

**KİTOSAN KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN
LAKKAZ İMMOBİLİZASYONUNDA VE REAKTİF BOYARMADDE
ADSORPSİYONUNDA KULLANILMASI**

Nüzhet Ayça KALKAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2010
ANKARA**

Nüzhet Ayça KALKAN tarafından hazırlanan “KİTOSAN KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN LAKKAZ İMMOBİLİZASYONUNDA VE REAKTİF BOYARMADDE ADSORPSİYONUNDA KULLANILMASI” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

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

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

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

Prof. Dr. Serpil AKSOY
Kimya, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Halil İbrahim ÜNAL
Kimya, Gazi Üniversitesi

Tarih: 04/01/2010

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

Prof. Dr. Bilal TOKLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Nüzhet Ayça KALKAN

**KİTOSAN KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN
LAKKAZ İMMOBİLİZASYONUNDA VE REAKTİF BOYARMADDE
ADSORPSİYONUNDA KULLANILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Nüzhet Ayça KALKAN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ocak 2010

ÖZET

Bu çalışmada, manyetik Fe_3O_4 nanoparçacıkları ters-faz süspansiyon metodu ile kitosanla kaplanmıştır. Hazırlanan manyetik Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıkları, geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR), x-ışını kırınımı yöntemi (XRD), termogravimetrik analiz (TGA), ζ (Zeta)-potansiyel analizleri, elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR) ve titreşimli örnek manyetometri (VSM) ile karakterize edilmiş ve nanoparçacıkların boyutlarının 50 nm' den küçük olduğu, 1,0-4,8 nm kalınlığında kitosanla kaplandıkları ve Fe_3O_4 spinel yapısının değişmediği, izoelektrik noktalarının 6,86 olduğu, kütlece %51,7 kitosan içerdikleri, doyum mıknatıslanmalarının 25,2 emu/g olduğu ve hemen hemen süperparamanyetik özellik gösterdikleri belirlenmiştir. Lakkaz enzimi manyetik Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarına adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemleri ile immobilize edilmiş ve enzimin varlığı SEM/EDS analizleri ile belirlenmiştir. Serbest ve immobilize lakkazların aktifliğine pH, sıcaklık, substrat derişimi ve depolama süresinin etkisi incelenmiş ve immobilize lakkazlar 1 gün içerisinde 30 kez kullanıldıklarında aktifliklerini %71-%81 arasında korumuşlardır.

Kitosanın yüksek adsorplama özelliğinden dolayı, manyetik Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 tekstil boyarmaddesinin sulu ortamdan kesikli metotla adsorpsiyonu incelenmiştir. Adsorpsiyonun pH' sı 3,0' te maksimum olduğu, sıcaklığın 25°C' den 45°C' ye artmasıyla ve 25°C' de tuz derişiminin artmasıyla artış gösterdiği belirlenmiştir. Adsorpsiyonun Langmuir modeline uyduğu, 25°C' de maksimum adsorpsiyon kapasitesinin 47,62 mg/g olduğu ve 25-45°C arasında adsorpsiyonun istemli ve endotermik olduğu tespit edilmiştir. Bir adsorpsiyon/desorpsiyon çevrimi sonunda, Reaktif Sarı 145' in maksimum %80' i desorbe edilmiştir.

Bilim Kodu : 201.1.117

Anahtar Kelimeler : Manyetik nanoparçacıklar, kitosan, lakkaz, enzim immobilizasyonu, adsorpsiyon, reaktif boyarmadde

Sayfa Adedi : 204

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Serpil AKSOY

**USE OF CHITOSAN COATED MAGNETIC NANOPARTICLES IN
LACCASE IMMOBILIZATION AND REACTIVE DYE ADSORPTION**

(M. Sc. Thesis)

Nüzhet Ayça KALKAN

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

January 2010

ABSTRACT

In this study, Fe_3O_4 nanoparticles were coated with chitosan by using reversed-phase suspension method. The magnetic Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy (TEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), x-ray diffraction method (XRD), thermogravimetric analysis (TGA), ζ (Zeta)-potential analysis, electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) and vibrating sample magnetometry (VSM). The results indicated that size of these nanoparticles are smaller than 50 nm, thickness of chitosan on the nanoparticles were 1.0-4.8 nm and they have the same spinel structure with Fe_3O_4 . The mass content of chitosan on magnetic Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles was estimated 51.7% and isoelectronic point of these nanoparticles were found to be 6.81. The saturation magnetization Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles were found to be 25.2 emu/g and the results indicated that these nanoparticles are almost superparamagnetic. Laccase enzyme was immobilized on the magnetic Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles by adsorption and covalent binding methods. The presence of laccase enzyme on these immobilized systems were detected by SEM/EDS analysis. The effect of pH, temperature, substrate concentration, storage time on the activities of

free and immobilized laccases were investigated. After using these immobilized systems repeatedly 30 times in a day, the retained activities were found to be 71%-81%. The adsorption of Reactive Yellow 145 textile dye on magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles from aqueous solution was investigated by batch method. The results indicated that maximum adsorption of dye was at pH 3.0, the amount of the adsorbed dye increased by increasing the temperature 25°C to 45°C and increasing the salt concentration at 25°C. It was shown that Langmuir model is well suited the adsorption of Reactive Yellow 145 between 25°C-45°C and the maximum adsorption capacity were calculated as 47.62 mg/g. Thermodynamics of adsorption were indicated that adsorption process is spontaneous and endothermic. Maximum desorption ratio of 80% was obtained over one adsorption/desorption cycle.

Science Code : 201.1.117

Key Words : Magnetic nanoparticles, chitosan, laccase, enzyme immobilization, adsorption, reactive dye

Page Number : 204

Adviser : Prof. Dr. Serpil AKSOY

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın oluşturulması süresince, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, ilgisiyle ve samimi desteğiyle beni hep yüreklendiren değerli hocam Prof. Dr. Serpil AKSOY' a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımı yürütmem sırasında değerli bilimsel katkılarıyla beni yönlendiren, laboratuvarlarında çalışma imkanı veren, güvenini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Nesrin HASIRCI' ya çok teşekkür ederim.

Bu çalışmaya 05/2009-29 kodlu proje kapsamında destek veren Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne teşekkür ederim.

EPR analizlerinin yapılmasında ve sonuçlarının değerlendirilmesinde emeği geçen Dr. Eda Ayşe AKSOY' a, aynı laboratuvarları paylaşarak birlikte çalıştığımız arkadaşlarım Şeyma Ruhan ŞİMŞEK' e, Filiz KARA' ya, Melek BULUT' a ve ODTÜ' de lisansüstü çalışmalarını yürüten Tuğba ENDOĞAN' a, Aysel KIZILTAY' a, Cansel IŞIKLAR' a ve Elif VARDAR' a ve tüm arkadaşlarıma her türlü destekleri için çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan dostlarım Zeynep Ceren AKYÜZ' e, Fulya ÖZERKAN' a, Yusuf Emre ÖZDEMİR' e ve Esra ÖZTÜRK' e hayatımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, amaçlarımın doğrultusunda ilerlemem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve maddi manevi destekleri ile her zaman yanımda olan annem Ayşe Sema KALKAN' a ve babam Halil Nadi KALKAN' a; abim Ömer Emre KALKAN' a ve tüm aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Bu tezi, her zaman benimle olan anneannem Sadise ÜÇER' e ve dedem Necdet ÜÇER' e hediye ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xvi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xvii
RESİMLERİN LİSTESİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Mıknatıslanma (Manyetizasyon).....	5
2.2. Demir oksitler.....	10
2.2.1. Manyetit (Fe ₃ O ₄)	10
2.3. Biyoteknolojik ve Biyomedikal Uygulamalarda Kullanılan Manyetik Mikro ve Nano Parçacıklar	12
2.4. Enzimler.....	15
2.4.1. Enzimlerin genel özellikleri	15
2.4.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması	15
2.4.3. Enzim katalizli tepkimeler	16
2.4.4. Enzim aktifliği ve enzim aktifliğine etki eden faktörler	17
2.5. Enzim İmmobilizasyonu	19
2.5.1. Enzim immobilizasyonunun tanımı ve önemi.....	19
2.5.2. Enzim immobilizasyonunda destek materyalin seçimi	20

Sayfa

2.5.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri	21
2.6. Adsorpsiyon	28
2.6.1. Adsorpsiyonun tanımı ve adsorpsiyon ile ilgili genel bilgiler	28
2.6.2. Adsorpsiyon yöntemiyle renk giderme.....	29
2.6.3. Adsorpsiyona etki eden faktörler	30
2.6.4. Adsorpsiyon izotermi	31
2.6.5. Adsorpsiyonun termodinamiğinin incelenmesi.....	35
2.7. Manyetik Destek Materyallere Enzim İmmobilizasyonu ve Boyarmadde Adsorpsiyonunun Önemi	36
2.8. Bu Çalışmada Hazırlanan Fe ₃ O ₄ -Kitosan Nanoparçacıkları	37
2.8.1. Kitosan	37
2.9. Fe ₃ O ₄ -Kitosan Nanoparçacıklarının Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler.....	38
2.9.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)	39
2.9.2. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR)	39
2.9.3. X-ışını kırınımı yöntemi (XRD).....	39
2.9.4. Termogravimetrik analiz (TGA)	40
2.9.5. ζ (Zeta) - potansiyel analizleri	40
2.9.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR).....	41
2.9.7. Titreşimli örnek manyetometrisi (VSM).....	42
2.9.8. Enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskopisi (SEM/EDS)	46
2.10. Lakkaz Enzimi.....	47
2.11. ABTS Substratı	50

Sayfa

2.12. Manyetik Destek Materyallere Enzimlerin, Proteinlerin ve Lakkaz Enziminin İmmobilizasyonuna İlişkin Literatürde Yer Alan Bazı Çalışmalar.....	51
2.13. Reaktif Boyarmaddeler ve Reaktif Sarı 145	56
2.14. Manyetik Adsorplayıcılara Boyarmaddelerin Adsorpsiyonuna İlişkin Literatürde Yer Alan Çalışmalar	57
3. DENEYSEL KISIM.....	59
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	59
3.2. Fe ₃ O ₄ -Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi	61
3.3. Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ -Kitosan Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu	62
3.3.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)	62
3.3.2. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR)	62
3.3.3. X-ışını kırınımı yöntemi (XRD).....	63
3.3.4. Termogravimetrik analiz (TGA)	63
3.3.5. ζ-(Zeta) potansiyel ölçümleri.....	63
3.3.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR).....	63
3.3.7. Titreşimli örnek manyetometri (VSM).....	64
3.4. Fe ₃ O ₄ -Kitosan Nanoparçacıklarına Lakkaz İmmobilizasyonu	64
3.4.1. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına adsorpsiyonla lakkaz immobilizasyonu.....	65
3.4.2. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarının karbodimitle aktifleştirilmesi ve kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu.....	65
3.4.3. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarının siyanürik klorürle aktifleştirilmesi ve kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu.....	67

Sayfa

3.4.4. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına immobilize edilen enzimlerin enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS) ile tayini.....	68
3.4.5. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına immobilize edilen enzim miktarının Bradford metodu ile tayini	69
3.5. Serbest Lakkazın Aktiflik Tayini	70
3.6. İmmobilize Lakkazların Aktiflik Tayini.....	72
3.7. Substrat Değişimi ile Tepkime Hızının Değişimi	73
3.8. Lakkaz Değişimi ile Tepkime Hızının Değişimi	74
3.9. Lakkaz Aktifliğine pH Etkisi	75
3.9.1. Serbest lakkaz aktifliğine pH etkisi.	75
3.9.2. İmmobilize lakkaz aktifliğine pH etkisi.....	75
3.10. Lakkaz Aktifliğine Sıcaklık Etkisi	76
3.10.1. Serbest lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi.	76
3.10.2. İmmobilize lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi	76
3.11. Lakkaz Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi	76
3.11.1. Serbest lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi.	76
3.11.2. İmmobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi	77
3.12. Lakkaz Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi.....	77
3.12.1. Serbest lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi.	77
3.12.2. İmmobilize lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi.	77
3.13. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Kullanım Sayısının Etkisi.....	77
3.14. Fe ₃ O ₄ -Kitosan Nanoparçacıklarına Boyarmadde Adsorpsiyonu	78
3.14.1. Reaktif Sarı 145 kalibrasyon eğrisinin hazırlanması	78

Sayfa

3.14.2. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna temas süresinin etkisi	79
3.14.3. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna pH etkisi.....	79
3.14.4. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi	79
3.14.5. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna tuz derişiminin etkisi.	80
3.14.6. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarından Reaktif Sarı 145' in desorpsiyonu.....	80
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	81
4.1. Fe ₃ O ₄ -Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi	81
4.2. Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ -Kitosan Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu	83
4.2.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)	83
4.2.2. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR)	90
4.2.3. X-Işını kırınımı yöntemi (XRD).....	92
4.2.4. Termogravimetrik analiz (TGA)	93
4.2.5. ζ-(Zeta) potansiyel analizi.....	95
4.2.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR).....	97
4.2.7. Titreşimli örnek manyetometri (VSM).....	99
4.3. Fe ₃ O ₄ -Kitosan Nanoparçacıklarına Lakkaz İmmobilizasyonu.....	103
4.3.1. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına immobilize edilen enzimlerin enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS) ile tayini.....	104
4.3.2. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına immobilize edilen enzim miktarının Bradford metodu ile tayini.....	107
4.4. Lakkazın Aktiflik Tayini	107

Sayfa

4.5. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Etki Eden Parametreler.....	108
4.5.1. Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine pH etkisi.....	108
4.5.2. Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi	114
4.5.3. Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi	119
4.5.4. Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi	124
4.5.5. İmmobilize lakkaz aktifliğine kullanım sayısının etkisi.....	131
4.6. Fe ₃ O ₄ -Kitosan Nanoparçacıklarına Boyarmadde Adsorpsiyonu....	135
4.6.1. Reaktif Sarı 145 kalibrasyon grafiğinin oluşturulması	135
4.6.2. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna temas süresinin etkisinin etkisi	135
4.6.3. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna pH etkisi.	137
4.6.4. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi	139
4.6.5. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna tuz değişiminin etkisi.....	149
4.6.6. Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarından Reaktif Sarı 145' in desorpsiyonu	151
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	153
KAYNAKLAR	156
EKLER	
EK-1 Manyetik terimlerin sembolleri, CGS ve SI sistemindeki birimleri ve çevirme faktörleri.....	171
EK-2 Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	172
EK-3 BSA kalibrasyon grafiğine ait veriler	174

Sayfa

EK-4	ABTS kalibrasyon grafiğine ait veriler	175
EK-5	Substrat derişimi ile tepkime hızının değişimine ait veriler.....	176
EK-6	Lakkaz derişimi ile tepkime hızının değişimine ait veriler.....	177
EK-7	İmmobilize edilen enzim miktarının tayinine ait veriler	178
EK-8	Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının ç- potansiyelinin pH ile değişimine ait veriler	179
EK-9	Serbest lakkaz ve immobilize lakkazların aktifliğine pH etkisine ait veriler	181
EK-10	Serbest lakkaz ve immobilize lakkazların aktifliğine sıcaklık etkisine ait veriler	183
EK-11	Serbest lakkaz ve immobilize lakkazların aktifliğine depolama süresinin etkisine ait veriler.....	185
EK-12	Serbest ve immobilize lakkazların aktifliğine substrat derişiminin etkisine ait veriler	187
EK-13	İmmobilize lakkazların aktifliğine kullanım sayısının etkisine ait veriler	188
EK-14	Reaktif Sarı 145 kalibrasyon eğrisine ait veriler	192
EK-15	Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun temas süresiyle değişimine ait veriler.....	193
EK-16	Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun pH ile değişimine ait veriler	194
EK-17	Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun sıcaklık ile değişimine ait veriler	195
EK-18	Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına 25,35,45°C' de Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonu için Langmuir modeline göre oluşturulan grafiklere ait veriler	196
EK-19	Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına 25,35,45°C' de Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonu için Freundlich modeline göre oluşturulan grafiklere ait veriler	197
EK-20	Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun termodinamik parametrelerinin hesaplanması için lnK _L -1/T değerleri	198
EK-21	Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna tuz derişiminin etkisine ait veriler	199
EK-22	Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarından Reaktif Sarı 145' in desorpsiyonuna ait veriler	200
EK-23	Yararlanılan internet adresleri.....	201
	ÖZGEÇMİŞ	202

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Manyetik davranışlara göre manyetik momentlerin durumu, dışarıdan uygulanan manyetik alanla yönelimleri ve manyetik alana karşı mıknatıslanma grafikleri	9
Çizelge 2.2. Destek materyalin içerdiği bazı fonksiyonel gruplara göre aktiveleştirilebileceği reaktifler, aktiveleşme ile oluşan reaktif gruplar, enzimin desteğe kovalent bağlanabileceği gruplar ve bağlanma tipi.....	27
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar	60
Çizelge 4.1. Fe ₃ O ₄ -CS ve adsorpsiyon ve kovalent bağlanma ile lakkaz immobilize edilmiş Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının EDS spektrumlarında tespit edilen atomlar ve atomların % dağılımı	107
Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize lakkazların depolama süresince maksimum aktiflikleri	124
Çizelge 4.3. Serbest ve immobilize lakkazların kinetik parametreleri.....	129
Çizelge 4.4. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun Langmuir modeline göre belirlenen parametreleri ve model sabitleri.....	142
Çizelge 4.5. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun Freundlich göre belirlenen parametreleri ve model sabitleri.....	145
Çizelge 4.6. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun 25°C, 35°C ve 45°C' de ΔG° ve TΔS° değerleri	149

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Atom çekirdeği çevresinde ve kendi etrafında spin hareketi yapan elektronun oluşturduğu manyetik moment.....	5
Şekil 2.2. Fe ₃ O ₄ birim hücresi	11
Şekil 2.3. Manyetik kompozit parçacıkların şematik olarak gösterimi	13
Şekil 2.4. Enzimatik tepkimenin hızına substrat derişiminin etkisi.	18
Şekil 2.5. Enzim immobilizasyon yöntemleri.	21
Şekil 2.6. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonu.....	22
Şekil 2.7. Mikrokapsül içerisinde hapsetme ile enzim immobilizasyonu.....	23
Şekil 2.8. Kafes tipi hapsetme ile enzim immobilizasyonu	24
Şekil 2.9. Kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonu.....	25
Şekil 2.10. Çapraz bağlanma ile enzim immobilizasyonu	28
Şekil 2.11. Kitin ve kitosanın yinelenen birimleri	37
Şekil 2.12. Uygulanan manyetik alanın elektronların enerji seviyelerinde meydana getirdiği değişme	41
Şekil 2.13. Ferromanyetik bir malzemenin manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi	43
Şekil 2.14. Birden çok manyetik bölgeden oluşan malzemenin yapısı ve atomik manyetik momentlerin durumu	45
Şekil 2.15. Süperparamanyetik nanoparçacıkların mıknatıslanmasının uygulanan manyetik alanla değişimi	46
Şekil 2.16. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması.....	49
Şekil 2.17. ABTS ve ABTS•+	51
Şekil 2.18. RY145 boyarmaddesinin yapısı ve bazı özellikleri	56
Şekil 3.1. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının sentezi	62

Şekil	Sayfa
Şekil 3.2. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına lakkaz immobilizasyonu sırasındaki işlem basamakları.....	65
Şekil 3.3. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının karbodimitle aktifleştirilmesi ve lakkaz immobilizasyonu	67
Şekil 3.4. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının siyanürik klorürle aktifleştirilmesi ve lakkaz immobilizasyonu	68
Şekil 3.5. BSA kalibrasyon grafiği.....	69
Şekil 3.6. ABTS kalibrasyon grafiği.....	71
Şekil 3.7. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkazın aktiflik tayinindeki işlem basamakları	73
Şekil 3.8. Substrat derişimi ile tepkime hızının değişimi	74
Şekil 3.9. Lakkaz derişimi ile tepkime hızının değişimi	75
Şekil 3.10. RY145 kalibrasyon grafiği	78
Şekil 4.1. Kitosanın glutaraldehitte çapraz bağlanması	82
Şekil 4.2. Fe ₃ O ₄ , CS ve Fe ₃ O ₄ -CS' in FT-IR spektrumları.....	91
Şekil 4.3. Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının x-ışını kırınım desenleri	92
Şekil 4.4. Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının TGA termogramları	94
Şekil 4.5. Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının ζ-potansiyelinin pH ile değişimi.....	96
Şekil 4.6. Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının EPR spektrumları.....	98
Şekil 4.7. Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklarının manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi	100
Şekil 4.8. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi	101
Şekil 4.9. Fe ₃ O ₄ -CS ve lakkaz immobilize edilmiş Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının SEM/EDS spektrumları	105

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. Serbest lakkaz aktifliğinin pH ile değişimi.....	108
Şekil 4.11. Fe ₃ O ₄ -CS-L aktifliğinin pH ile değişimi	110
Şekil 4.12. Fe ₃ O ₄ -CS-EDAC-L aktifliğinin pH ile değişimi	111
Şekil 4.13. Fe ₃ O ₄ -CS-SC-L aktifliğinin pH ile değişimi	113
Şekil 4.14. Serbest lakkaz aktifliğinin sıcaklık ile değişimi	114
Şekil 4.15. Fe ₃ O ₄ -CS-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	116
Şekil 4.16. Fe ₃ O ₄ -EDAC-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	117
Şekil 4.17. Fe ₃ O ₄ -SC-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	118
Şekil 4.18. Serbest lakkaz aktifliğinin depolama süresi ile değişimi	120
Şekil 4.19. Fe ₃ O ₄ -CS-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi	121
Şekil 4.20. Fe ₃ O ₄ -CS-EDAC-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi	122
Şekil 4.21. Fe ₃ O ₄ -CS-SC-L aktifliğinin depolama süresince değişimi	123
Şekil 4.22. Serbest lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği.....	126
Şekil 4.23. Fe ₃ O ₄ -CS-L için Lineweaver-Burk grafiği	127
Şekil 4.24. Fe ₃ O ₄ -CS-EDAC-L için Lineweaver-Burk grafiği	128
Şekil 4.25. Fe ₃ O ₄ -CS-SC-L için Lineweaver-Burk grafiği	129
Şekil 4.26. Fe ₃ O ₄ -CS-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi	132
Şekil 4.27. Fe ₃ O ₄ -CS-EDAC-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi	133
Şekil 4.28. Fe ₃ O ₄ -CS-SC-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi.....	134
Şekil 4.29. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun temas süresi ile değişimi.....	136
Şekil 4.30. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun pH ile değişimi	137

Şekil	Sayfa
Şekil 4.31. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonun farklı sıcaklıklardaki izoterm eğrileri.....	139
Şekil 4.32. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun C _e değerlerine karşı C _e /q _e grafiği (25°C).....	140
Şekil 4.33. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun C _e değerlerine karşı C _e /q _e grafiği (35°C).....	141
Şekil 4.34. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun C _e değerlerine karşı C _e /q _e grafiği (45°C).....	141
Şekil 4.35. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun ln C _e değerlerine karşı ln q _e grafiği (25°C).....	144
Şekil 4.36. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun ln C _e değerlerine karşı ln q _e grafiği (35°C).....	144
Şekil 4.37. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun ln C _e değerlerine karşı ln q _e grafiği (45°C).....	145
Şekil 4.38. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun 1/T değerlerine karşı lnK _L grafiği.....	146
Şekil 4.39. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonu sırasında RY145 ve su moleküllerinin durumu.....	148
Şekil 4.40. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun KCl derişimi ile değişimi.....	150
Şekil 4.41. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun NaOH derişimi ile değişimi.....	151

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Fe ₃ O ₄	10
Resim 2.2. <i>Trametes versicolor</i> mantarı	48
Resim 2.3. <i>Trametes versicolor</i> ' dan elde edilen lakkaz molekülü.....	49
Resim 4.1. Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklarının TEM görüntüleri	84
Resim 4.2. Resim 4.1. a' daki Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklarının boyutlarını gösteren TEM görüntüsü	85
Resim 4.3. Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının TEM görüntüleri	86
Resim 4.4. Resim 4.3. a, b ve c' deki Fe ₃ O ₄ -CS nanoparçacıklarının boyutlarını gösteren TEM görüntüleri.....	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
M	Mıknatıslanma
<i>m</i>	Manyetik moment
m	Kütle
σ	Kütle mıknatıslanması
χ	Manyetik duyarlılık
H	Manyetik alan
B	Manyetik indüksiyon
T_c	Curie sıcaklığı
T_N	Néel sıcaklığı
M_s	Doyum mıknatıslanması
σ_s	Kütleyle bağlı doyum mıknatıslanması
M_r	Kalıcı mıknatıslanma (remanans)
H_c	Zorlayıcı alan (koersivite)
V_{mak}	Maksimum hız
K_m	Michaelis-Menten sabiti
S	Substrat
pl	İzoelektronik nokta
t	Süre
A_0	t = 0 anındaki absorbans
A_t	t anındaki absorbans
C_0	t = 0 anındaki çözelti derişimi
C_t	t anındaki çözelti derişimi

Simgeler	Açıklama
q_t	t anında adsorplayıcının 1 gramına adsorplanan miktar
C_e	Dengede çözelti derişimi
q_e	Dengede adsorplayıcının 1 gramına adsorplanan miktar
q_{mak}	Adsorplayıcının 1 gramı başına maksimum adsorpsiyon kapasitesi
K_F	Freundlich denge sabiti
n	Freundlich sabiti
K_L	Langmuir denge sabiti
R_L	Ayırma faktörü (denge parametresi)
t	Sıcaklık
T	Mutlak sıcaklık
ΔG°	Adsorpsiyon standart serbest enerjisi
ΔS°	Adsorpsiyon standart entropisi
ΔH°	Adsorpsiyon standart entalpisi

Kısaltmalar	Açıklama
CS	Kitosan
Fe₃O₄-CS	Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıkları
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
TEM	Geçirimli elektron mikroskopisi
FT-IR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
XRD	X-ışınları kırınımı yöntemi
TGA	Termogravimetrik analiz
EPR	Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi
VSM	Titreşimli örnek manyetometrisi

Kısaltmalar	Açıklama
FT	Fosfat tamponu
FST	Fosfat-sitrat tamponu
L	Lakkaz
EDAC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'etil-karbodiimit hidroklorür
SC	Siyanürik klorür
RY145	Reaktif Sarı 145
Fe₃O₄-CS-EDAC	Karbodiimitle aktifleştirilen Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıkları
Fe₃O₄-CS-SC	Siyanürik klorürle aktifleştirilen Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıkları
Fe₃O₄-CS-L	Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz
Fe₃O₄-CS-EDAC-L	Karbodiimitle aktifleştirilen Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz
Fe₃O₄-CS-SC-L	Siyanürik klorürle aktifleştirilen Fe ₃ O ₄ -kitosan nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz
BSA	Sığır serum albümini
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit)

1. GİRİŞ

21. yüzyılın teknolojisi, malzemelerin nanometre mertebesine (10^{-9} m), küçültülerek, şu anki verimliliklerinin artırılması ve belirli bir amaca hizmet edebilecek işlevsellikte yeni malzemeler, aygıtlar ve sistemler üretilmesi yönünde ilerlemektedir. Malzeme boyutu nanometre seviyesine indirildiğinde, parçacıkların yüzey özelliklerinde ve birbirleri arasındaki etkileşimlerinde meydana gelen değişimler, yapıda yeni ve üstün özelliklerin ortaya çıkmasına neden olarak; nano yapılı malzemelerin elektronik, optik, biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda git gide artan bir şekilde kullanılabilir hale gelmesini sağlamaktadır [1-3].

