

**POLİMER MODİFİYELİ SİLİKA NANOPARTİKÜLLERİN ENZİM
İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANIMI**

Aybuke MALKOÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2011
ANKARA**

Aybuke MALKOÇ tarafından hazırlanan POLİMER MODİFİYELİ SİLİKA NANOPARTİKÜLLERİN ENZİM İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANIMI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK
Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

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

Yrd. Doç.Dr. Haydar ALTINOK
Kimya Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

Yrd. Doç.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Yrd. Doç.Dr. Gökhan DEMİREL
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih 16/06/ 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 kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Aybuke MALKOÇ

**POLİMER MODİFİYELİ SİLİKA NANOPARTİKÜLLERİN ENZİM
İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANIMI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Aybuke MALKOÇ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAZİRAN 2011**

ÖZET

Bu çalışmada, asetilkolinesteraz enzimi (E.C. 3.1.1.7) polietilenimin (PEI) ve 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) kullanılarak modifiye edilen silika nanopartiküllere kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimler üzerine pH, sıcaklık, depolama kararlılığı gibi çeşitli parametrelerin etkileri incelenmiştir. Optimum pH serbest enzim, APTES ve PEI ile modifiye edilmiş silika nanopartiküller için sırasıyla 7, 7 ve 8 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık serbest enzim, APTES ve PEI modifiye edilmiş silika nanopartiküller için sırasıyla 30 °C, 30 °C ve 35 °C olarak belirlenmiştir. Serbest enzim için K_m ve V_{mak} değerleri sırasıyla $6,35 \times 10^{-3}$ M ve $5,00 \times 10^{-4}$ M.dak⁻¹ ve APTES ve PEI modifiye edilmiş silika nanopartiküllere immobilize enzimler için ise K_m değerleri $1,19 \times 10^{-2}$ M, $2,1 \times 10^{-2}$ M ve V_{mak} değerleri $3,09 \times 10^{-3}$ M.dak⁻¹, $1,42 \times 10^{-3}$ M.dak⁻¹ arasında bulunmuştur

Asetilkolinesterazın tekrar kullanım sayısı ve depolama kararlılığı immobilizasyonu ile arttırılmıştır.

Bilim Kodu : 201.1.117
Anahtar Kelimeler : silika nanopartikül, enzim immobilizasyonu,
kovalent bağlanma
Sayfa Adedi : 98
Tez Yöneticisi : Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

**APPLICATION OF POLYMER-MODIFIED SILICA NANOPARTICLES IN
ENZYME IMMOBILIZATION**

(M.Sc. Thesis)

Aybuke MALKOÇ

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

JUNE 2011

ABSTRACT

In this study immobilization of acetylcholineesterase(E.C. 3.1.1.7) via covalent binding to modified silica nanoparticles was carried out by using polyethyleneimine (PEI) and 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). The effect of various parameters such as pH, temperature and storage stability on the free and immobilized enzymes were examined. Optimum pH for free enzyme, APTES-modified and PEI-modified silica nanoparticles were found to be 7, 7 and 8 respectively. Optimum temperature for free enzyme, APTES-modified and PEI-modified silica nanoparticles were determined to be 30 °C, 30 °C ve 35 °C respectively. For free enzyme maximum reaction rate (V_{max}) and Michaelis–Menten constant (K_m) values were found $6,35 \times 10^{-3}$ M and $5,00 \times 10^{-4}$ M.min⁻¹ respectively, and for immobilized enzyme to APTES-modified and PEI modified silica nanoparticles were found in the range of $1,19 \times 10^{-2}$ M, $2,1 \times 10^{-2}$ M and $3,09 \times 10^{-3}$ M.min⁻¹, $1,42 \times 10^{-3}$ M.min⁻¹, respectively.

Reuse number and storage stability of acetylcholineesterase were increased with immobilization

Science Code : 201.1.117
Key Words : silica nanoparticle, enzyme immobilization,
covalent binding
Page Numbers : 98
Adviser : Assist. Prof. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca ortaya çıkan her türlü probleme getirmiş olduğu bakış açısı ve yaklaşımları ile bana yol gösteren, iyi bir çalışma ortamı sağlayan ve her zaman desteğini hissettiren değerli Hocam Yrd. Doç Dr. Hayrettin TÜMTÜRK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Dr. Eylem TURAN ve Bil. Uzm. Kim. Ferat ŞAHİN' e sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yıllardır her anımda benimle olan, her türlü desteğini, ilgisini hep hissettiğim canım arkadaşım Burak BAY'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bana büyük moral ve destek veren, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan aileme en derin saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1.GİRİŞ	18
2. GENEL BİLGİLER.....	20
2.1. Enzimler ve Genel Özellikleri.....	20
2.1.1. Enzimlerin kataliz hızına etki eden faktörler	22
2.2. Asetilkolinesteraz.....	25
2.2.1. Asetilkolinesteraz enzimi (EC 3.1.1.7) ve özellikleri	25
2.2.2. Asetilkolin ve genel özellikleri.....	30
2.2.3.DTNB(5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit).....	31
2.3. Nanopartikül	32
2.3.1. Silika nanopartikül.....	33
2.3.2. PEI (Poli(etilen imin)).....	35
2.4. İmmobilizasyon.....	37
2.4.1. Taşıyıcı destek materyali.....	39
2.4.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	41
2.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması	50
2.6. İmmobilizasyonun Enzim Aktivitesine Etkisi	51

	Sayfa
2.7. İmmobilizasyon Metodunun Seçimi	53
3. DENEYSEL KISIM	54
3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	54
3.3. Asetiltiyokolin İyodür, DTNB ve Asetilkolinesteraz Çözeltilerinin Hazırlanması.....	54
3.4. Asetiltiyokolin iyodür Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	55
3.5. Enzim İmmobilizasyonu	55
3.5.1. Silika nanopartiküllerin sentezi.....	55
3.5.2. Silika nanopartiküllerin APTES ile modifikasyonu.....	56
3.5.3. Silika nanopartiküllerin PEI ile modifikasyonu.....	56
3.5.4. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere enzim immobilizasyonu.....	56
3.5.5. PEI modifiyeli silika nanopartiküllere enzim immobilizasyonu..	56
3.6. Aktiflik Tayini	57
3.6.1. Serbest asetilkolinesterazın aktiflik tayini.....	57
3.6.2. İmmobilize asetilkolinesterazın aktiflik tayini.....	57
3.7. Aktifliğe pH Etkisi.....	58
3.7.1. Serbest AChE nin aktifliğine pH' nın etkisi.....	58
3.7.2. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine pH' nın etkisi.....	58
3.7.3. PEI modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine pH' nın etkisi.....	57
3.8. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi.....	58
3.8.1. Serbest AChE' nin aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	58

Sayfa

3.8.2.APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	59
3.8.3.PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	57
3.9. Aktifliğe Substrat Değişiminin Etkisi	59
3.9.1. Serbest AChE nin aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	59
3.9.2.APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	59
3.9.3.PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine substrat değişiminin etkisi.....	58
3.10. Depolama Kararlılığı.....	60
3.10.1. Serbest AChE' nin depolanma kararlılığı.....	60
3.10.2. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin depolanma kararlılığı.....	59
3.10.3. PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin depolanma kararlılığı.....	59
3.11. Tekrar Kullanılabilirlik	61
3.11.1. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin tekrar kullanılabilirliği.....	59
3.11.2. PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin tekrarkullanılabilirliği.....	61
4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE TARTIŞMA	62
4.1. Silika Nanopartiküllerin Sentezi ve Tanecik Boyut Analizi	62
4.2. Silika Nanopartiküllerin APTES ile Modifikasyonu.....	64
4.3. Silika Nanopartiküllerin PEI ile Modifikasyonu	64
4.4. APTES ve PEI Bağlı Silika Nanopartiküllere Enzim İmmobilizasyonu	65

	Sayfa
4.5. FT-IR Spektroskopisi ile Yapısal Karakterizasyon.....	68
4.6. TEM ile nanopartiküllerin morfolojisi	72
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	89
KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Haloenzim yapısının şematik gösterimi	21
Şekil 2.2. Enzim-substrat kompleksi üzerinden ürün oluşumu	22
Şekil 2.3. Substrat derişiminin tepkime hızına etkisi	23
Şekil 2.4. Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.....	24
Şekil 2.5. AChE nin asetilkolini yıkım tepkime mekanizması.....	26
Şekil 2.6. Asetilkolinesteraz enziminin üç boyutlu yapısı	27
Şekil 2.7. AChE enzim molekül modeli.	28
Şekil 2.8. AChE enziminin aktif merkezindeki oyuk.....	29
Şekil 2.9. AChE enzim aktif merkezindeki substrat tepkime mekanizması ..	30
Şekil 2.10. Asetilkolin molekülünün şematik olarak gösterimi	30
Şekil 2.11. Asetilkolinin oluşum mekanizması	31
Şekil 2.12. DTNB tepkime mekanizması	31
Şekil 2.13. Silika nanopartikül görüntüsü	32
Şekil 2.14. Çekirdek-kabuk nanopartikülün şematik görüntüsü	34
Şekil 2.15. PEİ'in kimyasal yapısı	35
Şekil 2.16. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması	40
Şekil 2.17. Enzim ile destek materyali arasındaki kovalent bağlanmanın şematik gösterimi	44
Şekil 2.18. Enzimin çapraz bağlanmasının gösterimi	45
Şekil 2.19. Destek materyeline enzimin adsorpsiyonu	46
Şekil 2.20. Destek materyeline enzimin hapsetme ile immobilizasyonu.....	47
Şekil 2.21. Mikrokapsülleme ile immobilizasyon yöntemleri	49

Şekil	Sayfa
Şekil 2.22. Kafes tipi hapsetme metodu ile immobilizasyon	50
Şekil 2.23. İmmobilizasyonun enzim aktivitesine etkisi	52
Şekil 3.1. Asetiltiyokolin iyodür kalibrasyon grafiği.....	55
Şekil 4.1. Stöber metoduna göre silika nanopartiküllerinin sentezi.....	62
Şekil 4.2. Silika nanopartiküllerinin stabilizasyonu.....	62
Şekil 4.3. Silika nanopartikül sentezinde kullanılan farklı TEOS miktarları ..	63
Şekil 4.4. Silika nanopartiküllerin APTES ile modifikasyon mekanizması	64
Şekil 4.5. Silika nanopartiküllere PEI bağlanma mekanizması	65
Şekil 4.6. AChE'nin asit ucunun EDAC/NHS varlığında aktiflenmesi	66
Şekil 4.7. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere AChE'nin bağlanma mekanizması.....	67
Şekil 4.8. PEI modifiyeli silika nanopartiküllere Asetilkolinesterazın bağlanma mekanizması	68
Şekil 4.9. Silika nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu.....	69
Şekil 4.10. (a) Silika (b) APTES modifiyeli silika nanopartiküllere ait FT-IR .	70
Şekil 4.11. (a) Silika (b) PEI bağlı silika nanopartiküllere ait FT-IR	71
Şekil 4.12. Silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri	72
Şekil 4.13. APTES modifiyeli silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri	73
Şekil 4.14. PEI bağlı silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri	73
Şekil 4.15. (a) APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin TEM görüntüsü (b) PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize enzimin TEM görüntüsü	74
Şekil 4.16. Zeta potansiyel ölçüm sonuçları	75
Şekil 4.17. Serbest ve APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin aktifliklerinin pH ile değişimi	76

Şekil	Sayfa
Şekil 4.18.Serbest ve PEI modifiyeli immobilize enzimin aktifliklerinin pH ile değişimi.....	77
Şekil 4.19. Serbest ve APTES modifiyeli immobilize enzimin aktifliklerinin sıcaklıkla değişimi	79
Şekil 4.20.Serbest ve PEI modifiyeli immobilize enzimin aktifliklerinin sıcaklıkla değişimi	79
Şekil 4.21.Serbest ve APTES modifiyeli immobilize enzimin Lineweaver-Burk grafiği	82
Şekil 4.22. Serbest ve PEI bağlı immobilize enziminLineweaver-Burkgrafiği	83
Şekil 4. 23. Serbest ve APTES modifiyeli immobilize asetilkolinesterazın bağlı aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi	85
Şekil 4.24. Serbest ve PEI bağlı immobilize asetilkolinesterazın bağlı aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi	86
Şekil 4.25. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen asetilkolinesterazın bağlı aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi	87
Şekil 4.26. PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize edilen asetilkolinesterazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi	88

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Serbest ve immobilize enzim özelliklerinin karşılaştırılması	39
Çizelge 2.2. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri	42
Çizelge 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması	51
Çizelge 4.1. Serbest ve APTES modifiyeli immobilize edilen asetilkolinesterazın kinetik parametreleri	82
Çizelge 4.2 Serbest ve PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize enzimin kinetik parametreleri	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklama

°C	Derece Celcius
ζ	Zeta potansiyeli
UV	Ultraviyole
K _m	Michaelis sabiti
V _{mak}	Maksimum hız

Kısaltmalar

Açıklama

ACHe	Asetilkolinesteraz
APTES	3-(aminopropil)trietoksisilan
DTNB	<i>5,5'-Ditiyobis (2-nitro benzoik asit)</i>
EDAC	<i>1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) karbodiimit</i>
FTIR	Fourier transform infrared spektrometresi
TEM	Geçirmeli elektron mikroskobu
NSH	N-hidroksisüksinimit
TEOS	<i>Tetraetil-ortasilikat</i>
PEI	Poli(etilen)imin

1.GİRİŞ

Nanoteknoloji, günümüzde tekstil, inşaat, ilaç, otomotiv, elektronik, bilişim ve iletişim, tıp ve farmakoloji gibi hemen hemen her alanda hızla gelişmektedir. Nanoteknoloji nanometre (nm) büyüklüğünde boyutlarla uğraşan yeni bir teknoloji olarak tanımlanmaktadır [1].

Bu derece küçük yapıların benzersiz ve yeni fonksiyonel özellikler taşıdıklarının belirlenmesi ile nanoteknolojiye gösterilen ilgi ve bu araştırma alanında yapılan çalışmalar son yıllarda giderek artmıştır ve artmaya devam etmektedir. Nanoteknolojinin birçok uygulaması nano boyutlarda maddenin farklı davranmasına dayanır. Nano boyutlara inildiğinde artan yüzey alanı/hacim oranı maddeyi çok daha aktif yaparak çevredeki diğer atom ve moleküllerle farklı etkileşimlere neden olur. Çalışmalar başlangıçta optik ve elektronik cihazlar üzerinde yoğunlaşmışken, şimdi biyoölçümler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Nanopartiküller günümüzün en son teknolojisini oluşturmaktadır [2].

Enzimler canlı hücrelerden elde edilmiş proteinlerdir. Değişik avantajlarından dolayı enzimler çeşitli kimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılmaktadır [3]. Kompleks canlı sistemlerinde çalışan enzimler spesifiktir ve yan ürün oluşumuna neden olmadan yüksek verim eldesini sağlarlar. Enzimlerin spesifikliğı ve çok düşük derişimlerde bile substrat tepkimelerini katalizlemelerinden dolayı sanayide önemli kullanım alanları vardır. Enzim katalizli tepkimeler inhibitörlerin, aktivatörlerin ve substratların derişimlerini tayin etmek için uzun zaman analitik amaçlı kullanılmıştır. Birçok avantaja sahip olmalarına karşın endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimler sınırlıdır. Analitik reaktif olarak kullanılan enzimler deney şartlarına ve çevre koşullarına çok duyarlı olup yüksek sıcaklıklarda, asidik ve bazik çözeltilerde aktifliklerini kaybederler [4]. Çünkü enzimlerin pek çoğı kararsızdır. Enzimlerin izolasyonu ve artırılması ekonomik değildir. Bu nedenle enzimlerin bir kez kullanımı yerine immobilize edilerek tekrarlanabilir kullanımlara

girmeleri ekonomik açıdan büyük önem taşır. Enzimlerin spesifik olmaları ve tepkimeleri katalizleme kabiliyetleri onların biyokimyasal, endüstriyel ve analitik alanlarda uygulamalarını cazip hale getirmektedir.

Bu çalışmada, enzim immobilizasyonunda kullanılan silika nanopartiküller, tetraetilortosilikat (TEOS), etanol ve amonyak çözeltisi katalizörlüğünde oda sıcaklığında belirli bir hızda karıştırılmasıyla elde edildi. Elde edilen nanopartiküllerin ortalama çap ve boyut dağılımları Zeta Sizer ile belirlendi. Partikül şekil ve büyüklükleri geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) ile tayin edildi. Sentezi ve karakterizasyonu yapılan silika nanopartiküller 3-aminopropiltrimetoksisilan (APTES) molekülü ile amino fonksiyonel hale getirildi. Çalışmanın ikinci kısmında ise sentezlenen silika nanopartiküller polietilenimin (PEI) polimeri ile modifiye edildi. APTES ve polimer bağlı silika nanopartiküllerin yapısal karakterizasyonu ATR-FT-IR gerçekleştirildi. APTES bağlı ve polimer ile modifiye silika nanopartiküllere asetilkolinesteraz enzimi immobilize edildi. Immobilize enzimin aktifliğine pH, sıcaklık, substrat derişimi, depolama süresi ve sürekli kullanımın etkisi incelendi. Ayrıca nanopartiküllere enzim bağlanma kapasitesi belirlendi.

Elde edilen sonuçlardan, destek materyali olarak kullanılan APTES ve polimer modifiyeli silika nanopartiküllerin asetilkolin esteraz enziminin aktifliğine etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

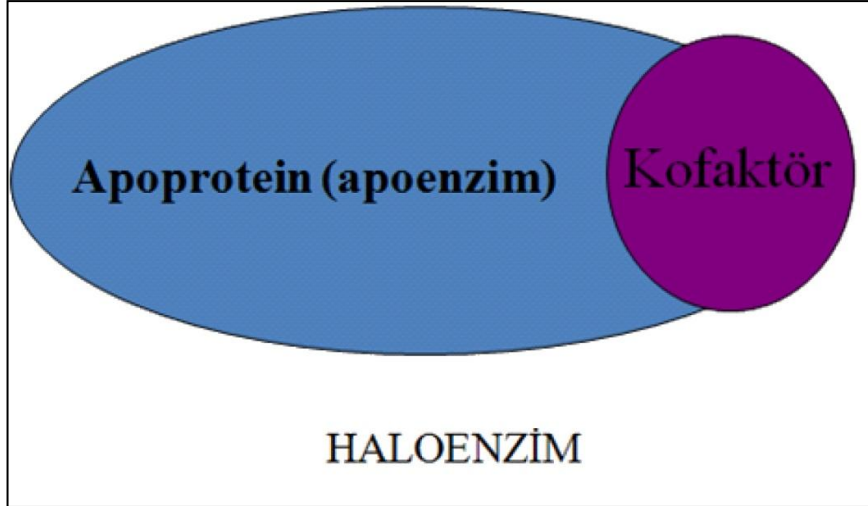
2.1. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal tepkimeleri, kendileri herhangi bir değişikliğe uğramaksızın hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına neden olmadan %100 verim sağlayan protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Bu katalizörlerin en önemli özellikleri, katalizleme güçleri ve spesifiklikleridir [5,6].

Canlı organizmalarda gerçekleşen pek çok tepkime enzimlerle katalizlenmektedir. Enzim katalizli bir tepkime, enzimsiz bir tepkimeye göre 10^7 - 10^{16} kat daha hızlı gerçekleşir. Enzimler olağanüstü katalitik aktiviteye sahiptirler. Termodinamik yönden oluşabilen bir tepkimenin hızını, tepkimenin denge sabitini değiştirmeden yaklaşık 10^{11} kat veya daha fazla artırmaktadırlar. Örneğin, Asetilkolinesteraz enzimi dakikada 1 500 000 tane molekülü etkilemektedir. Enzimlerin bu özellikleri, başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere fizikokimya, bakteriyoloji, mikrobiyoloji, genetik, botanik, tarım, farmakoloji, toksikoloji, patoloji, fizyoloji, tıp, mühendislik ve biyoteknoloji gibi bilim dalları ile onların endüstriyel, analitik ve biyokimyasal alanlarda uygulamalarına yol açmıştır [5,7].

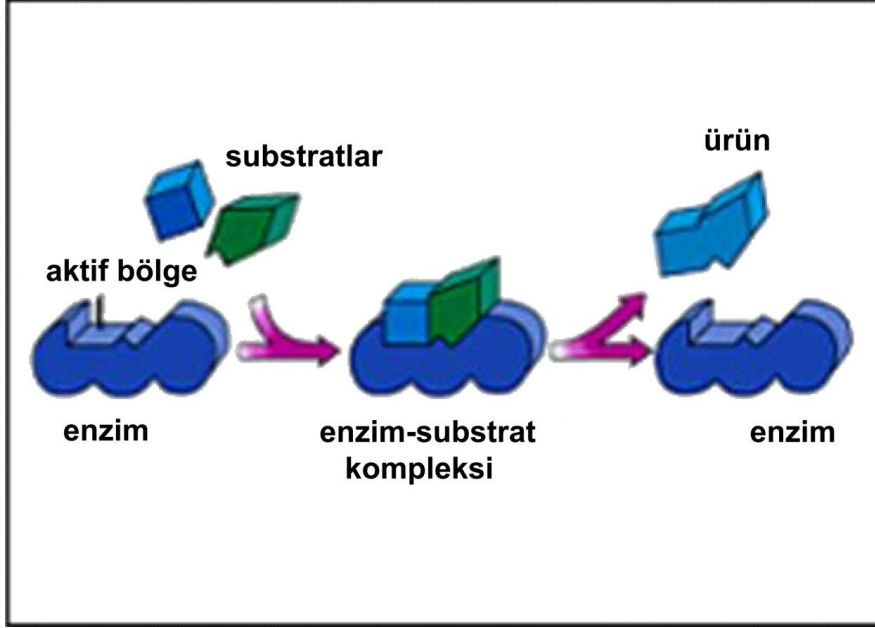
Enzimlerde proteini oluşturan aminoasitlerin sayısı, diziliş sırası ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir. Bu düzen enzimin substrata seçiciliğini sağlar. Bazı enzimler yalnızca proteinden oluşurken bazıları protein yanında protein olmayan bir kısım içerirler. Bu tip enzimlerde enzimin protein kısmına “*apoenzim*”, protein olmayan kısmına, enzimden kolayca ayrılabilirse “*koenzim*” veya “*kofaktör*”, sıkıca bağlı ise “*prostetik grup*” adı verilir. Koenzimler genellikle vitamin türevleri, organik moleküller ve inorganik metal anyon veya katyonlardan oluşur. Apoenzim ve koenzim ile birlikte “Haloenzim” diye adlandırılır (Şekil 2.1). Haloenzimin büyük bir kısmını apoenzim oluşturur. Apoenzim tek başına katalitik aktivite göstermez. Enzimin katalitik olma özelliğini veren koenzim tek başına, gerçek enzime

göre çok daha düşük aktivite gösterir. Enzimin gerçek aktivitesi sadece koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda gözlenir



Şekil 2.1. Haloenzim yapısının şematik gösterimi

Enzim moleküllerinde aktif bölge denilen özel bir boşluk ya da cep kısmı bulunur. Aktif bölgedeki aminoasitlerin yan zincirleri, substratın yapısına uyumlu, üç boyutlu bir yapı oluşturmaktadır (Şekil 2.2). Substratın dönüşümüne katılan ve katalitik prosesi yürüten aminoasitlerde aktif merkezden sayılırlar. Aktif bölgenin substratı bağlamasıyla oluşan enzim-substrat kompleksi (ES), önce enzim-ürün kompleksine, daha sonra ise serbest enzim ve ürüne dönüşmektedir [6,8]. Enzim ile substrat birbirine hidrojen, elektrostatik ve Van der Waals kuvvetleri gibi non-kovalent (zayıf) bağlarla bağlanır.



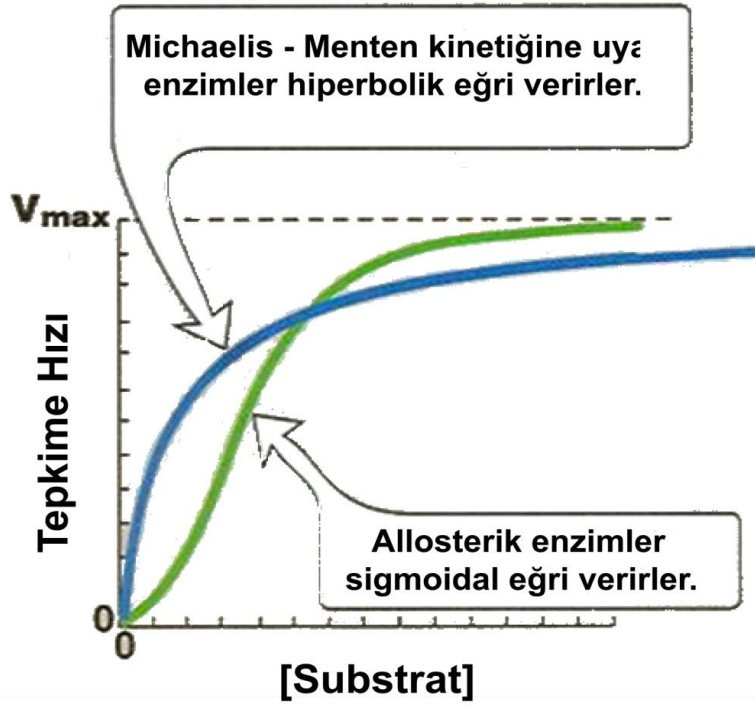
Şekil 2.2. Enzim-substrat kompleksi üzerinden ürün oluşumu

2.1.1. Enzimlerin kataliz hızına etki eden faktörler

Birim zamanda oluşan ürün ya da kaybolan substrat miktarı kataliz hızı olarak tanımlanmaktadır.

A-Enzim Derişimi: Enzimle katalizlenen tepkimelerde substrat derişimi, yüksek miktarda ise, tepkime başlangıç hızı (V_i), enzim derişimi ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Tepkime hızı belli bir düzeye ulaştığında ise sabit kalır.

