 TGA Termogramlarından, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CC nanoparçacıklarının manyetit yüzdesi

Çizelge 12.1. Selüloz için TGA termogramlarından alınan veriler

Sıcaklık (°C)	Kalan miktar (%)
325	91,1
415	13,9
900	7,68

Çizelge 12.2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Selüloz için TGA termogramlarından alınan veriler

Sıcaklık (°C)	Kalan miktar (%)
328	92,2
418	89,5
900	80,1

Çizelge 12.3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıkları için TGA termogramından alınan veriler

Sıcaklık (°C)	Kalan miktar (%)
325	97,9
420	97,8
900	97,5

$$\frac{R_q}{\Delta W_q} \times \Delta W_m + M = R$$

$$\frac{7,68}{77,2} \times 2,5 + M = 80,1$$

$$M = \% 77,3$$

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı	BEYLER, Aslı
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi ve yeri	06. 02. 1987- Konak/ İzmir
Medeni hali	Bekar
e-mail	aslibeyler@hotmail.com

Eğitim Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya Bölümü	2011
Lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya Bölümü	2009
Lise	Vali Nevzat Ayaz Lisesi (YDA)	2005

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-2011	Gazi Üniversitesi	Öğrenci Asistanlığı
2011-	Amasya Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

### Yabancı Dil

İngilizce