Son yıllarda, biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmalarına yönelik araştırmaların üzerinde yoğunlaştığı nano yapılı malzemeler arasında, manyetik özellik sergileyen nanoparçacıklar önemli bir yer edinmiştir. Manyetit (Fe_3O_4) ya da maghemit ($\gamma-Fe_2O_3$) gibi manyetik demir oksit nano parçacıklarının, çeşitli doğal ya da sentetik polimerlerle işlevsel hale getirilmesi yoluyla hazırlanabilen fonksiyonel manyetik nanoparçacıklar; ilaç taşıma sistemlerinde, doku onarımında, tümörlerin ısıyla bozundurulmasında, manyetik rezonans görüntüleme, hücrelerin ve RNA, DNA, proteinler ve enzimler gibi biyomoleküllerin biyolojik ortamlardan ayrılmasında, enzimlerin ve proteinlerin immobilizasyonunda [4-6], suyun ağır metal iyonları ve boyarmaddeler gibi kirleticilerden uzaklaştırılmasında ve manyetoreolojik araştırmalarda kullanılmaktadır [7,8].

Enzimler, hücrede meydana gelen biyokimyasal tepkimelerin hızını düzenleyen, protein yapısındaki biyomoleküllerdir. Biyolojik katalizör olarak görev yapan ve çoğu kez hücre dışında da etkinliklerini koruyan enzimler, ilaç, deterjan, gıda ve tekstil endüstrisindeki çeşitli uygulamalarda ve organik sentezlerde kullanılmaktadır. Enzimlerin bu uygulamalarının genellikle çözelti ortamı içerisinde yürütülmesi, tepkime ortamından istenilen anda uzaklaştırılmalarını ve saf bir şekilde geri kazanılmalarını zorlaştırmaktadır.

Ayrıca enzimin ayrılması ve saflaştırılması için gerçekleştirilen bir çok işlem, uygulamanın maliyetini artırmaktadır. Bu sınırlamaları ortadan kaldırmak ve enzimlerin ekonomik ve pratik bir şekilde kullanılmasını sağlamak amacıyla; çeşitli fiziksel ya da kimyasal yöntemlerle hareketi sınırlandırılmış, yani immobilize edilmiş enzimlerin kullanılması tercih edilir hale gelmiştir. Enzimler, suda çözünmeyen, katı bir destek materyale adsorpsiyonla tutuklandıklarında veya kovalent bağ ile bağlandıklarında, katalitik etkinlikleri kaybolmadan birbirlerine çapraz bağlandıklarında ya da suda çözünmeyen bir polimerik matriks veya yarı geçirgen bir membran içerisinde hapsedildiklerinde immobilize edilmiş olurlar. Böylece enzimler, tepkime ortamından istenilen bir anda ayrılabilir ve katalizledikleri tepkimelerde tekrar tekrar kullanılabilir hale getirilirler [9-11]. Enzimlerin immobilize edilmesi amacıyla, doğal ya da sentetik polimerlerden ve inorganik maddelerden çeşitli biçimlerde ve boyutlarda hazırlanabilen destek materyaller kullanılmaktadır. Yakın bir geçmişten bu yana ise, manyetik özellik gösteren destek materyaller, enzimlerin immobilize edilmesi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır.

Manyetik destek materyaller, immobilize enzimin tepkime ortamından santrifüjleme, süzme gibi işlemlere gerek kalmadan, bir mıknatıs yardımıyla kolaylıkla uzaklaştırılabilmesini sağlar. Böylelikle, immobilize enzimle yürütülen işlemlerin süresinin kısalmasına ve uygulamanın daha ekonomik hale gelmesine imkan tanır. Şimdiye kadar, çeşitli polimerler ile hazırlanan manyetik mikroküreler [12-16] ve manyetik nanoparçacıklar [17-21], enzimlerin immobilize edilmesinde kullanılmıştır. Manyetik nanoparçacıklar, geniş yüzey alanına sahip olmaları nedeniyle, yüksek miktarda enzimi tutuklayabilme avantajına sahiptirler.

Manyetik mikrokürelerin ve nanoparçacıkların diğer bir önemli uygulaması, sulu ortamdaki boyarmaddeler gibi kirleticilerin adsorpsiyonla uzaklaştırılmasıdır. Kağıt, deri, plastik ve tekstil endüstrisi atık suları içerisinde bulunan bir çok kimyasal ve boyarmadde, çevreyi ve insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu atık sularda bulunan

boyarmaddelerin uzaklaştırılması çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle gerçekleştirilmektedir ve bu yöntemlerin etkili olma derecesi, boyarmaddenin türüne ve atık suyun bileşimine bağlı olarak değişebilmektedir. Ayrıca, yöntemin maliyeti ve süresi de, uygulanabilirliği üzerinde etkilidir. Boyarmaddelerin uzaklaştırılmasında kullanılan tekniklerden biri olan adsorpsiyon, farklı türdeki boyarmaddelere uygulanabilmesi, daha düşük maliyetli ve kolay olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [22]. Çeşitli polimerler ya da materyaller kullanılarak hazırlanan mikro ve nanoboyutlu manyetik adsorplayıcılar, farklı türlerdeki boyarmaddelerin adsorpsiyonunda kullanılmıştır [23-27].

Bu çalışmada, manyetik özellik gösteren Fe_3O_4 nanoparçacıkları, doğal bir polimer olan kitosanla kaplanarak fonksiyonel hale getirilmiş ve kitosan kaplı manyetik nanoparçacıklar (Fe_3O_4 -CS), enzim immobilizasyonunda ve boyarmadde adsorpsiyonunda kullanılmıştır. Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının yapısal, yüzeysel ve manyetik özellikleri, geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR), X-ışınları kırınımı yöntemi (XRD), termogravimetrik analiz (TGA), ζ -(zeta) potansiyel analizleri, elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR) ve titreşimli örnek manyetometrisi (VSM) analizleri ile araştırılmıştır. Manyetik Fe_3O_4 -CS nanoparçacıkları, çevresel kirleticilerin enzimatik yolla bozundurulması, meşrubatların stabilizasyonunun sağlanması, kağıt hamurundan ligninin uzaklaştırılması gibi uygulamalarda yaygın olarak kullanılan lakkaz enziminin (E.C.1.10.3.2) immobilizasyonu için destek materyal olarak kullanılmıştır. Lakkaz enziminin Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına immobilizasyonu, adsorpsiyon ve bu manyetik nanoparçacıkların yüzeyinin karbodiimit ve siyanür klorürle aktifleştirilmesinin ardından, kovalent bağlanma yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve immobilize enzim sistemlerindeki enzimin varlığı, enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS) ile belirlenmiştir. Lakkaz aktivliği, ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit)) substratı ile tayin edilmiş ve serbest ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına 3 farklı yöntem ile

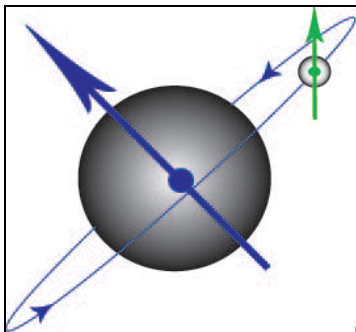
immobilize edilen lakkazların optimum pH ve optimum sıcaklıkları belirlenmiş, kinetik parametreleri (V_{mak} ve K_m), depolama süresince aktifliklerinde meydana gelen değişmeler araştırılmıştır. Ayrıca, immobilize lakkazların tekrar tekrar kullanılmaya karşı aktiflikleri incelenmiştir. Diğer bir uygulamada ise, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıkları, tekstil endüstrisinde kullanılan reaktif boyarmaddelerden Reaktif Sarı 145' in (C.I. Reactive Yellow 145), sulu ortamdan adsorpsiyonla uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. Reaktif Sarı 145' in Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına adsorpsiyonuna pH, sıcaklık ve tuz derişiminin etkisi incelenmiş ve adsorpsiyonun Langmuir ve Freundlich modellerine uygunluğu araştırılmıştır. Boyarmaddenin bu manyetik nanoparçacıklara adsorpsiyonu Langmuir modeline uyduğu için, bu modele göre hesaplanan farklı sıcaklıklardaki denge sabitleri kullanılarak, adsorpsiyon termodinamik açıdan değerlendirilmiş ve boyarmaddenin desorpsiyonu incelenmiştir. Kitosan kaplı manyetik nanoparçacıklar, enzim immobilizasyonu ve boyarmadde adsorpsiyonu uygulamalarında, uygulandıkları ortam içerisinde kolaylıkla dağıtılabilmiş ve bir mıknatis yardımıyla hızlıca toplanabilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mıknatıslanma (Manyetizasyon)

Mıknatıslanma (manyetizasyon), elektriksel yüklerin hareketleri sonucunda meydana gelen bir olaydır. Genel olarak, kendisinden belirli bir uzaklıkta bulunan Fe, Ni, Co gibi iletkenler ile bu iletkenlerin alaşımlarını kendine çekebilme özelliği gösteren maddelere “mıknatıs” adı verilir. Bir mıknatıs, kendi etrafında “manyetik alan” olarak tanımlanan bir etki alanı meydana getirir. Kendileri mıknatıs olmadıkları halde, bir mıknatısın etki alanı içinde kalınca, Fe, Ni, Co gibi iletkenler ve bunların alaşımlarını kendine çekebilme özelliği gösteren maddelere de “manyetik madde” denilir. Bunun tersine, mıknatısın etki alanı içinde kaldıkları halde, sözü geçen maddeleri kendisine çekme özelliği göstermeyen maddeler de “manyetik olmayan maddeler” dir [28].

Bütün manyetik maddelerin atomları, atomun çekirdeği çevresinde bulunan elektronların dönüş (spin) hareketlerinden ve elektronlarının kendi etrafındaki hareketlerinden kaynaklanan bir “manyetik moment”e sahiptir. Şekil 2.1.’ de atom çekirdeği çevresinde ve kendi etrafında dönen elektronun oluşturduğu manyetik moment şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Atom çekirdeği çevresinde ve kendi etrafında spin hareketi yapan elektronun oluşturduğu manyetik moment

Bir maddenin manyetik özelliğinin nedeni, maddenin elektronlarının kendi etrafındaki ve çekirdek etrafındaki dönüş (spin) hareketlerinin atomda bir

elektron akımı meydana getirmesi ve bu akımın da bir manyetik alan oluşturmasıdır.

Bir maddenin mıknatıslanması (M), dışarıdan uygulanan manyetik alana bağlıdır ve katı maddenin birim hacmindeki (V) manyetik moment (m) miktarına eşittir (Eş. 2.1) [29,30]:

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

Maddenin birim kütledeki mıknatıslanma (σ) ise, manyetik momentin, maddenin kütlesine (m) oranı ile hesaplanır (Eş. 2.2) [31].

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

Manyetik alan şiddeti (H) ve mıknatıslanma arasındaki ilişki de, Eş. 2.3' te verildiği gibidir [29,30]:

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

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

Maddeler, elektronlarının atom çekirdeği çevresindeki spin hareketlerine ve bunların birbirleriyle etkileşimlerine bağlı olarak belirli bir manyetik davranış sergiler. Bu davranışlar, diyamanyetizma, paramanyetizma, ferromanyetizma, antiferromanyetizma ve ferrimanyetizma olmak üzere 5 sınıfta incelenebilir. Bu manyetik davranışlara göre, maddenin atomlarındaki manyetik momentlerin durumu, dışarıdan uygulanan manyetik alanla manyetik momentlerin yönelimi ve manyetik alana karşı maddenin mıknatıslanma grafikleri, toplu olarak Çizelge 2.1' de gösterilmiştir.

Diyamanyetik maddeler, manyetik alan tarafından oldukça zayıf bir itme kuvveti ile itilen maddelerdir. Bu maddelerin atomları, net bir manyetik momente sahip değildir. Manyetik alana maruz bırakıldıklarında, manyetik alan tarafından zayıfça itildikleri için, mıknatıslanmaları negatif yönde artar. Bu maddelerin χ değeri negatif olup, yaklaşık -10^{-5} civarındadır [29].

Paramanyetik maddeler, eşleşmemiş elektronlar içermeleri nedeniyle, manyetik momente sahip olan ve manyetik alan içine yerleştirildikleri zaman, manyetik alan tarafından çekilen maddelerdir. Bu maddelerin χ değerleri yaklaşık 10^{-3} ile 10^{-5} civarındadır ve dış manyetik alan sıfır olduğunda bu maddelerin mıknatıslanması sıfırdır [29]. Maddeye dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında ise, Çizelge 2.1' de gösterildiği gibi, rasgele yönlenmiş manyetik momentler, manyetik alanla aynı doğrultuda yönlenir ve maddenin mıknatıslanması artar.



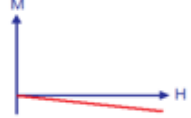


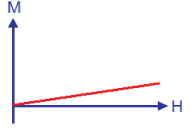


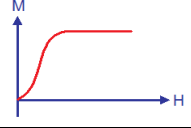


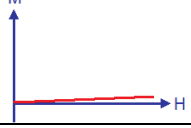
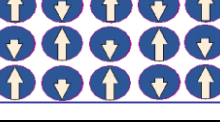
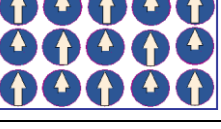
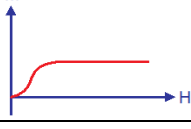
Ferromanyetik maddeler, manyetik alan içinde kalınca çok iyi mıknatıslanma özelliği gösteren ve χ değerleri $50-10^4$ dolaylarında olan maddelerdir. Fe, Ni, Co ferromanyetik özellik gösterir. Ferromanyetik maddelerin atomları net bir manyetik momente sahiptir ve bu manyetik momentler birbirlerinin etkisini artıracak şekilde aynı yönlü düzenlenmiştir. Bu maddelere dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında, Çizelge 2.1' deki gibi, manyetik momentlerin daha da düzenli hale geçmesiyle, maddenin toplam mıknatıslanması artar ve bir süre sonra, düzenlenecek manyetik moment kalmadığı için mıknatıslanma doygunluğa ulaşır. Bu andaki mıknatıslanma, "doyum mıknatıslanması" olarak tanımlanır ve " M_s " ile gösterilir (Eğer doyum mıknatıslanması kütle mıknatıslanması olarak veriliyorsa, σ_s olarak gösterilir). Doyum mıknatıslanmasının büyüklüğü, maddenin birim hacmindeki manyetik moment miktarına bağlıdır. Ayrıca sıcaklık, bu maddelerin mıknatıslanması üzerinde etkilidir. Ferromanyetik maddeler, "Curie sıcaklığı" olarak bilinen ve " T_C " ile simgelenen belirli bir sıcaklığın üzerinde, manyetik momentlerinin

düzenlenmelerini kaybetmesiyle paramanyetik davranış gösterirler. Fe için T_c 1043 K'dir [28,29].

Antiferromanyetik maddelerde, birbirine komşu olan eşit büyüklükteki manyetik momentler, birbirlerinin etkisini yok edecek şekilde ters yönlü düzenlenmiştir. Bu nedenle, dış manyetik alan sıfır olduğunda, maddenin net manyetik momenti sıfırdır. Bu durum, kristal örgü içerisinde, birbirine zıt yönlü manyetik momentlere sahip iki ayrı alt örgünün bulunmasından kaynaklanmaktadır. Maddeye dışarıdan manyetik alan uygulandığında ise, manyetik alana zıt yönlü olan manyetik momentler, manyetik alanla aynı yöne doğru yönlenmeye başlar ve maddenin mıknatıslanması artar (Çizelge 2.1). Antiferromanyetik maddelerin manyetik özelliği de sıcaklığa önemli ölçüde bağlıdır ve bu maddeler, "Néel sıcaklığı" olarak bilinen ve " T_N " ile simgelenen belirli bir sıcaklıkta, sahip oldukları düzenlenmeyi kaybederek paramanyetik davranış sergiler. FeO, 198 K altındaki sıcaklıklarda antiferromanyetik özellik gösterir [29].

Ferrimanyetik davranış, antiferromanyetik davranışı da içeren bir manyetik davranış türüdür. Ferrimanyetik maddeler, antiferromanyetik maddelerde olduğu gibi, birbirine zıt yönlü manyetik momentler içeren iki ayrı kristal alt örgüsünden oluşmuşlardır. Fakat, bu iki alt örgüdeki manyetik momentler, birbirine eşit büyüklükte değildir. En çok bilinen ferrimanyetik maddelerden birisi, Fe_3O_4 (manyetit)'tir (özellikleri ileride açıklanacaktır). Bu maddelere, dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında, manyetik momentlerin manyetik alanla aynı doğrultuda yönlenmesiyle, maddenin mıknatıslanması artmaya başlar. Manyetik alan şiddeti belirli bir değere ulaştığında ise, manyetik momentlerin tümü, manyetik alanla aynı doğrultuda yönlendiği için, maddenin mıknatıslanması, ferromanyetik maddelerde olduğu gibi doygunluğa ulaşır. Fakat, bu maddelerin mıknatıslanması, ferromanyetik maddelere göre daha düşük değerlerdedir (Çizelge 2.1). Ayrıca, T_c üzerindeki sıcaklıklarda ferrimanyetik maddeler, manyetik momentlerinin düzenlenmesini yitirmesiyle, paramanyetik hale dönüşür [29].

Çizelge 2.1. Manyetik davranışlara göre manyetik momentlerin durumu, dışarıdan uygulanan manyetik alanla yönelimleri ve manyetik alana karşı mıknatıslanma grafikleri

Manyetik davranış	Manyetik momentler		M-H grafiği
	Manyetik alan uygulanmadığında ($H = 0$)	Manyetik alan uygulandığında ($H = H \uparrow$)	
Diyamanyetizma			
Paramanyetizma			
Ferromanyetizma			
Antiferromanyetizma			
Ferrimanyetizma			

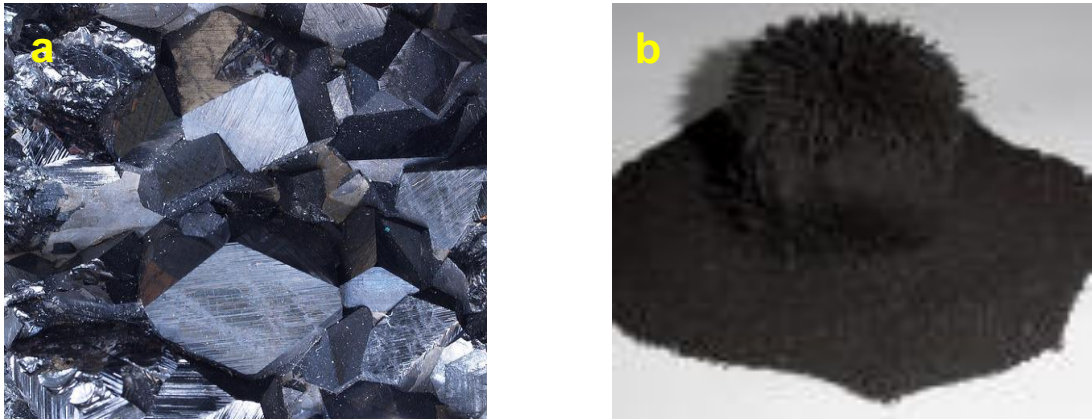
 Atom  Manyetik momentin yönü

2.2. Demir Oksitler

Demir oksitler, $Fe_xO_yH_z$ kapalı formülüne sahip inorganik bileşiklerdir. Bu bileşiklerin çoğunda $z=0$ ' dır. Demir oksit bileşikleri, $MO.Fe_2O_3$ olarak gösterilen kimyasal yapı içerisinde, $M=Co, Zn, Cu, Ni$ metal oksitleri ile birarada bulunurlar. Demir oksit bileşiklerinden en çok bilinen iki tanesi γ - Fe_2O_3 (maghemit) ve Fe_3O_4 (manyetit)' tir [32]. Aşağıda, manyetitin genel özellikleri ile ilgili bilgi verilmiştir.

2.2.1. Fe_3O_4 (Manyetit)

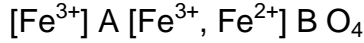
Fe_3O_4 , "mıknatıs taşı" olarak da bilinen, siyah renkli ferrimanyetik bir demir oksittir (Resim 2.1) [29].



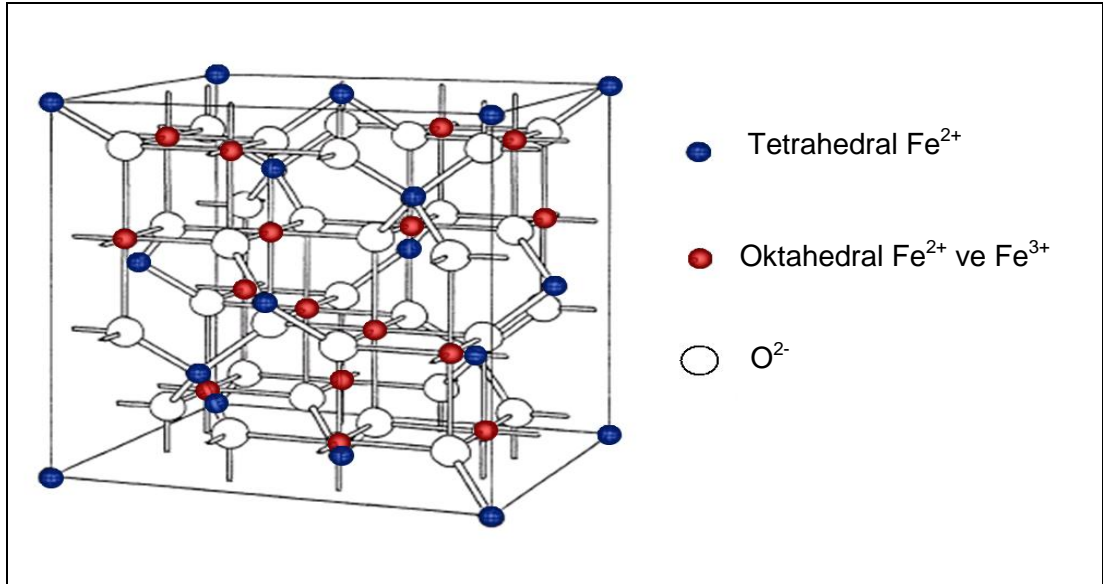
Resim 2.1. Fe_3O_4

a) Mineral b) Mıknatıslanmış toz

Fe_3O_4 , $FeO.Fe_2O_3$ yapısındadır. Şekil 2.2' de gösterilen Fe_3O_4 birim hücresi, 32 O^{2-} anyonu, 16 Fe^{3+} ve 8 Fe^{2+} katyonu olmak üzere 56 iyondan oluşur. Birim hücrede O^{2-} , kübik sık istiflenmiş yapıdadır. Fe^{2+} ve Fe^{3+} , tetrahedral (dörtüzlü) bölgelerde 4 adet, oktahedral (sekizyüzlü) bölgelerde ise 6 adet O^{2-} tarafından koordine olmuştur. Yapı içerisindeki tetrahedral ve oktahedral bölgeler, sırasıyla A ve B olarak temsil edilen iki ayrı alt örgüde düzenlenmiştir.

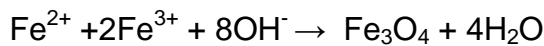


Bu yapıya göre, birim hücrede 8 adet Fe^{3+} , A (tetrahedral) alt örgüsüne; 8 adet Fe^{3+} ve 8 adet Fe^{2+} , B (oktahedral) alt örgüsüne 32 O^{2-} anyonu ile birlikte yerleşmiştir. A ve B alt örgülerindeki 8 Fe^{3+} , manyetik momentleri birbirine ters yönlü olmaları nedeniyle birbirinin manyetik momentini bertaraf eder. Bu nedenle, manyetitin net manyetik momenti oktahedral alt örgüdeki Fe^{2+} kationlarından ileri gelir. Manyetitin bu yapısı “ters spinel” olarak tanımlanır [29,33].



Şekil 2.2. Fe_3O_4 birim hücresi

Manyetit, aşağıdaki tepkimede gösterildiği gibi, 1:2 mol oranındaki $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}$ kationlarının sulu ortamda kuvvetli bir bazla çöktürülmesi ile elde edilir [32].



Tepkime sırasındaki $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}$ mol oranı, sentez ortamının doğası (ortamın pH ve sıcaklık değeri), oluşan demir oksitin türünü, boyutunu ve manyetik özelliğini etkilemektedir [4,34]. Ayrıca, sentez ortamındaki ya da havadaki

oksijen, veya çeşitli oksitleyici maddeler (hidrojen peroksit gibi) manyetiti maghemite oksitleyebilir [32].

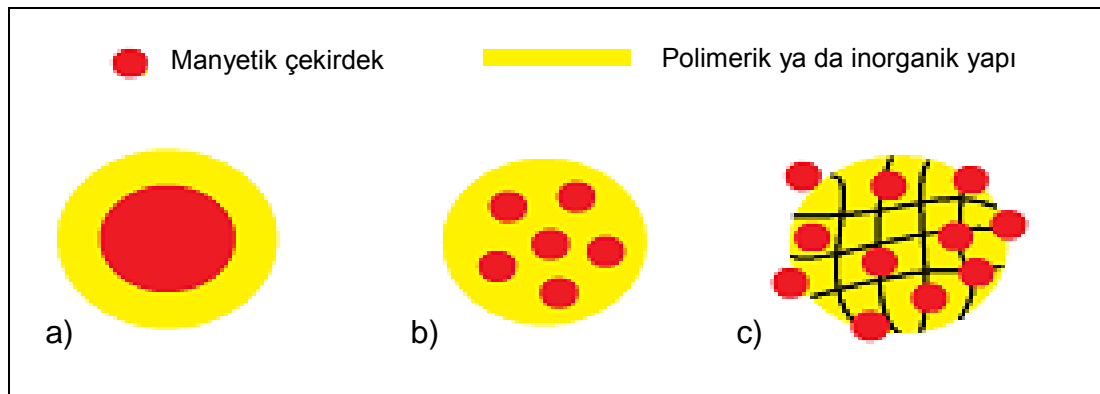
2.3. Biyoteknolojik ve Biyomedikal Uygulamalarda Kullanılan Manyetik Mikro ve Nano Parçacıklar

Fe_3O_4 ve $\gamma-Fe_2O_3$ gibi manyetik çekirdeklerle hazırlanan manyetik mikro ve nanoparçacıklar, biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalarda yakın bir geçmişten bu yana, giderek artan bir ilgiyle kullanılır hale gelmiştir. Manyetik nanoparçacıklar, ilerde tartışılacak olan süperparamanyetizma gibi üstün manyetik özelliklere sahip olabilmeleri nedeniyle, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ilaç salım sistemlerinde, tümörlerin ısıyla bozundurulmasında kullanılmaktadırlar [4,35]. Ayrıca, yüzeylerinde çeşitli fonksiyonel gruplar taşıyan manyetik nanoparçacıklar ve manyetik mikroküreler; biyolojik ve ekolojik ortamlardan toksik iyonların, proteinlerin, enzimlerin ve mikroorganizmaların bu manyetik parçacıklara tutunarak, manyetik ayırma tekniği ile uzaklaştırılmasında, manyetik taşıyıcı görevinde kullanılmaktadır. Manyetik taşıyıcı parçacıkların bu uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılmaları için sahip olmaları gereken özellikler aşağıda sıralanmıştır [32,36]. Buna göre manyetik taşıyıcı parçacıklar:

1. Dışarıdan uygulanan manyetik alana iyi bir cevap verebilmelidir.
2. Boyutları küçük olmalıdır. Böylelikle, yüzey alanının fazla oluşundan dolayı, daha fazla biyomolekül ve iyon yüzeye tutuklanarak ortamdan ayrılabilir.
3. Farklı ortam şartlarında kimyasal olarak kararlı olmalı ve mikrobiyal bozunmalara karşı dirençli olmalıdır.
4. Ortamdan ayrılmak ya da tutuklanmak istenen belirli bir bileşene karşı seçici olmalıdır. Yani elektrostatik adsorpsiyon yapabilmeli ya da yüzeylerinde fonksiyonel gruplar taşımalarıdır.
5. Bazı uygulamalarda geri kazanılabilir ve tekrar tekrar kullanılabilir olmalıdır.