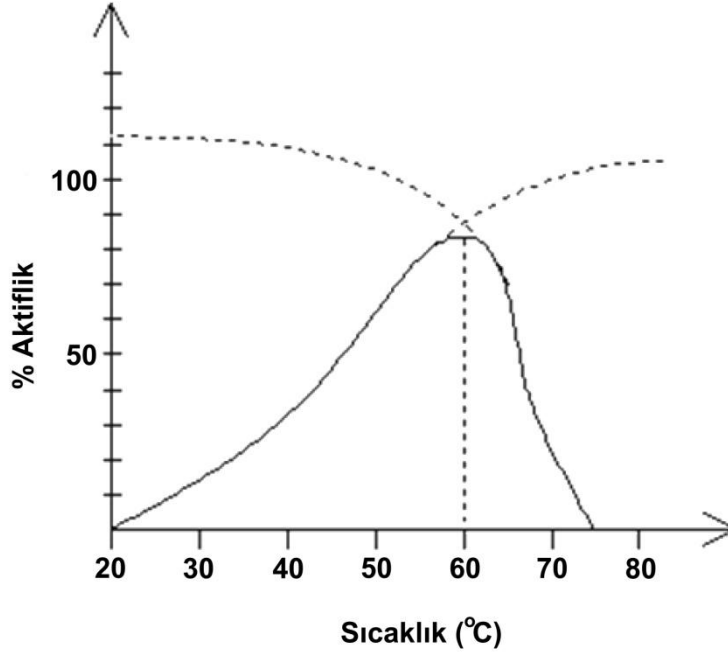
B-Substrat Derişimi: Enzimle katalizlenen bir tepkimenin hızı (V), ortamda enzim derişiminin sabit olması koşuluyla, substrat derişimi $[S]$ ile birlikte hızla artar ve maksimum hız $[V_{max}]$ değerine varıncaya kadar artış devam eder. Ancak V_{max} ' ta substrat derişimi ne kadar artarsa artsın, kataliz hızı artmaz. (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Substrat derişiminin tepkime hızına etkisi

C-Sıcaklık: Enzimle katalizlenen bir tepkimedeki sıcaklığın artması tepkime hızını artırmaktadır. Ancak enzimler protein yapısında olduklarından belirli bir sıcaklıktan itibaren enzimin denatürasyonu söz konusu olacağından, tepkime hızında bir azalma meydana gelecektir.

Serbest ve immobilize enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi genellikle "optimum sıcaklık eğrileri" çizilerek belirlenir (Şekil 2.4). Bu grafik bağıl aktivitenin sıcaklık ile değişimini gösterir. Bağıl aktivite ise deney koşullarında elde edilen aktivitenin yine aynı koşullarda ulaşılan en yüksek aktiviteye oranıdır ki bu oran hiçbir zaman 1'den veya %100'den büyük olamaz.



Şekil 2.4. Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

D-pH: Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik veya bazik özellik taşıyan gruplar vardır. “ES” kompleksinin en kararlı bir şekilde oluşması yani hızının maksimum olması için bu grupların belirli bir iyonlaşma durumunda olması gereklidir. $[H^+]$ derişimi tepkime hızını çeşitli yönlerden etkiler. İlk olarak, katalitik işlem için genellikle enzim ve substratın spesifik gruplarının tepkimeye girebilmeleri için iyonlaşmış veya iyonlaşmamış halde bulunmaları gerekir. Örneğin, katalitik aktivite için enzimin bir amino grubunun protonlanmış durumda ($-NH_3^+$) olması gerekebilir. Bazik pH’ da bu grup protonunu kaybeder ve bu yüzden tepkime hızı düşer. Bunun dışındaki iyonlaşmalarda “ES” kompleksi zayıflar ve tepkime hızı düşer. Bu optimum bir pH’ da tepkime hızının en yüksek olması demektir. pH-hız grafiği çan eğrisi şeklindedir.

2.2. Asetilkolinesteraz

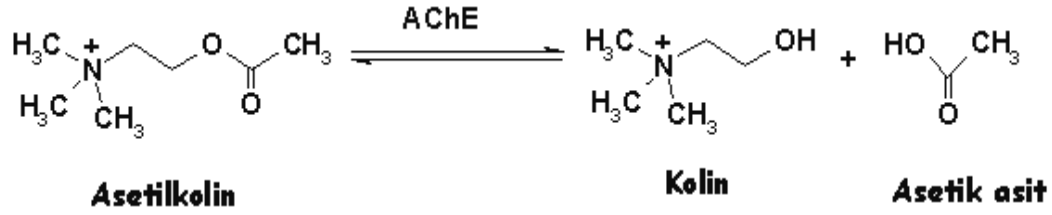
2.2.1. Asetilkolinesteraz enzimi (EC 3.1.1.7) ve özellikleri

Kolinesterazlar olarak bilinen enzimler grubu, 65 yılı aşkın bir süreden bu yana nörobiyoloji, tıp, ziraat gibi alanlarda karşımıza çok sık çıkmaktadır ve hızla artan bir önem kazanmaktadır. Bu enzimlerle yapılan ilk çalışmalarda oldukça çarpıcı gelişmeler sağlanmış ve erken dönemde çok sayıda önemli bilimsel sonuç elde edilmiştir. Böylece kolinesterazlar pek çok çalışmanın odağında yer almıştır. Asetilkolinesteraz enzimi (AChE) ile ilgili çalışmalar dokularda çok düşük derişimler de bulunması dolayısıyla AChE enzimi izolasyonu ve X-Ray kristallografisi ile amino asit dizisinin aydınlatılması çalışmaları çok güç olmuştur. Sonuçta, bu enzimin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapılarının aydınlatılması tam olarak belirlenebilmesi ancak çok yakın zamanda gerçekleştirilmiştir [9,10,11,12,13].

AChE enzimi başlıca beyinde, sinir hücrelerinde, kasta ve eritrositlerde bulunur [14].

AChE sinir sisteminin belirli kısımlarında nötrotransmitter bir madde olarak görev yapan asetilkolinin hidrolizini katalizleyen enzimdir. Asetilkolin uyarılmış bir sinir hücresi tarafından bir diğer sinir hücresi arasındaki sinaps içerisine salınır. Bir sonraki sinir hücresinin reseptör bölgesine bağlanır ve bu şekilde sinir impulsunun diğer sinir hücresine geçmesine neden olur. İkinci bir impuls sinapstan geçmeden önce ilk impulsun iletilmesi ile birlikte asetilkolinin AChE tarafından hidroliz edilmesi gereklidir. AChE nin bu aktivitesinin ürünleri transmitter aktiviteye sahip olmayan asetat ve kolindir [15].

AChE enziminin bilinen en temel fonksiyonu, asetilkolini kolin ve asetata hidrolize ederek kolinerjik etkiyi söndürmesidir [16-19]. AChE enziminin reaksiyon mekanizması Şekil 2.5' de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. AChE nin asetilkolini yıkım tepkime mekanizması

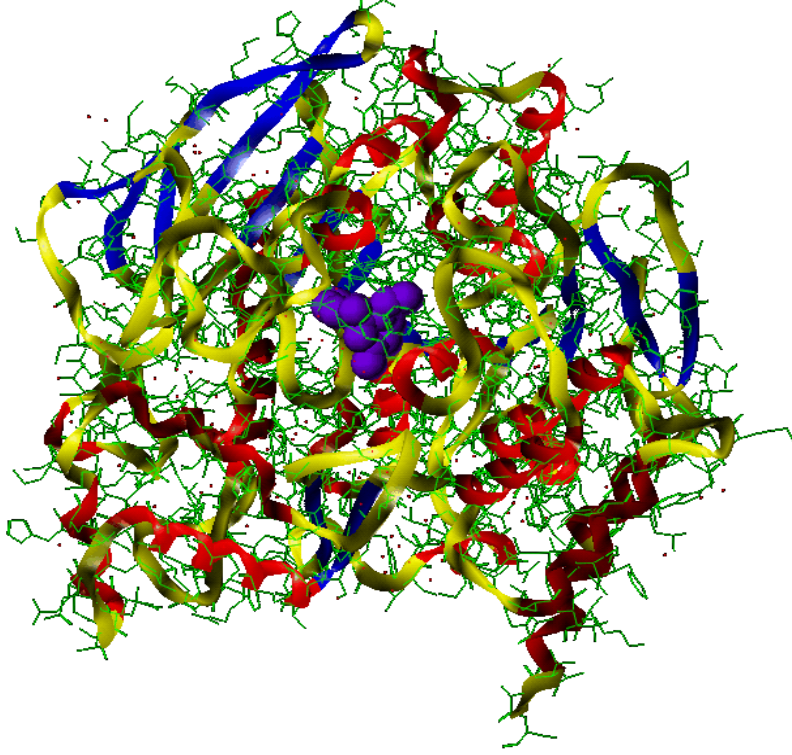
Asetilkolin'i, asetat ve kolin'e hidrolize eden AChE enzimi 1938 yılında David Nachmansohn tarafından bulunmuştur. Bundan bir yıl sonra 1939 yılında Stedman ve Stedman sığır beyninden ACh izole ettiklerini bildirmişlerdir [20,21]. Asetilkolinin beyin dokusunda hem serbest hem de bağlı durumda olduğunun bilinmesine rağmen, bağlanmanın doğasının açıklanması zaman almıştır. Önceleri hücre fraksiyonlarını santrifügasyon yöntemiyle birbirinden ayırma çalışmaları asetilkolinin mitokondial fraksiyona bağlı olduğunu göstermiştir. Ancak bu görüş 1955 yılında DeRobertis ve Bennett'in sinir uçlarında bulunan vezikülleri bulmalarıyla değişmeye başlamıştır. Bu sinaptik veziküller transmitter maddelerin sentez edildiği ve depolandığı yer olarak düşünülmüştür [21].

Elektrik balığının (*Electrophorus electricus*) elektrik organı, en zengin AChE kaynaklarından biridir. Elektrik balığı ve memeli sinir sisteminden elde edilen AChE enzimini saflaştırıp kristalize etmek mümkün olmuştur ve diğer esterazlardan asetilkolini hidroliz etmesinden dolayı kolaylıkla ayırt edilmektedir. Bu nedenle asetilkolinesteraz olarak adlandırılır [20,22,23].

Allosterik bir enzim olan AChE nin asetilkolini hidrolizinin yapım yıkım sayısı, enzim katalizi için bildirilen en yüksek değerler arasında, $>10^4 \text{ sn}^{-1}$ olarak bildirilmiştir [24].

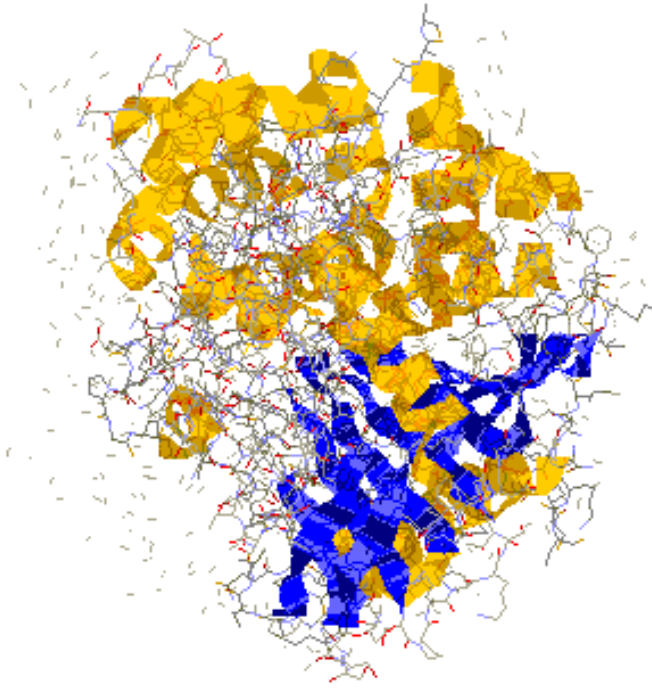
Günümüzde enzimlerin üç boyutlu yapıları ayrıntılı bir şekilde X-ışınları kristalografisiyle görüntülenebilmektedir. Bu şekilde pek çok enzimin üç boyutlu yapıları aydınlatılabilmektedir [25,26]. Ayrıca, proteinlerin yapılarının

aydınlatılmasında elektron mikroskopisinden de faydalanılmaktadır. AChE nin üç boyutlu yapısı Şekil 2.6' de gösterilmiştir.



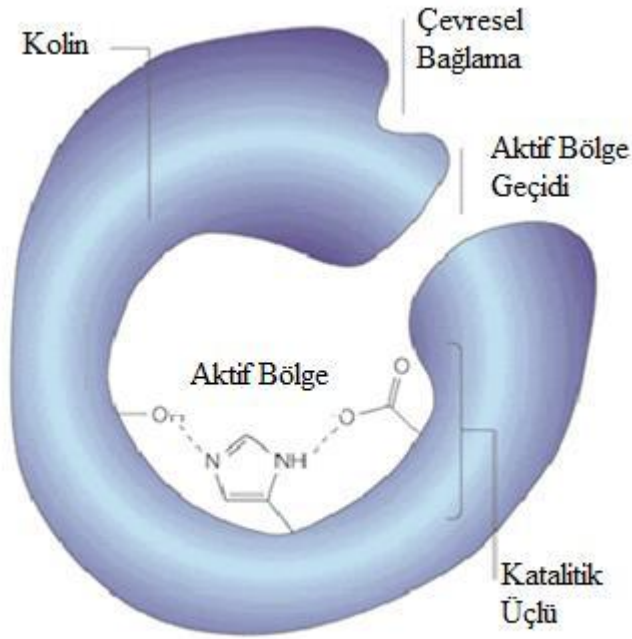
Şekil 2.6. Asetilkolinesteraz enziminin üç boyutlu yapısı

Bir proteinin dolayısıyla bir enzimin yapısında α -heliks ve β -katlanmış yaprak yapısı olmak üzere iki ana gruptan ve bunların dört farklı düzenlenmiş şeklinden oluşmaktadır [27]. Şekil 2.7' de AChE enzim molekül modelinin 14 α -heliks ve 12 β -katlanmış yaprak yapısı görülmektedir.



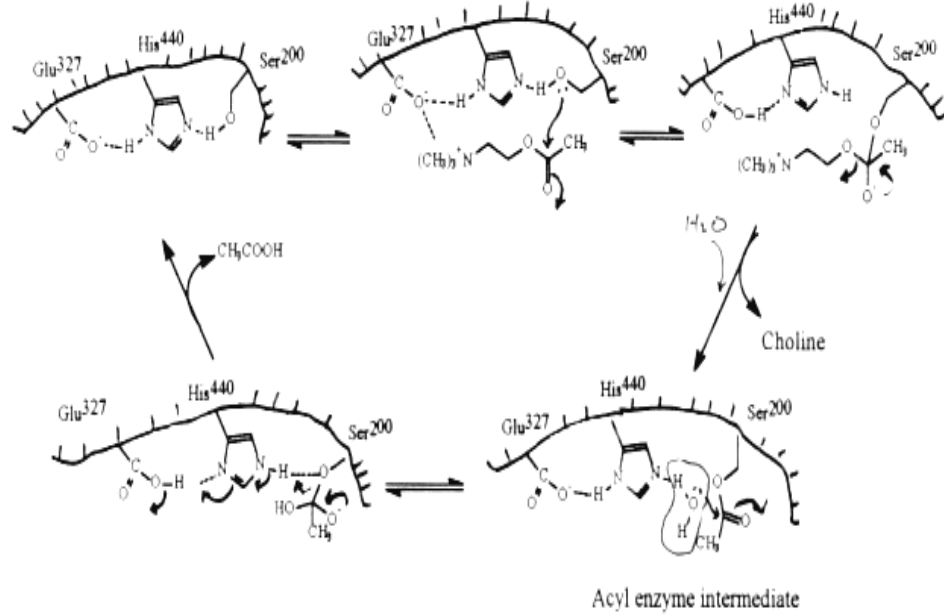
Şekil 2.7. AChE enzim molekül modeli.

Enzim moleküllerinde aktif merkez denilen bölgesinde bağlanmadan ve katalizden sorumlu özel bir cep yada yuva bulunmaktadır. Bu merkez bölgede substratın bağlanmasına uyumlu olan aminoasit yan zincirleri bulunmaktadır ve bu yan zincirler serinin -OH grubu, Histidinin imidazol grubu ve Glutamatın -COOH grubudur. Şekil 2.8' de AChE enziminin aktif merkezi ve aktif merkezdeki oyuk görülmektedir [28].



Şekil 2.8. AChE enziminin aktif merkezindeki oyuk

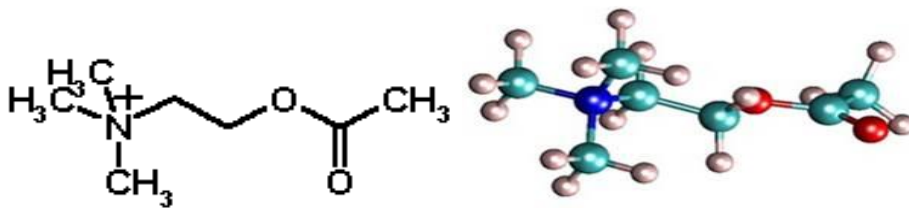
AChE enzimi birbirine yakın iki substrat bağlama bölgesine sahiptir. Bunlardan biri anyonik olup asetilkolinin katyonik kuarterner azotunu bağlar. Diğeri ise, katyonik olup enzimatik tepkime sırasında açığa çıkan protonu tutar. Bu bölge bir serin kalıntısı ve bir başka nükleofilik grup olan histidin kalıntısı imidazolünden oluşmuştur. Anyonik bölge substratın kuarterner azotuna bağlanırken, esteratik bölgedeki karbonil grubunun elektrofilik karbonu serinin oksijeniyle kovalent bir bağ oluşturur. Kolin serbestleşirken, asetillenmiş esteratik bölge suyla reaksiyona girerek asetik asit ve inaktif enzimi oluşturur (Şekil 2.9) [20-22,29,30].



Şekil 2.9. AChE enzim aktif merkezindeki substrat tepkime mekanizması

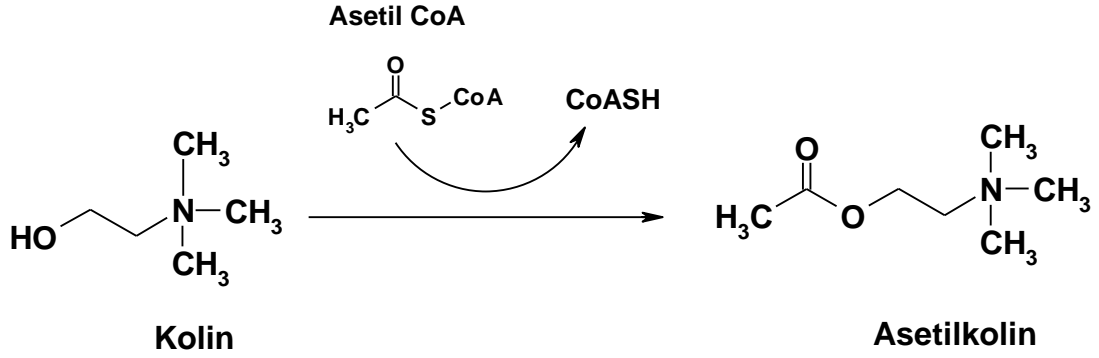
2.2.2. Asetilkolin ve genel özellikleri

Asetilkolin neuromuskuler kavşaklarda, otonom sinir sisteminin pregangliyonlarında ve parasempatik sinir sisteminin postgangliyoner sinir impulsu iletiminde görevli nörotransmitter bir maddedir (Şekil 2.10). Çok büyük biyolojik öneme sahip bir esterdir. Asetilkolinin güçlü farmakolojik etkisi 1906 yılında bulunmuştur [38]. Bazı farmakolog ve fizyologlar, bu esterin sadece sinir uçlarından etkilendiği organa veya sinir ucundan ikinci sinir hücresine, sinir impulsu taşıma görevi olduğuna inanılıyordu. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu esterin sadece bir görevi yapmadığı ayrıca sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasında da görevli olduğu bulunmuştur [13,14,23].



Şekil 2.10. Asetilkolin molekülünün şematik olarak gösterimi

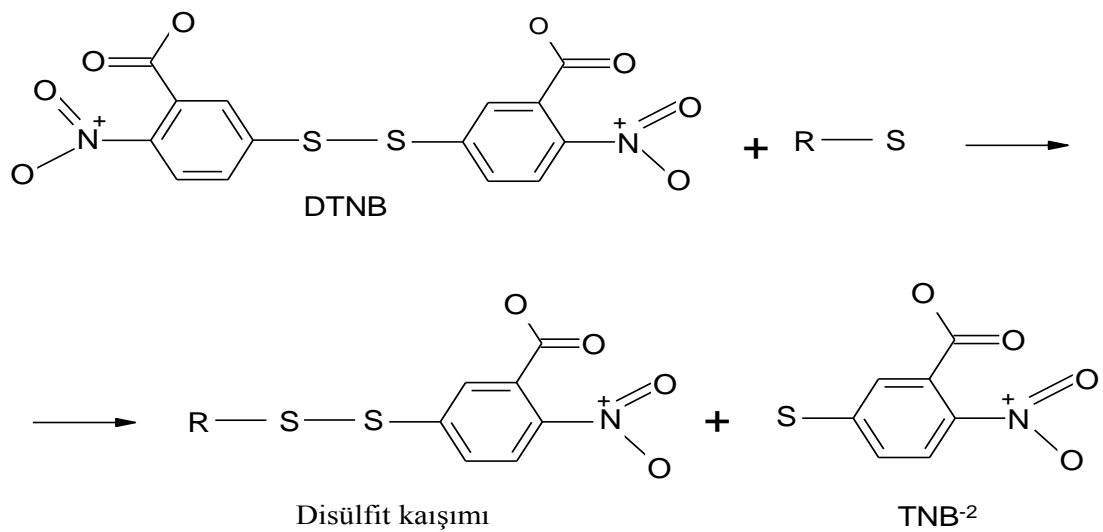
Kolinin kolinasetilaz enzimi etkisi altında asetilkoenzim A ile asetillenmesi sonucu oluşur (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Asetilkolinin oluşum mekanizması

2.2.3. DTNB (5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit)

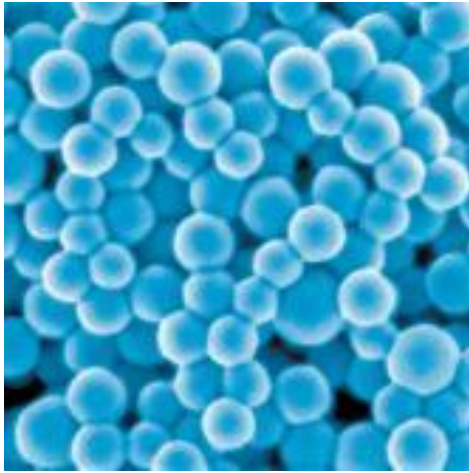
DTNB tepkime ortamında bulunan serbest tiyol gruplarının (sülfidril grupları) spektroskopik olarak tayininde kullanılan ve Ellman ajanı olarak bilinen bir belirteçtir. Serbest sülfidril grupları DTNB ile tepkimeye girerek oluşan sarı renkli anyon TNB (2-nitro-5 tiyobenzoat) bazik ortamda pH 7 - 8,5 ölçülmesiyle tayin edilir. Şekil 2.12'de tepkime mekanizması gösterilmiştir [32,33].



Şekil 2.12. DTNB tepkime mekanizması

2.3. Nanopartikül

Nanometre boyutlarındaki inorganik bileşikler diğer maddelerden daha farklıdır. Çünkü elektron tutucu etki gibi yapısal boyutlarına özgü özelliklere sahiptirler. Boyutları 1-100 nm arasında olan, bazı özel durumlarda ise 200-300 nm' nin de kabul edildiği bileşikler "nanopartikül" olarak adlandırılırlar [34]. Nanopartikül görüntüsü Şekil 2.13' de gösterilmiştir.



Şekil 2.13. Silika nanopartikül görüntüsü

Günümüzde birçok sektörde devrim niteliğinde bir potansiyele sahip olan ve heyecan verici bir hızla gelişen nanoteknoloji genel bir ifadeyle, çeşitli araçların, malzemelerin ve yapıların moleküler düzeyde işlenmesi, düzenlenmesi ve yaratılması olarak tanımlanmaktadır. Bugün bilim adamları doğada var olan bu nano ölçekteki olguları ve yöntemleri öğrenmeye ve kendi kendini çoğaltabilen, denetleyebilen, kontrol edebilen, onarabilen araçlar, malzemeler ve yapılar oluşturmaya çalışmaktadırlar. Nano birimi ile aslında 100 - 0.1 nanometre (nm) (10×10^{-7} metre ile 10×10^{-10} metre) arasındaki herhangi bir büyüklük ifade edilmektedir. Karşılaştırabilmek amacıyla örnek vermek gerekirse; görünür ışığın dalga boyu 400 ile 700 nm arasında değişmektedir.

Nanometre terimi, antik Yunanca 'da "cüce" anlamına gelen "nano" kökünden gelmektedir. Nanometre, metrenin milyarda biri kadar olan bir ölçüdür ve yaklaşık 10 atomluk bir genişliği kapsamaktadır [$1\text{nm}=10^{-9}\text{ m}$]. Karşılaştırma açısından bir saç telinin 150 000 nanometre olduğu söylenebilir ya da harfleri 10 nm boyutunda basılırsa 30 bin sayfalık Brittanica ansiklopedisi bir toplu iğne başına sığdırılabilir.

Nanopartiküllerin özgül yüzey alanı çok büyük, parçacığın yüzey enerjisi yüksek, partikül yüzeyinin kimyasal özellikleri çok aktiftir. Bu sebeple son yıllarda tıp, kimya, eczacılık, biyoloji, biyoteknoloji vs. gibi alanlarda yapılan araştırmalara konu olmaktadır [35]. Nanopartikül ile yüzey modifikasyonu sonucunda, yüzey kimyası ve yüzey pürüzlülüğü üzerinde tam ve bağımsız kontrol sağlanmaktadır. Nanopartiküllerin fonksiyonallitesi ve boyutları, nanopartiküllerin yüzeylere bağlanma yoğunluğu ve nanopartiküller aralarındaki mesafe değiştirilerek modifiye yüzeylerin özellikleri değiştirilebilir [36].