6. Yüzeysel ve manyetik özellikleri nedeniyle bir araya gelme eğilimleri en aza indirgenmiş olmalıdır. Parçacıkların iyi dağıtılabileceği bir sıvı, bu amaçla kullanılabilir.
7. Üretimleri kolay ve ekonomik olmalıdır.

Manyetik nanoparçacıkların biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalardaki biyobozunurluklarını kolaylaştırmak, bu nanoparçacıkları fizyolojik ortamda toksik etki göstermeyecek hale getirmek ve bu nanoparçacıkların hormonlar, vitaminler, ilaçlar ve enzimler gibi kompleks yapıları biyomoleküllere bağlanmalarını sağlamak amacıyla, yüzeyleri kimyasal işlemlerle modifiye edilir. Ayrıca, manyetik özelliğe sahip koloidal sistemin kararlılığının sağlanabilmesi, sentezleri sırasında ya da sentezlenmelerinden sonra orijinal boyutlarını ve manyetik özelliklerini korumaları ve iyonik etkileşim, şelatlaşma, biyospesifik ayırma gibi uygulamalarda kullanılmaları için, bu parçacıkların yüzeyinde fonksiyonel grupların bulunması gerekir [32,35-37]. Bu amaçla, bir polimerle kaplanmış, bir polimerik ya da inorganik matris içine hapsedilmiş ya da polimerik ya da inorganik bir kabuğun üzerine çöktürülmüş manyetik kompozit parçacıklar hazırlanabilir [34,35]. Şekil 2.3' te bu yollarla hazırlanan manyetik kompozit parçacıkların yapıları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Manyetik kompozit parçacıkların şematik olarak gösterimi
a) Bir polimerle kaplanmış manyetik kompozit parçacık
b) Polimerik ya da inorganik matris içine hapsedilmiş manyetik parçacık
c) Polimerik ya da inorganik bir kabuk üzerine çöktürülmüş manyetik parçacık

İnorganik maddeler mekanik dayanıklılık, ısıl kararlılık, kimyasal maddelere ve mikrobiyal etkilere karşı direnç ve kolay üretilebilme gibi avantajlara sahip olsalar da, bu maddeler bir biyomolekülün yüzeylerine tutuklanması için sınırlı sayıda fonksiyonel grup içerirler [36]. Sözü geçen uygulamalarda kullanılan manyetik mikro ve nanoparçacıklar arasında, genellikle çeşitli fonksiyonel gruplara sahip polimerlerle hazırlananlara daha çok rastlanılmaktadır.

Şimdiye kadar, poli(akrilik asit) [38], poli(etilen glikol) [39], polivinilpirolidon [40] gibi sentetik polimerler ve karboksimetil selüloz [41], dekstran [42], jelatin [43], kitosan [44] gibi doğal polimerler ve bunların bazı kopolimerleri [45,46], manyetik nanoparçacıklarının yüzeyinin modifiye edilmesinde ya da manyetik polimerik mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Polimer kaplanmış manyetik nanoparçacıkların hazırlanmasında, Fe_3O_4 ve γ - Fe_2O_3 gibi manyetik nanoparçacıklar, polimer çözeltisinde ya da monomer emülsiyonu içerisinde koloidal halde olacak şekilde dağıtılır. Daha sonra bu nanoparçacıklar, ortamda bulunan ya da monomerin polimerleştirilmesiyle oluşturulan polimer zincirleri tarafından, tek bir manyetik parçacık ya da bir araya gelmiş manyetik parçacıklar halinde kaplanır. Kaplama işlemi bitkisel ya da mineral yağ ve emülsiyon edicilerin bulunduğu ortamda yürütülebilir.

Polimer içerisine hapsedilmiş manyetik parçacıkların hazırlanmasında, Fe_3O_4 ve γ - Fe_2O_3 gibi manyetik nanoparçacıklar monomer ya da polimer içeren faz içerisinde dağıtılır ve sonrasında bu faz ile karışmayan ayrı bir sıvı içerisinde damlalar halinde emülsiyon edilir. Damlacıklar içerisinde yer alan manyetik nanoparçacıklar, monomerin polimerleştirilmesiyle ya da polimerin çapraz bağlanmasıyla polimer içerisinde hapsedilir.

Manyetik nanoparçacıkların üzerine polimerik veya inorganik bir kabuğun ya da nanoparçacığın çöktürülmesi ile hazırlanan parçacıklar ise, koloidal haldeki manyetik nanoparçacıkların yüzeyine polimerin

çöktürülmesi/adsorpsiyonu ile ya da yüzeyde gerçekleştirilen tepkimelerle sarılması ile hazırlanmaktadır. Bu metotta uygun reaktanların seçimi, sıcaklık ve pH' nin ayarlanması ile tek düzgün ve pürüzsüz bir tabaka halinde sarılmış tek dağılımlı küresel kompozitler hazırlanabilmektedir [34,35].

2.4. Enzimler

2.4.1. Enzimlerin genel özellikleri

Enzimler, hücre içerisinde meydana gelen biyokimyasal tepkimeleri hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin kendilerine özgü bazı özellikleri aşağıda özetlenmiştir:

1. Enzimler belirli bir substrat veya substrat grubuna etki ederek bunları ürüne dönüştürürler. Yani belirli substratlara karşı özgüllük (spesifiklik) gösterirler.
2. Enzimler, kimyasal katalizörlerden onbinlerce kat daha yüksek bir hızla biyokimyasal tepkimeleri katalizlerler.
3. Enzimlerin katalizlediği tepkimelerde yan ürün meydana gelmez ve substratın tamamı ürüne dönüştürülür. Fakat kimyasal tepkimelerde yan ürün meydana gelir.
4. Enzimler, ortam koşulları belirli bir pH, iyonik şiddet, sıcaklık ve basınç sınırları içerisinde olduğunda etkinlik gösterebilir. Bu şartların dışına çıkıldığında, enzimin etkinliği azalır ya da ortadan kalkar.
5. Enzimler, substratlara göre binlerce kat daha büyük moleküllerdir. Enzimin asıl tepkimeyi yürüten kısmı, yani aktif merkezi oldukça küçük bir bölgedir. Bu bölgede, substratın enzime bağlanmasıyla tepkime gerçekleşir [47,48].

2.4.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzimler genellikle diğer bileşiklerden ayırt edilmeleri için, isimlerinin sonuna "az" eki getirilerek adlandırılmaktadırlar. Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB)

bünyesindeki Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC), 1961' de yayımladığı raporda, enzimlerin katalizledikleri tepkimelere göre sınıflandırılmaları için bir numara dizgesi oluşturmuştur. Bu numaralandırma sistemine göre, her bir enzim, enzim kodu (EC) kısaltmasıyla başlayan ve sırasıyla 4 sayı içeren bir kod numarasına sahiptir. (Örnek: EC.1.10.3.2). EC kısaltmasından sonra sonraki ilk numara enzimin katalizlediği tepkimenin türüne göre ait olduğu sınıfı gösterir ve bu düzenlemeye göre enzimler, katalizlediği tepkimenin türüne göre aşağıda verilen 6 sınıfa ayrılmışlardır.

1. Oksidoredüktazlar: İndirgenme-yükseltgenme tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.
2. Transferazlar: Fonksiyonel bir grubun aktarımını katalizlerler.
3. Hidrolazlar: C-C, C-O, C-N bağlarını ve diğer bazı kimyasal bağların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.
4. Liyazlar: C-C, C-O, C-N bağlarını ve diğer bazı kimyasal bağları hidroliz ve oksidasyondan farklı yollarla kırarak, bu atomlar arasına çift bağ ilavesini katalizlerler.
5. İzomerazlar: Bir molekül içerisindeki geometrik ve yapısal değişim tepkimelerini (izomerleşme tepkimelerini) katalizlerler.
6. Ligazlar (Sentetazlar): Daha büyük bir molekül oluşturmak için genellikle ATP' deki ya da diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolizleyerek C-C, C-S, C-N arasında bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir.

Enzim kod numarasındaki ikinci ve üçüncü sayılar, sırasıyla tepkimenin tipi ve üzerinden gerçekleştiği fonksiyonel grup ve 4. sayı ise substratın özellikleri ile ilgilidir [9,47,48].

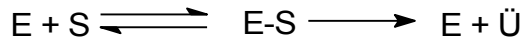
2.4.3. Enzim katalizli tepkimeler

Bütün kimyasal tepkimelerin gerçekleşebilmesi için, tepkimeye giren atom ya da moleküller, "aktifleşme enerjisi" olarak tanımlanan enerji engelini aşabilecek büyüklükte bir enerjiye sahip olmalıdırlar. Kimyasal tepkimelerin

hızı, birim zaman içerisinde aktifleşme enerjisini aşarak tepkimeye giren ve ürüne dönüştürülen moleküllerin sayısına bağlıdır. Aktifleşme enerjisi ne kadar yüksek olursa, bu engeli aşan moleküllerin sayısı o oranda az olacağı için, tepkime düşük hızla ilerler. Tepkimenin hızı, tepkimenin daha düşük enerjili mekanizmalar üzerinden yürümesini sağlayan katalizör maddelerin ortama eklenmesiyle artırılabilir. Biyokimyasal tepkimelerde ise, tepkime hızı enzimler tarafından artırılır.

Enzimin substratla etkileşimi, enzim molekülünün belirli bir bölgesindeki bazı amino asitlerin oluşturduğu ve “aktif merkez” olarak adlandırılan kısımda meydana gelmektedir. Substrat, enzimin aktif merkezine hidrojen bağları, iyonik ve/veya kovalent bağ ile bağlanmaktadır.

Enzim katalizli bir tepkime aşağıda gösterildiği gibidir:



Enzimin (E), substratla (S) tepkimeye girmesiyle, “E-S” ile gösterilen ve “enzim-substrat kompleksi” olarak tanımlanan kararsız bir bileşik oluşur. Enzimin aktif merkezinin substrat moleküllerine çok uygun bir geometride olması, E-S kompleksinin oluşumunu kolaylaştırarak, tepkimenin serbest enerji değişiminin (ΔG°), enzim katalizli olmayan tepkimenin ΔG° değerine göre küçülmesini ve böylelikle, tepkime hızının 10^{10} mertebesine varan bir hız artışıyla tepkimenin katalizlenmesini sağlar. Bunun sonucunda, substrat enzim tarafından ürüne dönüştürülür [47,48].

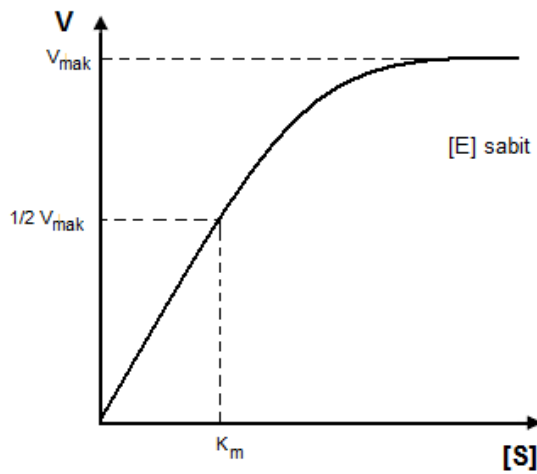
2.4.4. Enzim aktifliği ve enzim aktifliğine etki eden faktörler

Biyolojik sistemlerde çok az miktarlarda bulunan enzimlerin, buldukları ortamdaki miktarlarından çok, gösterdikleri katalitik aktiflik ölçülür. Enzimlerle yapılan çalışmalarda, enzim aktifliği en çok “ünite” (U) cinsinden verilmektedir

ve 1 ünite enzim aktivitesi, belirli şartlar altında 1 dakikada 1 μmol substratı katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanır.

Enzim katalizli tepkimelerin hızı, diğer bir ifade ile enzimin aktifliği; enzim derişimi, substrat derişimi, ortamın pH ve sıcaklığı ve zamana bağılı olarak değişim gösterir. Aşağıda, bu etkilerin enzimatik tepkime hızında meydana getirdiği değişmeler kısaca özetlenmiştir:

1. Enzim derişimi: Enzimatik tepkimenin hızı, substratın bol olduğu koşullarda, enzim derişimi arttıkça artar. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar çok ise, tepkime o kadar hızlı yürür.
2. Substrat derişimi: Enzimatik tepkime hızı (V), Şekil 2.4' te gösterildiği gibi, enzim derişimi sabitken, substrat derişiminin ($[S]$) artmasıyla belli bir süre doğrusal olarak artar. Bir süre sonra, enzim substratıyla doygun hale geldiğinde ise, tepkime sabit hızda ilerlemeye devam eder. Bu durumda enzim, tepkimeyi maksimum hızla katalizler. Maksimum hız, V_{mak} ile gösterilir. V_{mak} değerinin yarısına karşılık gelen substrat derişimi ise "Michaelis-Menten sabiti" olarak tanımlanır ve K_m ile gösterillir.



Şekil 2.4. Enzimatik tepkimenin hızına substrat derişiminin etkisi

3. Ortamın pH değeri: Enzimlerin substratı katalizlemeleri sırasında gösterdikleri aktiflik, ortamın hidrojen iyonu derişimine bağlı olarak değişir. Bazı enzimler, dűřük pH' larda daha aktifken, bazıları ise yűksek pH' larda aktiftir. Enzim aktifliğinin maksimum olduğu pH değerine, "optimum pH" adı verilir. Enzimlerle yapılan çalışmalarda ortamın pH değerini sabit tutmak için tampon özeltiiler kullanılır. Enzimin optimum pH değerine, kullanılan tampon çözeltiye, substrata ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlı olarak değişim gösterebilir.
4. Ortam sıcaklığı: Sıcaklığın artması, diğer tepkimelerde olduğu gibi enzimatik tepkimelerin de hızını artırır. Enzimatik tepkime hızı, her enzim için karakteristik olan, enzimin maksimum aktiflik gösterdiği sıcaklığa kadar, yani "optimum sıcaklık" değerine kadar artar. Fakat, optimum sıcaklık üzerindeki sıcaklıklarda, enzimi oluşturan protein zincirlerinin tersiyer yapısını yitirmeye başlaması nedeniyle enzim aktifliği azalır ve enzim denatűre olur.
5. Zaman: Enzimatik tepkime sűresince, tepkimenin hızı giderek azalır. Bu azalma, űrűn deriřiminin giderek artması ile, űrűnlerin birleřerek ters yűnde bir tepkime oluřturmaları, tepkimeyi inhibe eden maddelerin oluřması, enzimin zamanla deaktive olması ve substratın tűkenmesi olabilir. Bu etkilerin ortadan kaldırılması için, enzimlerle yapılan çalıřmalar, tepkimenin bařlangıcında yűrűtűlűr [9,47,49].

2.5. Enzim İmmobilizasyonu

2.5.1. Enzim immobilizasyonunun tanımı ve űnemi

Enzimler, substratlarını űrűne dűnűřtűrdűkten sonra, bir deđiřime uđramaksızın ilk hallerine geri dűnerek, tepkime ortamında bulunan substratı űrűne çevirmeye devam ederler. Bu nedenle aynı enzim, yeraldıđı tepkimenin katalizinde bir kereden fazla kullanılabilir. Fakat enzimin, substratı

ya da oluşturduğu ürünler ile birlikte bir çözelti içerisinde bulunması, tepkime ortamından istenilen anda uzaklaştırılmasını ve tepkimenin kontrolünü zorlaştırmaktadır. Bu durumun ortadan kaldırılması amacıyla, enzimler bir katıya tutturularak, yani immobilize edilerek kullanılabilirler. Böylelikle, enzimler tepkime ortamından kolayca ayrılarak ve endüstriyel ve analitik uygulamalarda tekrar tekrar kullanılabilir hale getirilirler. Enzim immobilizasyonu, enzimlerin katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar tekrar ve sürekli kullanılmalarını sağlamak amacıyla, bir destek materyale fiziksel veya kimyasal yöntemlerle tutturulmasıdır. Enzimler suda çözünmeyen bir destek materyale adsorpsiyonla ya da kovalent bağ ile tutturulduklarında, katalitik etkinliklerini yitirmeden bi- ya da multi- fonksiyonel çapraz bağlayıcılarla birbirlerine bağlandıklarında ya da suda çözünmeyen bir polimerik matriks ya da yarı geçirgen bir membran içerisine hapsedildiklerinde immobilize olurlar. Immobilize enzimler, serbest enzimlere göre ortam şartlarındaki değişmelere daha dayanıklı olabilme ve uzun süre aktifliklerini koruyabilme gibi avantajlara sahiptirler. Bunların yanı sıra, immobilize enzimlerin yer aldığı prosesler, yüksek saflıkta ürün elde edilebilmesine ve işlemlerin hızlı bir şekilde yürütülmesine imkan verirler [9,10,50].

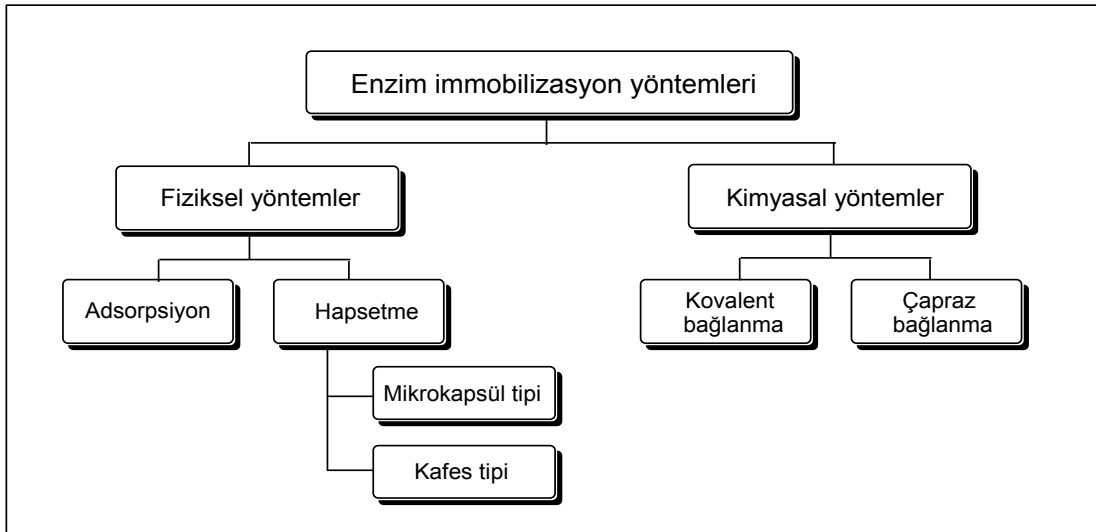
2.5.2. Enzim immobilizasyonunda destek materyalin seçimi

Enzim immobilize edileceği destek materyalin seçilmesinde, kullanılması planlanan malzemenin parçacık büyüklüğü, yüzey alanı, desteğin kimyasal bileşimi ve içerdiği fonksiyonel gruplar göz önünde bulundurulur. Destek materyalin yüksek bir tutuklama kapasitesinin olması, hidrofilik olması, suda çözünmemesi, belirli bir mekanik dayanıklılığa, kimyasal ve ısı kararlılığına sahip olması ve mikrobiyal bozunmalara karşı dirençli olması gerekir. Enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan destekler materyaller, hidrofilik yapılı doğal polisakkaritler (agaroz, dekstran, selüloz, kitin, kitosan v.b), sentetik polimerler (poliakrilamid, polistiren ve naylon v.b) ve inorganik maddeler (kil, cam, metal oksitler v.b) olabilir [10]. Bu maddeler arasında polimerler, fonksiyonel gruplara sahip olmaları, kimyasal olarak modifiye

edilebilmeleri, mikroorganizmalar ve kimyasallardan kaynaklanan bozulmalara karşı dirençli olabilmeleri ve adsorpsiyon yapabilen ya da çapraz bağlanabilen gruplar içermeleri nedeniyle, destek materyal olarak tercih edilmektedirler [9,51].

2.5.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri

İmmobilizasyon sırasında enzim aktifliğinin korunması oldukça önemlidir. Uygulanmak istenen immobilizasyon yöntemi enzim aktifliğinin kaybına neden olmamalıdır. Ayrıca, enzimin denatürasyonunu engellemek için, enzim immobilizasyonu ılıman koşullarda gerçekleştirilmeli ve ekonomik olmalıdır [9]. Enzim immobilizasyon yöntemleri, Şekil 2.5' te gösterildiği gibi, fiziksel ve kimyasal yöntemler olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir.



Şekil 2.5. Enzim immobilizasyon yöntemleri

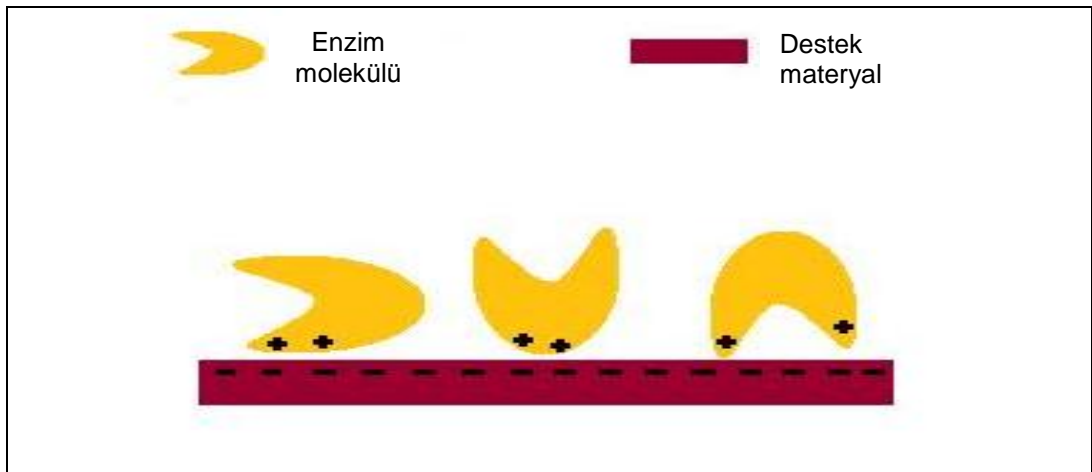
Fiziksel immobilizasyon yöntemleri, adsorpsiyon ve hapsetme yöntemleri olarak ikiye ayrılır. Hapsetme yöntemi ile enzim immobilizasyonu, enzimin bir mikrokapsül ya da polimerik kafes içerisinde tutuklanması ile gerçekleştirilebilir. Kimyasal yöntemlerle enzim immobilizasyonu ise, enzimin destek materyale kovalent bağlanması ya da enzimlerin birbirlerine çapraz bağlanması ile yapılabilir.

Fiziksel yöntemler

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

Adsorpsiyon

Adsorpsiyon yöntemi, enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve basit yöntemlerden biridir. Bu yöntemde enzimler, destek materyale (adsorplayıcıya) van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağı etkileşimleri gibi elektrostatik etkileşimler sonucunda immobilize olurlar (Şekil 2.6).



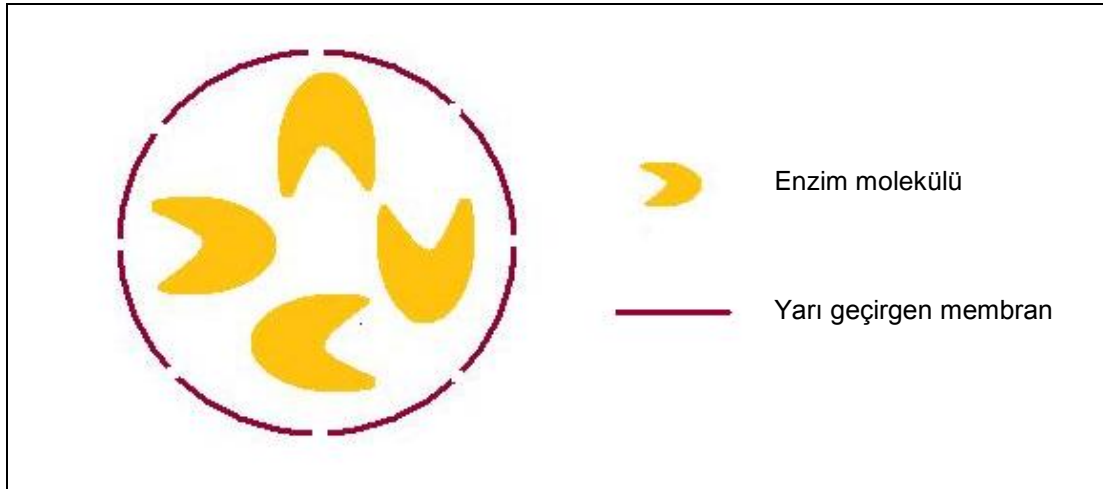
Şekil 2.6. Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu

Adsorpsiyonla enzim immobilizasyonu, enzim çözeltisi ile adsorplayıcı katının uygun şartlar altında karıştırılması ve adsorpsiyon sonrasında, tutuklanmayan enzimin yıkanarak uzaklaştırılması ile gerçekleştirilir. Adsorplanan enzim miktarı, ortamın pH değerine, sıcaklığına, iyonik şiddetine, enzim derişimine, adsorplayıcının miktarına bağlıdır. Bu yöntemin tersinir olması, enzimin ve adsorplayıcının geri kazanılabilmesine imkan vermektedir. Enzimler bu yöntemle immobilize edildiklerinde, aktifliklerini büyük ölçüde korumaktadırlar. Fakat, adsorplayıcı tarafından zayıf etkileşim kuvvetleri ile

tutulan enzimin kullanılması sırasında adsorplayıcıdan uzaklaşması, yöntemin bir dezavantajı olabilir [52]. Adsorpsiyonla enzim immobilizasyonunda, farklı fiziksel şekillerde olabilen ve çeşitli yüklü gruplara sahip adsorplayıcılar kullanılabilir. En çok kullanılanlardan bazıları, anyon ve katyon değiştiricili reçineler, aktif karbon, silika jel, alumina ve killer' dir [9,51,53].

Hapsetme

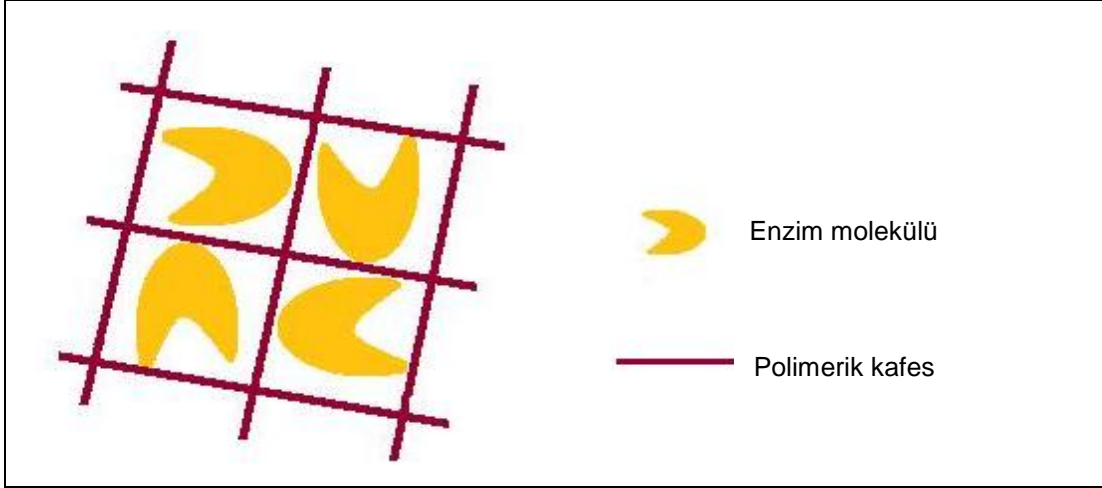
Hapsetme yöntemi ile immobilizasyon, enzimin polimerik bir matriks ya da yarı geçirgen bir membran içerisinde tutuklanmasına dayanır. Mikrokapsül içerisinde hapsetmede, enzim molekülleri 10-100 µm çapında olabilen yarı geçirgen membranlar içerisinde hapsedilir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Mikrokapsül içerisinde hapsetme ile enzim immobilizasyonu

Bu amaçla, naylon ve selüloz nitrattan hazırlanan mikrokapsüller kullanılmıştır [52]. Yarı geçirgen membran, substrata göre defalarca kat büyük olan enzim moleküllerinin mikrokapsül dışına çıkmalarına engel olurken, küçük substrat ve ürün moleküllerinin serbestçe giriş-çıkışına izin verir. Mikrokapsül içerisinde hapsetme yöntemi, fiziksel bir immobilizasyon metodu olduğundan, enzim aktifliği serbest enzimin aktifliğine çok yakındır.

Kafes tipi hapsetme yönteminde enzim, suda çözünmeyen çapraz bağlı polimerlerin boşlukları içinde tutuklanır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Kafes tipi hapsetme ile enzim immobilizasyonu

Bu amaçla, monomer/polimer içeren çözelti enzim çözeltisi ile karıştırılır. Monomerin polimerleştirilmesinin ardından, polimerin çapraz bağlanmasıyla oluşturulan yüksek oranda çapraz bağlanmış polimer ağı içerisine enzim molekülleri hapsedilir. Substrat ve ürün bu polimer ağı içerisine sürekli olarak girip çıkabilir [51,52,54]

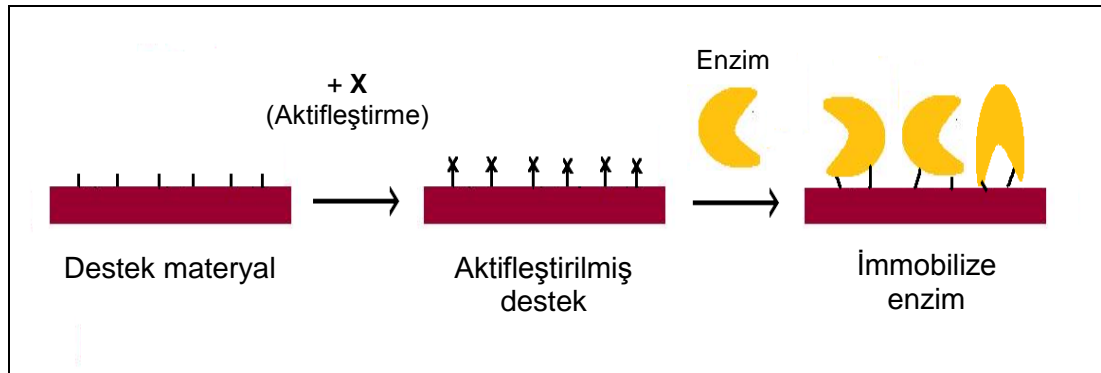
Kimyasal yöntemler

Kimyasal immobilizasyon yöntemleri, enzim ile destek materyal arasında kovalent bağ oluşumuna ya da birden fazla enzim molekülünün çapraz bağlayıcı moleküllerle birbirlerine bağlanmasına dayalıdır. Bu yöntemlerin çoğunlukla tersinmez olması nedeniyle, serbest enzimin geri kazanılması mümkün olamamaktadır [52,54]. Bu yöntemlerle immobilize edilen enzimler, çok kararlı olma ve ortam koşullarına dayanıklılık gösterme gibi üstün özelliklere sahip olabilmektedir. Bunun yanı sıra, immobilizasyon sırasında meydana gelen kimyasal tepkimeler, enzimde yapısal değişikliklere neden olarak katalitik özelliğinde değişmelere yol açabilir. Immobilizasyon veriminin

sınırlı olması, destek materyalin ve yöntemin maliyetli olabilmesi ve enzimin desteğe bağlanma tepkimesinin özel şartlar gerektirmesi yöntemin bazı dezavantajları arasındadır [11,51,54].

Kovalent bağlanma

Kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonu, enzimin aminoasit kalıntılarındaki reaktif gruplar ile destek materyaldeki reaktif grupların tepkimesi sonucunda gerçekleşir [52]. Enzimin destek materyale kovalent bağlanması için, seçilen destek materyalin, enzimle tepkime verebilecek reaktif gruplara sahip olması gerekir. Eğer destek materyalde enzimin bağlanabileceği reaktif gruplar bulunmuyor ise, destek materyaldeki mevcut fonksiyonel gruplar (amin, karboksil, hidroksil, epoksi gibi), glutaraldehit, karbodiimit, siyanürik klorür gibi uygun aktifleştirici maddelerle aktifleştirilir. Daha sonra enzim, aktifleştirilmiş bu destek materyale kovalent bağ ile bağlanır [10]. Şekil 2.9' da destek materyalin aktifleştirilmesi ve enzimin kovalent bağlanma ile immobilizasyonu şematik olarak gösterilmiştir.

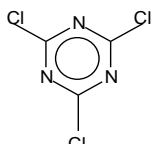
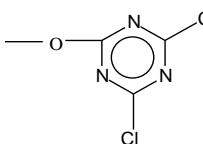
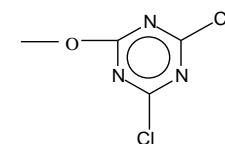
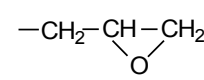
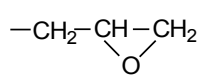


Şekil. 2.9. Kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonu

Destek materyalin içerdiği bazı fonksiyonel gruplara göre, aktifleştirmede kullanılabilecek bazı reaktifler, aktifleşme sonucunda oluşan reaktif gruplar, enzimin desteğe hangi grup üzerinden kovalent bağlanabileceği ve bağlanma türü Çizelge 2.2' de gösterilmiştir.

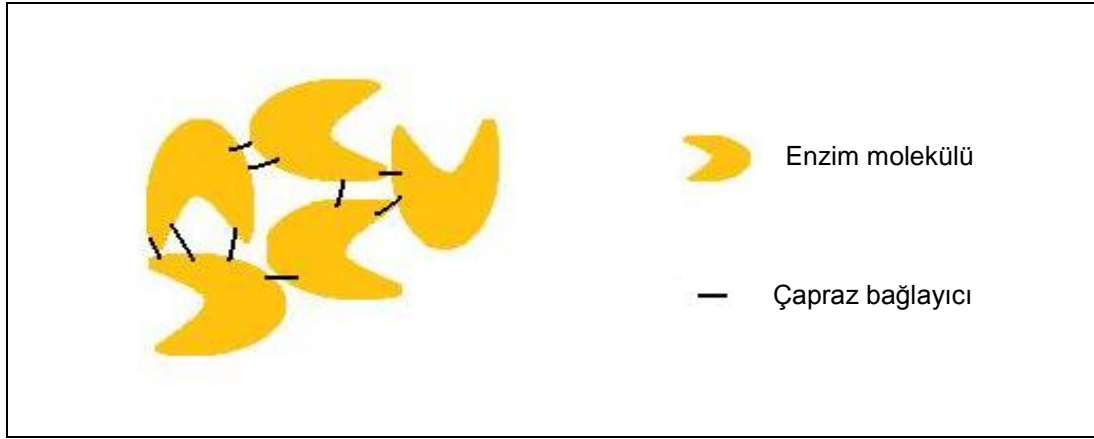
Kovalent bağlanma enzimin çözeltiliye geçmesini engeller ve enzimin kararlılığını sağlar. Ayrıca, enzim molekölü destek materyalin üzerinde yer aldığı için, substratla kolayca temas edebilir. Kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş enzimin aktifliği, serbest enzimin aktifliğinden farklı olabilir. Bu fark, destek materyalin yapısal özelliklerine, enzim-destek materyal arasındaki etkileşimlere, enzimin yapısına ve enzim-substrat arasındaki tepkime şartlarına bağlıdır [51-54].

Çizelge 2.2. Destek materyalin içerdiği bazı fonksiyonel gruplara göre aktifleştirilebileceği reaktifler, aktifleşme ile oluşan reaktif gruplar, enzimin desteğe kopvalent bağlanabileceği gruplar ve bağlanma tipi

Destek materyaldeki grup	Aktifleştirici	Aktifleşmiş yapı	Destek materyalde oluşan reaktif grup	Enzimin reaktif grubu	Bağlanma tipi
-NH ₂	HOC(CH ₂) ₃ CHO (Glutaraldehit)	-N=CH(CH ₂) ₃ CHO	-CHO	-NH ₂	Schiff bazı
-COOH (-CH ₂ OH) (-OH)	R-N=C=N-R', H ⁺ (Karbodiimit)	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{---COO---C} \\ \\ \text{NH}^+ \\ \\ \text{R}' \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{---COO---C} \\ \\ \text{NH}^+ \\ \\ \text{R}' \end{array}$	-NH ₂	Peptit bağı
-OH	 (Siyanürik klorür)			-NH ₂	Alkilasyon
	-	-		-NH ₂ , -OH, -SH	Alkilasyon

Çapraz bağlanma

Çapraz bağlanma ile enzim immobilizasyonu, destek materyal kullanılmadan, enzim moleküllerinin büyük ve üç boyutlu kompleks bir yapı halinde bir araya getirilmesi ile gerçekleştirilir. Bu amaçla, glutaraldehit ve toluen diizosiyanat gibi bi- veya multi- fonksiyonel moleküller kullanılır. Bu moleküller, enzim moleküllerini birbirine bağlayarak, çapraz bağlı ve suda çözünmeyen enzim kompleksleri oluştururlar (Şekil 2.10) [52].



Şekil 2.10. Çapraz bağlanma ile enzim immobilizasyonu

2.6. Adsorpsiyon

2.6.1. Adsorpsiyonun tanımı ve adsorpsiyon ile ilgili genel bilgiler

Adsorpsiyon, iyon ya da moleküllerin bir katı yüzeyinde tutunması olarak tanımlanır. Adsorplama işlemi yapan katıya adsorplayıcı, katı yüzeyine tutunan iyon ya da moleküllere adsoplanan, tutunan taneciklerin yüzeyden ayrılmasına ise desorpsiyon adı verilir. Adsorplanan moleküllerin adsorplayıcı tarafından zayıf ya da kuvvetli bir şekilde tutunmasına göre, adsorpsiyon fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon olmak üzere iki yolla gerçekleşir. Fiziksel adsorpsiyon sırasında atom, molekül ya da iyonlar ile adsorplayıcı yüzeyi arasında uzun mesafeli ve zayıf van der Waals çekim kuvvetleri etkindir [56].

Fiziksel adsorpsiyonlar, adsorpsiyon entalpisi (ΔH°) yaklaşık 8-40 kJ/mol civarında olan etkileşmeler sonucunda gerçekleşir. Kimyasal adsorpsiyonlar ise, adsorplanan ile adsorplayıcı yüzey arasında bir kimyasal bağ ve genellikle kovalent bağlanma ile meydana gelir ve bu tür adsorpsiyonların ΔH° değeri yaklaşık 60 kJ/mol' ün üzerindedir [57].

2.6.2. Adsorpsiyon yöntemiyle renk giderme

Adsorpsiyon yöntemi ile renk giderme, endüstriyel atık sular içerisinde fazlaca renk bırakan boyarmaddelerin ve kirleticilerin giderilmesinde çokça kullanılan, ekonomik ve çevre dostu bir tekniktir. Özellikle atık suyun fazlaca olduğu bir endüstri alanı olan tekstil endüstrisinin atık suları, tekstil boyama işlemlerinde kullanılan bir çok organik ya da inorganik kimyasalı ve boyarmaddeyi içerir. Bu atık sulardaki, boyarmaddeler yeterince uzaklaştırılmadan doğaya salındığında, çevre kirliliğine yol açmaktadırlar. Ayrıca, atık su içerisindeki bu kirleticiler, suyun ışık geçirgenliğini azaltarak, fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkilemeleri sonucunda, besin zincirinde kırılmalara sebep olabilmektedirler [58,59].

Boyarmaddelerin sulu ortamdan adsorpsiyonla uzaklaştırılmaları, kesikli ya da sürekli adsorpsiyon yöntemleri ile gerçekleştirilebilir. Sürekli adsorpsiyon yönteminde boyarmadde, içerisinde adsorplayıcı katı bulunan bir kolon ya da reaktör sistemi içerisinde uygun koşullar altında, sürekli geçirilerek, adsorbe edilir. Kesikli adsorpsiyon yönteminde ise adsorpsiyon, içerisinde belirli hacimde boyarmadde çözeltisi ve adsorplayıcı bulunan bir reaktörde belirli bir sıcaklık, pH ve çalkalama hızında gerçekleştirilir. Adsorpsiyon işlemi başlatıldıktan belirli süre sonra, çözeltide adsorplanmadan kalan boyarmaddenin absorbansı, spektrofotometre ile boyarmaddenin maksimum absorbans dalga boyunda ölçülür. Boyarmadde çözeltisinin absorbansının derişimiyle doğrusal olarak değiştiği bölgede oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla, çözeltide adsorplanmadan kalan boyarmaddenin derişimi belirlenir. Kesikli adsorpsiyon yöntemi, küçük veya orta çaptaki uygulamaların

yürütülebilmesi, kolaylıkla bulunabilen reaktör ve gereçlerin kullanılması nedeniyle maliyetinin düşük olması ve kontrol edilme kolaylığının olması avantajlarına sahiptir. Bu yöntemin diğer bir avantajı ise, boyarmadde derişimi, pH, iyonik şiddet, sıcaklık gibi çözeltilerin parametrelerin kontrol edilebilmesi ya da ayarlanabilmesidir [60].

2.6.3. Adsorpsiyona etki eden faktörler

Adsorpsiyonla uzaklaştırılan boyarmaddenin miktarı, adsorplayıcı ve adsorplananın özelliklerine, ve ortam şartlarına bağlı olarak (pH, sıcaklık, iyonik şiddet gibi) değişebilmektedir. Aşağıda, bu faktörlerin adsorpsiyona etkisi kısaca açıklanmıştır:

1. Adsorplayıcının özellikleri: Adsorplayıcının yüzey alanı, parçacık boyutu, gözenekliliği, yüzeyindeki fonksiyonel gruplar gibi bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri, adsorpsiyonu etkiler. Adsorplayıcının yüzey alanı arttıkça, adsorplanan molekülleri ile etkileşime alanı artacağından, uygun koşullar altında adsorpsiyon artar. Bu nedenle, adsorplayıcının geniş bir yüzey alanına sahip olması, arandığı bir özelliğidir. Boyarmaddelerin sulu ortamdan uzaklaştırılması amacıyla şimdiye kadar yaygın olarak kullanılan adsorplayıcılardan bazıları silika, doğal killer, zeolitler ve aktif karbon' dur [22]. Fakat, daha ucuz, kolay rejenere edilebilen ve adsorpsiyon kapasitesi yüksek adsorplayıcıların kullanılmasına yönelik araştırmalar devam etmektedir.
2. Adsorplananın özellikleri: Adsorplanan moleküllerin derişimi, çözünürlüğü, molekül büyüklüğü, içerdiği fonksiyonel ve yüklü gruplar, adsorpsiyonunu etkiler.
3. Temas süresi: Genel olarak adsorplanan moleküllerin miktarı, adsorplayıcı ve adsorplananın temas etme süresinin artmasıyla artar. Adsorpsiyon dengesi kurulduktan sonra ise, adsorplanan boyarmadde miktarı değişmez.

4. Ortam pH'sı: Adsorpsiyon ortamının pH'sı, boyarmaddenin iyonlaşmasını ve dolayısıyla çözünürlüğünü etkiler. Ayrıca, ortamdaki H^+ ve OH^- derişimine bağlı olarak, adsorplayıcı yüzeyindeki fonksiyonel grupların ya da adsorplanan moleküllerinin tutunduğu bölgelerin iyonlaşması etkilenir ve adsorplanan boyarmadde miktarı değişir [60].
5. Sıcaklık: Bir çok kimyasal tepkimenin hızının sıcaklıkla arttığı bilinmektedir. Adsorpsiyon olayının doğasına bağlı olarak, sıcaklığın artması ya da azalması adsorpsiyon hızını etkiler. Genellikle, kirleticilerin adsorpsiyonunun yüksek sıcaklıklarda adsorplayıcıya daha hızlı difüzenmeleri nedeniyle artığı belirtilmektedir [60,61].
6. Tuz derişimi: Ortama tuzların ya da yüzey aktif maddelerin eklenmesi, boyarmaddenin adsorpsiyonunu hızlandırıcı ya da yavaşlatıcı etki gösterebilir. Tuzlar genellikle iki şekilde etki gösterebilirler. Birincisi, adsorplayıcı ve boyarmadde molekülleri arasındaki karşıt yüklerin etkileşimini azaltarak adsorpsiyonu azaltabilirler. Diğeri ise, boyarmadde moleküllerinin ayrışmasını hızlandırarak adsorplanan kirletici miktarını artırabilirler [60].

2.6.4. Adsorpsiyon izotermi

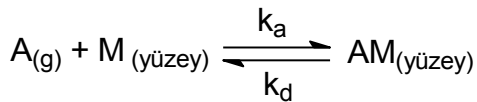
Çözeltiden gerçekte adsorpsiyonlar sırasında adsorplanan madde miktarı, adsorplayıcı, sıcaklık ve diğer faktörler (pH, tuz derişimi gibi) sabit tutulduğunda, adsorplanan maddenin derişimine bağlıdır. Bu durumda adsorplanan madde miktarının derişimle değişimini veren çizgilere adsorpsiyon izotermi denir. Denel yoldan belirlenen adsorpsiyon izotermelerini ve diğer adsorpsiyon verilerini değerlendirebilmek için çok sayıda denklem türetilmiştir ve adsorplanan ve adsorplayıcı maddenin özelliklerine göre, bu denklemlerden biri ya da bir kaçı daha adsorpsiyon için uygun olmaktadır [56]. Boyarmadde adsorpsiyonunun incelenmesinde, en yaygın olarak kullanılan

iki adsorpsiyon izotermi, Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermidir. Aşağıda, bu adsorpsiyon izotermi kısıca açıklanmıştır.

Langmuir adsorpsiyon izotermi

Yüzey kimyası alanındaki çalışmalarından dolayı 1932 yılı Nobel Kimya Ödülü sahibi Amerikalı bilim adamı Irving Langmuir tarafından 1916 yılında kimyasal adsorpsiyon için çok basit bir izoterm denklemleri türetilmiştir. Bu denklem, tek tabakalı fiziksel adsorpsiyon ve çözüldüden adsorpsiyon için de geçerlidir [56]. Ayrıca, bu adsorpsiyon izotermi, adsorplayıcı üzerinde adsorpsiyonun gerçekleştiği bütün bölgelerin eşdeğer ve enerjik olarak birbirine eşit olduğu ve adsorplayıcının adsorplanana karşı belirli bir adsorpsiyon kapasitesi olduğu temellerine dayanır [60].

A, adsorplanan molekülleri, M yüzeyi, k_a adsorpsiyon hız sabitini ve k_d desorpsiyon hız sabitini göstermek üzere, adsorpsiyon ve desorpsiyon dengesi aşağıda gösterildiği gibidir [62]:



Adsorplayıcı yüzeyinin adsorplanan molekülleri ile kaplanan kesri θ ile gösterildiğinde, adsorplayıcı yüzeyinin adsorplanan moleküllerle kaplanma hızı, yüzeyin kaplanmamış kesri $(1-\theta)$ ve çözeltinin dengedeki derişimi (C_e) ile orantılıdır ve aşağıda gösterildiği gibidir:

$$\text{Adsorpsiyon hızı} = d\theta / dt = k_a C_e (1-\theta) \quad (2.4)$$

Desorpsiyon nedeniyle, yüzeyin kaplanma hızının değişimi ise şöyledir:

$$\text{Desorpsiyon hızı} = d\theta / dt = k_d \theta \quad (2.5)$$

Adsorpsiyon dinamik dengede iken, adsorpsiyon hızı, desorpsiyon hızına eşit olacağından,

$$k_a C_e (1-\theta) = k_d \theta \quad (2.6)$$

yazılabilir. Bu eşitliğin düzenlenmesi ile,

$$k_a/k_d = \theta / (C_e - C_e\theta) \quad (2.7)$$

yazılabilir. Adsorpsiyonun denge sabiti K , k_a/k_d 'ye eşittir. Eş. 2.7' de k_a/k_d yerine, K yazılarak düzenlenirse,

$$\theta = K C_e / 1 + K C_e \quad (2.8)$$

ifadesi elde edilir.

Dengede adsorplayıcının birim kütlesi başına adsorplanan miktarı, q_e ile maksimum adsorpsiyon kapasitesi (q_{mak}) ve yüzeyin kaplanan kesri arasında,

$$q_e = q_{mak} \theta \quad (2.9)$$

bağıntısı vardır. Bu ifadede θ , Eş. 2.8' de yerine yazılırsa, aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$C_e/q_e = 1/K q_{mak} + C_e/q_{mak} \quad (2.10)$$

Eş. 2.10, Langmuir eşitliği olarak bilinir. Bu eşitliğe göre, C_e 'ye karşı C_e/q_e grafiğe geçirildiğinde, elde edilen doğrunun eğimi, $1/Kq_{mak}$ ve y eksenini kayması $1/q_{mak}$ değerine eşittir [56,63].

Langmuir adsorpsiyon izoterminin karakteristik özellikleri ile bilgiler, birimsiz bir nicelik olan ve “ayırma faktörü” ya da “denge parametresi” olarak tanımlanan R_L değerinin, aşağıdaki bağıntı ile hesaplanması ile elde edilebilir.

$$R_L = 1/(1+K_L C_0) \quad (2.11)$$

Burada K_L , Langmuir sabitini ve C_0 adsorplananın başlangıç derişimini göstermektedir. R_L değeri, adsorpsiyon izoterminin şekli hakkında bilgi verir ve $R_L = 0$ olması adsorpsiyon izoterminin tersinmez, $0 < R_L < 1$ olması uygun ve $R_L = 1$ olması uygun olmadığını göstermektedir [64,65].

Freundlich adsorpsiyon izotermi

Langmuir denkleminin türetilmesinde düşünülen ideal olarak temiz ve homojen olmayan katı yüzeylerdeki adsorpsiyonlar için Alman Fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich tarafından türetilen Freundlich adsorpsiyon izoterm denklemine göre, dengede adsorplayıcının 1 gramı başına adsorplananın miktarı q_e ve adsorplananın derişimi C_e arasındaki aşağıdaki gibi yazılabilir [56]:

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (2.12)$$

Burada K_F ve n Freundlich sabitleridir. Bu eşitliğin doğal logaritması ya da logaritması alınarak,

$$\ln q_e = \ln K_F + (1/n) \ln C_e \quad (2.13)$$

bağıntısı elde edilir. Bu bağıntıya göre, $\ln C_e$ değerlerine karşı $\ln q_e$ için çizilen doğrunun eğimi, $1/n$ değerine; y eksenini kesim noktası ise $\ln K_F$ değerine eşittir. K_F adsorpsiyon kapasitesi ve n adsorpsiyon kuvveti ile ilişkili olan Freundlich sabitleridir.

2.6.5. Adsorpsiyonunun termodinamiğinin incelenmesi

Adsorpsiyon sırasındaki entalpi değişimi, entropi değişimi, serbest entalpi değişimi ve denge sabiti belirlenerek adsorpsiyon olayı, termodinamik olarak incelenir [56]. Adsorpsiyonun standart serbest enerjisi, ΔG° ; standart entropisi ΔS° , ve standart entalpisi ΔH° , çeşitli sıcaklıklarda elde edilen denge sabiti (K) değerleri kullanılarak hesaplanabilir. ΔG° ve K arasındaki ilişki aşağıda verildiği gibidir:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (2.14)$$

Burada, R, ideal gaz sabitini ($R = 8,314 \text{ J/molK}$) ve T, mutlak sıcaklığı (K) göstermektedir.

ΔG° , ΔH° ve ΔS° arasındaki bağıntı ise aşağıdaki gibidir:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (2.15)$$

Eş. 2.14, Eş. 2.15' e eşitlenerek düzenlenirse,

$$\ln K = \Delta S^\circ / R - \Delta H^\circ / RT \quad (2.16)$$

bağıntısı elde edilir. Bu ifadeye göre, $1/T$ ' ye karşı $\ln K$ değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi, $-\Delta H^\circ / R$ değerine ve y eksenini kesim noktası $\Delta S^\circ / R$ ' ye eşittir. ΔH° ve ΔS° değerleri bu şekilde hesaplandıktan sonra, Eş. 2.15' ten adsorpsiyonun ΔG° değeri hesaplanır.

Sabit sıcaklık ve basınçta adsorpsiyon olayı kendiliğinden gerçekleştiği için ΔG° daima (-) işaretlidir. Genellikle gaz ya da sıvı ortamında daha düzensiz olan tanecikler, bir katı yüzeyine adsorplandıklarında daha düzenli hale geldiklerinden, ΔS° azalır. Eş. 2.16' da ΔG° (-) ve ΔS° (-) olduğunda, eşitliğin sağlanabilmesi için adsorpsiyonun ΔH° değerinin (-) olması gerekir.

Fakat, adsorpsiyon olayı, adsorplayıcının fizikokimyasal özelliklerine ve adsorplanan moleküllerin ya da iyonların özelliklerine bağlı olarak çok farklı şekillerde meydana gelebilen karmaşık bir olay olduğundan, adsorpsiyon istemli olduğu halde ($\Delta G^\circ < 0$), ΔH° ve ΔS° değerlerindeki değişimler her zaman anlatıldığı şekilde gerçekleşmeyebilir.