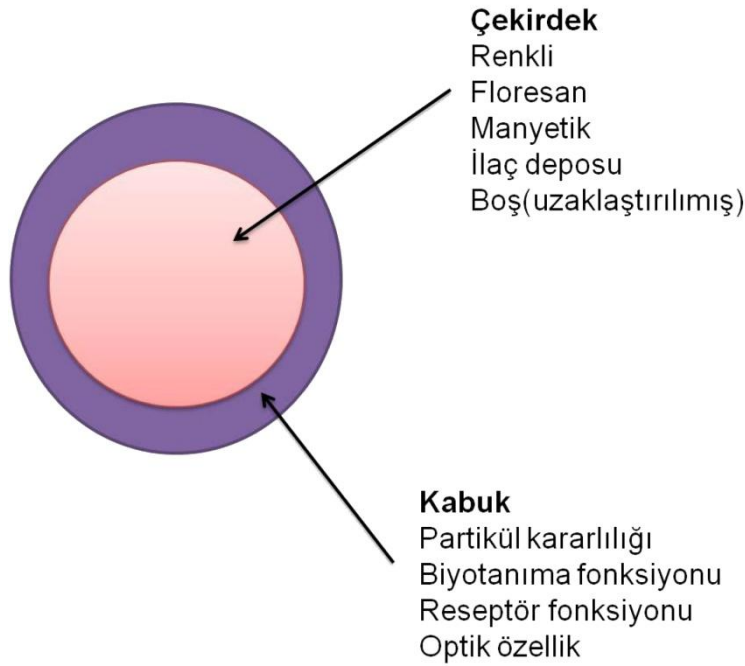
2.3.1. Silika nanopartikül

Nanopartiküllerin boyutları onların özelliklerini belirlemede ve biyolojik uygulamalardaki kullanılabilirliklerinde önemli rol oynar. Büyüklükleri 20 nm 'den küçük olan silika nanopartiküller suda yüksek çözünürlük ve kolloidal kararlılık gösterirler. Nanopartiküller biyomedikal uygulamalarda spesifik etkileşimleri ve sterik engelleri en aza indirmekte önemli rol oynar [34].

Küresel şekli, dar boyut dağılımı, geniş yüzey alanı ve pürüzsüz yüzeyi silika nanopartiküllerin kullanım avantajlarından birkaçıdır. Sulu ortamda, elektriksel çift tabaka sebebiyle agregate olmaları ise nanopartiküllerin dezavantajıdır.

Çekirdek-kabuk nanopartiküller kendilerinin tek bileşenli yapılarına göre daha gelişmiş fiziksel ve kimyasal özellik göstermeleri nedeniyle dikkat

çekmektedir (Şekil 2.14). Mükemmel optik, elektrik, termal, mekanik, elektro-optik, manyetik ve katalitik özelliklerinden dolayı Çekirdek-kabuk kürelerin hazırlanmasıyla ilgili çalışmalar son yıllarda artmıştır [37]. Çekirdek ve kabuk küreleri birleşerek core-shell nanopartikülleri oluşturduklarında ilginç fonksiyonel ve karakteristik özellik göstermektedir.



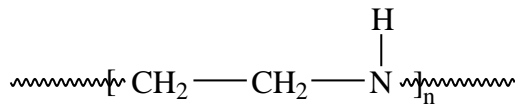
Şekil 2.14. Çekirdek-kabuk nanopartikülün şematik görüntüsü

Çekirdek-kabuk nanopartiküllerin hazırlanması için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar emülsiyon polimerizasyonu [38,39], dispersiyon polimerizasyonu [40,41], *in-situ* polimerizasyonu [42,43], atom transfer radikal polimerizasyonu ve miniemülsiyon polimerleşmesidir. Ayrıca çekirdek-kabuk nanopartiküller alerjik tepkimeleri önlemede önemli rol oynarlar.

Çekirdek-kabuk silika nanopartiküller ilaç salımı, gen transferi, enzim immobilizasyonu gibi çok çeşitli uygulamaları nedeniyle çok ilgi görmektedir. Sabit yapı ve kanallı boş nanopartiküller çekirdek silikaların içi ve dışı arasında madde alışverişin kolaylaştırdığı için pratik uygulamalarda dikkat çekici bir yöntemdir.

2.3.2. PEİ (Poli(etilen imin))

Poli(etilen imin) (PEİ) tipik suda çözünür poliamindir. Makromolekül zincirlerindeki amino gruplarının azot atomu miktarı fazladır. Ticari PEİ'in molekülleri sık sık dallanmış zincirlere sahiptir, yaklaşık 1:2:1 oranlarında birincil, ikincil ve üçüncül amino grupları içermektedir. PEİ makromolekülleri verilen elektronların kuvvet özelliklerine sahiptir, makromolekülde bulunan çok miktardaki azot atomları sebebiyle çok kuvvetli hidrofilik özellik gösterir ve kuvvetli hidrojen bağı etkileşimi PEİ ve proton donorları arasında oluşturulabilir. Molekül zincirlerindeki amino gruplarının çoğunluğu $pH < 10$ da ki sulu çözeltide protonize haldedir. Bu yüzden PEİ katyonik polielektrolit türüdür. PEİ'in özellikleri birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. PEİ ayırma, arıtma ve biyomakromoleküllerin immobilizasyonunda, pH sensörü ve biyosensör yapımında, ilaç serbestleştirme sistemlerinde vb. kullanılmaktadır. Şekil 2.15' de PEİ'in kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.15. PEİ'in kimyasal yapısı

Yapılan bir araştırmada PEİ γ -kloropropil trimetoksisilan (CP)'ın bağlanma etkisi yolu ile silika jel partiküllerinin yüzeyine aşılınmış, ürik asit için kuvvetli adsorpsiyon etkisi ile birleşik adsorpsiyon materyali PEİ/SiO₂ hazırlanmıştır. Kuvvetli fiziksel adsorpsiyonun etkisi ile çok kuvvetli adsorpsiyona sahip silika partiküllerine aşılınan PEİ'in makromolekülleri PEİ ve 2,6,8-trihidroksipurin arasındaki hidrojen bağı etkileşimlerine neden olmuş ve kesin boyutun kimyasal adsorpsiyonu Schiff bazı tepkimesine yol açmıştır. PEİ/SiO₂ ürik asit için güçlü adsorpsiyon yeteneği gösterir. Oysa asidik ve bazik çözeltide adsorpsiyon zayıftır. Sıcaklığın PEİ/SiO₂ 'nin adsorpsiyonu üzerine etkisi incelenmiş ve artan sıcaklık ile adsorpsiyon kapasitesinin arttığı bulunmuştur [44].

PEİ'in doğrusal makromolekül zincirlerindeki amino gruplarının azot atomları miktarının fazla olması çok güçlü şelat etki oluşturmaya neden olur. Bu sebeple eğer toprak alkali metal iyonlarının yüksek içeriği varsa PEİ ağır metal iyonları için yeni tutucu ajan türüdür. Ağır metal iyonlarının adsorpsiyon ayırma alanlarında PEİ'in uygulanması gelişmektedir. Örneğin; iyon yüzeyine PEİ kaplanması sonucunda sulu ortamdan çıkan ağır metal iyonları ile reçine ya da silika jel tanecikleri değişir, bu fiziksel işlemdir ve adsorpsiyon verimi sınırlıdır.

Adsorpsiyon lifinin yüzeyine aşılana PEİ adsorpsiyon lifi adsorpsiyon özelliklerini düzeltir. Yapılan bir çalışmada ağır metal iyonları için adsorpsiyon materyalinin kimyasal yapısı tasarlanmıştır. Öncelikle Cu^{+2} , Cd^{+2} ve Zn^{+2} ile doğrusal PEİ 'in kordinasyon prosesleri görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi ve şelat iletkenlik titrasyon metodu kullanılarak çalışılmış ve şelatların yapıları belirlenmiştir. Daha sonra PEİ γ -kloropropil trimetoksilanın (CP) bağlanma etkisi ile silika jel partiküllerinin yüzeyine aşılana ve ağır metal iyonlarını adsorplama kabiliyeti ile orijinal birleşik adsorpsiyon materyali PEİ/SiO₂'in şelat adsorpsiyon özellikleri statik ve dinamik metodlar ile araştırılmıştır. Cu^{+2} , Cd^{+2} ve Zn^{+2} ile PEİ'in reaksiyona girmesi kolaydır. Ligantlar ile suda çözünür şelatlar oluşturulmuştur. Ağır metaller iyonları için çok güçlü şelat adsorpsiyon yeteneğine sahip olan PEİ/SiO₂ 'in adsorplama yeteneği $Cu^{+2} > Cd^{+2} > Zn^{+2}$ şeklinde bulunmuştur [45].

Yapılan bir başka çalışmada PEİ/Akrilamit (AAm) hidrojelleri PEİ ve AAm 'in farklı oranlarını içeren sulu çözeltilerin γ radyasyon polimerizasyon/çapraz bağlanma ile sentezlenmiştir. Sentezlenen hidrojellerin jelleşme yüzdesi ve şişme denge derecesi (EDS) araştırılmıştır. Elde edilen hidrojellerin bileşimlerinin beslenme bileşimlerinden farklı olduğu bulunmuştur. İyon kromatografisi tekniği ile hidrojin adsorpladığı Pb(II) ve Cd(II) 'nin miktarları belirlenmiştir. PEİ/AAm hidrojellerinin maksimum bükülme kapasitesi Pb(II) ve Cd(II) için sırasıyla 19,0 ve 12,6 mg/g olarak bulunmuştur. PEİ/AAm

hidrojelleri 50ppm den daha az derişimde saf AAm hidrojelinden daha çok metal kaldırma verimine sahip olduğu belirlenmiştir [46].

2.4. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon; suda çözünen ve çözültide serbest hareket edebilen enzim moleküllerinin suda çözünmeyen polimerik destek materyaller kullanılarak hareketlerinin sınırlandırılmasına denir.

Enzimler suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel ve kimyasal bağlanma ile veya polimerik bir matriks içerisinde hapsedilerek immobilize edilebilirler. İmmobilizasyon uygulamaları sadece enzimlere değil hücrel organellere, mikrobiyal hücrelere, bitki hücrelerine ve hayvan hücrelerine v.b. uygulanabilir.

Enzim immobilizasyonun da amaç yalnız istenilen anda enzimi tepkime ortamından uzaklaştırmak değil, aynı zamanda immobilizasyon sonucunda enzimatik aktivitede de çok önemli bir düşmenin de olmamasıdır. Bu sebeple immobilizasyon çok ılıman koşullarda gerçekleştirilmelidir. Enzimin taşıyıcıya aktif merkezi oluşturan aminoasit kalıntıları üzerinden bağlanmasını önlemek için enzim aktif merkezinin hangi aminoasitlerden oluştuğu bilinmeli ve buna göre uygun destek materyal seçilmelidir.

Son 20-30 yılda enzim immobilizasyonunun yanında mikroorganizma immobilizasyonu da önem kazanmıştır. Substrat, mikroorganizmanın içerdiği enzimlerden biri için özgül ise saf bir enzimin immobilizasyonu yerine bunu içeren mikroorganizmanın immobilizasyonu ve saflaştırılmasına gerek kalmayacağından ekonomik açıdan büyük yarar sağlamaktadır. Özellikle son ürün elde edebilmek için birden fazla enzimden yararlanılıyor ve problem yaratmıyor ise enzim yerine mikroorganizma immobilizasyonu çok ekonomiktir [47,48].

İmmobilize enzimlerin en önemli avantajları [49,50]:

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.
- Mekanik çalışmalar için uygundur.

İmmobilize enzimlerin bazı dezavantajları da vardır. Bunların başlıcaları aşağıda özetlenmiştir [51].

1. İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifiği azalabilir veya kaybolabilir.
2. Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
3. Enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksektir.

Enzimlerin immobilize edilmesinin en önemli avantajları Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Serbest ve immobilize enzim özelliklerinin karşılaştırılması

SERBEST ENZİM	İMMOBİLİZE ENZİM
1. Reaksiyon sonunda ortamdan uzaklaştırılması güçtür	1. Süzme, santrifüjleme gibi basit yöntemlerle ortamdan kolayca ayrılır.
2. Ürünlerde azda olsa kirlilik yapar.	2. Tamamen ayrıldığından ürünlerde kirlilik söz konusu olmaz.
3.Çevre koşullarından daha kolay etkilenirler.	3. Çevre koşullarına daha dayanıklıdır.
4. Her örnek bir kere ve kısa süre kullanılır.	4. Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
5. Kararsız ve dayanıksızdır.	5. Daha dayanıklı ve kararlıdır.
6. Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlarda kullanılmaz.	6.Çok adımlı reaksiyonlara uygundur.
7. Aktivitesini çabuk kaybeder.	7. Basit immobilizasyon yöntemleri aktiviteyi artırır.
8. Kendi kendini parçalayabilir.	8. Kendi kendini parçalama minimuma indirgenir.

2.4.1. Taşıyıcı destek materyali

İyi bir destek materyalinde büyük yüzeysel alan, geçirgenlik, hidrofilik karakter, çözünmezlik, kimyasal, mekanik ve termal kararlılık, yüksek tutuculuk, uygun biçim ve parça büyüklüğü, mikrobiyolojik saldırılara karşı direnç gibi özellikler aranır. Bu özellikler enzim aktifliğinin korunmasını ve işlem kararlılığını artırır [52].

Enzim immobilizasyonun da kullanılan çeşitli organik ve inorganik materyaller Çizelge 2.2' de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri

Organik Destekler	<i>Doğal polimerler</i>	1- <u>Polisakkaritler</u> : Selüloz, dekstran, agar, agaroz, kitin, aljinat
		2- <u>Proteinler</u> : Kollojen, albümin
		3- <u>Aktif Karbon</u>
	<i>Sentetik polimerler</i>	1- <u>Polistiren</u>
2- <u>Diğer polimerler</u> : Poliakrilat, polimetakrilat, poliakrilamid, poliamidler, vinil, alil-polimerler		
İnorganik Destekler	1- <u>Doğal mineraller</u> : Bentonit, silika	
	2- <u>İşlenmiş materyaller</u> : Cam (nonporöz ve kontrollü gözenekli), metaller, kontrollü gözenekli metal oksitler	

İmmobilizasyonda kullanılan destek materyallerinde çeşitli özellikler aranır. [53].

Bunlar;

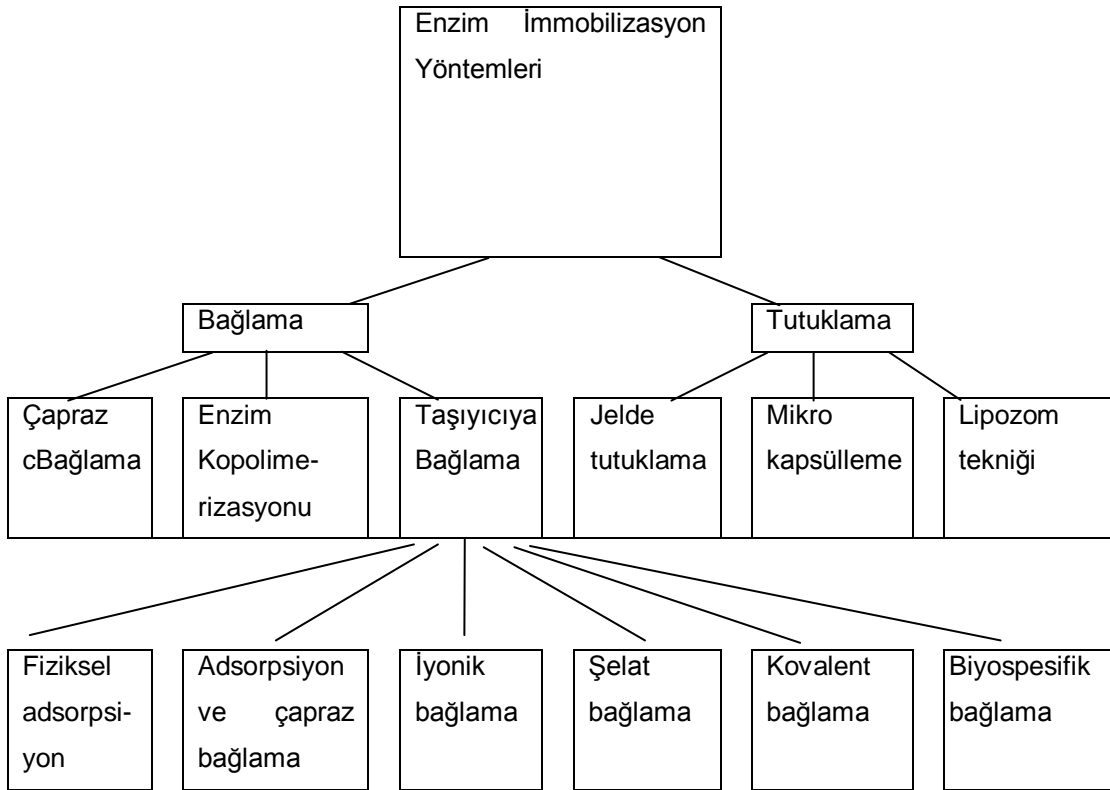
1. Hidrofilik karakter
2. Suda çözünmeme
3. Gözenekli (poröz) yapı
4. Mekanik stabilite ve uygun parçacık formu
5. Kimyasal veya termal kararlılık
6. Mikroorganizmalara karşı dirençlilik
7. Ucuzluk
8. Zehirsizliktir.

İmmobilizasyon sırasında enzim moleküllerinde yapısal değişiklikler olabilir. İmmobilize enzimin hareketleri çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar, immobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi, destekle enzimin karşılıklı etkileşmesi, aktiveleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesi olarak belirtilebilir. Enzimin katı destek üzerinde immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikroçevreyi etkileyebilir, bu da enzimin görünen davranışları üzerinde bazı değişiklikler oluşturabilir [54]. Bunlar; bölme etkisi, difüzyon sınırlaması, yapısal değişiklikler, sterik sınırlamalar ve inaktivasyon olarak söylenebilir.

2.4.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Kelime anlamı olarak immobilizasyon, hareketi sınırlandırma demektir. İmmobilize edilen enzimlerin gerçekten hareketleri sınırlandırılmış olmaktadır. İmmobilize enzim çerçeve bir isim olup 'tutuklanmış', 'çözünmez hale getirilmiş', 'bağlanmış' gibi terimleri kapsamaktadır. İmmobilizasyon yöntemleri enzimler için kullanıldığı gibi mikroorganizma hücrelerini tutuklamak içinde kullanılabilir. Bugün 100' ün üzerinde immobilizasyon tekniği geliştirilmiştir.

Enzim immobilizasyon yöntemlerin sınıflandırılması Şekil 2.16' da verilmiştir



Şekil 2.16. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile destek arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği destekler seçilmeli yada immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır [55]. Enzim immobilizasyon yöntemleri çok farklı kaynaklarda değişik şekillerde sınıflandırılmalarına karşın fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir.

1. Kimyasal Yöntemler

a)Kovalent bağlanma

b)Çapraz bağlanma

2. Fiziksel Yöntemler

a)Adsorpsiyon ile immobilizasyon

b)Hapsetme ile immobilizasyon

i)Mikrokapsül ile hapsetme

ii)Kafes tipi hapsetme

Kimyasal Metotlar

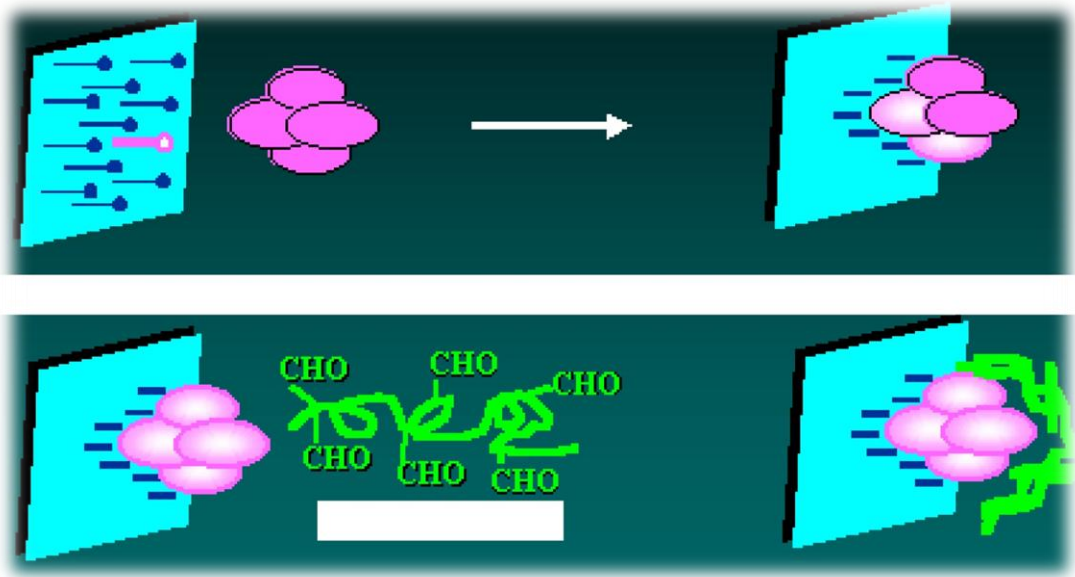
Kimyasal immobilizasyon metotları suda çözünmeyen aktifleştirilmiş polimer ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu veya birden fazla enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumunu gerektirir. Kimyasal metotlar çoğunlukla tersinmezdir. Serbest enzimin yeniden geri kazanılması mümkün değildir [56].

Kimyasal yöntemle immobilizasyonla birlikte enzimin kimyasal ve fiziksel özellikleri de değişebilir. Bazı organik fonksiyonel gruplar çıkarılarak , farklı yapıda ve aktivitede gruplar elde edilebilir. Böylece immobilize edilmiş enzimlerin, serbest haldeki özelliklerine göre değişmeler gözlenebilir. Kararlılık ve dayanıklılık açısından pek çok üstünlükleri ortaya çıkarken kinetik özelliklerinde de farklılıklar görülür. Kimyasal bağlanma ile immobilizasyonun üstünlüğü, immobilize enzimin çok kararlı olması, destek maddesinin çok dayanıklı olması gibi önemli avantajları vardır. Bunun yanında immobilizasyon veriminin sınırlı olması, reaksiyon şartlarının çok özel olması, kimyasal olarak inert olan destek maddelerine uygulanamaması gibi bazı dezavantajları da vardır [57]. Kimyasal bağlanma ile immobilizasyon kovalent ve çapraz bağlanma olarak iki grupta incelenir.

a)Kovalent bağlanma

Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzim immobilizasyonunda sık kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin sağladığı yararlar, enzim türevlerinin kararlı olması ve enzimin çözeltiye geçmemesi olarak sıralanabilir.

Kovalent bağlanma yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması, böylece her türlü akış ortamında kullanılabilirliğidir. Enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması kolaydır (Şekil 2.17). Ayrıca enzim molekülü ve destek materyali birlikte genellikle ısıl kararlılık gösterirler. Yöntemin dezavantajı, destek materyali ile enzim arasındaki sıkı etkileşim enzimin doğal konformasyonunu bozabilir [58].

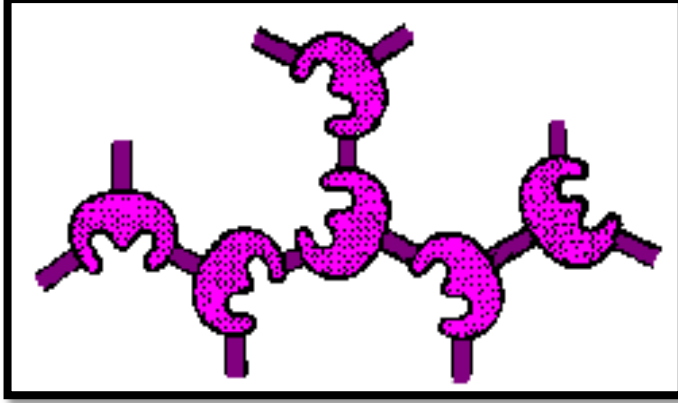


Şekil 2.16. Enzim ile destek materyali arasındaki kovalent bağlanmanın şematik gösterimi

b) Çapraz bağlanma

Küçük molekülü iki veya daha çok fonksiyonlu maddeler (reaktifler), enzim molekülleri ile aralarında bağ yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. Molekül içi bağlanmalar yanında moleküller arası bağlanmalarda söz konusudur [59]. Bu yöntemin en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Yöntemin dezavantajı ise moleküller arası çapraz

bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki güçlüklerdir. Şekil 2.18' de enzimin destek materyeline çapraz bağlanması gösterilmektedir.