2.7. Manyetik Destek Materyallere Enzim İmmobilizasyonu ve Boyarmadde Adsorpsiyonunun Önemi

Enzimlerin immobilize edilmelerinin en önemli nedenlerinden biri, tepkime ortamından kolaylıkla ayrılabilmelerini ve tekrar tekrar kullanılabilmelerini sağlamaktır. Endüstriyel uygulamalarda immobilize enzimler, tepkime ortamından süzme, santrifüjleme, çöktürme yöntemleri ile uzaklaştırılırlar. Ayrıma yönteminin seçiminde, immobilize enzimi taşıyan destek materyalin parçacık boyutu ve immobilize enzimin aktifliğinin korunması göz önünde bulundurulur. Ayrıma işleminin basit yöntemlerle hızlı bir şekilde yapılması, işlem maliyetini düşürür ve ayırma süresini kısaltır. Bu doğrultuda enzimler, mıknatısla kolaylıkla toplanabilen ve tepkime ortamında kolayca dağıtılabilen manyetik desteklere immobilize edilebilirler [66]. Manyetik destek materyaller, Fe_3O_4 gibi manyetik bir bileşen içeren polimerik mikroküreler ya da geniş yüzey alanına sahip olan ve yüksek miktarda enzimin immobilize edilmesine imkan veren, yüzeyi bir polimerle kaplanmış ya da çeşitli aktif gruplar kazandırılmış manyetik nanoparçacıklar olabilir [32].

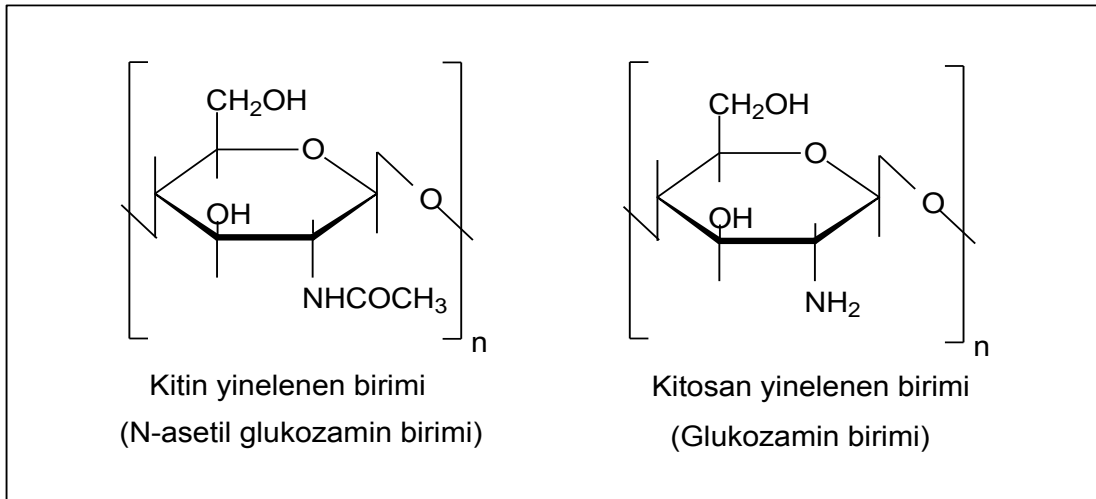
Çevresel kirleticilerin adsorpsiyonla uzaklaştırılması amacıyla kullanılan adsorplayıcılara manyetik özellik kazandırılmasıyla, adsorplanan maddenin ve adsorplayıcının ortamdaki kolaylıkla uzaklaştırılması mümkün hale getirilir. Bu amaçla, boyarmadde adsorpsiyonunda çok kullanılan inorganik ve polimerik yapıları olan düşük maliyetli adsorplayıcılara manyetik özellik kazandırılarak, yeni ve alternatif adsorplayıcılar hazırlanabilir [25].

2.8. Bu Çalışmada Hazırlanan Fe₃O₄-Kitosan Nanoparçacıkları

Bu çalışmada, lakkaz enziminin immobilizasyonunda ve Reaktif Sarı 145 boyarmaddesinin adsorpsiyonunda kullanılmak üzere, yüzeyi kitosanla (CS) fonksiyonelleştirilmiş Fe₃O₄ nanoparçacıkları hazırlanmıştır. Kitosan kaplı Fe₃O₄ nanoparçacıklarının (Fe₃O₄-CS) enzim immobilizasyonu ve boyarmadde adsorpsiyonunda kullanılması ile, bu nanoparçacıkların bir mıknatıs yardımıyla kolaylıkla ayrılabilmesi ve boyutlarının çok küçük olması nedeniyle, yüksek miktarda enzimi tutuklayabilmeleri ve boyarmaddeyi adsorplayabilmeleri amaçlanmıştır.

2.8.1.Kitosan

Kitosan (CS), genellikle böceklerde ve bazı kabuklu deniz canlılarında bulunan doğal bir polimer olan kitinin deasetillenmesiyle elde edilen, glukozamin birimlerinden oluşmuş bir poliaminosakkarittir. Şekil 2.11' de kitinin ve kitosanın yinelenen birimleri gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Kitin ve kitosanın yinelenen birimleri

Kitosanın fiziksel ve kimyasal özellikleri deasetilenme derecesine, molekül ağırlığına ve elde edildiği kitinin özelliklerine bağlı olarak değişir. Kitosan

içerdiği -OH ve -NH₂ grupları nedeniyle, çeşitli aktifleştiricilerle aktifleştirilebilir ve çapraz bağlayıcı moleküllerle çapraz bağlanabilir. Ayrıca kitosanın içerdiği bu fonksiyonel gruplar, kitosana şelatlaşma, kompleks oluşturma ve adsorplama özelliği kazandırır. Kitosan suda çözünmez fakat, pH' sı 6,5' ten düşük olan asetik asit gibi organik asit çözeltilerinde, amin gruplarının protonlanması ile çözünür [60].

Kitosan, gıda, tekstil, tarım, kağıt endüstrisindeki uygulamalarda ve çeşitli biyoteknolojik ve biyokimyasal uygulamalarda kullanılmaktadır [60,67]. Kitosan, hidrofilik oluşu, mikrobiyal bozulmalara karşı dirençliliği ve enzimi elektrostatik adsorpsiyonla tutuklayabilme özelliği nedeniyle, bir çok enzimin immobilizasyonunda mikroküre, film, membran ve parçacık formunda kullanılmıştır [68]. Ayrıca doğada bol bulunan, düşük maliyetli ve yüksek adsorplama kapasitesine sahip bir malzeme olması nedeniyle, sulu ortamdan boyarmaddeler [60] ve ağır metal iyonları gibi çeşitli kirleticilerin adsorpsiyonla uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır [69].

2.9. Fe₃O₄-Kitosan Nanoparçacıkların Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

Bu çalışmada, Fe₃O₄ ve Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının yapısal, yüzeysel ve manyetik özellikleri, geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR), X-ışını kırınımı yöntemi (XRD), termogravimetrik analiz (TGA), ζ(Zeta)-potansiyel analizleri, elektron paramanyetik rezonans spektrometrisi (EPR) ve titreşimli örnek manyetometrisi (VSM) yöntemleriyle analiz edilmiştir. Ayrıca, lakkaz immobilize edilen Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının atomik kompozisyonu, enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS) ile araştırılmıştır. Bu bölümde, her bir karakterizasyon yönteminin temel prensipleri ile ilgili kısa bilgi verilmiştir.

2.9.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)

Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), atomik seviyede görüntü elde etmeye imkan veren ve nanoteknoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılan hassas bir mikroskopik tekniktir. Bu yöntemde yüksek enerjili elektron demeti (100-500 kV), malzemeye gönderilir ve elektronlar malzeme içerisinden geçerek yol alırlar. Malzemededen geçen elektronlar bir mercek sistemini takip ederek malzemenin yapısını gösteren görüntüyü mikroskobun ekranında oluşturur. TEM ile görüntü alabilmek için elektron demetinin mutlaka malzeme içerisinden geçmesi ve bunun için de malzemenin kalınlığının birkaç yüz nanometreyi geçmemesi gereklidir [70].

2.9.2. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR)

FT-IR spektroskopisi, elektromanyetik spektrumun infrared bölgesinde, örnekteki atom gruplarının ve fonksiyonel grupların kendilerine özgü dalga boylarında absorpsiyon yaparak, bir titreşim veya dönme enerji seviyesinden diğerine geçişleri vasıtasıyla belirlenmelerini sağlayan bir yöntemdir [71].

2.9.3. X-ışını kırınımı yöntemi (XRD)

X-ışını kırınımı yöntemi, her bir kristal maddenin kendine özgü olan X-ışını kırınım modeline göre, kristal yapıların analiz edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Tabiatta bulunan metaller genellikle kristal yapıya sahip oldukları için, kristal örgüleri içerisinde simetrik ve periyodik olarak dizilmiş elementlerden oluşmuşlardır ve karakteristik bir kırınım desenine sahiptirler. İncelenen rneğin kırınım desenindeki x-ışını kırılma açılarının, literatürde o kristal yapı için verilen kırınım desenlerindeki kırılma açılarıyla karşılaştırılması ve aynı bulunması yoluyla, örneğin kimyasal yapısı belirlenebilir [71-73]. Ayrıca malzemenin parçacık boyutu, Eş. 2.17' de verilen Debye-Scherrer eşitliği kullanılarak, x-ışını kırınım desenindeki pikler yardımıyla hesaplanabilir [74].

$$d = k\lambda / \beta \cos\theta \quad (2.17)$$

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

2.9.4. Termogravimetrik analiz (TGA)

Termogravimetrik analiz metoduyla, kontrol edilen bir atmosferde, sıcaklığın programlı olarak artırılması ya da azaltılmasıyla maddenin kütlesinde meydana gelen kayıp (değişiklik) sıcaklığın ya da zamanın fonksiyonu olarak incelenir ve sıcaklığa karşı maddenin kütlesinde meydana gelen azalmayı gösteren termogramlardan, maddenin yapısal özellikleri ve içerdiği su miktarı konusunda bilgi edinilebilir [71,75].

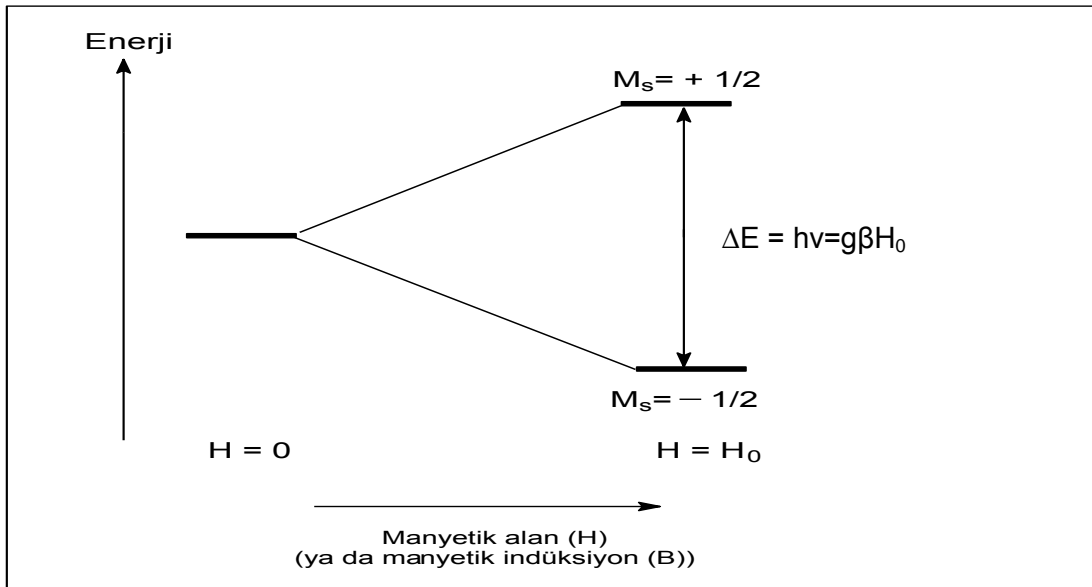
2.9.5. ζ (Zeta) -potansiyel analizleri

ζ -potansiyel, kolloidal çözelti içerisindeki katı taneciklerin yüzeyinin ölçülebilen potansiyel değeridir. Sıvı veya çözelti içerisindeki kolloidal tanecikler, yüzey kompozisyonları nedeniyle bir elektriksel yüke sahiptirler. Bu elektriksel yükten dolayı taneciklerin çevrelerinde, bu yüke zıt yüklü iyonlar birikir ve karşıt yüklü iki iyon tabakası "elektriksel çift tabaka" oluşturur. Taneciğin yüzeyindeki iyon tabakası, yüzeye sıkıca tutunmuş halde iken, bunu çevreleyen zıt yüklü iyon tabakası daha gevşek halde tutunmaktadır. Yüklü tanecik ve etrafını saran iyonlar, "kayma yüzeyi" olarak tanımlanan bir sınıra kadar tek bir parça halinde hareket ederler. Kayma yüzeyindeki potansiyel farkına ζ -potansiyel, kayma yüzeyi üzerindeki net yükün 0 olduğu pH değerine izoelektronik nokta (pI) adı verilmektedir. ζ -potansiyeli, sistem içerisindeki katı taneciğe, bu taneciğin dağıtıldığı ortama ve bu ortamın pH'ına bağlıdır [63,76].

2.9.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR)

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

Serbest elektron, kendi eksenini etrafında dönmelerinden dolayı bir manyetik momente sahiptir ve spin kuantum sayısı $1/2$ ' dir. Yapısında eşleşmemiş elektronlar içeren bir maddeye dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında, bu manyetik alan, maddenin elektronlarının enerji seviyelerinde ΔE ile temsil edilen büyüklükte bir fark meydana getirir [75]. Şekil 2.12' de uygulanan manyetik alanın, elektronların enerji seviyelerinde meydana getirdiği değişme gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Uygulanan manyetik alanın elektronların enerji seviyesinde meydana getirdiği değişme

Elektronun bulunacağı bu iki enerji seviyesi arasındaki fark,

$$\Delta E = g\beta H \quad (2.18)$$

bağıntısı ile verilmektedir. Bu eşitlikte g , her maddeye özgü bir değer olan “spektroskopik yarıлма çarpanı” ve β , elektronun yükünü ve kütesini içeren evrensel bir büyüklük olan ve değeri $9,273 \times 10^{-24}$ J/T olan “Bohr magnetonu”nu, H , ise manyetik alanı göstermektedir. Elektronlar bir de, ΔE enerji farkına eşit olacak şekilde bir mikrodalga enerjisi ile etkileştiğinde, mikrodalga enerjisini Eş. 2.19’ da verilen enerjiye sahip bir ışığa ile soğurur.

$$\Delta E = h\nu \quad (2.19)$$

Bu bağıntıda h , Planck sabitini ($6,63 \times 10^{-34}$ Js) ve ν , mikrodalga frekansını gösterir. Bu ışımının enerjisi, manyetik alan etkisi altındaki elektronun bulunabileceği iki enerji seviyesi arasındaki farka eşit olduğunda, elektronun spin hareketleri manyetik alanla rezonansa gelir ve rezonans koşulu Eş. 2.20 ile sağlanmaktadır.

$$\Delta E = h\nu = g\beta H_0 \quad (2.20)$$

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

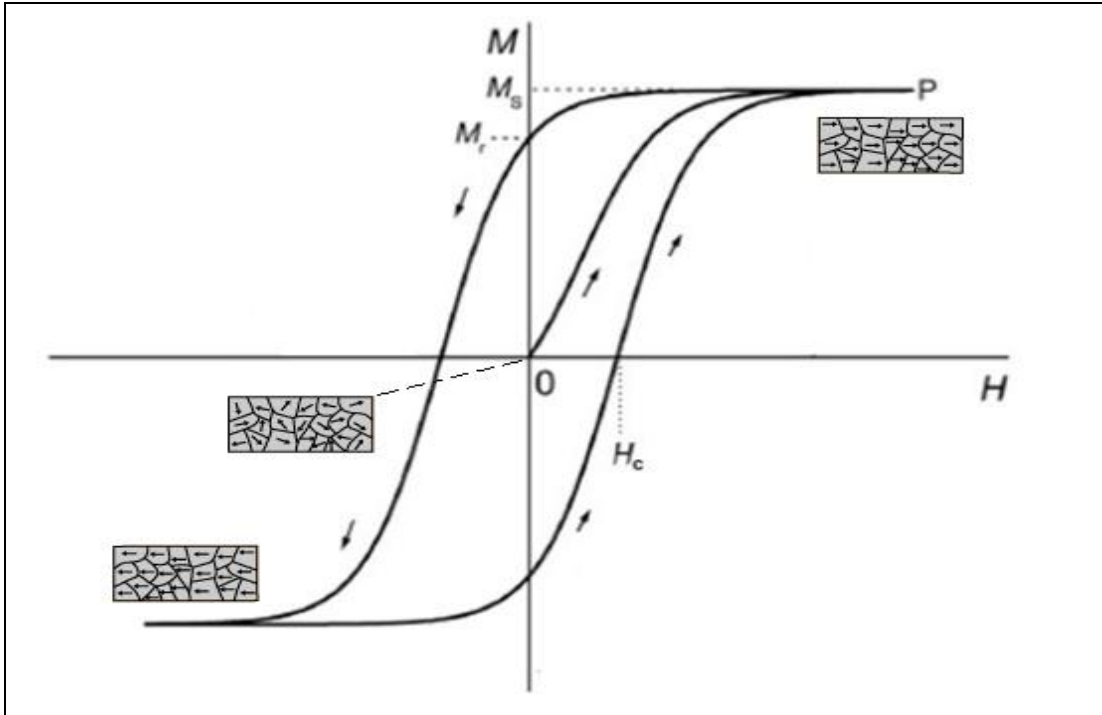
2.9.7. Titreşimli örnek manyetometrisi (VSM)

İlk kez Foner tarafından geliştirilen titreşimli örnek manyetometresi (VSM), bir malzemenin mıknatıslanmasının ölçülmesini ve doyum mıknatıslanmasının belirlenebilmesini sağlayan bir cihazdır [29]. VSM ile ölçüm yapılırken,

mıknatıslanması ölçülmek istenen örnek, bir ucunda titreştirici bulunan uzun bir çubuğun diğer ucuna yerleştirilir. Örneğin titreşimi nedeniyle meydana gelen manyetik alan, cihazın bobinlerinin sarımlarında bir elektromanyetik kuvvet meydana getirir. Bu sırada, çubuğun üst ucunun olduğu taraftaki sarımlar da, referans uzayın titreşiminden meydana gelen elektromanyetik kuvveti de kayıt eder. Örnekten gelen ile referanstan gelen elektromanyetik kuvvet arasındaki potansiyel fark, örneğin manyetik momenti ile ilişkili bir değerdir [73]. Aşağıda ferromanyetik bir malzemenin manyetik alana karşı mıknatıslanmasının değişimini gösteren VSM eğrileri ve bu eğrilerin karakteristik özelliklerine ilişkin bilgi verilmiştir.

Ferromanyetik malzemelerin ve manyetik nanoparçacıkların manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrileri

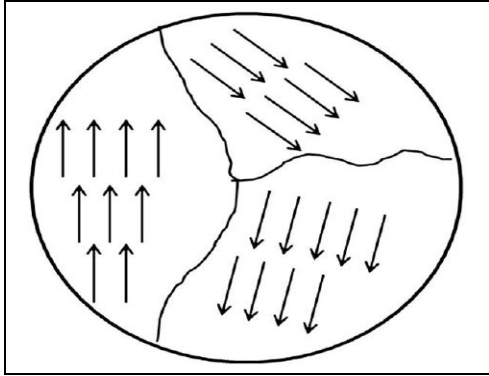
Ferromanyetik bir malzemenin dışardan uygulanan manyetik alana karşı mıknatıslanmasını gösteren tipik bir eğri Şekil 2.13' te gösterilmiştir.



Şekil 2.13. Ferromanyetik bir malzemenin manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi [32]

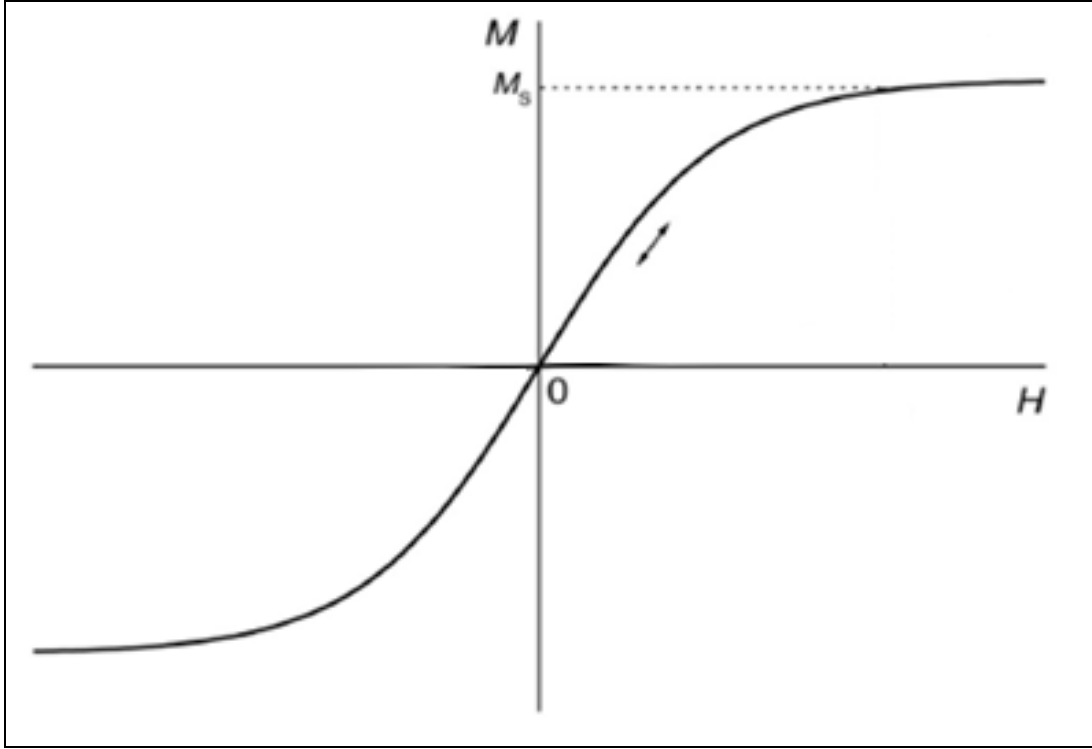
Ferromanyetik bir malzemeye sıfırdan başlayarak dışarıdan manyetik alan uygulandığında, OP eğrisi boyunca, manyetik alan (H) arttıkça mıknatıslanma (M) artış gösterir ve manyetik alan belirli bir değere ulaştıktan sonra, maddenin tüm manyetik momentleri manyetik alanla aynı doğrultuda yönlendiği için maddenin mıknatıslanması, M_s ile gösterilen doygunluk değerine ulaşır. Mıknatıslanma M_s değerine ulaştığında, uygulanan manyetik alan şiddeti azaltılmaya başlanırsa, malzemenin mıknatıslanması yavaş yavaş azalmaya başlar. Fakat, mıknatıslanma eğrisi aynı rotayı (OP eğrisini) takip etmez ve manyetik alan sıfıra düşürülse bile, malzemenin mıknatıslanması sıfıra inemez, yani madde mıknatıslanmayı hafızasında tutar. Bu davranışa “manyetik histerisis” denilmektedir [29,73]. Eğri üzerinde “ M_r ” ile gösterilen noktadaki mıknatıslanma “remenans” ya da “kalıcı mıknatıslanma” olarak tanımlanır ve M_r değeri, malzemenin manyetik alan sıfırken sahip olduğu mıknatıslanmayı gösterir. Malzemenin manyetik alan sıfır iken, sıfır mıknatıslanmaya sahip olacak duruma geri döndürülebilmesi için, eğri üzerinde “ H_c ” ile gösterilen ve “koersivite” ya da “zorlayıcı alan” olarak tanımlanan manyetik alan değeri kadar ters yönde bir manyetik alan uygulanması gereklidir [29,73].

Manyetik histerisisin nedeni, ferromanyetik malzemenin pek çok manyetik bölgeden (magnetic domain) meydana gelmesi temeline dayanır. Manyetik bölgeler, çok sayıda spinleri aynı yönlü atomik manyetik momentin (yaklaşık 10^{15}) bir araya gelmesiyle oluşmuş ve birbirinden “bölge duvarı” denilen sınırlarla ayrılmış kısımlar olarak tanımlanabilir [28,72]. Şekil 2.14’ te birden çok manyetik bölgeden oluşan bir malzemenin yapısı ve manyetik momentlerin durumu gösterilmiştir.



Şekil 2.14. Birden çok manyetik bölgeden oluşan malzemenin yapısı ve atomik manyetik momentlerin durumu [77]

Malzeme yığın halde iken, manyetik bölgeler yüzeysel olarak birbirini etkiledikleri için, ferromanyetik malzemelerin mıknatıslanması çabucak eski haline dönemez. Malzeme boyutlarının yığın halden nanoboyuta inmesiyle, malzeme yüksek bir yüzey/hacim oranına sahip olur ve buna bağlı olarak yüzey atomlarının kesrinin yığın haldeki duruma göre artması ile parçacıklar arası etkileşimler, yapıda yeni fiziksel özelliklerin ortaya çıkmasını sağlar [73]. Parçacık boyutunun nanoboyuta inmesiyle, aynı değişimler manyetik özellikler için de meydana gelir ve parçacıkların boyutu birkaç 10 nm' nin altına düştüğünde, ferromanyetik maddeler sadece tek manyetik bölge içeren hale dönüşür ve malzemede "süperparamanyetizma" olarak tanımlanan üstün bir manyetik özellik ortaya çıkar. Süperparamanyetik nanoparçacıklar, tek bir manyetik bölge içeren halde oldukları ve kendi aralarında manyetik etkileşimler bulunmadığı için durgunluk mıknatıslanması (M_r) göstermezler. Buna bağlı olarak da koersiviteyi (H_c) sıfırdır [32,78]. Şekil 2.15' te süperparamanyetik malzemenin mıknatıslanmasının manyetik alana değişimi gösterilmiştir.



Şekil 2.15. Süperparamanyetik nanoparçacıkların mıknatıslanmasının uygulanan manyetik alanla değişimi [32]

Süperparamanyetik nanoparçacıkların mıknatıslanması paramanyetik maddelerde olduğu gibi T_c altındaki sıcaklıklarda manyetik alan arttıkça lineer olarak artar fakat M_s değerine ulaşıldığında mıknatıslanma sabit kalır [32]. Süperparamanyetik nanoparçacıklar, özellikle manyetik rezonans görüntülenmede ve Bölüm 1 ve Bölüm 2.3' te anlatılan biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadırlar.

2.9.8. Enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskopisi (SEM/EDS)

Enerji dispersif x-ışınları analizi (EDS), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile bağlantılı olan bir x-ışınları dedektörü vasıtasıyla, örneğin atomik kompozisyonunun belirlenmesini sağlayan spektroskopik bir tekniktir. SEM ile bir örnek incelenirken, örneğe 1-40 kV civarında bir elektron demeti gönderilir ve daha sonra elektron demeti, örnek üzerinde tarama yapılacak şekilde

gezdirir. Elektron demeti malzemeye çarptığı zaman, bir takım elektronlar ve ışınlar (radyasyon) yayılır. Bunlar, x-ışınları, katot ışıması, Auger elektronları, birincil ve ikincil geri saçılan elektronlardır. Bunlardan x-ışınları, incelenen maddenin atomlarının iç kabuk elektronlarının geçişleri sonucunda oluşan ve her yöne doğru hareket eden ışınlardır ve atomların cinsleri hakkında bilgi verirler [70].

2.10. Lakkaz Enzimi

Lakkaz (benzen diol: oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2), moleküler oksijenin suya indirgenmesini ve aynı zamanda substratının yükseltgenmesini katalizleyen, elde edildiği kaynağa göre molekülünde değişebilen sayıda bakır atomları taşıyan, ağırlıkça %15-45' i karbonhidratlardan oluşan ve molekül ağırlığı 50-130 kDa arasında değişebilen glikoprotein yapılı bir enzimdir [79,80]. İlk kez 1883' te Yoshida tarafından Japon laquer (vernik) ağacı *Rhus vernicifera*' dan elde edilmiştir [81].

Lakkaz enziminin tepkime verdiği substratlar; orto ve para difenoller, aminofenoller, benzentiyoller, polifenoller, poliaminler, hidroksiindoller, bazı aromatik diaminler ve bazı inorganik iyonlar (Mn^{2+} , $Fe(EDTA)^{2-}$) olmak üzere geniş bir aralıkta değişmektedir [82].

Lakkaz enzimleri bakteriler [83], böcekler [84], bitkiler ve en çok mantarlar olmak üzere [85,86]; 4 kaynaktan elde edilmektedir. Lakkaz kaynağı olan mantarlar arasında, *Lentinula edodes*, *Myceliophthora thermophila*, *Cerrena maxima*, *Trametes hirsuta*, *Trametes villosa* ve *Trametes versicolor* sayılabilir [80]. "Hindi kuyruğu mantarı" olarak da bilinen *Trametes versicolor* mantarı Resim 2.2' de görülmektedir.



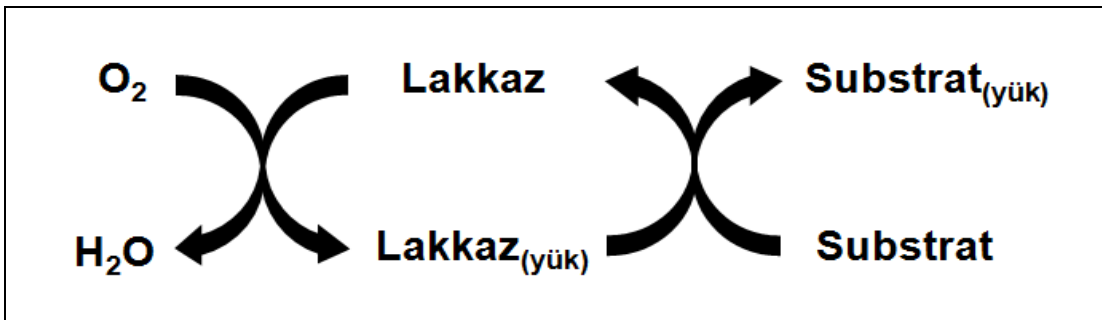
Resim 2.2. *Trametes versicolor* mantarı

Trametes versicolor' dan elde edilen lakkaz molekülü Resim 2.3' te görülmektedir ve lakkazın aktif merkezinde 4 pembe kürecik halinde temsil edilen 4 bakır iyonu bulunmaktadır.



Resim 2.3. *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz molekülü

Çeşitli spektroskopik tekniklerle yapıları ortaya çıkarılan bu bakır iyonları, enzimin substratını katalizlemesi sırasındaki işlevlerine ve enzim molekülü içerisindeki konumlanma biçimlerine göre T1, T2 ve T3 olmak üzere 3 kısma ayrılmıştır [80]. Substratlar T1 kısmında yükseltgenerek, ve bu sırada alınan elektronlar T2 ve T3 kümesine iletilmektedir. Bu kısımlara iletilen elektronlarla da, moleküler oksijen suya indirgenerek açığa çıkmaktadır. Şekil 2.16' da lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması gösterilmiştir.

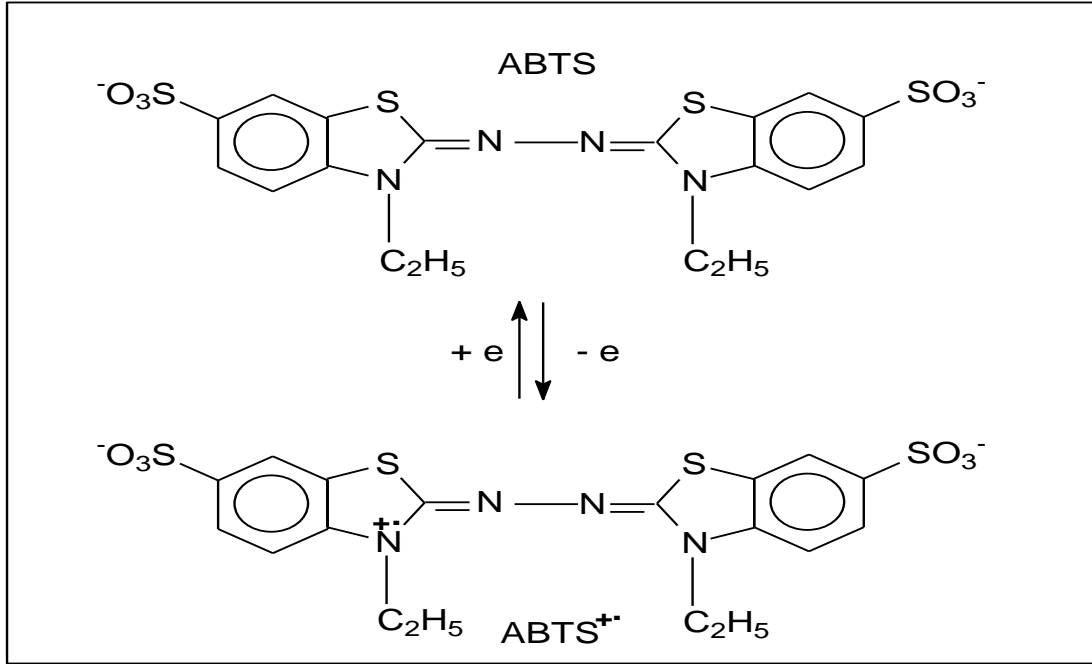


Şekil 2.16. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması

Lakkazlar, çoğunlukla çeşitli destek materyallere immobilize edilerek, tekstil, kağıt, gıda endüstrisindeki çeşitli uygulamalarda ve çevre kirliliğinin önlenmesine yönelik uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Bunlar arasında, pamuğun ağartılması [87], kağıt hamurundan ligninin uzaklaştırılması [88], meşrubatların stabilizasyonunun sağlanması [89], tekstil endüstrisi atık sularındaki bazı boyarmaddelerin [90] ve zeytinyağı endüstrisi atıklarının bozundurulması [91], polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi çevresel kirleticilerin yıkımı [92,93] gibi uygulamalar yer almaktadır. Ayrıca lakkazlar, biyoyakıt hücrelerinin üretilmesinde [94] ve fenollere duyarlı biyosensörlerin geliştirilmesinde de kullanılmaktadır [95].

2.11. ABTS Substratı

Son yıllarda ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit)) substratı, lakkaz aktifliğinin hızlıca tayin edilmesine imkan vermesinden dolayı yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. ABTS, fosfat ve fosfat-sitrat tamponu gibi çözeltilerde hazırlandığında renksiz bir çözelti oluşturur. Bu renksiz çözeltilere lakkazla müdahale edildiğinde, ABTS lakkaz tarafından yükseltgenerek mavi-yeşil renkli ABTS katyon radikaline (ABTS^{•+}) dönüştürülür (Şekil 2.17) Literatürde, ABTS^{•+}'nin maksimum absorban dalga boyu için 405-420 nm arasında değişim gösteren değerler verilmektedir [96].



Şekil 2.17. ABTS ve ABTS•+

2.12. Manyetik Destek Materyallere Enzimlerin, Proteinlerin ve Lakkaz Enziminin İmmobilizasyonuna İlişkin Literatürde Yer Alan Bazı Çalışmalar

Manyetik desteklere enzim immobilizasyonu, genellikle adsorpsiyon ve kovalent bağlama yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir. Enzimlerin manyetik mikrokürelere ve nanoparçacıklara immobilize edilmesine yönelik literatürde yer almış çalışmalar ve bu çalışmalarda elde edilen bazı bulgular aşağıda özetlenmiştir.

Shinkai ve arkadaşları 1991' de 3-aminopropiltrioksisilan ile aktifleştirdikleri Fe₃O₄ nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile β-glukosidoz, α-amilaz, alkoldehidrojenaz, glukoz oksidaz, termolizin ve BSA immobilize etmişlerdir. Enzim immobilize edilmiş manyetik nanoparçacıkların boyutlarının 4-70 nm arasında değiştiği ve manyetik nanoparçacıkların 1 gram başına, bu enzim ve proteinlerin 70-200 mg arasında değişen miktarlarda immobilize olduğu belirlenmiştir [97].

İman ve arkadaşları 1992' de modifiye edilmiş bir süspansiyon polimerleşmesi tekniği ile demir tozu hapsedilmiş manyetik polistiren küreleri hazırlamışlar ve bu manyetik küreleri fotooksidasyon yoluyla fonksiyonelleştirerek, üreaz enzimini kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. İmmobilize üreaz, ürenin parçalanmasında etkili bir şekilde kullanılmıştır [12].

Tanyolaç ve arkadaşları 2000' de modifiye edilmiş çözücü buharlaştırma metodu ile hazırladıkları boyutları 125-250 µm arasında olan manyetik nitroselüloz mikrokürelere, bu mikrokürelere hidrosil gruplarını glutaraldehitte aktifleştirdikten sonra, glukoamilaz enzimini immobilize etmişler ve 1 gram manyetik mikroküre başına 17 mg glukoamilazın immobilize olduğunu belirlemişlerdir [13].

Liao ve arkadaşları 2001' de Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarını hidrotermal koşullar altında bazik ortamda çöktürerek hazırladıkları 10,6 nm boyutundaki süperparamanyetik Fe_3O_4 nanoparçacıklarını karbodiimitle aktifleştirmişler ve bu nanoparçacıklara mayadan elde edilen alkol dehidrojenaz enzimini kovalent bağlama ile immobilize etmişlerdir. Serbest alkol dehidrojenaza göre, immobilize alkol dehidrojenazın pH 5' teki aktifliği 2,7 kat artış göstermiştir [98].

Liao ve arkadaşları 2002' de boyutları 13,2 nm olan süperparamanyetik poli (akrilik asit) bağlı Fe_3O_4 nanoparçacıklarını lizozim enziminin adsorpsiyonunda kullanmışlar ve difüzyon sınırlamalarının olmaması nedeniyle bu manyetik nanoparçacıklara lizozim adsorpsiyonunun 1 dakikada tamamlandığını belirlemişlerdir. Ayrıca optimum koşullar altında, enzimin tamamı desorbe edilebilmiştir [17].

An ve arkadaşları 2003' te baryum ferrit parçacıklarına kitosanı glutaraldehit ve epiklorhidrinle çapraz bağlayarak hazırladıkları manyetik kitosan mikrokürelere tripsin enzimini kovalent bağlanma ile immobilize etmişler ve

20 saat immobilizasyon sonunda, immobilize tripsinin serbest tripsine göre spesifik aktifliğini %71 daha fazla koruduğunu belirlemişlerdir [99].

Guo ve arkadaşları 2003' te oleik asitle stabilize edilmiş Fe_3O_4 çekirdekleri kullanarak, vinil asetat ve divinil benzenin kopolimerleşmesi ile hazırladıkları manyetik poli(vinil asetat-divinil benzen) mikrokürelere *Candida cylindracea*' dan elde edilen lipaz enzimini immobilize etmişler ve immobilize lipazın serbest lipaza göre sıcaklık değişimlerine karşı dayanıklı olduğunu ve 6 kullanım sonunda başlangıç aktifliğinin %74' ünü koruduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca manyetik mikrokürelere, manyetik ayırma ile 3 dakika içinde ortamdaki ayrılabilmiş ve bu ayırmanın çökelme ile ayırmaya göre 300 kat daha hızlı gerçekleştiği bildirilmiştir [100].

Lei ve arkadaşları 2004' te karboksil grupları içeren manyetik kompozit mikrokürelere tiyonil klorürle aktifleştirerek kovalent bağlanma ile papain enzimini immobilize etmişler ve immobilize papainin serbest enzime göre pH ve sıcaklık değişimlerine karşı aktifliğini daha fazla koruduğunu ve depolamaya karşı daha dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir [101].

Liu ve arkadaşları 2005' te modifiye edilmiş süspansiyon polimerleşmesi ile hazırladıkları boyutları 8 μm ' den küçük süperparamanyetik manyetik poli(metakrilat-divinil benzen) mikrokürelere *Candida cylindracea*' dan elde edilen lipaz enzimini kovalent bağlanma ile immobilize etmişler ve 1 gram manyetik mikroküre başına 34,0 mg lipaz immobilize olduğunu ve immobilize lipazın manyetik ayırma ile 20 saniye içerisinde ortamdaki ayrılabilmediğini belirlemişlerdir [15].

Jiang ve arkadaşları 2005' te ters-fazlı süspansiyon yöntemi ile boyutları yaklaşık 5 μm olan glutaraldehit ile çapraz bağlı manyetik kitosan mikrokürelere hazırlamışlar ve bu manyetik mikrokürelere adsorpsiyon ve çapraz bağlama yöntemi ile *Pycnoporus sanguineus*' tan elde edilen lakkaz enzimini immobilize etmişlerdir. En uygun koşullar altında immobilize lakkazın

aktifliğinin 1 gram manyetik mikroküre başına 322,6 U olduğunu belirlemişlerdir [102].

Feng ve arkadaşları 2005' te süspansiyon çapraz bağlama tekniği ile hazırladıkları manyetik kitosan mikrokürelere selülaz enzimini immobilize etmişler ve immobilize selülazın serbest selüloza göre daha geniş bir sıcaklık ve pH aralığında aktifliğini koruduğunu, K_m değerinin serbest selüloza göre arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca, immobilize selülazın depolama kararlılığı artmış ve 10 kullanım sonunda immobilize selülazın başlangıç aktifliğinin %78' ini korumuştur [103].

Yang ve arkadaşları 2005' te süspansiyon kopolimerleşmesi ile hazırladıkları ve boyutları yaklaşık 10 μm olan manyetik poli(metil metakrilat-divinil benzen-glisidil metakrilat) mikrokürelere adsorpsiyonla BSA immobilize etmişler ve en uygun koşullar altında, 1 gram manyetik mikroküre başına 70 mg BSA immobilize olduğunu belirlemişlerdir [104].

Pich ve arkadaşları 2006' da hazırladıkları boyutları yaklaşık 470 nm olan manyetik poli(stiren-ko-asetoasetoksietilmetakrilat) parçacıklarının β -diketon grubu üzerinden kovalent bağlanma ile *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz enzimini immobilize etmişlerdir. Immobilize lakkaz, pH 5,0-7,0 ve 50-70°C aralığında serbest lakkaza göre daha yüksek bir aktiflik göstermiş ve depolamaya karşı aktifliğini serbest lakkaza göre daha fazla korumuştur [66].

Xiao ve arkadaşları 2006' da glutaraldehitte çapraz bağlayarak iki aşamalı yöntemle hazırladıkları manyetik bakır-tetraaminftalosiyanın nanokompozitine lakkaz enzimini kovalent bağlanma ile immobilize etmişler ve immobilize lakkazın aktifliğinin 1 g nanokompozit başına 1430 U olduğunu belirlemişlerdir [105].

Zhu ve arkadaşları 2007' de *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz enzimini boyutları 2 μm olan manyetik mezogözenekli silika küreciklerine

adsorpsiyonla ve bu kürecikleri 3-aminopropiltrietoksisilan ve glutaraldehitte aktifleştirerek kovalent bağlama yöntemleri ile immobilize etmişlerdir. Kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz, adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaza göre göre pH ve sıcaklık değişimlerine karşı maksimum aktifliğini daha fazla korumuştur [106].

Wang ve arkadaşları 2008' de zeta potansiyel ölçümleri ile pH 4' te yüzeyinin pozitif olduğunu belirledikleri boyutları 10-20 nm olan manyetik kitosan nanoparçacıklarını, bu pH' da negatif yüklü olan BSA proteininin adsorpsiyonunda kullanmışlar ve nanoparçacıkların 1 gramı başına 110 mg BSA adsorplandığını belirlemişlerdir [107].

Yong ve arkadaşları 2008' de vinil-trietoksisilkanla fonksiyonel hale getirdikleri boyutları yaklaşık 20 nm olan Fe_3O_4 nanoparçacıklarının yüzeyine yüzeyde başlatılan radikal polimerleşmesi ile glisidil metakrilatı ve metakriloksietil trimetil amonyum klorürü polimerleştirerek aşlamışlar ve hazırladıkları manyetik polimerik nanoparçacıklara lipaz enzimini adsorpsiyon ve kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. Immobilize lipazın optimum sıcaklık aralığının serbest lipaza göre 5°C daha artmış ve immobilize lipaz 5 kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %70' ini korumuştur [19].

Kornwah ve arkadaşları 2009' da poli(etilen glikol) ile modifiye edilmiş ve boyutları ortalama 12,56 nm olan Fe_3O_4 nanoparçacıklarına keratinaz enzimini kovalent bağlanma ile immobilize etmişler ve immobilize keratinazın serbest keratinaza göre sıcaklık değişimine ve depolamaya karşı kararlılığının arttığını belirlemişlerdir [20].

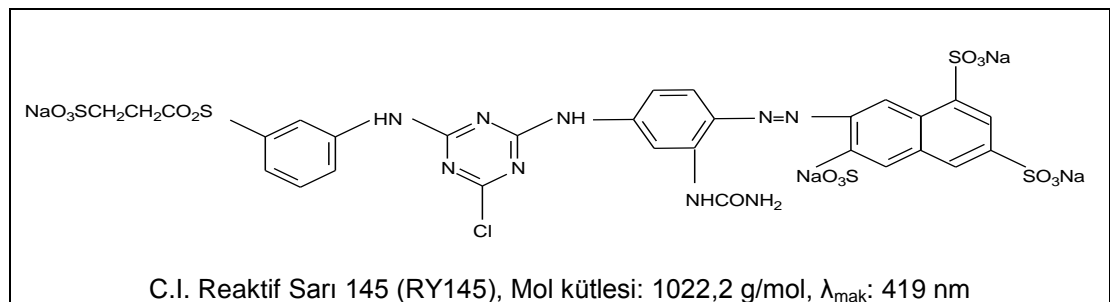
Wu ve arkadaşları 2009' da sodyum tripolifosfatla çapraz bağlayarak hazırladıkları ve boyutları 80 nm olan Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarına lipaz enzimini immobilize etmişler ve immobilize lipazın 5 kullanım sonunda aktifliğinin %88' ini koruduğu bildirmişlerdir [21].

Rotkova ve arkadaşları 2009' da boyutları 125-250 μm arasında olan manyetik selülozik mikrokürelere kovalent bağlanma ile *Pycnopus cinnabarinus* ve *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz enzimini immobilize etmişler ve immobilize lakkazı 1 ay süresince 5-10°C' de saklamaları sonunda enzim aktifliğinin değişmediğini ve immobilize lakkazların 7. kez kullanılmaları sonunda başlangıç aktiflikleri aynı oranda koruduklarını belirlemişlerdir [108].

2.13. Reaktif Boyarmaddeler ve Reaktif Sarı 145

Reaktif boyarmaddeler, pamuklu ve yünlü dokumalara uygun koşullar altında kovalent bağlanabilme özellikleri olan, yapılarında sübstitüe aromatik ya da heterosiklik gruplar ve birkaç sülfonik asit grubu içeren, sudaki çözünürlükleri yüksek boyarmaddelerdir [109]. Tüm dünyada ve ülkemizdeki tekstil fabrikalarında yürütülen boyama işlemlerinde kullanılan reaktif boyarmaddeler, tekstil endüstrisi atık suları içerisinde en çok tespit edilenlerin başında gelmektedir. Bu durumun nedenleri, pamuk lifi üretiminin ve boyama işlemlerinin hayli fazla olması ve boyama işlemleri sırasında bu boyarmaddelerin dokumaya tamamen bağlanamayarak atık sulara karışmasıdır [58,59].

Bu çalışmada Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına adsorpsiyonu incelenilen Reaktif Sarı 145 (RY145) tekstil boyarmaddesinin yapısı, molekül kütlesi ve maksimum absorpsiyon dalga boyu Şekil 2.18' de gösterilmiştir.



Şekil 2.18. RY145 boyarmaddesinin yapısı ve bazı özellikleri

RY145, 4 adet $-SO_3^-$ grubu ve 1 azo köprüsü ($-N=N-$) içeren ve anyonik bir reaktif boyarmaddedir.

2.14. Manyetik Adsorplayıcılara Boyarmaddelerin Adsorpsiyonuna İlişkin Literatürde Yer Alan Çalışmalar

Manyetik adsorplayıcılar kullanılarak çeşitli boyarmaddelerin sulu ortamdan adsorpsiyonla uzaklaştırılmasına yönelik literatürde yer almış bazı çalışmalar ve bu çalışmalarda elde edilen bazı bulgular aşağıda özetlenmiştir.

Safarik ve arkadaşları 1994' te ϵ -kaprolaktamın Fe_3O_4 parçacıkları varlığında poli(oksi-2,6-dimetil-1,4-fenilen) ile eritilmesi ile hazırladıkları manyetik polimerik kompozit parçacıklara trifenilmetan, heteropolisiklik ve azo boyarmaddelerinin sulu ortamdan adsorpsiyonunu incelemişler ve heteropolisiklik boyaların adsorplayıcı-adsorplanan etkileşimlerine bağlı olarak, diğer boyarmaddelere göre en az miktarda adsorplandığını belirlemişlerdir [23].

Mak ve arkadaşları 2004' te boyutları 12 nm olan poli(akrilik asit) ile modifiye edilmiş Fe_3O_4 nanoparçacıkları üzerine metilen mavisinin adsorpsiyonunu incelemişler ve ortam pH' sının 2,0' den 10,0' a artması ile adsorplanan metilen mavisinin miktarının arttığını, 10-40°C aralığında adsorpsiyonun endotermik olduğunu ve asetik asitin metanoldeki çözeltisi ile gerçekleştirilen desorpsiyonun, nanoparçacıkların difüzyonel sınırlamaları olmamaları nedeniyle, adsorpsiyonla eşit sürede ve 2 dakikada tamamlandığını belirlemişlerdir [24].

Chang ve arkadaşlarının 2005' te boyutları 13,5 nm karboksimetil kitosan bağlı Fe_3O_4 nanoparçacıklara Asit Turuncu 12 ve Asit Yeşil 25 boyarmaddelerinin adsorpsiyonunu incelemişler ve izoelektronik noktası (pI) 5,95 olan manyetik nanoparçacıklara her iki boyanın da adsorplanan miktarının pH' nin artması ile azaldığını, iyonik şiddetin artmasının ise, Asit

Yeşil 25' in adsorplanan miktarını azaltırken azaltırken, Asit Turuncu 12' ninkini etkilemediğini tespit etmişlerdir [110].

Wu ve arkadaşları 2005' te $MnO-Fe_2O_3$ parçacıklarına Asit Kırmızı B azo boyarmaddesinin adsorpsiyonunu incelemişler ve bu nanoparçacıklara maksimum miktarda pH 3,5' te boyarmaddenin adsorplandığını ve manyetik adsorplayıcı içerisindeki Fe miktarının artması ile adsorpsiyon kapasitesinin arttığını belirlemişlerdir [111].

Atia ve arkadaşları 2009' da, 3-aminopropiltrioksolan ile modifiye ettikleri silika ve Fe_3O_4 -silika parçacıklarına Asit Turuncu 10 boyarmaddesinin adsorpsiyonunu incelemişler ve Fe_3O_4 -silika parçacıklarının, silika parçacıklarına göre boyarmaddeyi daha hızlı adsorpladığını, adsorpsiyonun istemli ve ekzotermik olduğunu ve boyarmaddenin bazik ortamda yüksek bir oranda geri kazanılabildiğini belirlemişlerdir [65].