Şekil 2.17. Enzimin çapraz bağlanmasının gösterimi

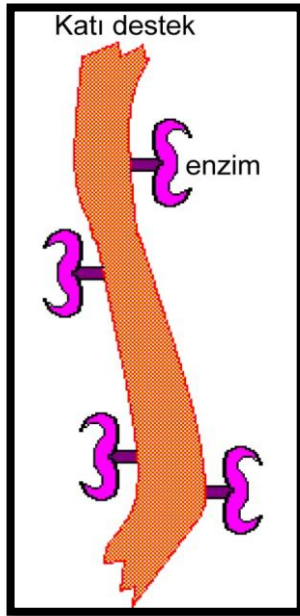
Fiziksel Metotlar

Fiziksel metotlar ile enzimin belirli bir yere tutturulması veya hapsedilmesi prensibine dayanan bir metottur. Enzimlerin immobilizasyonu bazı fiziksel kuvvetlerin etkileştirilmesiyle elektrostatik, protein-protein etkileşmesi, iyonik bağların oluşumu vb. enzimin destek maddesindeki mikrobölmeler içerisinde veya gözenekli membranlarda tutturulmasıyla sağlanır. Fiziksel immobilizasyon metotları tamamen tersinirdir. Bazı özel örneklerde göz ardı edilemeyecek kadar tersinmez bağ oluşumları da gözlenebilir. Fiziksel metotlar adsorpsiyon ve hapsedme ile immobilizasyon olarak iki gruba ayrılabilir.

a) Adsorpsiyon ile immobilizasyon

Bu metot çok eski ve basit bir immobilizasyon metodudur. Enzim immobilizasyonu katı matris üzerinde enzimin fiziksel adsorpsiyonuna veya iyonik bağlanmasına dayanır (Şekil 2.19). Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyondan sorumlu kuvvetler hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir. İyonik bağlanma ile immobilizasyon,

proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karşıt yükleri arasındaki çekim kuvvetlerine dayanır. Enzimin suda çözünmeyen materyallerde adsorpsiyonu, pH, çözücü karakteri, iyonik kuvvet, protein ve adsorbanın derişimi, sıcaklık gibi deney koşullarına bağlıdır. Enzim ile destek maddesi arasındaki zayıf bağlardan dolayı adsorplanan enzim kullanım esnasında taşıyıcıdan uzaklaşabilir, bu da metodun bir dezavantajıdır. Adsorpsiyonla immobilizasyon basit, çeşitli yüklü taşıyıcılar seçilebildiği ve taşıyıcılar farklı fiziksel şekillerde kullanılabilirdiği için avantajlıdır. Ayrıca bu metotta enzim aktifliğini büyük ölçüde veya tamamiyle korur. Bu metot tersinirdir ve bu da destek maddesinin ve enzimin başka amaçlarda tekrar kullanımını sağlar. En çok kullanılan taşıyıcı maddeler anyon ve katyon değiştiricili reçineler, sentetik polimerler, aktif karbon, silikajel, diatomili topraklar, killer, alumina, gözenekli camlar ve seramiklerdir [60,61].

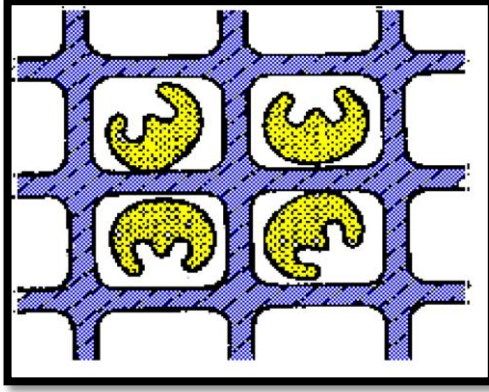


Şekil 2.18. Destek materyeline enzimin adsorpsiyonu

b) Hapsetme ile immobilizasyon

Yarı geçirgen membranlarda yada polimerik matriklerde enzimin hapsedilmesi prensibine dayanan bir yöntemdir (Şekil 2.20) [52]. Enzim, sulu

monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer çapraz bağlanma, ısı, gama radyasyonu veya UV ışınlarıyla başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir [62,63]. Polimerik matriks, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeterli derecede sıkı olması gerekir. Bu metot her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için çok kullanılan bir yöntemdir [52]. Hapsetme metodu mikrokapsül ve kafes tipi olarak iki gruba ayrılır.

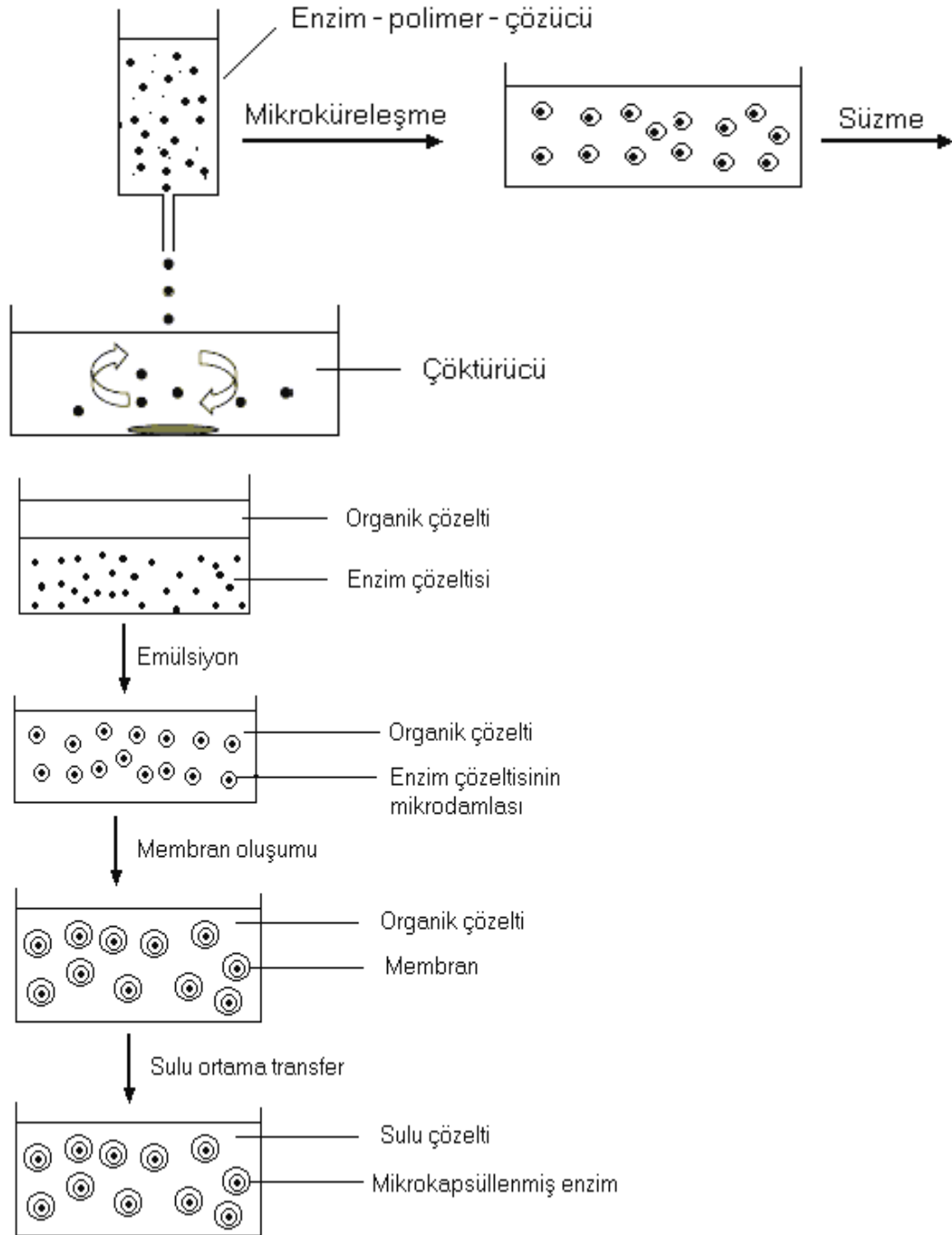


Şekil 2.19. Destek metaryeline enzimin hapsetme ile immobilizasyonu

i) Mikrokapsül ile hapsetme metodu

Bu metotda 10-1000 μm çaplı küçük yarı geçirgen membranlar içine enzim molekülleri hapsedilmektedir. Yarı geçirgen membran, büyük protein veya enzim moleküllerinin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürün moleküllerinin serbestçe mikrokapsül içine giriş ve çıkışına izin verir. Enzimlerin mikrokapsülleme şekillerinden birincisi faz ayrımıdır. Faz ayrımı metodunda, enzim ve mikrokapsülü oluşturan çözelti damlalar şeklinde çöktürücüye ilave edilir. Diğer ikinci metot olan, ara yüzey polimerizasyonun da ise enzimin sulu bir çözeltisi, suyla karışmayan organik çözelti içerisinde emülsiyeye edilir. Ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikro damlalarının etrafında membran oluşturur. Böylece polimerik membran tarafından sarılan enzim mikrokapsülleme olur (Şekil 2.21). Mikrokapsülleme yöntemi ile hapsetmede herhangi bir modifikasyon

olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır [64]. Yüzey-hacim oranının büyük olması, mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat reaksiyonunu artırır. Mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein derişimine gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler için sınırlı olması, bu yöntemin dezavantajlarıdır.

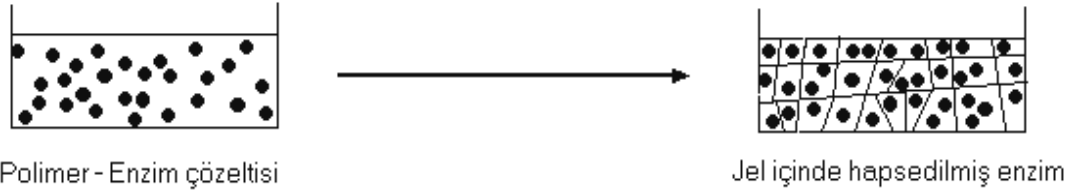


Şekil 2.20. Mikrokapsülleme ile immobilizasyon yöntemleri

ii) Kafes tipi hapsedme metodu

Suda çözünmeyen çapraz bağlı polimerlerin boşluklar içinde enzimin tutulması esasına dayanan bir metottür. UV veya gama ışınları, enzim içeren monomer yada polimer çözeltilerine uygulanarak yüksek oranda çapraz bağlı

bir polimer şebekesi oluşturulur (Şekil 2.22). Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisinde tutulur ve jel matrisin dışına çıkamaz, fakat substrat ve ürün sürekli olarak giriş-çıkış yapabilir.



Şekil 2.21. Kafes tipi hapsedme metodu ile immobilizasyon

Enzim kimyasal değişime uğramaz ve enzimin özelliklerinde herhangi bir değişim gözlenmez. Metot, farklı fiziksel formlarda suda çözünmeyen enzim türevlerinin hazırlanmasına olanak verir. Jelatinimsi yapıya sahip enzim türevleri, immobilize bir enzimin hem düzenli hem de düzensiz yüzeyler üzerinde kolayca depolanmasını sağlar.

Bu metodun avantajları aşağıda sıralanmıştır.

1. Ortamdaki monomer ve çapraz bağlayıcı derişimini değiştirerek farklı büyüklükte gözenek boyutuna sahip polimerik kafesler elde edilebilir.
2. Polimerleşme kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleşebilmektedir.
3. Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzimin yapısını ve aktifiğini kimyasal metotlara göre daha az etkiler.

Çapraz bağlı polimer ağlarından enzimin sızması, küçük hacimli substratlar için sınırlı olması ve makromoleküler substrat için düşük aktiflik göstermesi bu yöntemin dezavantajlarıdır [62,64].

2.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

İmmobilizasyon işlemi sırasında veya immobilizasyondan sonra aktif merkezin zarar görmeyeceği bir yöntem seçilmelidir. Böyle bir seçimin sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir. Enzim ile

taşıyıcı arasında herhangi bir bağlama söz konusu ise bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli veya immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır [65]. Bu koruma bazen substrat bazen de yarışmalı inhibitör tarafından sağlanır. Çizelge 2.3' de enzim immobilizasyon yöntemleri çeşitli bakımlardan karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2.2. Immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Özellik	Kovalent Bağlama	Adsorpsiyon	İyonik Bağlama	Çapraz bağlama yöntemi	Hapsetme yöntemi
Hazırlanması	Zor	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Enzim aktivitesi	Yüksek	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
Bağ gücü	Kuvvetli	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli
Substrat spesifikliği	Değişebilir	Değişmez	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
Yenilenme	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil
Genel uygulanabilirlik	Orta	Düşük	Orta	Düşük	Yüksek
İmmobilizasyon masrafı	Yüksek	Düşük	Düşük	Orta	Düşük

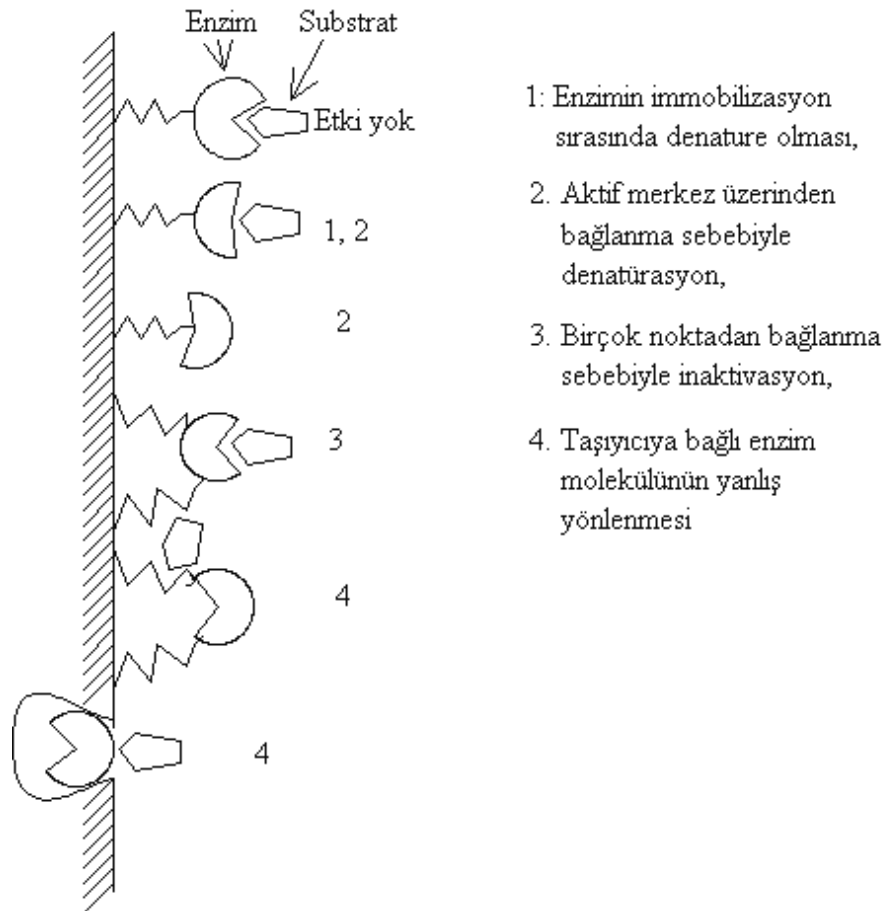
Taşıyıcıya bağlanma sonucu enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi doğaldır. Enzim molekülünün hareket yeteneği sınırlanır, konformasyonu değişir, kimyasal kovalent bağlanma durumunda yükü ve kimyasal yapısı değişir.

2.6. Immobilizasyonun Enzim Aktivitesine Etkisi

Teorik olarak immobilizasyondan sonra enzimin spesifik aktivitesinde düşme beklenir. Fakat hiç değişmediği veya arttığı örneklere de literatürde

rastlanmaktadır. Enzim aktivitesindeki düşmenin başlıca sebepleri Şekil 2.23' de verilmiştir.

Enzim immobilizasyonunun verimi aktivite hakkında fikir vermez. Bağlı enzimin ne oranda aktif enzim molekülü içerdiği ancak "aktif merkez tayini" ile belirlenebilir [54].



Şekil 2.22. Immobilizasyonun enzim aktivitesine etkisi

Enzimin Kararlılığı

Endüstriyel üretimde kullanılacak bir immobilize enzim örneğinin kararlılığı en önemli kriterlerden biridir. Immobilize enzimin kararlılığından anlaşılan, belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak korunmasıdır. Enzim aktivite kaybı değişik sebeplere dayanır (mikrobiyal yıkım, sıcaklığın etkisi, pH veya kimyasal başka etkiler vb.). Bunun dışında taşıyıcının

parçalanması veya başka sebepler ile matriksten enzimin uzaklaşması da aktivite kaybına sebep olur. Ayrıca substrat çözeltisindeki kirlilikler tarafından matriks gözeneklerinin tıkanması da immobilize enzimi etkisiz hale getirir.

2.7. İmmobilizasyon Metodunun Seçimi

Yapılan immobilizasyonun başarılı olabilmesi için aşağıdaki faktörlere dikkat edilmelidir.

1. Enzim, immobilizasyonun gerçekleştirileceği koşullarda kararlı olmalıdır.
2. Enzimin aktif uçları, çapraz bağlayıcı reaktiflerle reaksiyona girmemelidir. Çapraz bağlayıcı reaktif, enzimin aktif ucuna nüfuz etmemesi için olabildiğince büyük olmalıdır.
3. Mümkün olabildiğince enzimin aktif ucu korunmalıdır. Sülfidril enzimleri gibi, glutatyon veya sistein ile reaksiyona sokularak korunabilir ve daha sonra tekrar aktifleştirilebilir.
4. İmmobilizasyon sonunda bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulanan yıkama işlemi enzimi etkilememelidir.
5. İmmobilize enzim, bazı kimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılacak ise immobilizasyon metodu seçilmeden önce reaksiyon doğası göz önünde bulundurulmalıdır.
6. Destek materyalinin mekanik özellikleri, özellikle fiziksel formu ve mekanik kararlılığına dikkat edilmelidir [50].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetilkolinesteraz (AChE), (asetilkolin asetilhidrolaz EC 3.1.1.7), Asetiltiyokolin iyodür(ACh), 5,5'-Ditiyobis (2-nitro benzoik asit) (DTNB): Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.

Tetraetil-ortasilikat (TEOS): Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.

1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) karbodiimid (EDAC) (% 99,0), N hidroksisüksinimit (NHS) (% 98,0), mutlak Etanol (\geq % 99,5), Poli(etilen)imin (PEI), Amonyum Hidroksit (NH_4OH) ve 3-(aminopropil)trioksisilan (APTES) Aldrich firmasından temin edildi.

Sodyum dihidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfat: Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

3.2. Kullanılan Cihazlar

UV/VIS Spektrofotometre: UNICAM UV/Vis Spektrofotometre

pH metre : Orion pH metre 420A

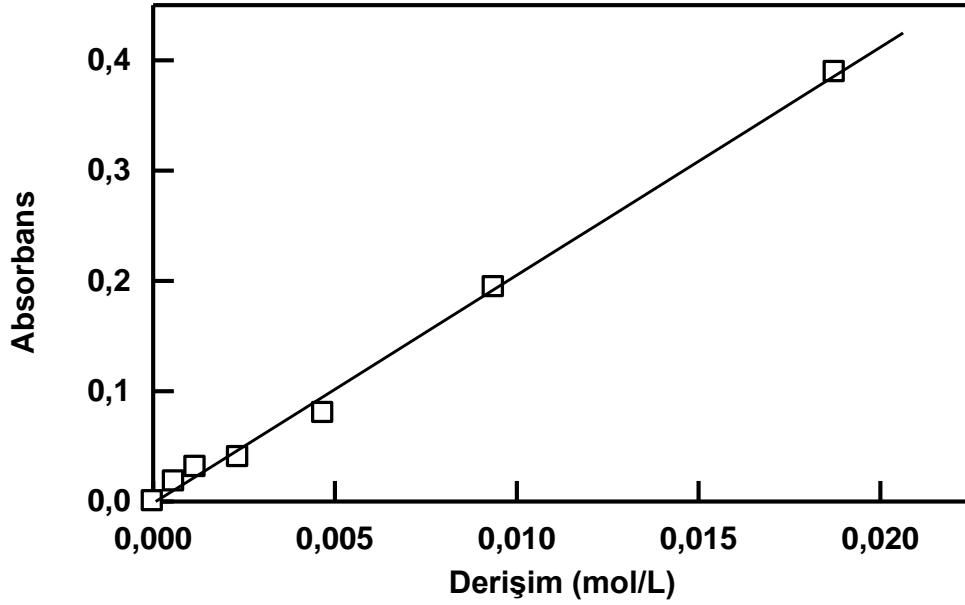
Çalkalamalı su banyosu : ST 402 NÜVE marka sıcaklık kontrollü su banyosu

3.3. Asetiltiyokolin iyodür, DTNB ve Asetilkolinesteraz Çözeltilerinin Hazırlanması

Asetiltiyokolin iyodür (substrat) çözeltisi, pH 8 (18,75 mM) fosfat tamponu kullanılarak hazırlandı. DTNB çözeltisi, pH 7 (0,01 M) fosfat tamponu kullanılarak hazırlandı. Asetilkolinesteraz enzim çözeltisi, 20 mL %1 lik jelatin çözeltisininin 1:200 oranında distile su ile seyreltilmesi ile oluşan seyreltik jelatin çözeltisinden hazırlandı.

3.4. Asetiltiyokolin iyodür Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon grafiği hazırlamak amacıyla farklı derişimlerde (18,75-0,5mM) asetiltiyokolin iyodür çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 20 µL alınıp, içerisinde DTNB çözeltisi (100 µL, 0,01 M), 50 µL enzim çözeltisi ve fosfat tamponu (3 mL, 0,1 M) bulunan karışıma ilave edildikten 20 dakika sonra UV spektrofotometresi kullanılarak 412 nm' de aynı şekilde hazırlanan ancak substrat içermeyen blank çözeltisine karşı absorbans değerleri ölçüldü. Asetiltiyokolin iyodür derişimlerine karşı gelen absorbans değerleri. Şekil 3.1' de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Asetiltiyokolin iyodür kalibrasyon grafiği

3.5. Enzim İmmobilizasyonu

3.5.1. Silika nanopartiküllerin sentezi

Stöber yöntemi ile silika nanaopartiküller sentezlendi [66]. Stöber yöntemine göre 114 mL etanol, 6 mL amonyumhidroksit ve farklı hacimlerde (1-5 mL) TEOS oda sıcaklığında 5 saat manyetik karıştırıcıyla karıştırıldı. Daha sonra

nanopartiküller ultrasonik banyoda etanolle 3 defa yıkandı. Elde edilen silica nanopartiküller 25°C' lik etüvde 2 gece bekletilerek kurutuldu.

3.5.2. Silica nanopartiküllerin APTES ile modifikasyonu

Elde edilen silica nanopartiküllerden 1 g alındı, üzerine 50 mL etanol ve 2 mL APTES ilave edildi. Tepkime 50 °C 'de 18 saat geri soğutucu altında karıştırılarak gerçekleştirildi. Elde edilen APTES modifiyeli silica nanopartiküller 25 °C' lik etüvde 2 gece bekletilerek kurutuldu.

3.5.3. Silica nanopartiküllerin PEI ile modifikasyonu

1g PEI 25 mL etanolde çözüldü. Daha sonra 114 mL etanol, 6 mL amonyumhidroksit, 1,5 mL TEOS ve etanolde çözülen PEI iki boyunlu reaksiyon balonuna konularak oda sıcaklığında mekanik karıştırıcı ile 24 saat karıştırıldı. Elde edilen PEI modifiyeli silica nanopartiküller 25 °C' lik etüvde 2 gece bekletilerek kurutuldu.

3.5.4. APTES modifiyeli silica nanopartiküllere enzim immobilizasyonu

Öncelikle Asetilkolinesterazın (0,5 mg) asit uçlarının aktif hale gelmesi için EDAC/NHS (1:1, m/m) 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra üzerine APTES bağlı 0,5 g silica nanopartikül eklenerek oda sıcaklığında 24 saat karıştırılarak enzim immobilize edildi. Enzim immobilize edilen APTES modifiyeli silica nanopartiküller 25 °C' lik etüvde 2 gece bekletilerek kurutuldu.

3.5.5. PEI modifiyeli silica nanopartiküllere enzim immobilizasyonu

Öncelikle Asetilkolinesterazın (0,5 mg) asit uçlarının aktif hale gelmesi için EDAC/NHS (1:1, m/m) 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra üzerine PEI bağlı 0,5 g silica nanopartikül eklenerek oda sıcaklığında 24 saat karıştırmak suretiyle enzim immobilize edildi. Enzim immobilize edilen PEI

modifiyeli silika nanopartiküller 25 °C' lik etüvde 2 gece bekletilerek kurutuldu.

3.6. Aktiflik Tayini

3.6.1. Serbest asetilkolinesterazın aktiflik tayini

Asetilkolinesterazın aktifliği Ellman tarafından tanımlanan metoda göre tayin edildi [74]. 3 mL fosfat tamponu, 20 µL asetiltiyokolin iyodür (18,75 mM) ve 100 µL DTNB (0,01 M) içeren karışıma 50 µL enzim çözeltisi ilave edilerek tepkime başlatıldı. Tepkime süresince sıcaklık çalkalamalı su banyosunda 25 °C' da 20 dakika sabit tutuldu. Oluşan sarı renkli kompleksin UV spektrofotometresi kullanılarak 412 nm de aynı şekilde hazırlanan ancak substrat içermeyen blank çözeltisine karşı absorbansı ölçüldü. Aktiflik, zamana karşı ölçülen absorbans değerlerinden ve asetiltiyokolin iyodür kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{Hız (v)} = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{412}}{\Delta t} \times \frac{\Delta c}{\Delta A_{412}}$$

Bu eşitlikte c, g/mL olarak asetiltiyokolin iyodür derişimindeki değışimi gösterir.

Asetilkolinesteraz için *1 ünite enzim* veya birim aktiflik, pH=7'de 1 dakikada ve 25°C da 1 µmol asetiltiyokolin iyodürü parçalayan enzim miktarıdır.

3.6.2. İmmobilize asetilkolinesterazın aktiflik tayini

İmmobilize asetilkolinesterazın aktifliği bölüm 3.6.1' de açıklandığı gibi tayin edildi.

3.7. Aktifliğe pH Etkisi

3.7.1. Serbest AChE nin aktifliğine pH' nın etkisi

Serbest AChE' nin aktifliğine pH etkisini araştırmak amacıyla çeşitli pH larda (4,0 – 9,0) fosfat tamponu ile hazırlanan enzim, asetiltiyokolin iyodür ve DTNB çözeltileri kullanıldı ve bölüm 3.6.1' de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilmek suretiyle aktiflikler tayin edildi.

3.7.2. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine pH' nın etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla çeşitli pH' larda (4,0 – 9,0) bölüm 3.6.1' de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

3.7.3. PEI modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine pH' nın etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine pH nın etkisini incelemek amacıyla çeşitli pH larda (4,0 – 10,0) bölüm 3.6.1'de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

3.8. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi

3.8.1. Serbest AChE' nin aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest AChE nin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (15°C - 40°C) bölüm 3.6.1' deki reaksiyonlar gerçekleştirildi ve aktiflikler tayin edildi.

3.8.2. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine sıcaklığın etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (15°C - 40°C) bölüm 3.6.1' de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

3.8.3. PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine sıcaklığın etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (15°C - 45°C) bölüm 3.6.1' de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

3.9. Aktifliğe Substrat Değişiminin Etkisi

3.9.1. Serbest AChE nin aktifliğine substrat değişiminin etkisi

Serbest asetilkolinesterazın aktifliğine substrat değişiminin etkisini incelemek amacı ile değişik derişimlerde (18,75-0,59 mM) hazırlanan substrat çözeltilerinde bölüm 3.6.1' de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik

3.9.2. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine substrat değişiminin etkisi

İmmobilize asetilkolinesterazın aktifliğine substrat değişiminin etkisini incelemek amacı ile değişik derişimlerde (18,75-0,59 M) hazırlanan substrat çözeltilerinde bölüm 3.6.1' de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

3.9.3. PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

İmmobilize asetilkolinesterazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile değişik derişimlerde (18,75-0,59 M) hazırlanan substrat çözeltilerinde bölüm 3.6.1' de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

3.10. Depolama Kararlılığı

3.10.1. Serbest AChE' nin depolanma kararlılığı

Serbest AChE'nin depolanma kararlılığını incelemek amacı ile fosfat tamponunda (pH 8; 3 mL, 0,1 M) hazırlanan enzim çözeltileri buzdolabında 4°C de saklandı. Belirli aralıklarda enzim çözeltilerinden alınan örneklerle bölüm 3.6.1' de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

3.10.2. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin depolanma kararlılığı

İmmobilize AChE' nin depolanma kararlılığını incelemek amacıyla buzdolabında 4°C de saklanan APTES modifiyeli silika nanopartiküllerden belirli aralıklarla alınan örnekler kullanılarak bölüm 3.6.1' de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

3.10.3. PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin depolanma kararlılığı

İmmobilize AChE' nin depolanma kararlılığını incelemek amacıyla buzdolabında 4°C de saklanan PEI bağlı silika nanopartiküllerden belirli aralıklarla alınan örnekler kullanılarak bölüm 3.6.1' de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

3.11. Tekrar Kullanılabilirlik

3.11.1. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin tekrar kullanılabilirliği

İmmobilize AChE' nin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacı ile belli aralıklarla enzim aktiflikleri tayin edildi. APTES modifiyeli immobilize enzim kolon sistemine yerleştirildi. 3 mL fosfat tamponu, 20 µL asetiltiyokolin iyodür (18,75 mM) ve 100 µL DTNB (0,01 M) içeren karışım sürekli sistem ile kolondan geçirilerek aktiflikler tayin edildi.

3.11.2. PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize edilen AChE' nin tekrar kullanılabilirliği

İmmobilize AChE' nin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacı ile belli aralıklarla enzim aktiflikleri tayin edildi. PEI modifiyeli immobilize enzim kolon sistemine yerleştirildi. 3 mL fosfat tamponu, 20 µL asetiltiyokolin iyodür (18,75 mM) ve 100 µL DTNB (0,01 M) içeren karışım sürekli sistem ile kolondan geçirilerek aktiflikler tayin edildi.

4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE TARTIŞMA

4.1. Silika Nanopartiküllerin Sentezi ve Tanecik Boyut Analizi

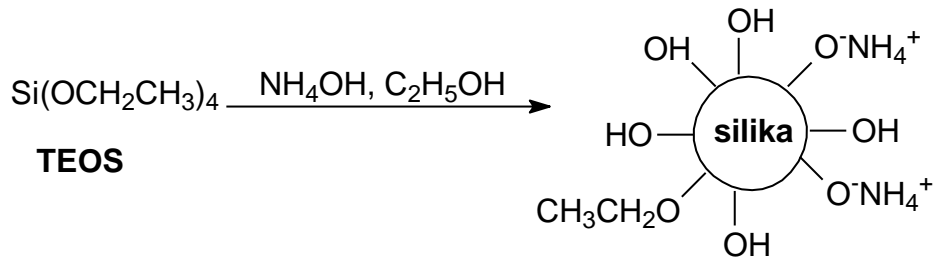
Kolloidal kararlılığa sahip silika nanopartiküller, kolaylıkla sentezlenebilmeleri, boyutlarının ve boyut dağılımlarının kontrol edilebilmesi açısından son yıllarda oldukça ilgi çekmektedirler.

1968 yılında Stöber ve arkadaşları kolloidal kararlılığa sahip silika nanopartiküllerin sentezi için oldukça basit bir yöntem önermişlerdir [66]. Bu yöntemde göre, tetraetilortosilikatın (TEOS) etanol ve katalizör olarak kullanılan NH_4OH çözücü karışımı içerisinde gerçekleştirilen kondenzasyon ve hidroliz tepkimeleri sonucunda silika nanopartiküller sentezlenmektedir. Genellikle hidroliz tepkimesini tek başına hidrolize olabilen TEOS monomeri vermektedir (Şekil 4.1.Eş. 4.1.). Bu hidroliz tepkimesi sonucu meydana gelen araürün, kondenzasyon tepkimesi sonucunda silika nanopartiküllerini oluşturmaktadır (Şekil 4.1.Eş. 4.2.).



Şekil 4.1. Stöber metoduna göre silika nanopartiküllerinin sentezi

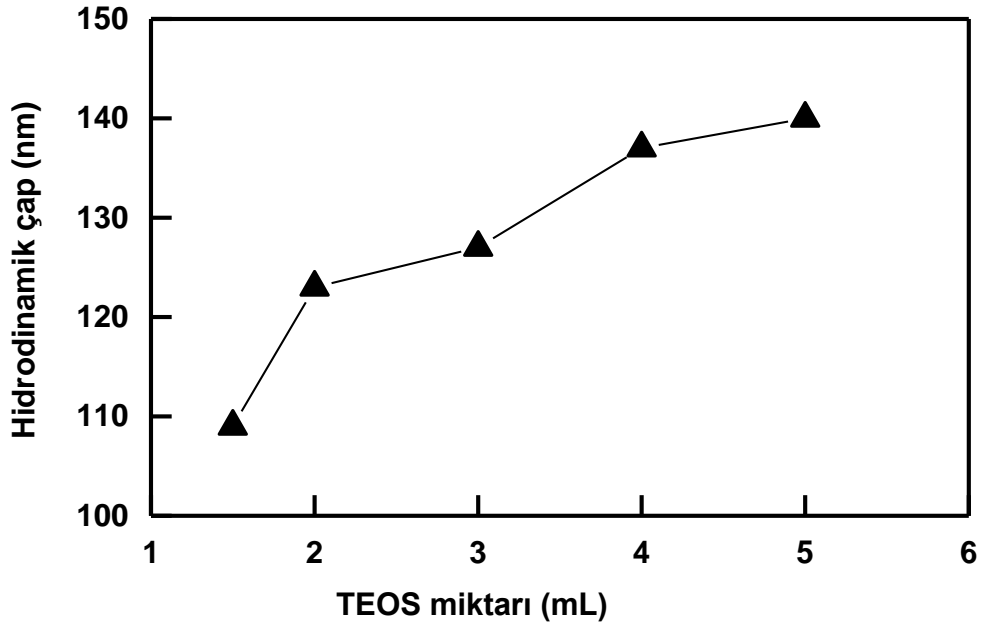
Oluşan silika nanopartiküller çözücü ortamındaki NH_4^+ iyonlarından dolayı ortaya çıkan elektrostatik itme kuvvetleri sebebiyle kararlı hale gelmektedirler (Şekil 4.2.) [67].



Şekil 4.2. Silika nanopartiküllerinin stabilizasyonu

Sentezlenen silika nanopartiküller, yüzeylerindeki hidroksil gruplarından dolayı polimerlerle ve/veya organik moleküllerle kolaylıkla fonksiyonel hale getirilebilirler.

Farklı miktarlarda TEOS kullanılarak Stöber metoduna göre sentezlenen silika nanopartiküllerin Dinamik Işık Saçılımı (DLS) yöntemi ile ölçülen hidrodinamik çapları Şekil 4.3'de verilmiştir

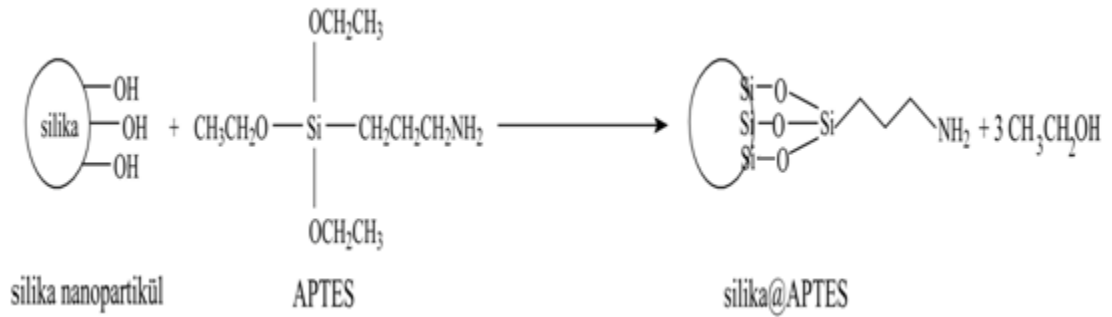


Şekil 4.3. Silika nanopartikül sentezinde kullanılan farklı TEOS miktarları ve nanopartiküllerin ortalama hidrodinamik çapları

Şekil 4.3' de görüldüğü gibi kullanılan TEOS miktarı arttıkça hidrat çapında artış gözlenmiştir. Hidrat çapındaki bu artışın sebebi, nanopartiküllerin agrege olmalarının ve koloidal kararlılıklarındaki azalmanın bir sonucu olabilir. Bu çalışmanın amacı doğrultusunda, koloidal kararlılığı en yüksek ve agregasyonu en düşük olan 109 nm' lik hidrat çapındaki silika nanopartiküller enzim immobilizasyonunda kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.2. Silika Nanopartiküllerin APTES ile Modifikasyonu

Amin sonlu nanopartiküller biyoaktif moleküllerin spesifik olarak bağlanabilmesi için uygundurlar. Ayrıca hidroksil sonlu silika nanopartiküllere enzimin kovalent immobilizasyonu için aktif uçların olmaması bu nanopartiküllerin amin sonlu organosilan molekülü ve PEI ile modifiye edilmesi için bir etkidir. Bu amaçla, öncelikle silika nanopartiküller 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) ile modifiye edilmiştir [68]. Bu modifikasyon için önerilen mekanizma Şekil 4.4' de verilmiştir.

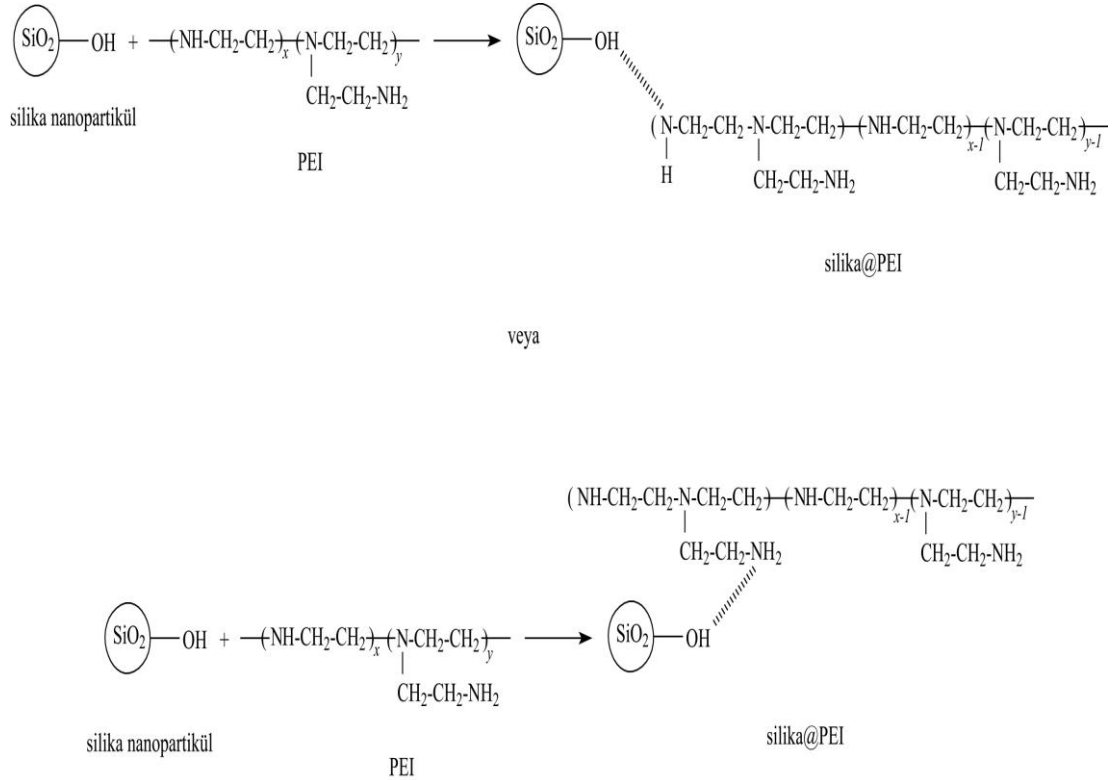


Şekil 4.4. Silika nanopartiküllerin APTES ile modifikasyon mekanizması

Silika nanopartiküller ile APTES arasındaki kondenzasyon tepkimesi sonucunda organosiloksan bağları oluşturulmuş ve amino grupları partiküllerin yüzeyine bağlanmıştır.

4.3. Silika Nanopartiküllerin PEI ile Modifikasyonu

Enzim immobilizasyonunda kullanılmak üzere yüzeylerin fonksiyonelleştirilmesi amacıyla nanopartiküller polietilenimin (PEI) polimeri ile amin gruplarınca zenginleştirilmiştir. Nanopartiküllerin PEI ile modifikasyon mekanizması Şekil 4.5' de verilmiştir.



Şekil 4.5. Silika nanopartiküllere PEI bağlanma mekanizması

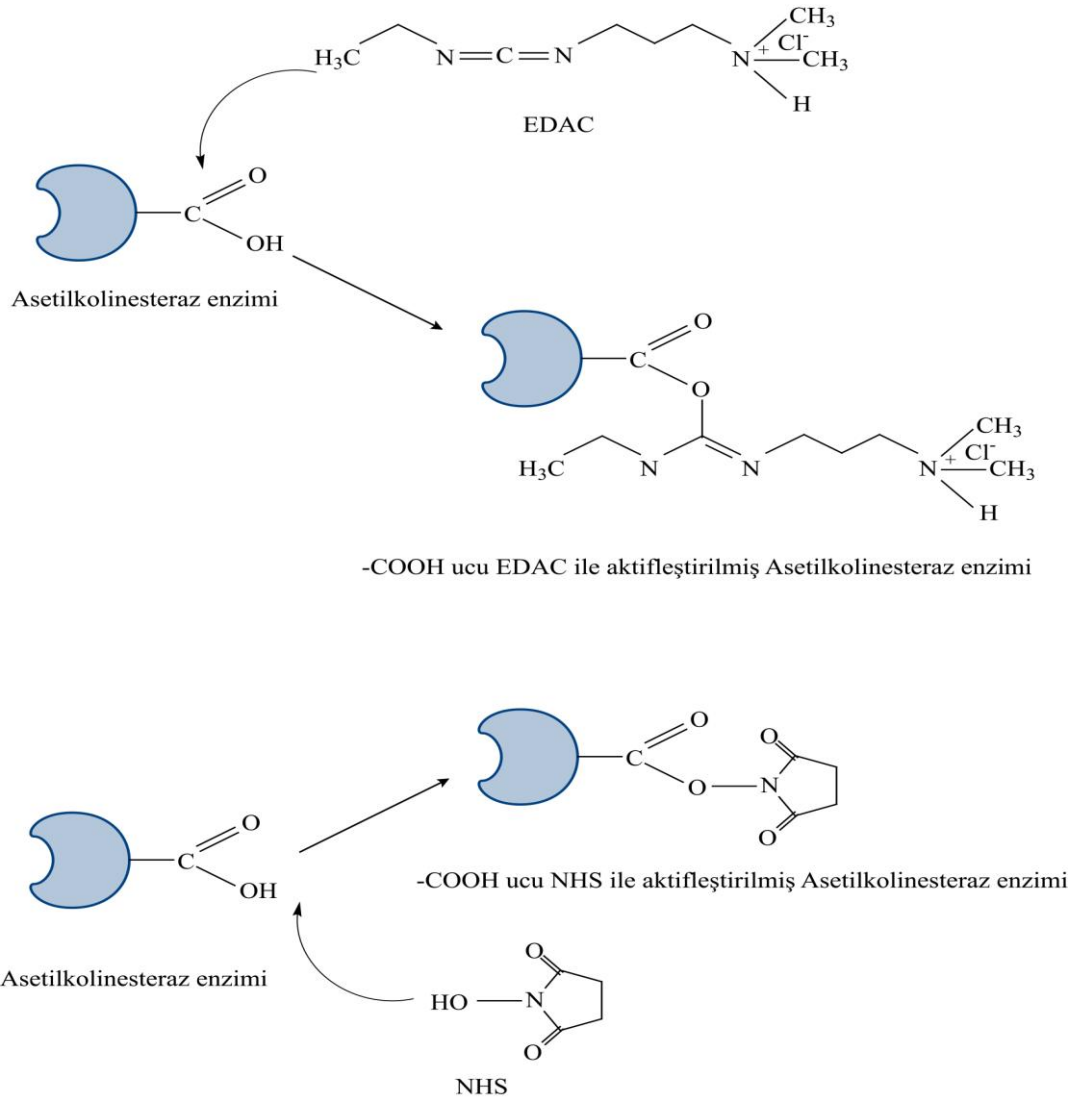
PEI yapısındaki amin gruplarıyla silika nanopartiküllerin –OH grupları arasındaki H-bağları ve Van der Waals etkileşimleri sebebiyle PEI polimerinin nanopartikül yüzeyine daha çok fiziksel adsorbe olduğu düşünülmektedir [69].

Mekanizmada PEI'in birincil ve ikincil amin grupları üzerinden yürüdüğü gösterilmiştir. PEI yapısındaki üçüncül amine bağlı komşu grupların ve dallanmış polimer zincirlerinin sterik engel oluşturması, üçüncül amindeki azot atomunun bir bağ daha yapmasıyla daha kararsız bir yapı oluşturmasından dolayı nanopartiküllerin üçüncül amin grubu üzerinden yürümeyeceği düşünülmüştür [70].

4.4. APTES ve PEI Bağlı Silika Nanopartiküllere Enzim İmmobilizasyonu

Amin sonlu nanopartiküllerin, biyoaktif moleküllerin spesifik olarak bağlanabilmesi için uygun oldukları bilinmektedir. Bu amaçla, öncelikle

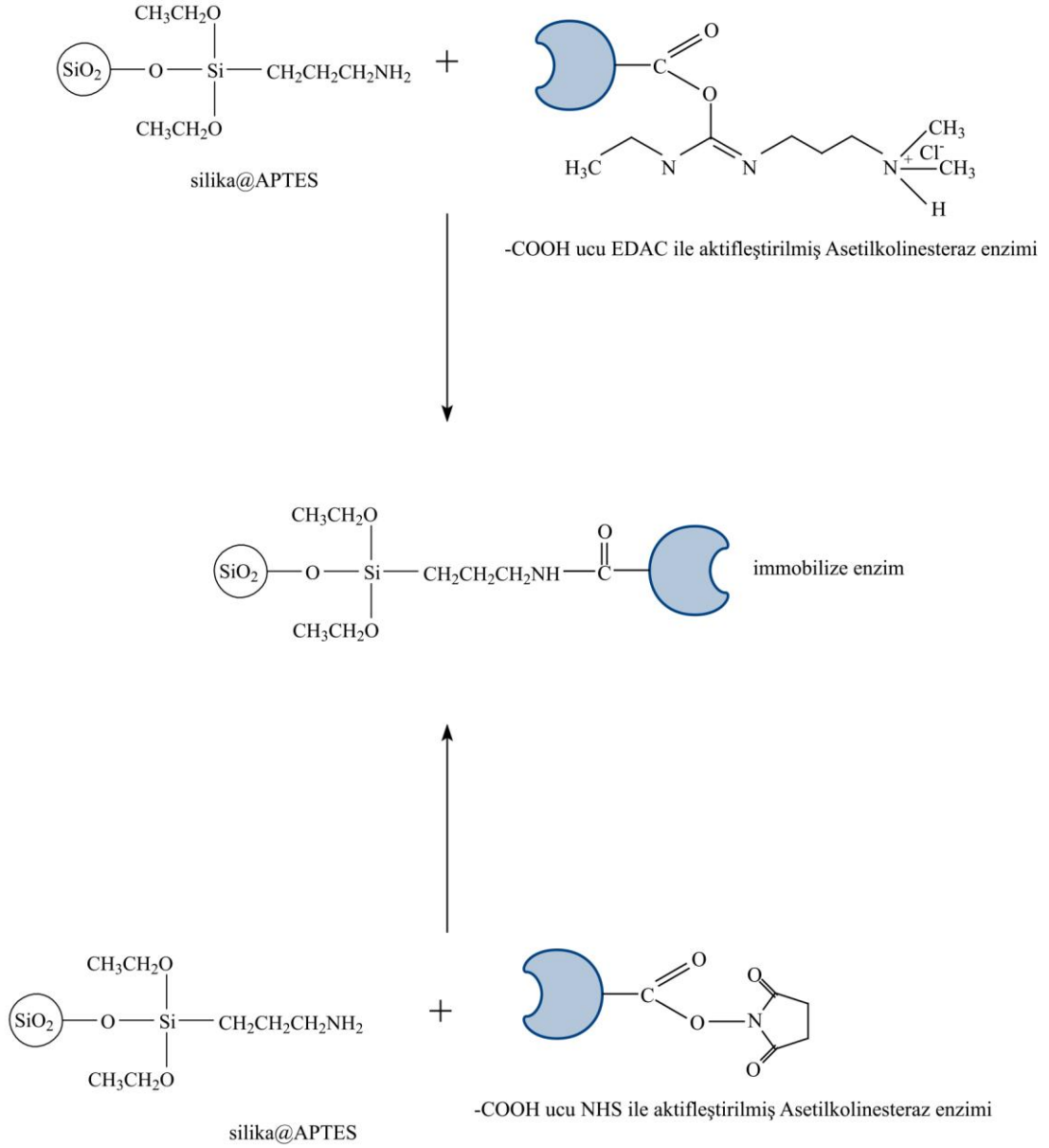
Asetilkolinesterazın karboksilli asit grupları 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDAC) ve N-hidroksisüksinimit (NHS) ile aktif hale getirmiştir. Bu aktifleşme mekanizması Şekil 4.6' da gösterilmiştir.



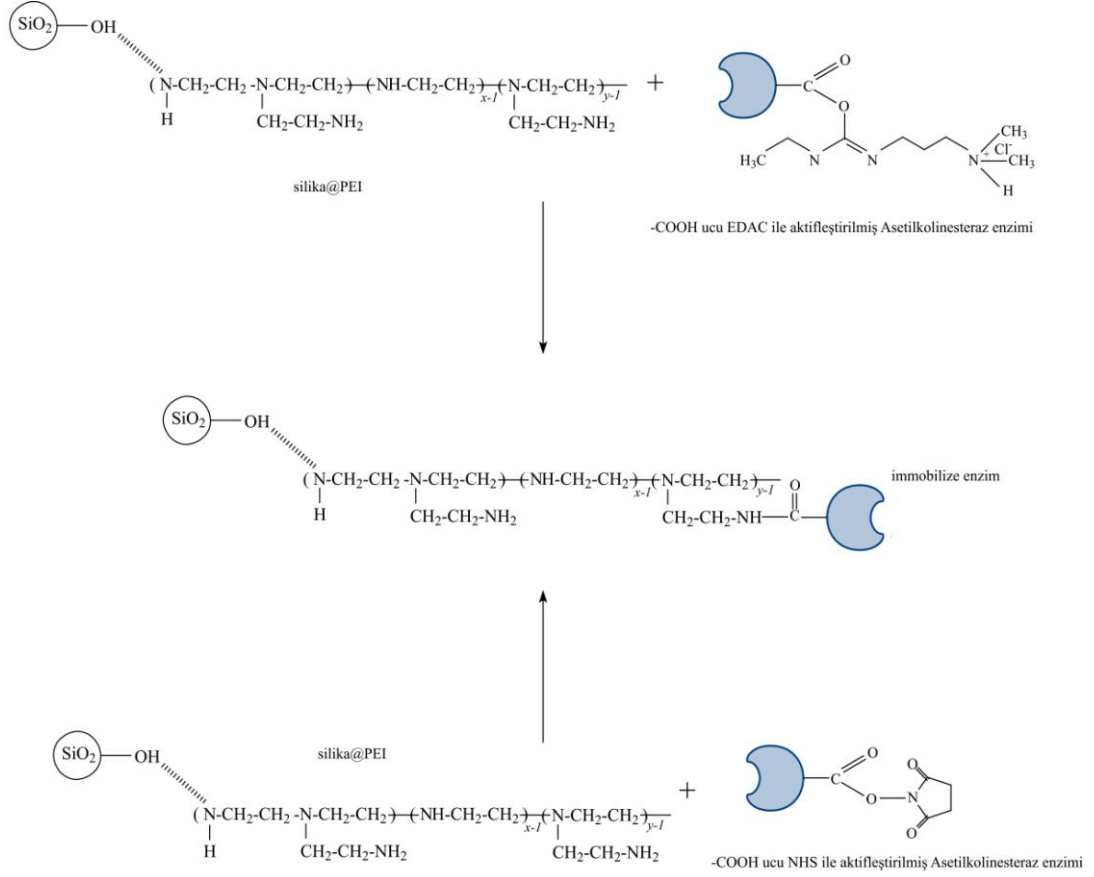
Şekil 4.6. AChE'nin asit ucunun EDAC/NHS varlığında aktiflenmesi

EDAC/NHS varlığında aktif hale gelen Asetilkolinesteraz enziminin -COOH uçları birincil amin molekülleri ile amit bağı oluşturmak için hazır durumdadır. Bölüm 3.5.4' de anlatıldığı gibi aktifleme yapıldığında, enzimin yapısındaki karboksilli asit gruplarıyla silika nanopartiküllerdeki birincil amin grupları arasında EDAC/NHS varlığında amit bağları oluşturmaktadır.