Elwaakel ve arkadaşları 2009' da, kitosanı Fe_3O_4 parçacıkları varlığında glutaraldehitte çapraz bağlayarak iki farklı modifiye edici madde ile kitosan/amino ve kitosan/amino-kuvarterner amonyum klorür esaslı reçinelere Reaktif Siyah 5 boyarmaddesinin adsorpsiyonunu incelemişler ve adsorpsiyonun endotermik ve istemli olduğunu ve bu reçinelere adsorplanan boyarmaddenin etkili şekilde geri kazanıldığını bildirmişlerdir [112].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

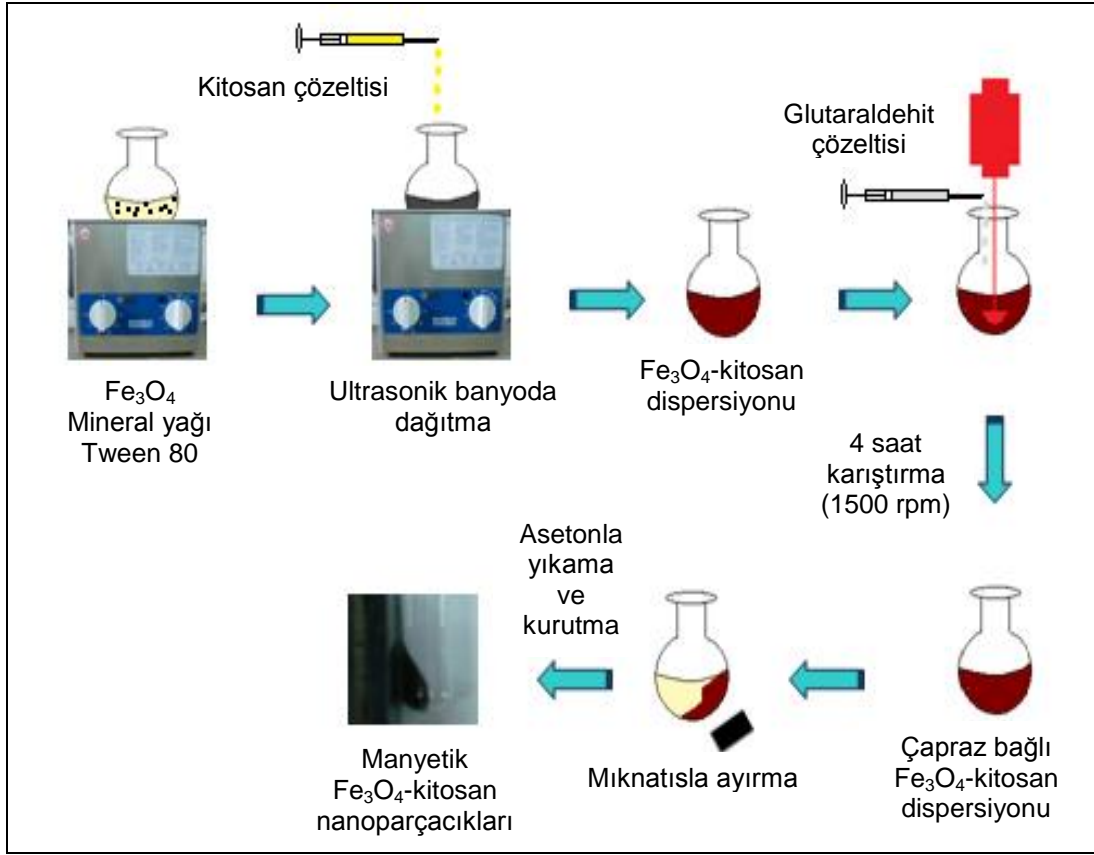
Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, bu maddelerin bazı özellikleri ve temin edildikleri firmalar izelge 3.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar

Kimyasal madde	Üretici firma
Asetik asit (%99-100)	Sigma (Steinheim, Almanya)
Bradford reaktifi, BSA çözeltisi (0,5 mg/mL) ve NaCl çözeltisi (0,15 M)	Amresco (Ohio, ABD)
Demir (II,III) oksit (Fe_3O_4) nano tozu (50 nm' den küçük boyutta (TEM))	Aldrich (Steinheim, Almanya)
Etanol	Riedel de Häen (Seelze, Almanya)
Fosforik asit (%98)	Riedel de Häen (Seelze, Almanya)
Glutaraldehit (%50)	British Drug House (Poole, İngiltere)
Kitosan (Crab shells' den elde edilen, en az %85 deasetillenmiş)	Sigma (Steinheim, Almanya)
Lakkaz (E.C. 1.10.3.2), (<i>Trametes versicolor</i> ' dan elde edilen, 22,5 U/mg)	Sigma - Aldrich (Steinheim, Almanya)
Mineral yağı (ağır, 25°C' deki yoğunluğu 0,862 g/L olan)	Sigma - Aldrich (Steinheim, Almanya)
N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etil-karbodiimit hidroklorür	Merck (Hohenbrunn, Almanya)
Potasyum klorür	Riedel de Häen (Seelze, Almanya)
Sitrik asit monohidrat	Merck (Darmstadt, Almanya)
Siyanürik klorür	Merck (Schuchardt, Almanya)
Sodyum hidrojen fosfat heptahidrat	Riedel de Häen (Seelze, Almanya)
Tween 80	Across Organics (New Jersey, ABD)
C.I. Reaktif Sarı 145 (Burafix Yellow BF-R)	Burboya (Bursa, Türkiye)
1,4-Dioksan	Carlo Erba (Rodano, İtalya)
2,2'-Azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit) diammonyum tuzu	Sigma (Steinheim, Almanya)

3.2. Fe₃O₄-Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi

Fe₃O₄-kitosan (Fe₃O₄-CS) nanoparçacıkları, ters-faz süspansiyon metodu ile Li ve arkadaşları tarafından önerilen yöntemle sentezlenmiştir [113]. Bu amaçla, 200 mg Fe₃O₄ nanoparçacıkları etanolle yıkanarak vakum etüvünde kurutulduktan sonra, 50,0 mL mineral yağı ve 0,5 mL Tween 80 karışımına eklenmiş ve ultrasonik banyoda (Bandelin Sonorex RK 100 H (Berlin, Almanya)) dağıtılmıştır. Bu Fe₃O₄ dispersiyonu üzerine, 15,0 mL kitosan çözeltisi (%1,0 w/v) damlalar halinde ilave edilerek, sistem ultrasonik banyoda tutulmaya devam edilmiştir. Elde edilen Fe₃O₄-kitosan dispersiyonuna, 3,0 mL glutaraldehit çözeltisi (%25,0 v/v) eklenmiş ve karışım mekanik karıştırıcı (Heidolph RZR 2021 (Schwabach, Almanya)) ile 1500 rpm' de 4 saat karıştırılmıştır. Bu süre sonunda, elde edilen Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları neodyum mıknatısla toplanarak, yağ fazının tamamen uzaklaştırılması amacıyla asetonla defalarca yıkanmış, vakum etüvünde (Nüve EV 018 (Akyurt, Türkiye)) 24 saat süresince kurutulmuş ve lakkaz immobilizasyonu ve boyarmadde adsorpsiyonunda kullanılmıştır. Şekil 3.1' de Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının sentez basamakları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının sentezi

3.3. Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -Kitosan Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

3.3.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)

Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıkları etanolla karıştırılarak ultrasonik banyoda dağıtılmış ve elde edilen dispersiyonlar farklı karbon gridlere damlatılmıştır. Gridler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, örneklerin TEM görüntüleri, geçirimli elektron mikroskobu (Technai™ G² F30 (Hillsboro, ABD)) ile 100 kV' da alınmıştır.

3.3.2. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR)

Spektrumu alınacak örnekler (Fe_3O_4 , CS ve Fe_3O_4 -CS); KBr içerisinde, örnek/KBr : 1/150 w/w olacak şekilde dağıtılmış ve her bir örneğin FT-IR

spektrumları, FT-IR spektrofotometresi (Perkin Elmer PE 1600 (Massachusetts, ABD)) ile 400-4000 cm^{-1} aralığında alınmıştır.

3.3.3. X-ışını kırınımı yöntemi (XRD)

Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının x-ışını kırınım desenleri, Cu K α ışını ($\lambda = 0,15406$ nm) ile, $2\theta = 10^\circ - 90^\circ$ arasında ve $4^\circ/\text{dakika}$ tarama hızı ile x-ışını kırınım cihazı (Rigaku Ultima-IV (Tokyo, Japonya)) ile alınmıştır.

3.3.4. Termogravimetrik analiz (TGA)

Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının termogramları, TGA cihazı (Perkin Elmer Pyris 1 TGA (Massachusetts, ABD)) ile 25-700°C aralığında ve N_2 ortamında, $10^\circ\text{C}/\text{dakika}$ ısıtma hızı ile alınmıştır.

3.3.5. ζ -(Zeta) potansiyel ölçümleri

Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının %2,5' lik (w/v) sulu dispersiyonlarının ζ -potansiyelleri, pH 2,0-9,5 aralığında, ortamın pH' sı 10^{-2} M HCl ya da NaOH ile ayarlanarak, ζ -potansiyel ölçüm cihazı (Malvern Nano ZS90 (Worcestershire, İngiltere)) ile oda sıcaklığında ölçülmüştür.

3.3.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR)

Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının EPR spektrumları, manyetik nanoparçacıklar 4 mm çapındaki kuvarz EPR analiz tüplerine eşit miktarda (~40 mg) alındıktan sonra, elektron paramanyetik rezonans spektrometresi (Bruker ELEXSYS E 580 FT-EPR (Rheinsteffen, Almanya)) ile oda sıcaklığında, sürekli dalga modunda, standart X-band kavitesinde, 9,85 GHz frekansta; 100 kHz manyetik alan modülasyon frekansı, 99 mW mikrodalga ışınlanması ve 1 G genlik modülasyonu uygulaması altında alınmıştır. Analizler, tek tarama sayısında 1024 noktadan veri toplanarak

gerçekleştirilmiştir. Manyetik alan DPPH (difenil pikril hidrazil, $g = 2,0036$) standardı kullanılarak kalibre edilmiştir. Her iki örneğin EPR spektrumları, nanoparçacıkların mikrodalga enerjisini absorpsiyonunun birinci türevinin manyetik indüksiyonun (B) bir fonksiyonu olarak çizdirilmesiyle elde edilmiştir.

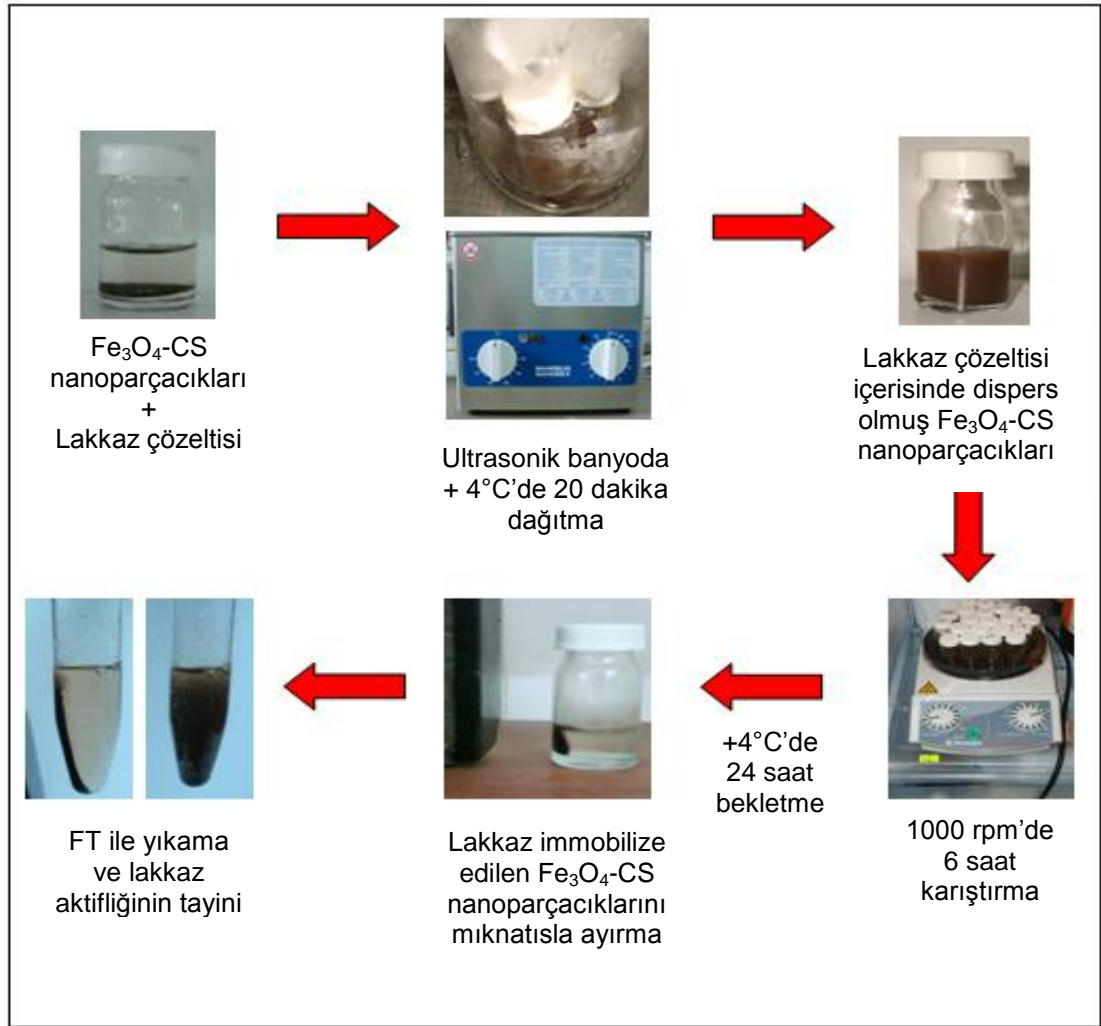
3.3.7. Titreşimli örnek manyetometrisi (VSM)

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

3.4. Fe_3O_4 -Kitosan Nanoparçacıklarına Lakkaz İmmobilizasyonu

3.4.1. Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarına adsorpsiyonla lakkaz immobilizasyonu

50 mg Fe_3O_4 -CS nanoparçacıkları üzerine 2,0 mL fosfat tamponu (FT) (0,04 M, pH = 6,0) eklenerek, sistem 30 dakika ultrasonik banyoda dağıtılmıştır. Karışım, manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm' de 6 saat karıştırılmış ve 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda, dispersiyon ortamındaki Fe_3O_4 -CS nanoparçacıkları mıknatısla toplanmış ve 2,0 mL lakkaz çözeltisi (1,0 mg/mL, pH = 6,0) eklenerek, sistem su-buz içeren ultrasonik banyoda 20 dakika dağıtılmıştır. Bu işlem sonrasında, karışım manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001 (Schwabach, Almanya)) ile $4^{\circ}C$ ' de 1000 rpm' de 6 saat karıştırılmış ve yine aynı sıcaklıkta 24 saat bekletilmiştir. Son işlem olarak, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz (Fe_3O_4 -CS-L), mıknatısla toplanmış ve FT (0,04 M, pH = 6,0) ile 4-5 kez yıkanmıştır. İmmobilizasyon sırasındaki işlem basamakları Şekil 3.2' de gösterilmiştir. İmmobilize edilen lakkaz miktarının tayini için, Fe_3O_4 -CS-L üzerindeki lakkaz çözeltisi ve yıkama suyu birleştirilmiş ve immobilize edilen enzim miktarının tayininde kullanılmıştır.



Şekil 3.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına lakkaz immobilizasyonu sırasındaki işlem basamakları

3.4.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-kitosan}$ nanoparçacıklarının karbodiimitle aktifleştirilmesi ve kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu

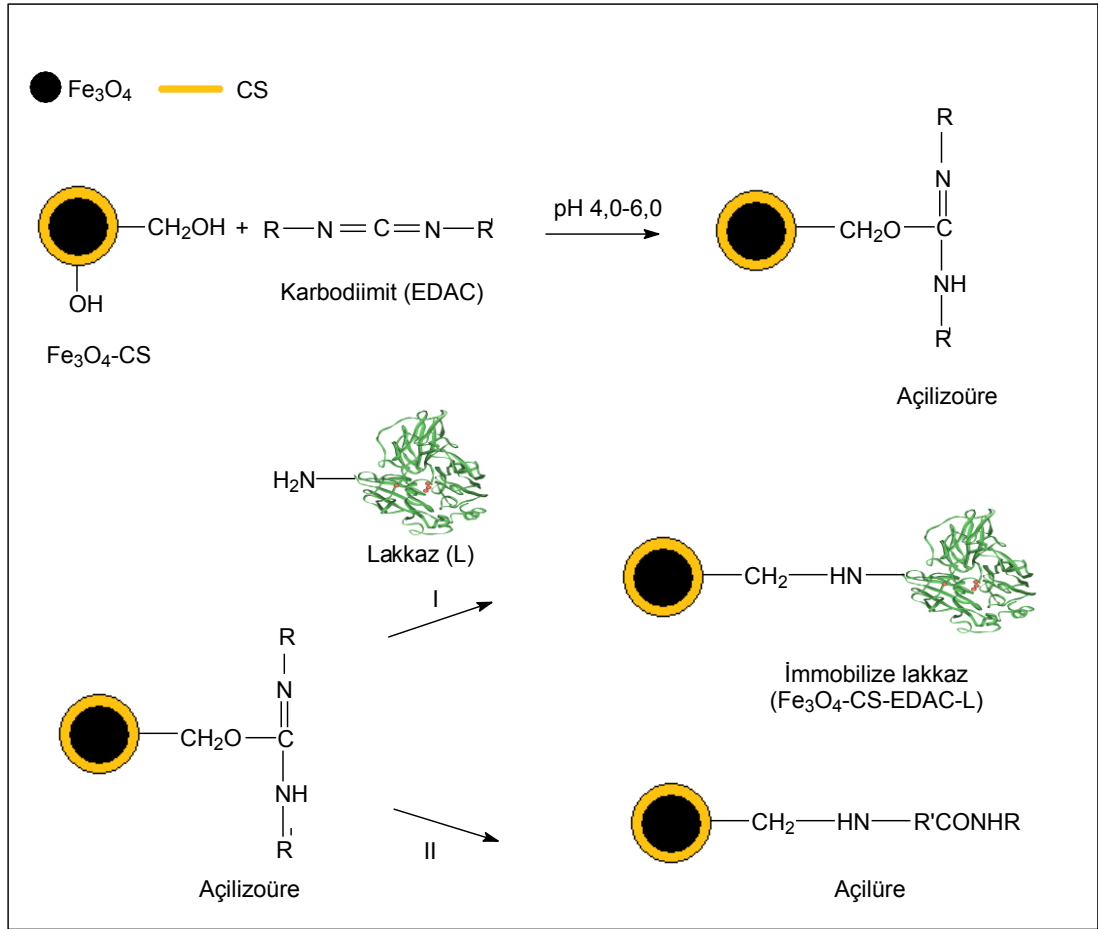
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarının karbodiimitle aktifleştirilmesi

50 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıkları üzerine 2,0 mL FT (0,04 M, pH = 6,0) ve 0,5 mL karbodiimit (EDAC) çözeltisi (%2,5 w/v, pH = 6,0) eklenerek; karışım 30 dakika su-buz içeren ultrasonik banyoda dağıtılmış ve sonrasında manyetik karıştırıcı ile 6 saat 1000 rpm' de ve 4°C' de karıştırılmıştır. Sistem, 4°C' de 24 saat bekletildikten sonra, karbodiimitle aktifleştirilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$

nanoparçacıkları ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-EDAC}$) mıknatısla toplanmış ve 4-5 kez 2,0 mL FT (0,04 M, pH = 6,0) ile yıkanmıştır.

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-EDAC}$ nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-EDAC}$ nanoparçacıkları üzerine 2,0 mL lakkaz çözeltisi (1,0 mg/mL, pH = 6,0) eklenerek, sistem su - buz içeren ultrasonik banyoda 20 dakika dağıtılmıştır. Karışım, manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm' de ve 4°C' de 6 saat karıştırıldıktan sonra, yine aynı sıcaklıkta 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda, karbodiimitle aktifleştirilmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-EDAC-L}$), mıknatısla toplanarak FT (0,04 M, pH = 6,0) ile 4-5 defa yıkanmıştır. Immobilize edilen lakkaz miktarının tayini için, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-EDAC-L}$ üzerindeki lakkaz çözeltisi ve yıkama suyu birleştirilmiş ve immobilize edilen enzim miktarının tayininde kullanılmıştır. Şekil 3.3' te, manyetik nanoparçacıkların karbodiimitle aktifleştirilmesi ve lakkaz immobilizasyonu sırasındaki tepkimeler şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının karbodimitle aktifleştirilmesi ve lakkaz immobilizasyonu

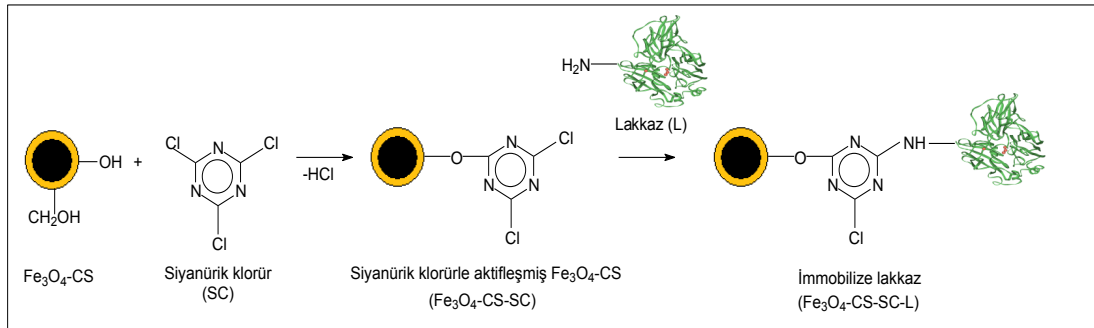
3.4.3. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarının siyanürik klorürle aktifleştirilmesi ve kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının siyanürik klorürle aktifleştirilmesi

50 mg Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına 2,5 mL siyanürik klorür (SC) çözeltisi (%0,5 w/v) eklenerek, sistem ultrasonik banyoda 30 dakika dağıtılmış ve manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm' de ve oda sıcaklığında 6 saat karıştırılmıştır. Sistem 24 saat bekletildikten sonra, siyanürik klorürle aktifleştirilmiş Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları (Fe₃O₄-CS-SC), mıknatısla toplanarak 3 kez 2,0 mL aseton ve 3 kez 2,0 mL FT (0,04 M, pH = 6,0) ile yıkanmıştır.

Fe₃O₄-CS-SC nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu

Fe₃O₄-CS-SC nanoparçacıkları üzerine 2,0 mL lakkaz çözeltisi (1,0 mg/mL, pH = 6,0) eklenerek, sistem ultrasonik banyoda 20 dakika dağıtılmıştır. Karışım, manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm' de ve 4°C' de 6 saat karıştırılmış ve yine aynı sıcaklıkta 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda, siyanürik klorürle aktifleştirilmiş Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz (Fe₃O₄-CS-SC-L), mıknatısla toplanarak FT (0,04 M, pH = 6,0) ile 4-5 defa yıkanmıştır. Immobilize edilen lakkaz miktarının tayini için, Fe₃O₄-CS-SC-L üzerindeki lakkaz çözeltisi ve yıkama suyu birleştirilmiş ve immobilize edilen enzim miktarının tayininde kullanılmıştır. Şekil 3.4' te Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının aktifleştirilmesi ve lakkaz immobilizasyonu sırasındaki tepkimeler şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının siyanürik klorürle aktifleştirilmesi ve lakkaz immobilizasyonu

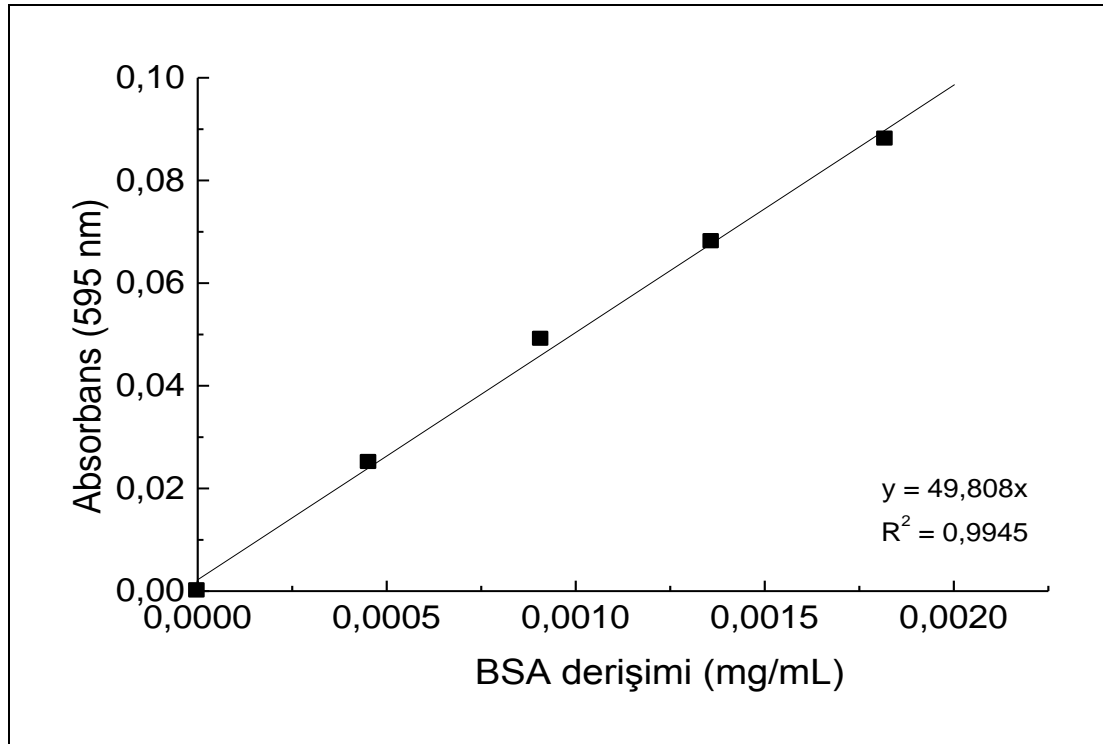
3.4.4. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına immobilize edilen enzimlerin enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS) ile tayini

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının ve adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemleri ile lakkaz immobilize edilen Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının (Fe₃O₄-CS-L, Fe₃O₄-CS-EDAC-L, Fe₃O₄-CS-SC-L) atomik kompozisyonunu yüzde olarak gösteren SEM/EDS spektrumları, lakkaz immobilize edilmiş

manyetik nanoparçacıklar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (Quanta 400F Field Emission SEM (Eindhoven, Hollanda)) ile elde edilmiştir.

3.4.5. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına immobilize edilen enzim miktarının Bradford metodu ile tayini

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz miktarı, Bradford metoduna göre tayin edilmiştir [114]. Önce BSA (Sığır Serum Albümin) kalibrasyon eğrisi hazırlamak amacıyla, mikroküvetlere 1, 2, 3 ve 4 µL BSA çözeltisi (0,5 mg/mL) alınmış ve üzerlerine sırasıyla 99, 98, 97 ve 96 µL NaCl çözeltisi (0,15 M) eklenerek, hacimleri 100 µL' ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilere 1000 µL Bradford reaktifi eklendikten 2 dakika sonra, çözeltilerin absorbansı UV-vis spektrofotometresi (Hitachi U-1800, (Tokyo, Japonya)) ile 595 nm' de okunmuştur. BSA derişimine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek, kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve Şekil 3.5' te gösterilmiştir.

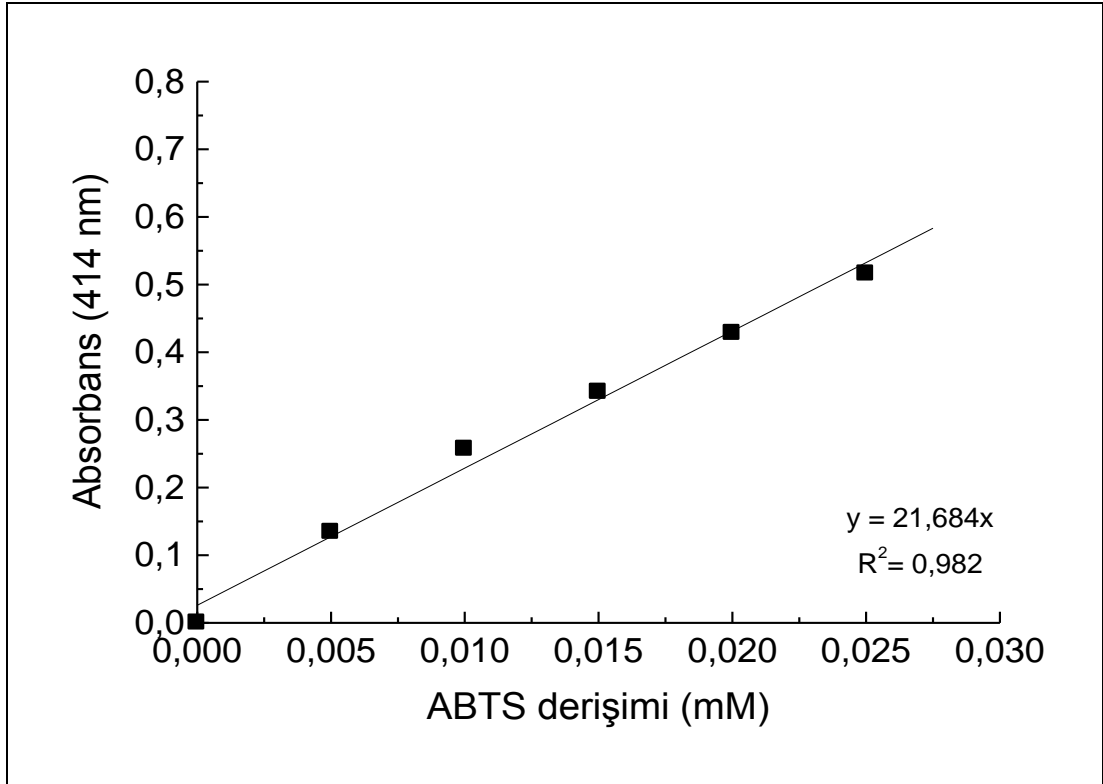


Şekil 3.5. BSA kalibrasyon grafiği

İmmobilize edilen lakkaz miktarının tayini için, lakkaz immobilizasyonunda kullanılan lakkaz süzüntüsü ve yıkama suları birleştirilerek hacmi 10 mL' ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 100 µL alınarak, üzerine 100 µL NaCl (0,15 M) ve 1000 µL Bradford reaktifi eklendikten 2 dakika sonra, çözeltilerin absorbanansı 595 nm' de okunmuş ve Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz miktarı BSA kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır.