Asetilkolinesteraz enziminin yapısındaki karboksilli asit grubu ile APTES ve PEI yapısında bulunan birincil amin grupları arasında amit bağı oluşumu Şekil 4.7 ve Şekil 4.8' de gösterilmiştir.



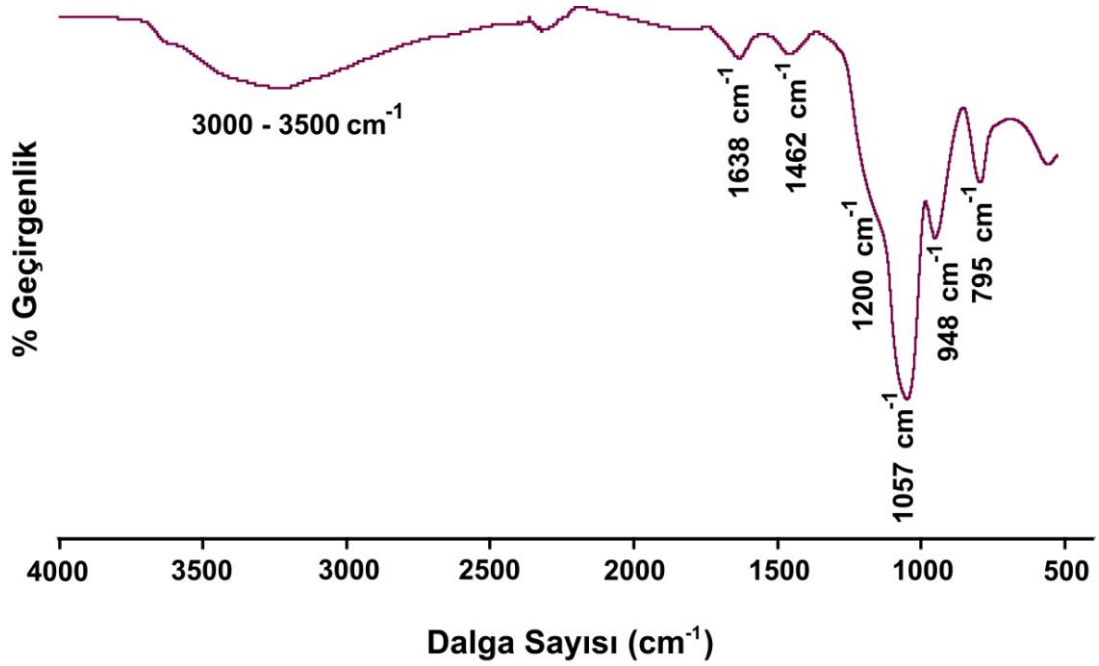
Şekil 4.7. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere AChE'nin bağlanma mekanizması



Şekil 4.8. PEI modifiyeli silika nanopartiküllere Asetilkolinesterazın bağlanma mekanizması

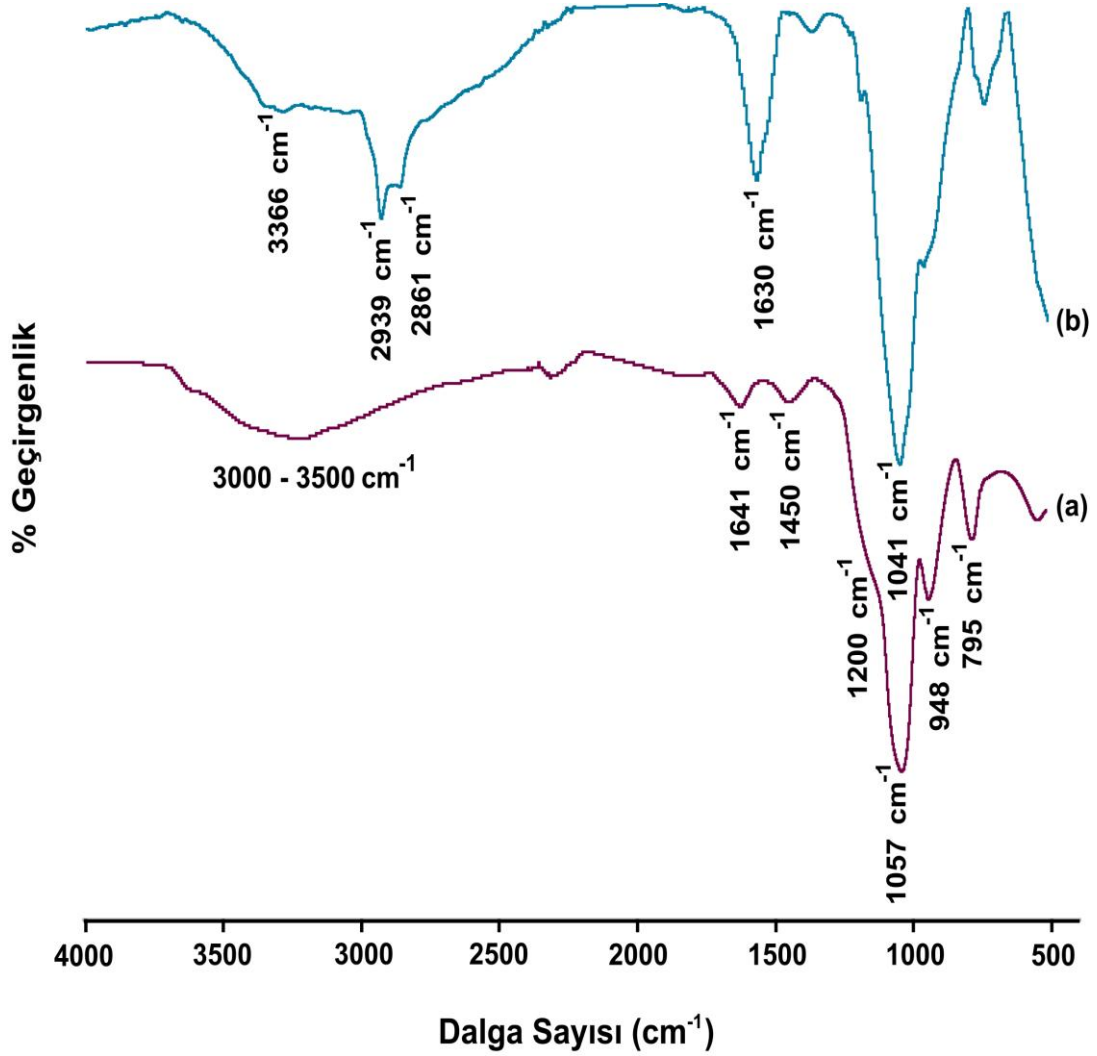
4.5. FT-IR Spektroskopisi ile Yapısal Karakterizasyon

Stöber yöntemi ile sentezlenen silika nanopartiküllerin yanısıra APTES ve PEI modifiyeli nanopartiküllerin yapısal karakterizasyonları FT-IR spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Silika nanopartiküllerin, FT-IR spektrumu Şekil 4.9' da verilmiştir.



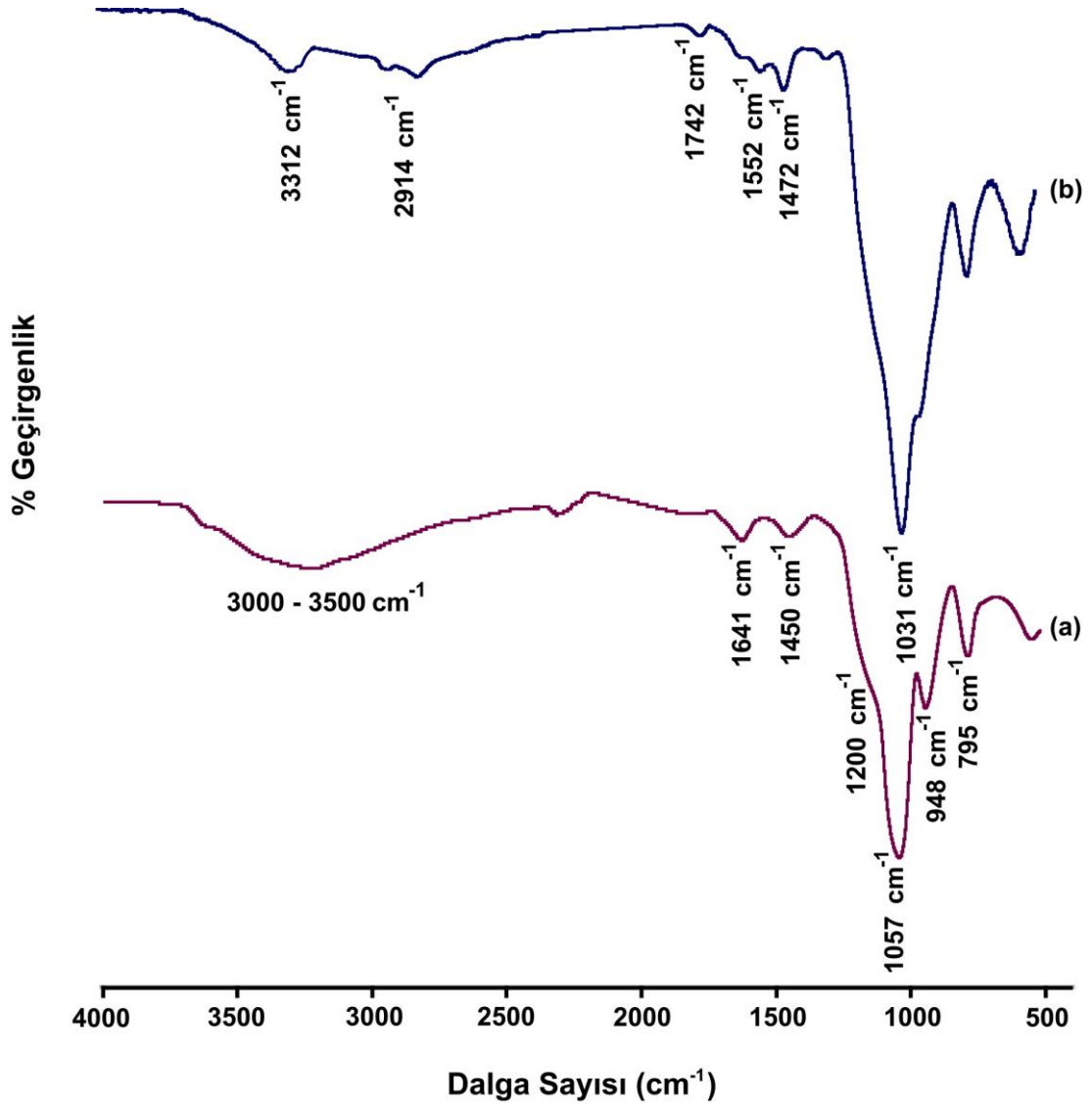
Şekil 4.9. Silika nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu

Silika nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu incelendiğinde, 1057, 948 ve 795 cm^{-1} deki bandlar SiO_2 ' ye ait gerilme titreşimlerine ait oldukları düşünülmektedir. 1200 cm^{-1} de gözlenen band Si-O-Si (siloksan) gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1462 cm^{-1} de gözlenen band Si-OCH₂ eğilme titreşimlerinden dolayı ortaya çıkmıştır. 1638 cm^{-1} gözlenen band H-OH gruplarına ait eğilme titreşimlerinden, 3000-3500 cm^{-1} aralığında gözlenen geniş band ise silanol (Si-OH) ve H-OH gruplarına ait gerilme titreşimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [71].



Şekil 4.10. (a) Silika (b) APTES modifiyeli silika nanopartiküllere ait FT-IR spektrumları

APTES ile modifiye edilen silika nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumunda 1630 cm^{-1} 'deki band $-\text{NH}_2$ gruplarına ait bükülme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 2861 cm^{-1} 'deki bandın yapıdaki $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ gruplarına ait simetrik gerilme titreşimlerine ait olduğu düşünülmektedir. 2939 cm^{-1} 'deki band yapıdaki $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ gruplarına ait asimetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 3366 cm^{-1} 'de gözlenen geniş band ise NH_2 gruplarına ait gerilme titreşimlerinden olduğu düşünülmektedir [71]. Sonuç olarak, FT-IR spektrumları silika nanopartiküllerin yüzeylerinin APTES ile kaplandığını göstermektedir.



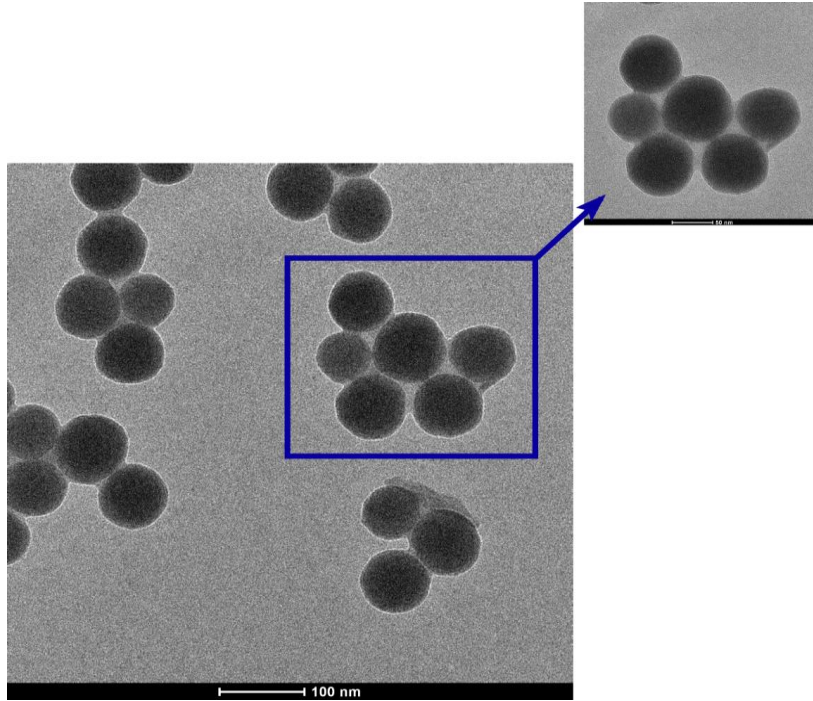
Şekil 4.11. (a) Silika (b) PEI bağlı silika nanopartiküllere ait FT-IR Spektrumları

PEI bağlı silika nanopartiküllerin spektrumunda 3312cm^{-1} de gözlenen band karakteristik aminometil (N-H) gruplarına ait bükülme titreşimlerine, 1742cm^{-1} de gözlenen band ise birincil alkilamin (C-N) gruplarına ait eğilme titreşimlerine ait olduğu düşünülmektedir. 1472 ve 1552cm^{-1} gözlenen bandlar ise C-N grubuna ait bükülme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 2914cm^{-1} 'deki band yapıdaki alifatik $-\text{CH}_2$ gruplarına ait gerilme titreşimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [70]. Bütün FT-IR

spektrumları silika nanopartiküllerin yüzeylerinin PEI ile kaplandığını göstermektedir.

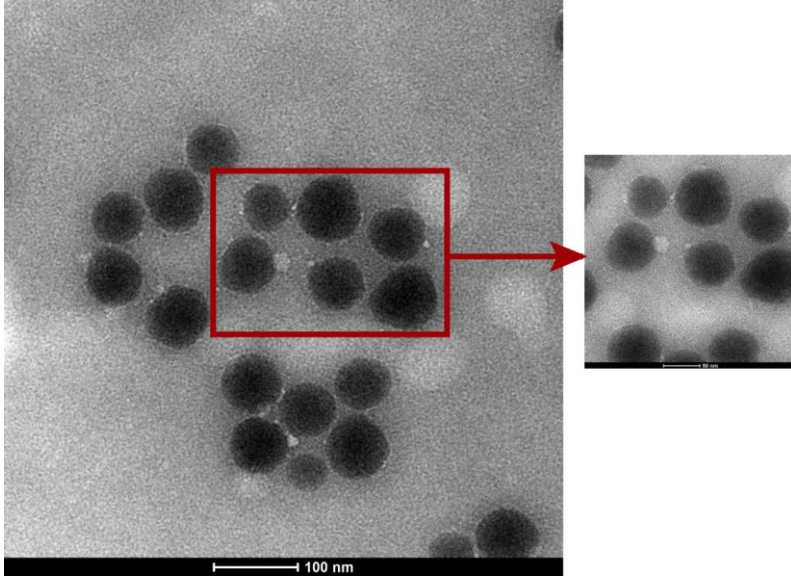
4.6. TEM ile nanopartiküllerin morfolojisi

Sentezlenen silika nanopartiküllerin, APTES ve PEI modifiyeli nanopartiküllerin morfolojisi Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile gerçekleştirilmiştir.



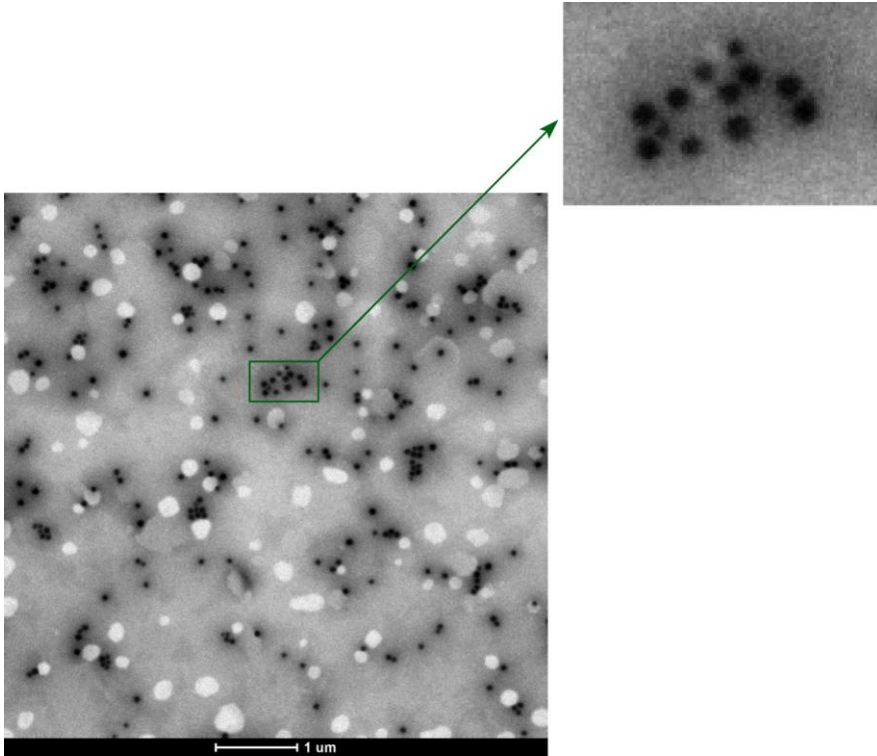
Şekil 4.12. Silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri

Şekil 4.12' de ki TEM görüntülerinden partikül boyutu 60 ± 10 nm olduğu bulunmuştur. Yüksek çözünürlüklü TEM analiz ölçümlerinden elde edilen görüntülerden silika nanopartiküllerin aynı düzgün küresel şekilde olduğu görülmektedir.



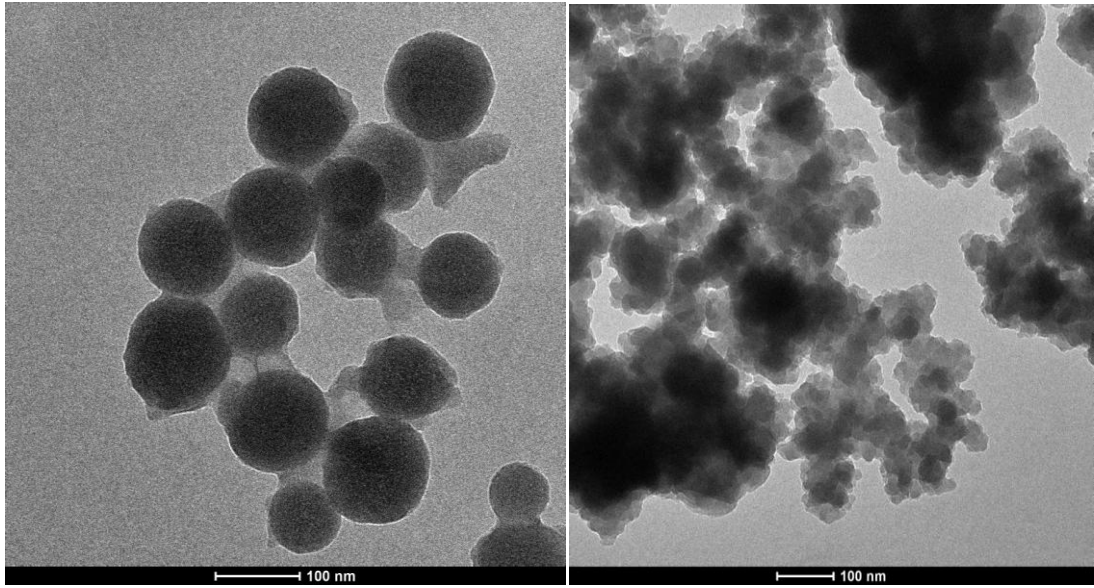
Şekil 4.13. APTES modifiyeli silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri

APTES modifiyeli silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri incelendiğinde küresel morfolojinin değişmediği ve partikül boyutunun yaklaşık 70 ± 10 nm olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.14. PEI bağlı silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri

PEI bağlı silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri incelendiğinde küresel morfolojide bir bozulma olmamiş basit bir çekidek-kabuk yapısı oluşmuştur. Çekirdek-kabuk yapısında koyu renkte görülen çekirdek kısmı silika nanopartiküllerden oluşmakta, açık renkli kabuk kısmı ise silika nanopartiküllere bağlanmış PEI yapısını göstermektedir.



(a)

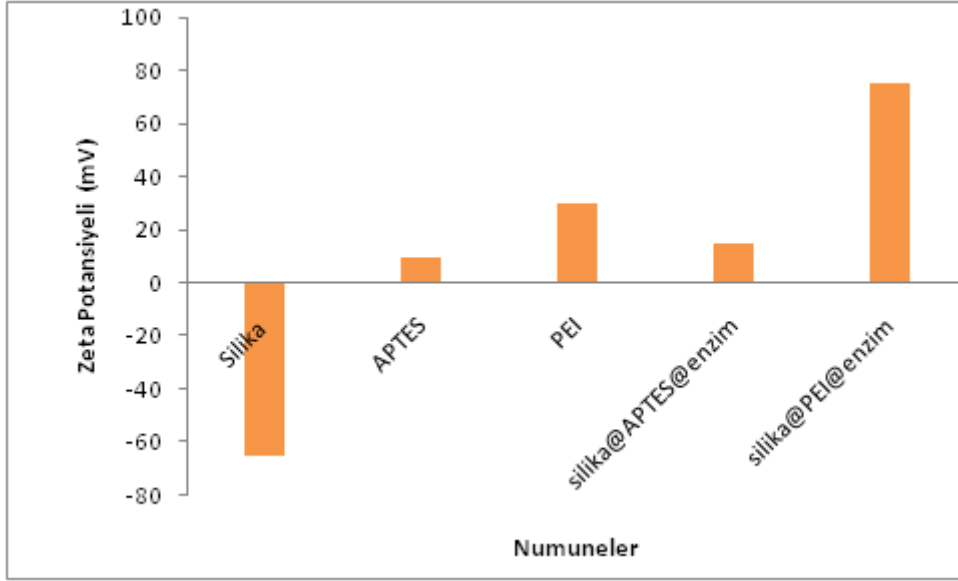
(b)

şekil 4.15. (a) APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin TEM görüntüsü (b) PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize enzimin TEM görüntüsü

APTES ve PEI modifiyeli silika nanopartiküllere enzimin bağlandığında, düzgün küresel morfolojilerinin bozulduğu gözlenmiştir.

4.7. Zeta Potansiyeli Ölçümleri

Silika nanopartiküller, APTES modifiyeli ve PEI bağlı silika nanopartiküllere, APTES ve PEI modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimlerin yüzeylerinin karakteristik özelliklerini belirlemek amacıyla Zeta Potansiyeli ölçümleri yapılmıştır ve sonuçlar şekil 4.16' da verilmiştir.



Şekil 4.16. Zeta potansiyel ölçüm sonuçları

Ç-potansiyeli değerinin büyüklüğü kolloidal sistemin kararlılığını belirlemektedir. Eğer dispersiyon içindeki taneciklerin hepsi negatif ya da pozitif Ç-potansiyeli değerine sahip ise tanecikler birbirlerini iterek bir araya gelemez. Kolloidal olarak kararlı ve kararsız dispersiyonu birbirinden ayıran Ç-potansiyeli sınır değeri genellikle $-30\text{mV} \geq \zeta \geq +30\text{ mV}$ aralığında rapor edilir. Bu aralığın dışında sistemin, taneciklerin bir araya gelerek çökmesini engelleyecek kadar kararlı olduğu söylenebilir.

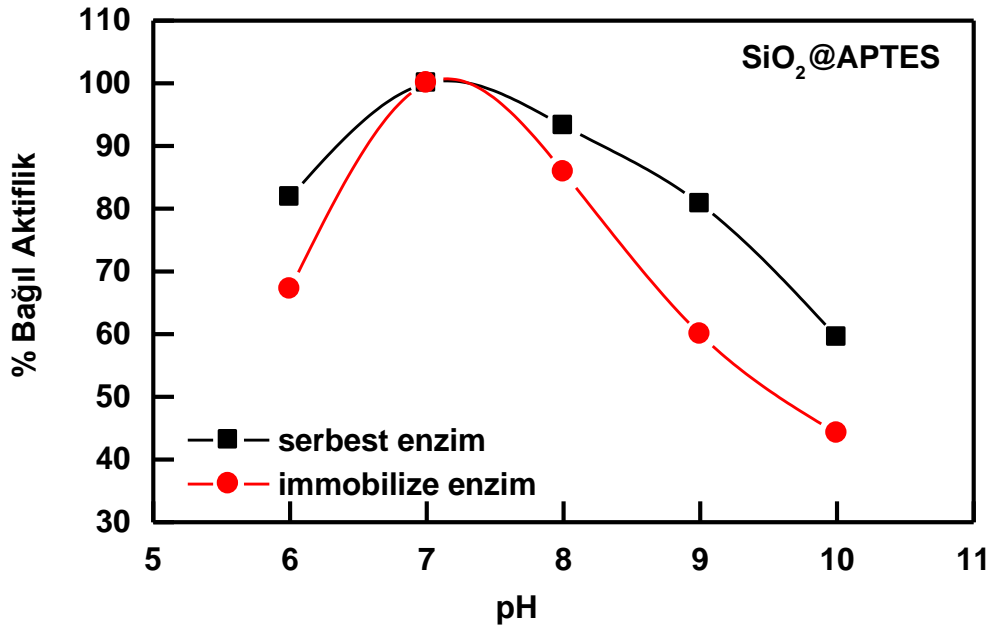
Silika nanopartiküllerin bilindiği gibi sulu ortamda kolloidal kararlılıkları yüksektir. Bu sebeple Şekil 4.10' da görüldüğü gibi Ç-potansiyeli sonuçları $+30\text{ mV}$ ' dan yüksek çıkmıştır. Silika nanopartiküllerin yapısında bulunan hidroksil grupları zeta potansiyelinin negatif yöne kaydirmiştir [72].

APTES molekülü yapısında $-\text{NH}_2$ grubu bulundurmaktadır. Makromolekül olan PEI zincirlerinde çok sayıda protonlanmış amino grubu mevcuttur. Şekil 4.10' da görüldüğü gibi yapılarında bulunan pozitif tanecikler potansiyel değerini pozitive kaydirmiştir [73]. Ortamda bulunan katyon miktarının artması PEI' ni APTES molekülüne göre daha pozitif bölgeye kaydirmiştir. PEI ve APTES yapısına enzim molekülü bağlandığında ise ortamdaki katyon miktarı

arttığından zeta potansiyel sonuçları daha pozitive kaymıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak, silika nanopartikül yüzeylerine APTES ve PEI' in bağlandığını ve modifiye nanopartiküllere enzimin kovalent immobilize edildiğini söylemek mümkündür.

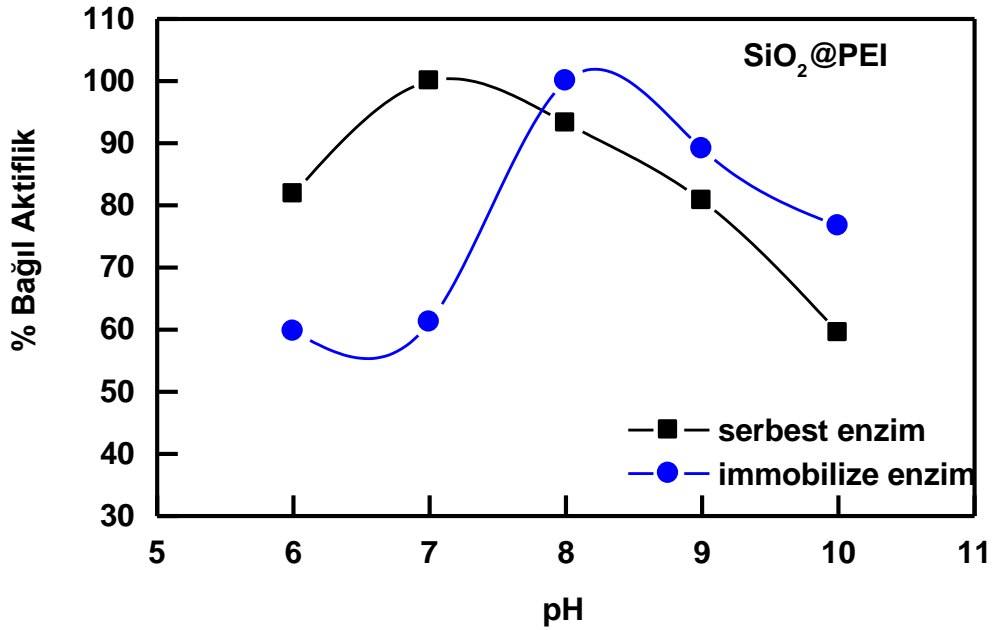
4.8. Aktifliğe pH Etkisi

Serbest ve immobilize enzimlerin aktifliğine pH'nın etkisi Bölüm 3.7.2 ve 3.7.3' de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Farklı pH'larda gerçekleştirilen tepkimeler sonucunda maksimum aktiflik değerlerinin pH ile değişimi Şekil 4.17. ve 4.18.' de gösterilmiştir. Serbest enzim ve organosilan modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin optimum pH' sı 7 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.17. Serbest ve APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin aktifliklerinin pH ile değişimi

Şekil 4.17. incelendiğinde, asidik ve bazik bölgelerde maksimum aktifliklerde bir azalma olduğu açıkça görülmektedir. Enzimler elektrolit karakterli olduğundan enzimin aktifliği pH ile değişme gösterir. Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik ve bazik grupların varlığı pH değişimi ile enzim-substrat (ES) kompleksinin kararlılığını etkiler. Tepkime hızı maksimum olduğunda kararlı ES kompleksi oluşur. Bu nedenle serbest enzimler için tepkime hızının maksimum olduğu optimum bir pH değeri vardır. Genellikle enzimlerin optimum pH değerleri 7 civarındadır ve bu değer 3 - 8 arasında değişim gösterebilir. Asidik ve bazik ortamlarda enzimler denatüre olacağından tepkime hızları tersinmez olarak azalır ve sıfıra kadar düşebilir. Şekil 4.17' den de görüldüğü gibi AChE' nin aktifliğinin asidik ve bazik bölgelere kaydıka azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.18. Serbest ve PEI modifiyeli immobilize enzimin aktifliklerinin pH ile değişimi

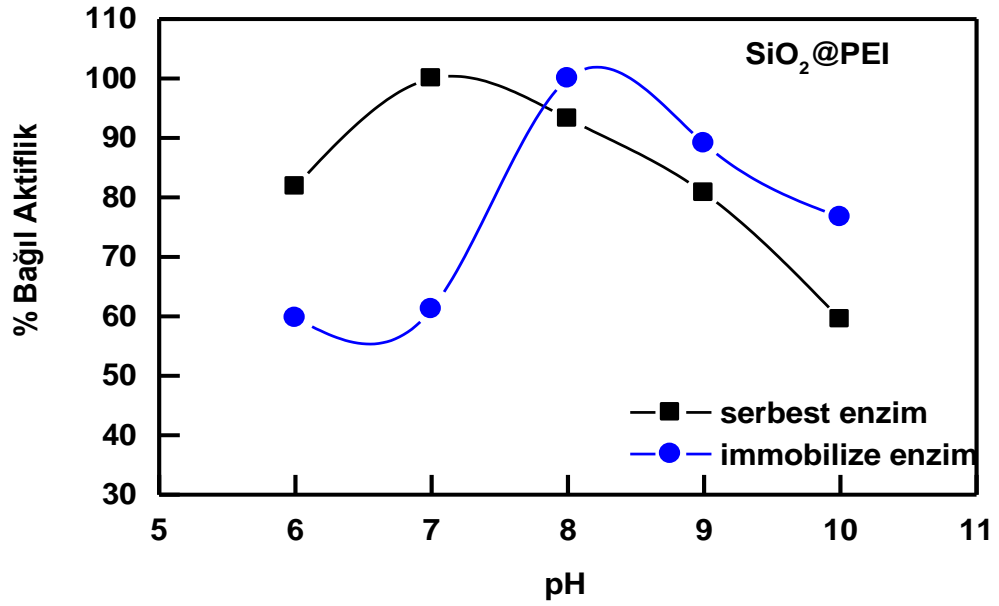
Polimer modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin optimum pH' sı 8 olduğu Şekil 4.18' den görülmektedir. Poliyonik matriksler enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak kullanıldığında, enzimin

mikroçevresi ile tepkimenin ana çözeltisi arasında protonların farklı derişimlerde bulunmasına neden olurlar. Polianyonlar enzim etrafındaki protonları çekme eğiliminde iken, polikasyonlar bunları iter. Dolayısıyla polimerik destek çevresindeki pH ana çözeltiden farklı olur. pH'daki kayma aynı zamanda enzim tepkimesinin tipine ve matriksin yapısına da bağlıdır. Diffüzyonel sınırlamalar nedeni ile de ana çözeltinin pH' sı tepkimenin meydana geldiği matriks çevresininkinden oldukça farklı olabilir. Diğer taraftan enzim ile polimerik destek maddesi arasında oluşabilecek farklı etkileşim kuvvetlerinin de (hidrojen bağı oluşumu, dipol dipol etkileşimi gibi) pH'yı etkilediği bilinmektedir [62,74,75]. PEI modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin pH' sındaki artış, immobilize edilen enzim sistemlerinde matriks ile enzim arasındaki ikincil etkileşimler (hidrojen bağı, iyonik polar etkileşimler), PEI yapısında bulunan (-NH) gruplarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca PEI modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin pH grafiğindeki plato bölgesi, PEI makromoleküler zincirlerindeki amino gruplarının bağı olduğu destek (SiO₂/PEI) yüzeyin pozitif yüklenmesini sağlar. PEI modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin maksimum aktifliğinin pH ile değişim grafiğinde pH=6 ile pH=7 arasında oluşan plato bölgesi PEI' in katyonik polielektrolit türü bir molekül olmasıyla açıklanabilir.

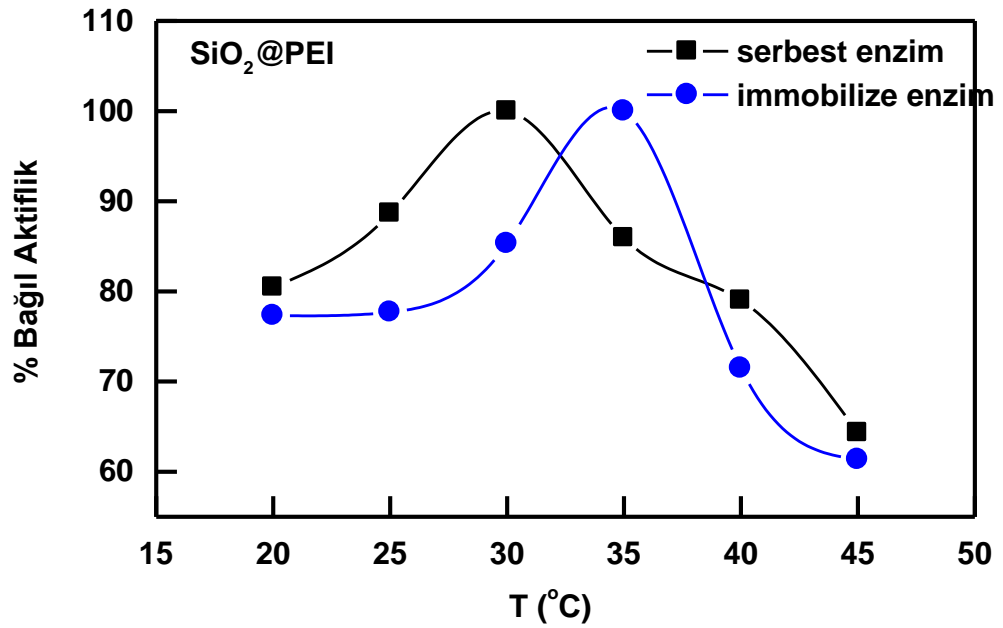
4.9. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve immobilize enzimlerin aktifliğine sıcaklığın etkisi Bölüm 3.8.2 ve 3.8.3' de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen tepkimeler sonucunda maksimum aktiflik değerlerinin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.19. ve 4.20' de verilmiştir.

Serbest ve APTES modifiyeli immobilize enzimin optimum sıcaklığı 30 °C olarak bulunurken, PEI modifiyeli immobilize enzimin optimum sıcaklığı ise 35 °C olarak bulunmuştur.



Şekil 4.19. Serbest ve APTES modifiyeli immobilize enzimin aktifliklerinin sıcaklıkla değişimi



Şekil 4.20. Serbest ve PEI modifiyeli immobilize enzimin aktifliklerinin sıcaklıkla değişimi

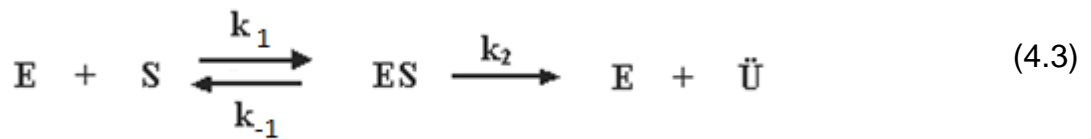
Protein yapısında olan enzimler belirli bir sıcaklıktan sonra (genelde 50 °C'nin üzerinde) denatüre olmaya başlarlar. Sıcaklık arttıkça enzimlerin önce tersiyer yapısı sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapısı) bozulur. Bu olaydan enzimin aktif merkezi de etkilenir, dolayısıyla enzim aktifliğini kaybeder.

PEI modifiyeli immobilize enzimin optimum sıcaklığı ise kovalent bağlanma sırasında enzim molekülünün kimyasal bağlanması ve ikincil etkileşimler sonucu 35°C'ye kaymıştır.

Enzim ile polimerik destek arasında kovalent bağların oluşması enzim hareketlerinde konformasyonel sınırlamaların doğmasına neden olabilir. Buna bağlı olarak optimum sıcaklıkta artış ya da azalış gözlenebilir. Sonuçta enzim katalitik aktifliğini gösterebilmek için daha büyük ya da küçük aktifleşme enerjisine sahip olabilir.

4.10. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest AChE nin aktifliğine substrat derişiminin etkisi incelenmiş ve çeşitli substrat derişimlerinde (18,75-0,59 mM) okunan absorbans değerlerinden hesaplanan V_{mak} ve K_m değerleri verilmiştir.



Bu eşitlikte; E = enzim, S = substrat, ES = enzim-substrat kompleksi, \ddot{U} = ürünü gösterir.

Enzim reaksiyon hızı Michaelis-Menten eşitliği ile verilir.

$$V = \frac{V_{\text{mak}} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{Michaelis-Menten Eşitliği} \quad (4.4)$$

Michaelis-Menten eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk bağıntısı elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{mak}}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{mak}}} \quad \text{Lineweaver-Burk Bağıntısı} \quad (4.5)$$

Bu eşitlikte;

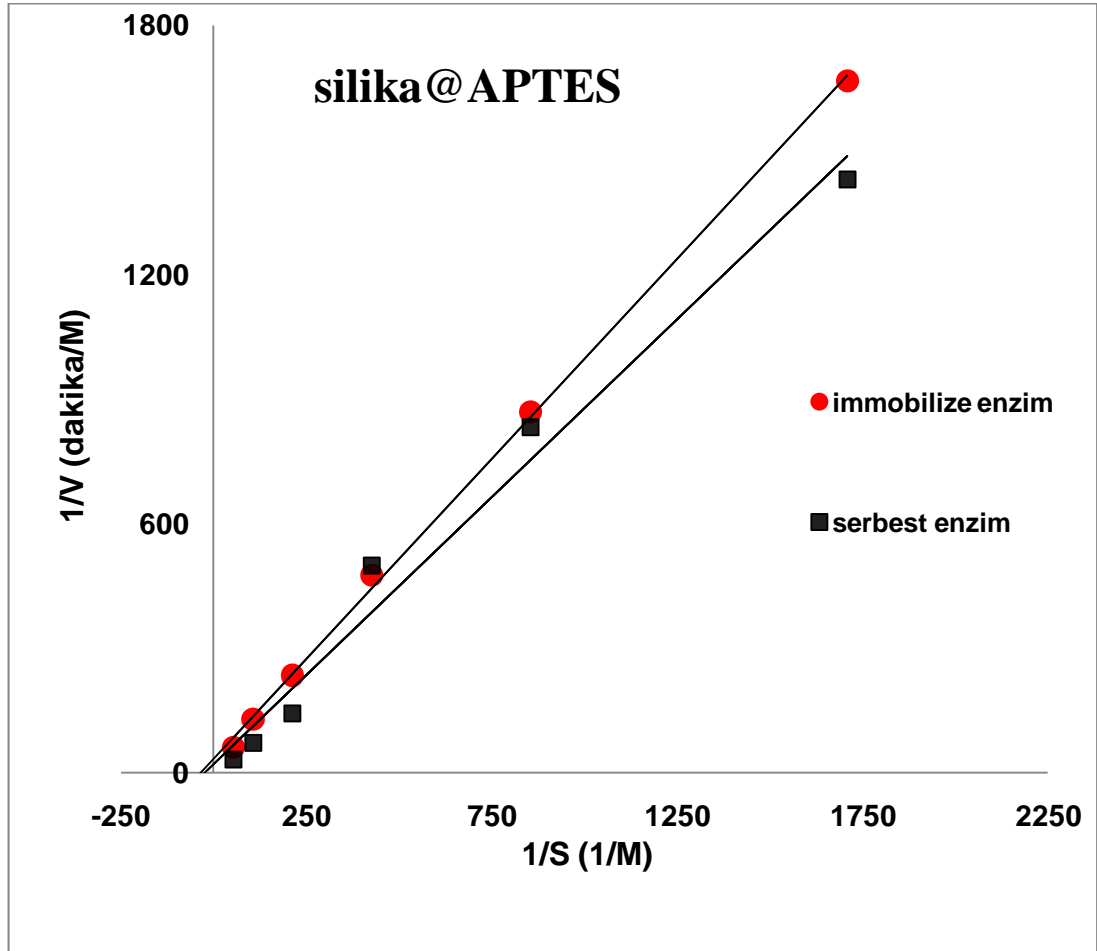
V = başlangıç hızı,

V_{mak} = maksimum hız,

K_m = Michaelis sabiti,

S = substrat derişimi olarak verilmektedir.

Serbest enzim ve APTES modifiyeli silika nanopartikülere immobilize enzimlerin aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla değişik derişimlerde hazırlanan substrat çözeltileri 3.9.2' de belirtilen koşullarda gerçekleştirilen reaksiyonlar ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen eğim yardımıyla hesaplanan reaksiyon hızlarından yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiğı çizildi (Şekil 4.21). Grafikten V_{mak} ve K_m değerleri hesaplandı.



Şekil 4.21. Serbest ve APTES modifiyeli immobilize enzimin Lineweaver-Burk grafiği

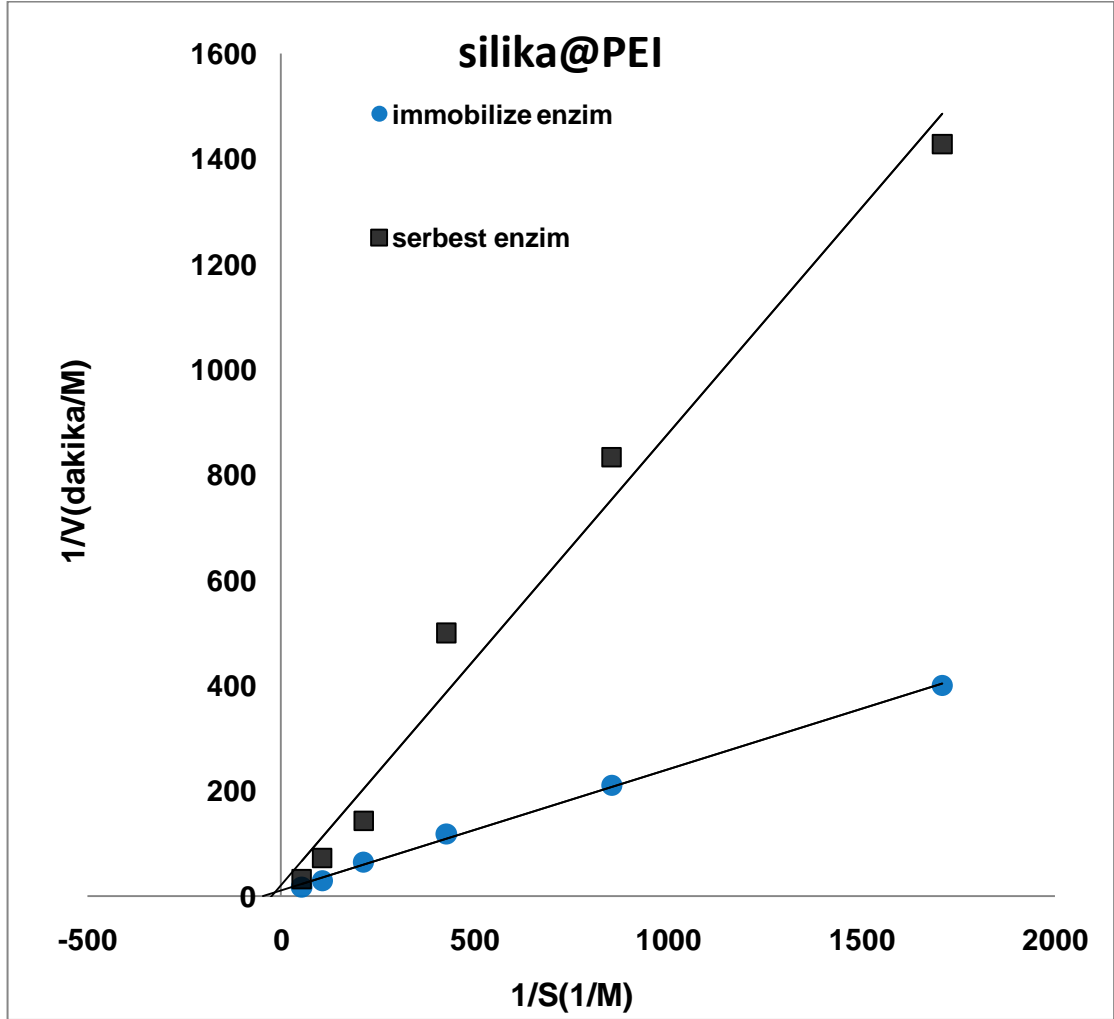
APTES modifiyeli silika nanopartikülere immobilize enzim sistemlerinde difüzyonel etkiler nedeniyle K_m ve V_{mak} değerlerinde değişiklikler gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Serbest ve APTES modifiyeli immobilize edilen asetilkolinesterazın kinetik parametreleri

Destek	K_m (M)	V_{mak} (M.dak ⁻¹)
Serbest AChE	$6,35 \times 10^{-3}$	$5,00 \times 10^{-4}$
APTES modifiyeli enzim immobilize silika nanopartikül	$1,19 \times 10^{-2}$	$3,09 \times 10^{-3}$

PEI modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen enzimlerin aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla değişik derişimlerde

hazırlanan substrat çözeltileri 3.9.3' de belirtilen koşullarda gerçekleştirilen tepkimeler ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen eğimden hesaplanan tepkime hızlarından yararlanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.22' de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Serbest ve PEI bağlı immobilize enzimin Lineweaver-Burk grafiği

PEI bağlı silika nanopariküllere immobilize edilen AChE ye ait K_m ve V_{mak} değerleri Çizelge 4.2' de verilmiştir.

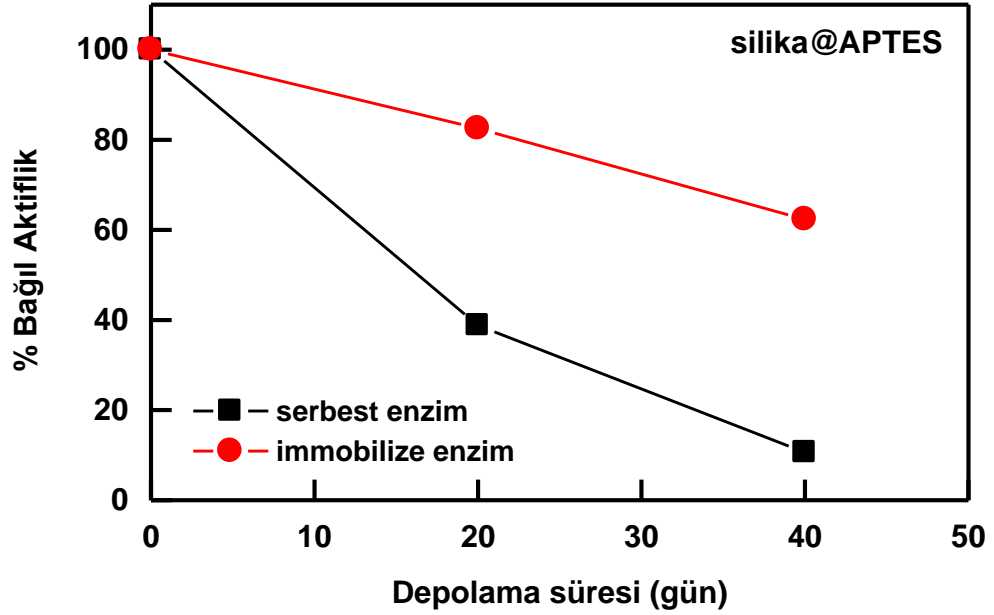
Çizelge 4.2. Serbest ve PEI bağı silika nanopartikülere immobilize enzimin kinetik parametreleri

Destek	K_m (M)	V_{mak} (M.dak ⁻¹)
Serbest AChE	$6,35 \times 10^{-3}$	$5,00 \times 10^{-4}$
PEI bağı enzim immobilize silika nanopartikül	$2,1 \times 10^{-2}$	$1,42 \times 10^{-3}$

PEI bağı silika nanopartikülere immobilize enzim sistemlerinde kovalent bağlanmadan kaynaklanan diffüzyonel etkiler ve hem polimer zincirlerinden hem de enzimin sebep olduğu sterik engeller nedeniyle K_m ve V_{mak} değerlerinde değişiklikler gözlenmiştir. İmmobilizasyonla enzimlerin K_m değerlerinde bir artma gözlendiği literatürlerde verilmiştir [76-80].

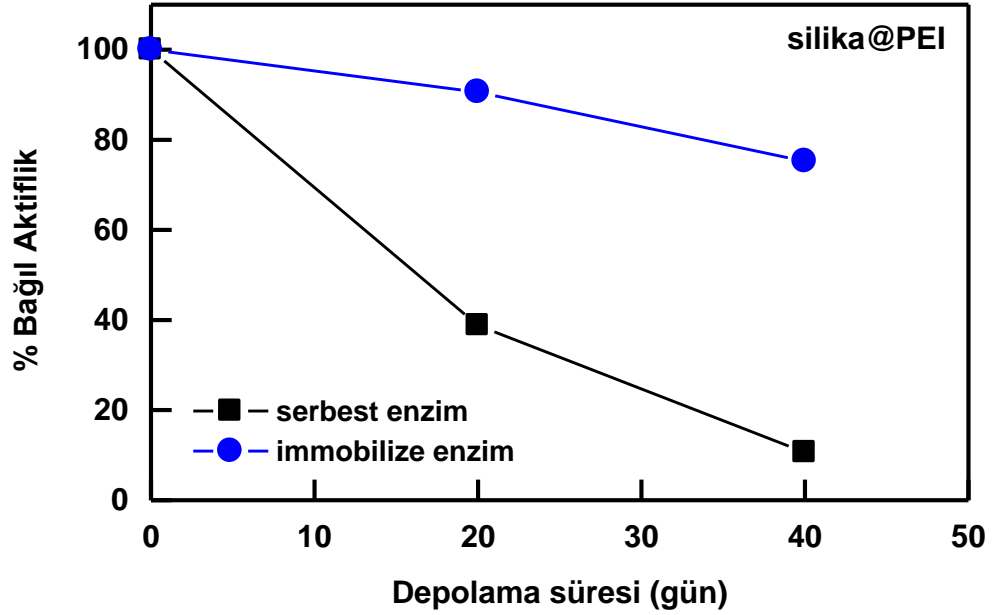
4.11. Serbest ve İmmobilize AChE nin Depolanma Kararlılığı

Serbest enzim, APTES modifiyeli ve PEI bağı silika nanopartiküllere immobilize enzimlerin aktifliğine depolama süresinin etkisinin incelenebilmesi için çözeltiler +4°C' de buzdolabında saklanmıştır. Belirli zaman aralıklarında alınan örnekler kısım 3.6.1' de belirtilen koşullarda incelenmiş, maksimum aktifliğin depolanma süresi ile değişimi Şekil 4.23 ve 4.24'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 23. Serbest ve APTES modifiyeli immobilize asetilkolinesterazın bağlı aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi

Enzimler çözelti içinde saklandıkları zaman yapısal değişime uğrarlar ve buna bağlı olarak aktifliklerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlenebilir. Bu değişim ortamın sıcaklık, iyonik şiddet ve pH gibi faktörlerine bağlıdır. Yapılan çalışmalarda serbest enzimin aktifliğinin belirtilen depolama şartlarında, 30. gün sonunda yaklaşık %20' lik bir aktiviteye sahip iken 40. günün sonunda ise enzim aktifliğini %90' ını kaybetmiştir. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin 30.gün sonunda %60-80 arasında bir aktiviteye sahiptir.

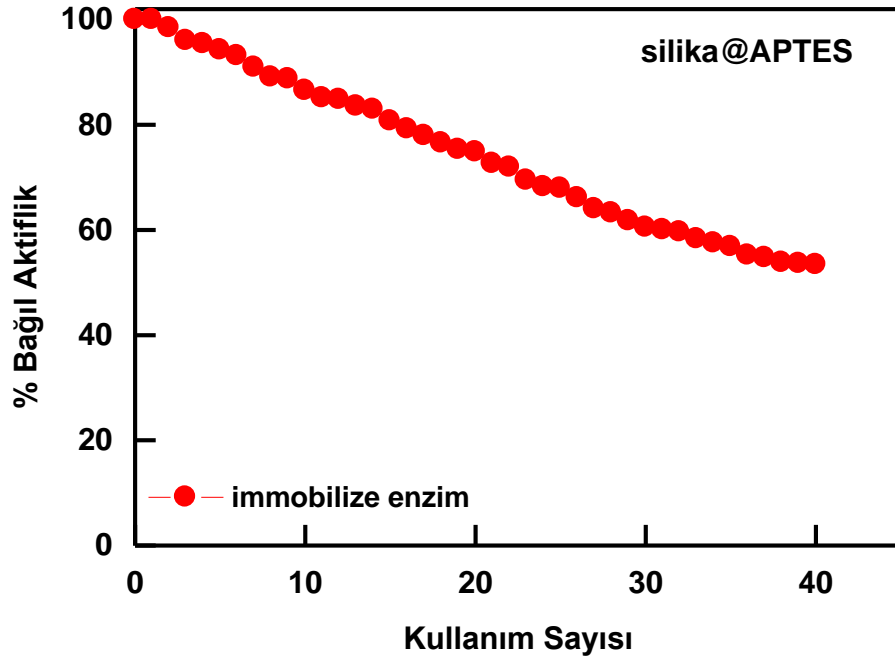


Şekil 4.24. Serbest ve PEI bağlı immobilize asetilkolinesterazın bağli aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi

Şekil 4. 24' de görüldüğü gibi PEI bağlı silika nanopariküllere immobilize enzimin ise 40 günün sonunda enzim aktifliğinin yaklaşık %80' ini korumaktadır.

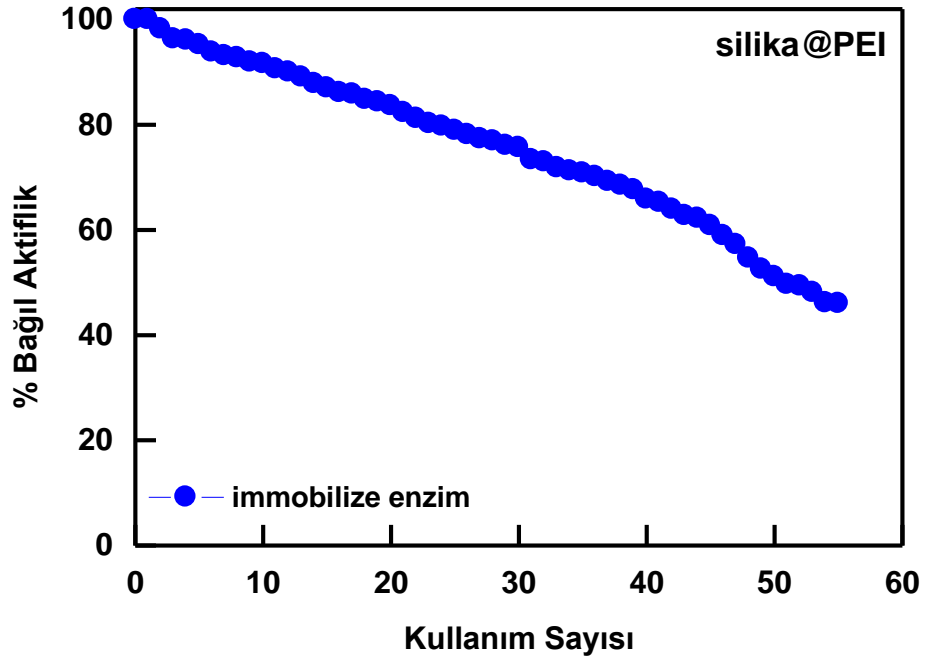
4.12. İmmobilize AChE nin Tekrar Kullanılabilirliği

Serbest AChE bir kez, immobilize enzimin ise aktifliğini koruduğu sürece pek çok kez kullanımı mümkündür. APTES modifiyeli ve PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize AChE' nin tekrar kullanım sayısını incelemek amacıyla aktiflikleri tayin edilmistir. Maksimum aktifliğin kullanım sayısı ile değişimi Sekil 4.25 ve 4.26' da verilmiştir.



Şekil 4.25. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize edilen asetilkolinesterazın bağıl aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enziminin 10 kez kullanım sonunda aktifliğini %89 oranında korurken, 30 kez kullanım sonunda %60 oranında koruduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.26. PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize edilen asetilkolinesterazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize enzimin aktifliğini 10 kez kullanım sonunda %90 koruduğu gözlenirken, 40 kez kullanım sonunda %65 aktifliğini koruduğu gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Farklı miktarlarda TEOS kullanılarak Stöber metoduna göre silika nanopartiküller sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin tanecik boyut analizleri Zeta Sizer ile gerçekleştirilmiştir ve ortalama hidrat çapı en düşük koloidal kararlılığı en yüksek agregasyonu en az olan nanopartiküller enzim immobilizasyonunda kullanılmak üzere seçilmiştir.
- Sentezlenen silika nanopartiküller organosilan molekülü olan APTES ile modifiye edilmiştir. Amin grubu ile zenginleşen nanopartiküllerin yapısal karakterizasyonu FT-IR spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir.
- Sentezlenen silika nanopartiküller PEI ile modifiye edilmiştir. Amin grubu ile zenginleşen nanopartiküllerin yapısal karakterizasyonu FT-IR spektroskopisi, morfolojisi ise TEM ile gerçekleştirilmiştir.
- APTES ve PEI modifiyeli silika nanopartiküllere EDAC/NSH varlığında Asetilkolinesteraz enzimi kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin aktifliklerinin farklı parametrelerle değişimi incelenmiştir.
- Serbest AChE ve APTES modifiyeli silika nanopartiküller için optimum pH değeri 7 olarak bulunmuştur. Ancak, PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize enzimin optimum pH değeri 8' e kaymıştır.
- Serbest AChE için optimum sıcaklık 30°C olarak bulunmuştur. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize AChE için bu sıcaklık değeri değişmemiştir. Ancak, PEI bağlı silika nanopartiküllerle yapılan immobilizasyonda bu sıcaklık değeri 35°C' ye kaymıştır.

- Serbest AChE için K_m değeri $6,35 \times 10^{-3}$ M, APTES modifiyeli silika nanopariküllere immobilize AChE için bu değerlerde çok az bir artış gözlenmiştir. PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize enzim için bu değerde yaklaşık 3 kat bir artma olduğu gözlenmiştir.
- Serbest AChE için V_{mak} değeri $5,00 \times 10^{-4}$ M.dak⁻¹, APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize AChE için bu değerler; $3,09 \times 10^{-3}$ M.dak⁻¹, $1,42 \times 10^{-3}$ M.dak⁻¹ arasında bulunmuştur.
- APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin 10 kez kullanım sonunda aktifliğini % 89, 30 kez kullanım sonunda % 60 koruduğu gözlenirken, PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilize enzimin 10 kez kullanım sonunda %90, 40 kez kullanım sonunda % 65 koruduğu gözlenmiştir.
- Serbest AChE 4°C' da depolandığında 40.günde aktifliğini büyük bir kısmını kaybettiği gözlenmiştir. APTES modifiyeli silika nanopartiküllere immobilize enzimin 30.gün sonunda aktifliğinin %60-80 arasında, PEI bağlı silika nanopartiküllere immobilie enzimin aktifliğinin yaklaşık %80' ini koruduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Taylor, J., "New Dimensions for Manufacturing. A Strategy for Nanotechnology", **UK Advisory Group on Nanotechnology Publishing**, London, 16, (2002).
2. Deak, A., Bancsi, B., Toth, A.L., Kovacs A.L., , Horvölgyi, Z., "Complex Langmiur-Blodgettbfilms from silica nanoparticles:An optical spectroscopy study", **Colloids and Surfaces A**, 278 10-16 (2006).
3. Zaborsky, O., "Immobilized Enzyme", **CRC Pres**, Ohio, 1-3 (1973).
4. Atlow, S.C., Bonadonna-Aparo, L., Klibanow, A.M., "Dephenolization of industrial wastewaters catalysed by polyphenol oxidase", **Biotechnology Bioengineering.**, 26: 599-603 (1984).
5. Harper, H., "Enzymes Review of Physiological Chemistry", **California los Atlos 15 th. Edition**, 126-172 (1975).
6. Lehninger, A.L., "Enzymes Principles of Biochemistry", New York, **Worth Puplichers Inc.**, 207-244 (1982).
7. Stryer, L., "Introduction to Enzymes", **Biochemistry**, San Fransisco, W.H. **Freeman and Company**, 103-131 (1981).
8. Boyer, P.D., "The Enzymes Ed. 3", New York, **Academic Press Inc.**, 130 (1970).
9. Brimijoin, S., Rakonczay, Z., "Biochemistry and Pathophysiology of the Molecular form of Cholinesterases", **Subcell Biochem.**, 12:335-378 (1988).
10. Brimijoin, S., Rakonczay, Z. Mintz, K., "Immunochemistry of Mammalian Cholinesterases", **Fed. Proc.**, 45: 2960-2964 (1986).
11. La Du, B.N., Lockridge, O., "Molecular Biology of Human Serum Cholinesterases", **Fed. Proc.**, 45: 2965-2969 (1986).
12. Rosenberry, T.L., "Glycolipid Membrane-Binding Domain of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase", **Fed. Proc.**, 45: 2970-2975 (1986).
13. Schumacher, M., "Primary Structure of Acetylcholinesterase: Implications for Regulation and Function", **Fed. Proc.**, 45: 2976-2981 (1986).
14. Wilson, I.B., Nachmansohn, D. Quan, C., "Acetylcholinesterase Studies on Molecular Complementarines", **Arch. Biochem.Biophys.**,73:131-143 (1958).

15. Rakonczay, Z., Brimijoin, S., "Monoclonal Antibodies to Human Brain Acetylcholinesterase : Properties and Applications", ***Cell Mol.Neurobiol.***, 8:85-93 (1988).
16. Huussein, A.S., Grigg, M.E., Selkrik, M.E., "Nippostrongylus Brasiliensis: Characterisation of a Somatic Amphiphilic Acetylcholinesterase with Properties Distinct from the Secreted Enzymes", ***Exp. Parasitol.***, 91:144–150 (1999).
17. Ashani, Y., Wilson, I., "A Covalent Affinity Column for the Purification of Acetylcholinesterase", ***Biochim Biophys Acta***, 276:317 (1972).
18. Brimijoin, S., Mintz, K., "Human Acetylcholinesterase. Immunochemical Studies with Monoclonal Antibodies", ***Biochim Biophys Acta***, 828:290-295 (1985).
19. Das, Y., Brown, H., Chattopadhyay, S., "Microcalorimetric Determination of Binding Sites of Acetylcholinesterase", ***Biochim Biophys Acta***, 746:107-113 (1983).
20. Mc Geer, P.L., Eccles, J.C., Mc Geer, E.G., "Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain", Second edition, ***Plenum Press***, New York and London, 238-241 (1987).
21. Stryer, L., "Biochemistry", Third edition, ***Freeman and Company***, New York, 1013-1023 (1988).
22. Weiner, N., Taylor, P., "Neurohumoral Transmission: the Autonomic and Somatic Motor Nervous Systems. In GOODMAN AND GILMAN's The Pharmacological Basis of Therapeutics", Seventh edition, Gilman, G.A., Goodman, L.S., Rall, T.W., Murad, F., ***Macmillan Publishing Company***, New York, 78-79 (1985).
23. Nachmansohn, D., Lededer, E., "Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity", ***Bull. Soc. Chim. Biol.***, 21:797 (1939).
24. Taylor, J.L., Mayer, R.T., Himel, C.M., "Conformers of Acetylcholinesterase: A Mechanism of Allosteric Control", ***Mol Pharmacol.***, 45:74-83 (1993).
25. Schulz, G.E., Schirmer, R.H., "Principles of Protein Structure" ,***Springer Verlag***, New York, 100-102 (1979).
26. Creighton, T.E., "Proteins" ***Freeman***, New York, 87-93 (1983).
27. Levitt, M., Chothia, C., "Structural Patterns in Globular Proteins", ***Nature***, 261: 552-558 (1976).

28. Soreq, H., Seidman, S., "Acetylcholinesterase-New Roles for an Old Actor", *Nature Reviews of Neuroscience*, 2: 294-302 (2001).
29. Herz, F., Kaplan, E., "A Review: Human Erythrocyte Acetylcholinesterase", *Pediat, Res.*, 7: 240-214 (1973).
30. Rawn, J.D., "Molecular Biology of the Cell", Part six, Chapter 31. "Biological Membrane Transport", Chapter 32. "Transmission of Nerve Impulse and Signal Transduction in Sensory Systems", *Biochemistry Neil Patterson Publishers*, Caroline Biological Supply Company Burlington, North Caroline, 1021-1076 (1986).
31. Nachmanson, D., "In Modern Trends in Physiology and Biochemistry", E.S.G. Barron edition, *Academic Press*, New York, 229 (1952).
32. Ellman, G.L., "A Colorimetric Method for Determining Low Concentrations of Mercaptans", *Arch. Biochem. Biophys*, 74: 443-450 (1958).
33. Ellman, G.L., "Tissue Sulfhydryl Groups", *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77 (1959).
34. Eugenii, K., Willner, I., "Integrated Nanoparticle–Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43:6042 (2004).
35. Tsai, H.J., Lee, Y.L., "Facile Method to Fabricate Raspberry-like Particulate Films for Superhydrophobic Surfaces", *Langmuir*, 23:12687–12692 (2007).
36. Cebeci, F. C., Wu, Z., Zhai, L., Cohen, R. E., Rubner, M. F., "Nanoporosity-Driven Superhydrophilicity: A Means to Create Multifunctional Antifogging Coatings", *Langmuir*, 22:2856–2862 (2006).
37. Scharl, W., "Crosslinked spherical nanoparticles with core-shell topology", *Adv. Mater.*, 12:1899–1908 (2000).
38. Espiard, P., Guyot, A., "Poly(ethyl acrylate) latexes encapsulating nanoparticles of silica: 2. Grafting process onto silica", *Polymer*, 36:4391–4395 (1995).
39. Xu, X., Friedman, G., Humfeld, K.D., Majetich, S.A., Asher, S.A., "Synthesis and utilization of monodisperse superparamagnetic colloidal particles for magnetically controllable photonic crystals", *Chem Mater*, 14:1249–56 (2002).
40. Bourgeat-Lami, E., Lang, J., "Encapsulation of inorganic particles by dispersion polymerization in polar media: 2. Effect of silica size and

concentration on the morphology of silica–polystyrene composite particles”, *J. Colloid Interface Sci*, 210:281–289 (1999).

41. Bourgeat-Lami, E., Lang, J., “Silica–polystyrene composite particles”, *Macromol Symp*, 151:377–385 (2000).

42. Percy, M.J., Barthet, C., Lobb, J.C., Khan, M.A., Lascelles S.F., Vamvakaki, M., “Synthesis and characterization of vinyl polymer–silica colloidal nanocomposites”, *Langmuir*, 16:6913–6920 (2000).

43. Mandal, T.K., Fleming, M.S., Walt, D.R., “Preparation of polymer coated gold nanoparticles by surface-confined living radical polymerization at ambient temperature”, *Nano Lett*, 2:3–7 (2002).

44. Fuqiang, A., Baojiao, G., “Adsorption of phenol on a novel adsorption material PEI/SiO₂”, *Journal of Hazardous Materials*, 152:1186–1191(2008).

45. Shubo, D., Yen-Peng, T., “ Characterization of PEI-modified biomass and biosorption of Cu(II), Pb(II) and Ni(II)”, *Water Research*, 39:2167–2177 (2005).

46. Andrea, B., Olivia, M., Felix, K., Thomas, K., Tobias, S., “Comparative in vivo study of poly(ethylene imine)/siRNA complexes for pulmonary delivery in mice ”, *Journal of Controlled Release*, 51-56 (2011).

47. Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S., Scounten, W.H., “Immobilizations Methods, Solid Phase Biochemistry”, *New York Press*, New York, 253-391 (1995).

48. Pitcher, W.H., Ford, Jr., “Immobilized Lactase for Whey Hydrolysis: Stability and Operating Strategy”, *Enzyme Engineering* ed. By Brown, Ganecke, G.B., Wingard, L.B., Jr., *Plenium Press*, New York, 4 (1978).

49. Mosbach, K., “Methods in Enzymology”, *Academic Press*, New York, 4 (1976).

50. Trevan, M.D., “Techniques of Immobilization. In Immobilized Enzyme”, *John Wiley and Sons*, New York, 1-11 (1980).

51. Dimitriu, S., Popa, M., Dimitriu, M., “Polymeric Biomaterials as Enzyme and Drug Carriers”, *J. Bioactive and Compatible Polymers*, 3:243-321 (1988).

52. Chen, S., Liu, Y., Yu, P., “Study on Column Reactor of Chitosan-Immobilized”, *Chemical Abstracts*, 127:46739 (1996).

53. Gloger, M., Tischer, W., "Determination of Catalytic Activity of Immobilized Enzymes", **Methods of Enzymatic Analysis**, 142-154 (1981).
54. Bonnet, C., Andreescu, S., Marty, J.L., "Adsorption: an Easy and Efficient Immobilization of Acetylcholinesterase on Screen-printed Electrodes", **Analytica Chimia Acta**, 481:209-211 (2003).
55. Chase, H.A., Yang, Y., "Immobilization of α -amylase on poly(vinylalcohol)-coated perfluoro polymer supports for use in enzyme reactors", **Biotechnology and Biochemistry**, 28:145-154 (1998).
56. Arica, Y.M., Hasirci, V.N., "Immobilization for the Production of Membranes", **Biomaterials**, 8:489 (1987).
57. Zaborsky, O., "Adsorption Immobilize Enzyme", **CRC.Press.**, Ohio, 75 (1973).
58. Gerharts, W., "Enzyme in Industry", Production And Applications, **UCH Velosgesellschaft Mblt**, Weinheim, 35-43 (1990).
59. Zaborsky, O., "In Biomedical Application Of immobilized Enzymes Proteins", Chang, T.M.S., **Plenum**, New York, 1 (1997).
60. Matsuura, H., Sato, Y., Sawaguchi, T., Mizutani, F., "Rapid and highly-sensitive determination of acetylcholinesterase activity based on the potential-dependent adsorption of thiocholine on silver electrodes", **Sensor and Actuators B**, 91:148-151 (2003).
61. Bonnet, C., Andreescu, S., Marty, J.L., "Adsorption: an Easy and Efficient Immobilization of Acetylcholinesterase on Screen-printed Electrodes", **Analytica Chimia Acta**, 481:209-211 (2003).
62. Arica, Y.M., Hasirci, V.N., "Immobilization of Glucose Oxidase: a Comparison of Entrapped and Covalent Bonding", **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 58: 287-292 (1993).
63. Chang, T.M.S., "Microcapsulation of Enzyme and Biological Methods in Enzymology", **Academic Press Inc.**, New York, 44: 201 (1976).
64. Allan, S.F., "A Review of the Use of Radiation", **Radiat. Phys. Chem.**, 18: 323 (1985).
65. Kahn, K., "Theoretical Study of Intermediates in the Urate Oxidase Reaction", **Bioorganic Chemistry**, 27: 351-362 (1999).
66. Stober, W., Fink, A., Bohn, E., **J. Colloid Interface Sci.**, 26 (1968).

67. Van, B., Vrij, A., **J. Colloid Interface Sci.**, 156 1 (1993).
68. Howarter, J. A., Youngblood, J. P., "Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane", **Langmuir**, 22:11142–11147 (2006).
69. Bahulekar, R., Ayyangar, N.R., Ponrathnam, S., **Enzyme Microb. Technol.** 13:858 (1991) .
70. Baojiao, G., Xupeng, W., Yanling, S., "Studies on characters of immobilizing penicillin G acylase on a novel composite support PEI/SiO₂", **Biochemical Engineering Journal**, 28:140–147 (2006).
71. Huijun, W., Mao, P., Jun, Z., Peng, L., "Encapsulation of silica nanoparticles by redox-initiated graft polymerization from the surface of silica nanoparticles", **J. Colloid Interface Sci.**, 326:151-157 (2008).
72. Gurdev, S., Lianfa, S., "Experimental correlations of pH and ionic strength effects on the colloidal fouling potential of silica nanoparticles in crossflow ultrafiltration", **Journal of Membrane Science**, 303:112–118 (2007).
73. Jana, N. R., Earhart, C., Ying, J. Y., "Synthesis of Water- Soluble and Functionalized Nanoparticles by Silica Coating", **Chem. Mater**, 19:5074–5082 (2007).
74. Liu, B., Yang, Y.H., Wu, Z.Y., Wang, H., Shen, G.L., Yu, R.Q., "A Potentiometric Acetylcholinesterase Biosensor Based on Plasma-Polymerized Film", **Sensors and Actuators B**, 104: 186-190 (2005).
75. Doonng, R.A., Tsai, H.C., "Immobilization and Characterization of Sol-Gel-Encapsulated Acetylcholinesterase Fiber Optic Bioensor", **Analytica Chimica Acta**, 434:239-246 (2001).
76. Demircioğlu, H., Beyenal, H., Tanyolaç, A., Hasırcı, N., "Entrapment of Urease in Glycol Containing Polymeric Matrices and Estimation of Effective Diffusion Coefficients of Urea", **Polymer**, 36:4091-4096 (1995).
77. Bartolini, M., Cavrini, V., Andrisano, V., "Choosing the Right Chromatographic Support in Making a New Acetylcholinesterase-Micro-Immobilised Enzyme Reactor for Drug Discovery", **Journal of Chromatography A**, 1065:135-144 (2005).
78. Johnson, G., Moore, S.W., "Catalytic Antibodies with Acetylcholinesterase Activity", **Journal of Immunological Methods**, 269:13-28 (2002).

79. White, B.J., Legako, A.J., Harmon, H.J., "Spectrophotometric Detection of Cholinesterase Inhibitors with an Integrated Acetyl-/Butyrylcholinesterase Surface", ***Sensors and Actuators B***, 89:107-111 (2003).

80. Singh, A.K., Flounders, A.W., Volponi, J.V., Ashley, C.S., Wally, K., Schoeniger, J.S., "Development of Sensors for Direct Detection of organophosphates. Part I: Immobilization, Characterization and Stabilization of Acetylcholinesterase and Organophosphate Hydrolase on Silica Supports", ***Biosensors and Bioelectronics***, 14:703-713 (1999).

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Soyadı, adı MALKOÇ, Aybuke
Uyruğu T.C.
Doğum tarihi ve yeri 08. 07. 1986- Çankaya, Ankara
Medeni hali Bekar
e-mail aybukemalkoc@gmail.com

Eğitim Derece**Eğitim Birimi****Mezuniyet****Tarihi**

Lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya Bölümü	2009
Lise	Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2005

Yabancı Dil

İngilizce