3.5. Serbest Lakkazın Aktiflik Tayini

Serbest lakkazın aktiflik tayini, Niku-Paavola tarafından önerilen yöntemle göre, 2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) substratı kullanılarak yapılmıştır [115]. Önce ABTS kalibrasyon grafiğinin hazırlanması amacıyla, fosfat-sitrat tamponu (FST), (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat, pH = 5,0) içerisinde farklı derişimlerde ABTS çözeltileri (0,05; 0,10; 0,15; 0,20 ve 0,25 mM) hazırlanmış ve santrifüj tüpüne 8,9 mL FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat, pH = 5,0) ve 100 µL lakkaz çözeltisi (0,1 mg/mL, pH = 5,0) ilave edildikten sonra, bu ABTS çözeltilerinden 1,0 mL ortama eklenerek 25°C' de tepkime başlatılmıştır. Sistem tüp çalkalayıcısında 1 dakika karıştırıldıktan sonra, ABTS' nin lakkaz tarafından yükseltgenmesi sonucunda oluşan yeşil renkli ABTS katyon radikali (ABTS^{•+})' nin absorbanansı, UV-vis spektrofotometresi ile 414 nm' de ölçülmüştür. Farklı ABTS derişimlerine karşılık gelen absorbanans değerleri grafiğe geçirilerek elde edilen ABTS kalibrasyon eğrisi Şekil 3.6' da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. ABTS kalibrasyon grafiği

Serbest lakkaz aktifliğinin tayini için, santrifüj tüpüne 8,9 mL (FST), (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat, pH = 5,0) ve 100 µL lakkaz çözeltisi (0,1 mg/mL, pH = 5,0) ilave edildikten sonra, 1,0 mL ABTS çözeltisi (0,25 mM) ortama eklenerek, tepkime 25°C' de başlatılmıştır. Sistem, tüp çalkalayıcısı (vortex karıştırıcı) (Fisons whirlimixer, (Sussex, İngiltere)) ile 1 dakika karıştırıldıktan sonra, çözeltinin absorbansı UV-vis spektrofotometresi (Shimadzu Pharma Spec 1700 (Tokyo, Japonya)) ile 414 nm' de ölçülmüştür. Tepkime hızı yani aktiflik; ölçülen absorbans değerleri ve ABTS kalibrasyon eğrisinin eğiminin tersi ($\Delta C/\Delta A_{414}$) kullanılarak; Eş. 3.1' e göre hesaplanmıştır.

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

Bu eşitlikte ΔC , ABTS derişimindeki değışimi (mM); ΔA_{414} , absorbanstaki değışmeyi ve Δt , süreyi göstermektedir. 1 ünite lakkaz, 25°C ve pH 5,0' te, 1 dakika içerisinde, 1 µmol ABTS' yi ABTS^{•+} ne oksitleyen enzim miktarıdır.

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

3.6. İmmobilize Lakkazların Aktiflik Tayini

Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına adsorpsiyon, karbodiimitle aktifleştirilerek kovalent bağlanma ve siyanürik klorürle aktifleştirilerek kovalent bağlanma yöntemleri ile immobilize edilen 50 mg immobilize lakkaz (Fe_3O_4 -CS-L, Fe_3O_4 -CS-EDAC-L ve Fe_3O_4 -CS-SC-L) santrifüj tüpüne alınarak, oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş ve üzerlerine 9,0 mL FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat, pH = 5,0) eklenerek, tüp çalkalayıcısında 1 dakika karıştırılmış ve tampon çözelti ortamında termal dengeye getirilmiştir. Bu süre sonunda tampon çözelti uzaklaştırılmıştır.

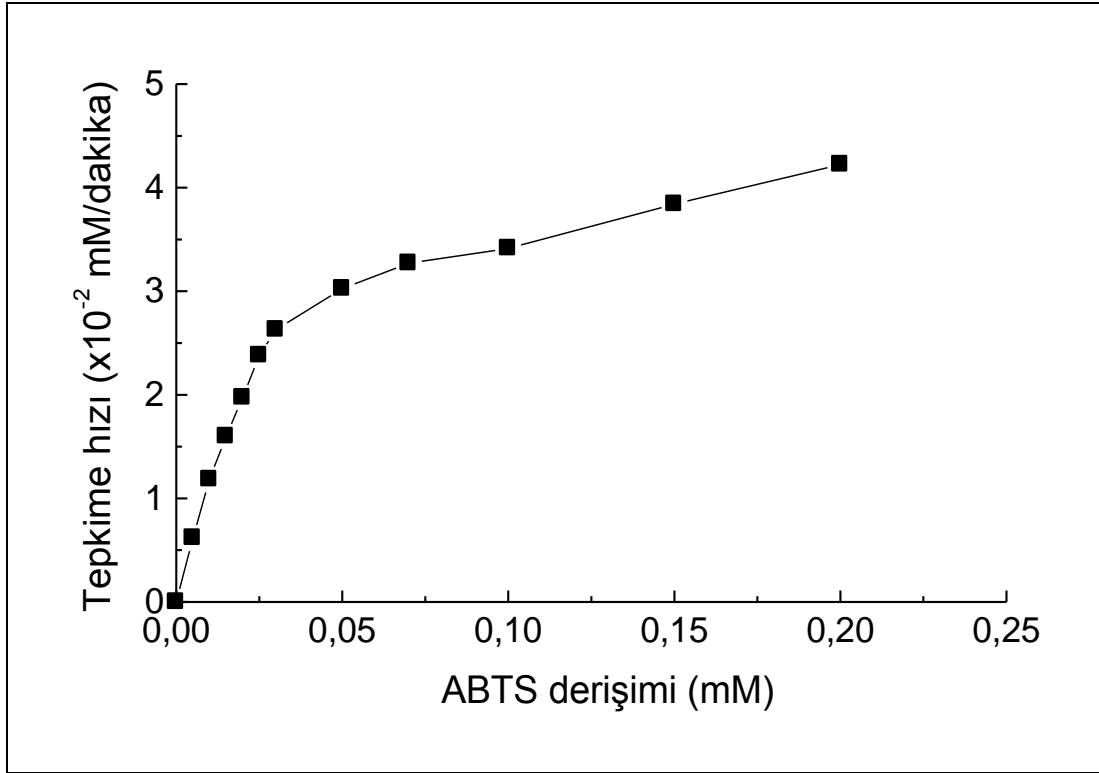
İmmobilize lakkaz aktifliğinin tayini için, her bir örnek üzerine 9,0 mL FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat, pH = 5,0) ve 1,0 mL ABTS çözeltisi (0,25 mM) eklenerek tepkime başlatılmıştır. 1 dakika süresince tüp çalkalayıcısında karıştırıldıktan sonra, Fe_3O_4 -CS-L, Fe_3O_4 -CS-EDAC-L ve Fe_3O_4 -CS-SC-L sistemleri mıknatısla toplanmış ve oluşan yeşil renkli çözeltinin absorbansı UV-vis spektrofotometresi ile 414 nm' de ölçülmüştür. İmmobilize lakkazların aktiflik tayinindeki işlem basamakları Şekil 3.7' de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkazların aktiflik tayinindeki işlem basamakları

3.7. Substrat Değişimi ile Tepkime Hızının Değişimi

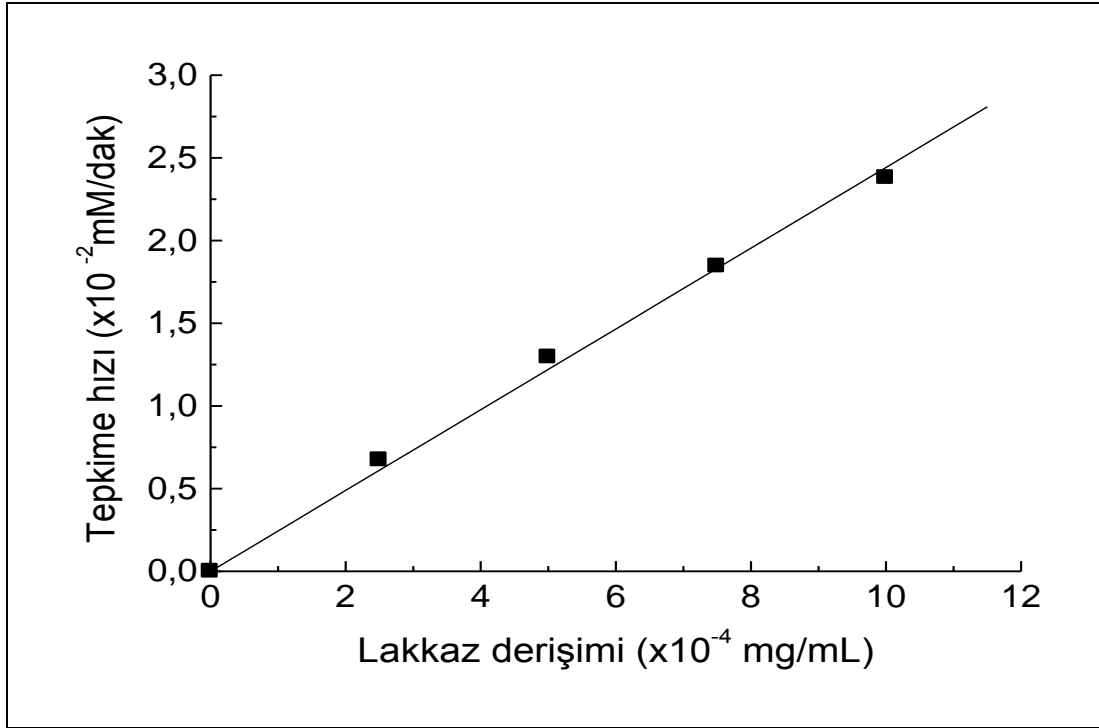
ABTS substratı değişiminin enzimatik tepkime hızına etkisinin incelenmesi amacıyla, 0,05; 0,10; 0,20; 0,25; 0,30; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50 ve 2,00 mM ABTS çözeltileri hazırlanmış ve lakkaz aktifliği tayin edilmiştir. Tepkime hızının ABTS derişimi ile değişimi Şekil 3.8' de gösterilmiştir.



şekil 3.8. Substrat derişimi ile tepkime hızının değişimi

3.8. Lakkaz Derişimi ile Tepkime Hızının Değişimi

Enzimatik tepkime hızının lakkaz derişimi ile değişiminin incelenmesi amacıyla, 0,025; 0,050; 0,075 ve 0,100 mg/mL' lik lakkaz çözeltileri hazırlanmış ve lakkaz aktifliği tayin edilmiştir. Tepkime hızının lakkaz derişimi ile değişimi şekil 3.9' da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Lakkaz derişimi ile tepkime hızının değişimi

3.9. Lakkaz Aktifliğine pH Etkisi

3.9.1. Serbest lakkaz aktifliğine pH etkisi

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

3.9.2. İmmobilize lakkaz aktifliğine pH etkisi

Fe₃O₄-CS-L, Fe₃O₄-CS-EDAC-L, Fe₃O₄-CS-SC-L aktifliğine pH etkisi, pH 2,5-6,5 aralığında incelenmiştir. Ortam pH'ının pH = 2,5' e ayarlanması için 0,1 M fosfat tamponu, pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 ve 6,5' e ayarlanması

için 0,1 M fosfat/0,2 M sitrat tampon çözeltileri kullanılmış ve lakkaz aktifliği tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 25°C' de sabit tutulmuştur.

3.10. Lakkaz Aktifliğine Sıcaklık Etkisi

3.10.1. Serbest lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine sıcaklığın etkisi, farklı sıcaklıklarda (10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C ve 65°C), her bir sıcaklık için lakkaz aktifliğinin tayin edilmesi ile incelenmiştir. Tepkime süresince ortamın pH' sı, FST (0,1 M fosfat/0,2 M sitrat) ile pH = 5,0' te sabit tutulmuştur.

3.10.2. İmmobilize lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi

Fe₃O₄-CS-L, Fe₃O₄-CS-EDAC-L, Fe₃O₄-CS-SC-L aktifliğinin sıcaklıkla değişimi; farklı sıcaklıklarda (10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C ve 65°C), her bir sıcaklık için lakkaz aktifliğinin tayin edilmesi ile incelenmiştir. Tepkime süresince ortamın pH' sı, FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) ile pH = 5,0' te sabit tutulmuştur.

3.11. Lakkaz Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

3.11.1. Serbest lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla; pH' sı 5,0 olan FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) ile, 0,1 mg/mL' lik lakkaz çözeltisi hazırlanarak, bu çözelti 4°C' de saklanmış ve lakkaz aktifliği 30 gün süresince belirli aralıklarla tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 25°C' de ve ortam pH' sı FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) ile pH = 5,0' te sabit tutulmuştur.

3.11.2. İmmobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Fe_3O_4 -CS-L, Fe_3O_4 -CS-EDAC-L, Fe_3O_4 -CS-SC-L aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla; immobilize lakkazlar, 30 gün boyunca üzerlerindeki FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat, pH = 5,0) uzaklaştırılarak fakat kurutulmadan 4°C' de saklanmış ve aktiflikleri belirli aralıklarla tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 25°C' de ve ortam pH' sı FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) ile pH = 5,0' te sabit tutulmuştur.

3.12. Lakkaz Aktifliğine Substrat Değişiminin Etkisi

3.12.1. Serbest lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisini incelemek amacıyla, 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 ve 0,25 mM ABTS çözeltileri hazırlanmış ve lakkaz aktifliği tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 25°C' de ve ortam pH' sı FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) ile pH = 5,0' te sabit tutulmuştur.

3.12.2. İmmobilize lakkaz aktifliğine substrat değişiminin etkisi

Fe_3O_4 -CS-L, Fe_3O_4 -CS-EDAC-L, Fe_3O_4 -CS-SC-L aktifliğine substrat değişiminin etkisini incelemek amacıyla, 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 ve 0,25 mM ABTS çözeltileri hazırlanmış ve lakkaz aktifliği tayin edilmiştir. Tepkime süresince sıcaklık 25°C' de ve ortam pH'sı FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) ile pH = 5,0' te sabit tutulmuştur.

3.13. İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Kullanım Sayısının Etkisi

Fe_3O_4 -CS-L, Fe_3O_4 -CS-EDAC-L, Fe_3O_4 -CS-SC-L aktifliğine kullanım sayısının etkisinin incelenmesi amacıyla, immobilize lakkazlar aynı gün içerisinde art arda 30 kez ABTS substratına karşı kullanılmış ve lakkaz aktifliği tayin edilmiştir. Her bir aktiflik tayini sonrasında immobilize lakkazlar,

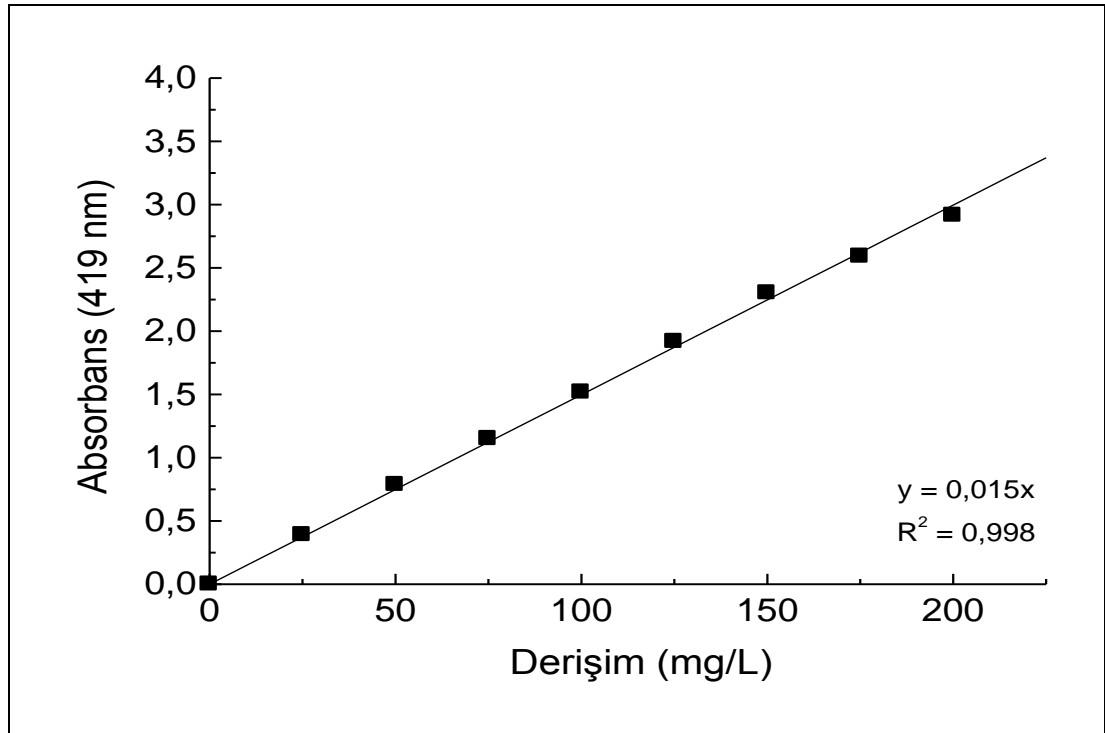
FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat, pH 5,0) ile yıkanmıştır. Tepkime süresince sıcaklık 25°C ve ortam FST ile pH = 5,0' te sabit tutulmuştur.

3.14. Fe₃O₄-Kitosan Nanoparçacıklarına Boyarmadde Adsorpsiyonu

Çalışmanın bu kısmında, manyetik Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının özellikle tekstil endüstrisinde kullanılan Reaktif Sarı 145 (RY145) boyarmaddesinin sulu ortamdan adsorpsiyonu araştırılmıştır.

3.14.1. Reaktif Sarı 145 kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

RY145 boyarmaddesinin deiyonize suda 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 ve 200 mg/L' lik sulu çözeltileri hazırlanmış ve absorbansları UV-vis spektrofotometresi ile boyarmaddenin maksimum absorbans dalga boyu olan 419 nm' de ölçülmüştür. RY145 derişimi ile absorbans değişimini gösteren kalibrasyon grafiği Şekil 3.10' da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. RY145 kalibrasyon grafiği

3.14.2. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna temas süresinin etkisi

50 mg Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına 25 mL RY145 (100 mg/L; pH 3,0) çözeltisi eklenerek (pH ayarlaması 0,03 M asetat tamponu ile yapılmıştır), sistem ultrasonik banyoda 5 dakika dağıtılmış ve ardından 25°C' deki çalkalamalı su banyosunda 250 rpm' de çalkalanmıştır. Adsorpsiyonun başlatılmasının 10., 20., 30., 40., 50., 60., 90., 120. ve 180. dakikalarında, Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları mıknatısla toplanarak, çözeltilerin absorpsiyon boyarmaddenin maksimum absorpsiyon dalga boyunda ölçülmüştür.

3.14.3. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna pH etkisi

50 mg Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına pH' sı 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 ve 11,0 olan (pH≤5,0 için 0,03 M asetat tamponu, pH>5,0 için 0,03 M fosfat tamponu ile pH ayarlaması yapılmıştır) 25 mL RY145 (100 mg/L) çözeltisi eklenerek sistem ultrasonik banyoda 5 dakika dağıtılmış ve 25°C' deki çalkalamalı su banyosunda 250 rpm' de çalkalanmıştır. 90. dakika sonunda, Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları mıknatısla toplanmış ve çözeltilerin absorpsiyon boyarmaddenin maksimum absorpsiyon dalga boyunda ölçülmüştür.

3.14.4. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi

50 mg Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına pH' sı 3,0 olan 50; 75; 100; 125; 150; 175 ve 200 mg/L' lik 25 mL RY145 (pH 3,0) çözeltisi eklenerek, sistemler ultrasonik banyoda 5 dakika dağıtılmış ve ardından 25°C' deki çalkalamalı su banyosunda 250 rpm' de çalkalanmıştır. 90. dakika sonunda, Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları mıknatısla toplanmış ve boyarmadde çözeltilerin absorpsiyon boyarmaddenin maksimum absorpsiyon dalga boyunda ölçülmüştür.

boyarmaddenin maksimum absorbans dalga boyunda ölçülmüştür. Aynı işlemler 35°C ve 45°C' de yürütülmüştür.

3.14.5. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna tuz derişiminin etkisi

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonuna tuz derişiminin etkisi, KCl kullanılarak incelenmiştir [24]. Bu amaçla, 25 mL RY145 (100 mg/L, pH 3,0) çözeltisinde, KCl derişimi 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 ve 50,0 mM olacak şekilde KCl çözülmüştür. Bu çözeltiler, 50 mg Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına ayrı ayrı eklenmiş ve karışımlar ultrasonik banyoda 5 dakika dağıtıldıktan sonra, 25°C' deki çalkalamalı su banyosunda 250 rpm' de çalkalanmıştır. 90. dakika sonunda, Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları mıknatısla toplanarak, çözeltilerin absorbansı boyarmaddenin maksimum absorbans dalga boyunda ölçülmüştür.

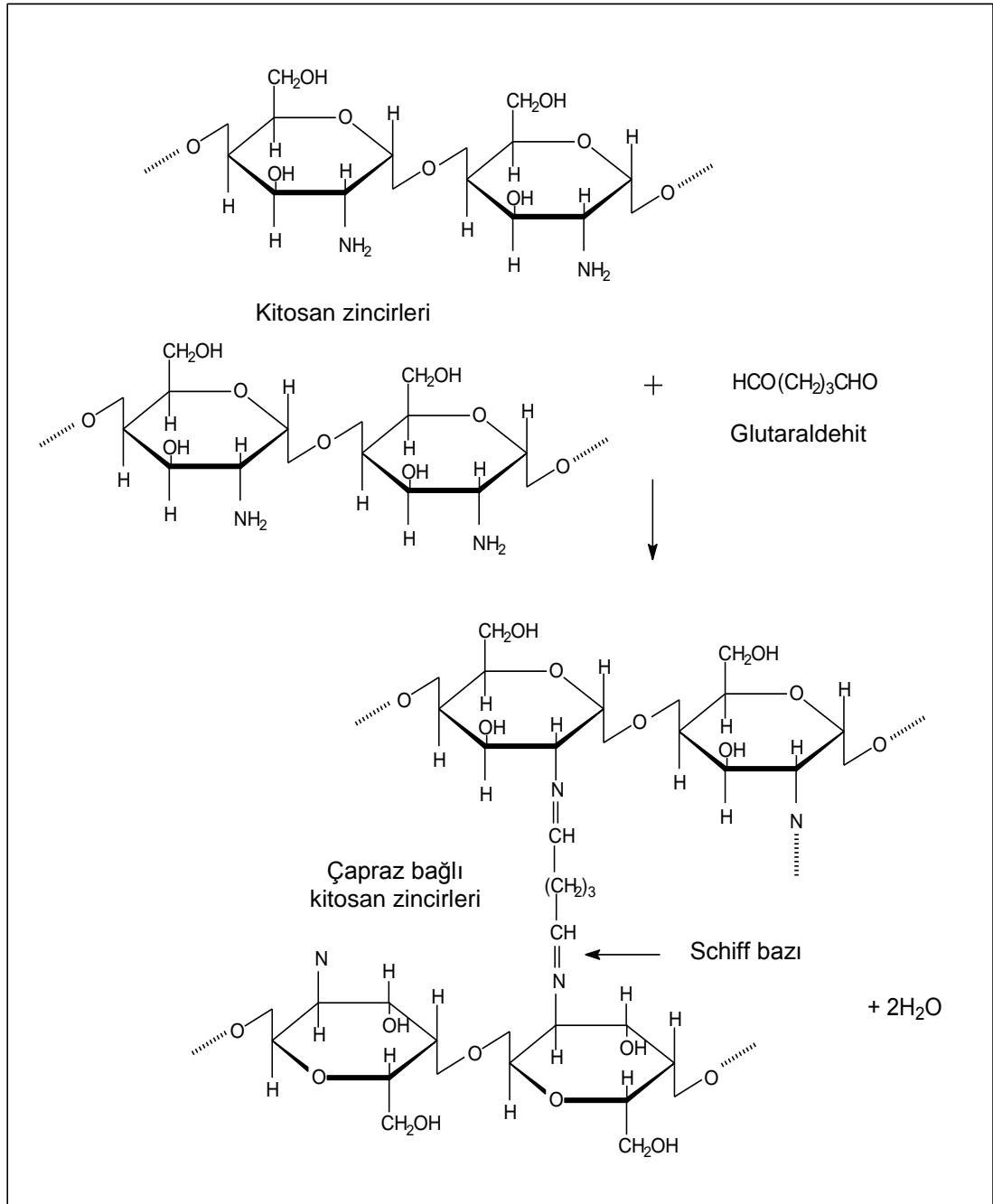
3.14.6. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarından Reaktif Sarı 145' in desorpsiyonu

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarından RY145' in desorpsiyonunun incelenmesi amacıyla, 90 dakika süresince RY145 adsorplatılmış 50 mg Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları kullanılmıştır. Bu nanoparçacıklara 2,5; 5,0; 7,5 ve 10,0 mM' lık 25 mL NaOH çözeltisi eklenerek desorpsiyon başlatılmış ve bu sistemler 25°C' deki çalkalamalı su banyosunda 250 rpm' de 90 dakika çalkalanmıştır. RY145' in Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarından desorplanması sonucunda renklenen çözeltilerin absorbansı, boyarmaddenin maksimum absorbans dalga boyunda ölçülmüştür.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Fe₃O₄-Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi

Bu çalışmada; manyetik özellik gösteren Fe₃O₄ nanoparçacıklarının, enzim immobilizasyonunda ve boyarmadde adsorpsiyonunda etkili bir şekilde kullanılmalarını sağlamak amacıyla, bu nanoparçacıkların yüzeyi kitosanla kaplanarak fonksiyonel hale getirilmiştir. Fe₃O₄ nanoparçacıkları, kitosan zincirlerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanarak bu nanoparçacıkların yüzeyini sarmasıyla kaplanmaktadır. Şekil 4.1' de kitosanın glutaraldehit ile çapraz bağlanması gösterilmiştir. Çapraz bağlanma sırasında, glutaraldehitin aldehit grupları ile kitosanın amin grupları arasındaki tepkime sonucunda su açığa çıkmakta ve Schiff bazı (-C=N-) oluşmaktadır.



Şekil 4.1. Kitosanın glutaraldehitle çapraz bağlanması

4.2. Fe₃O₄ ve Fe₃O₄-Kitosan Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

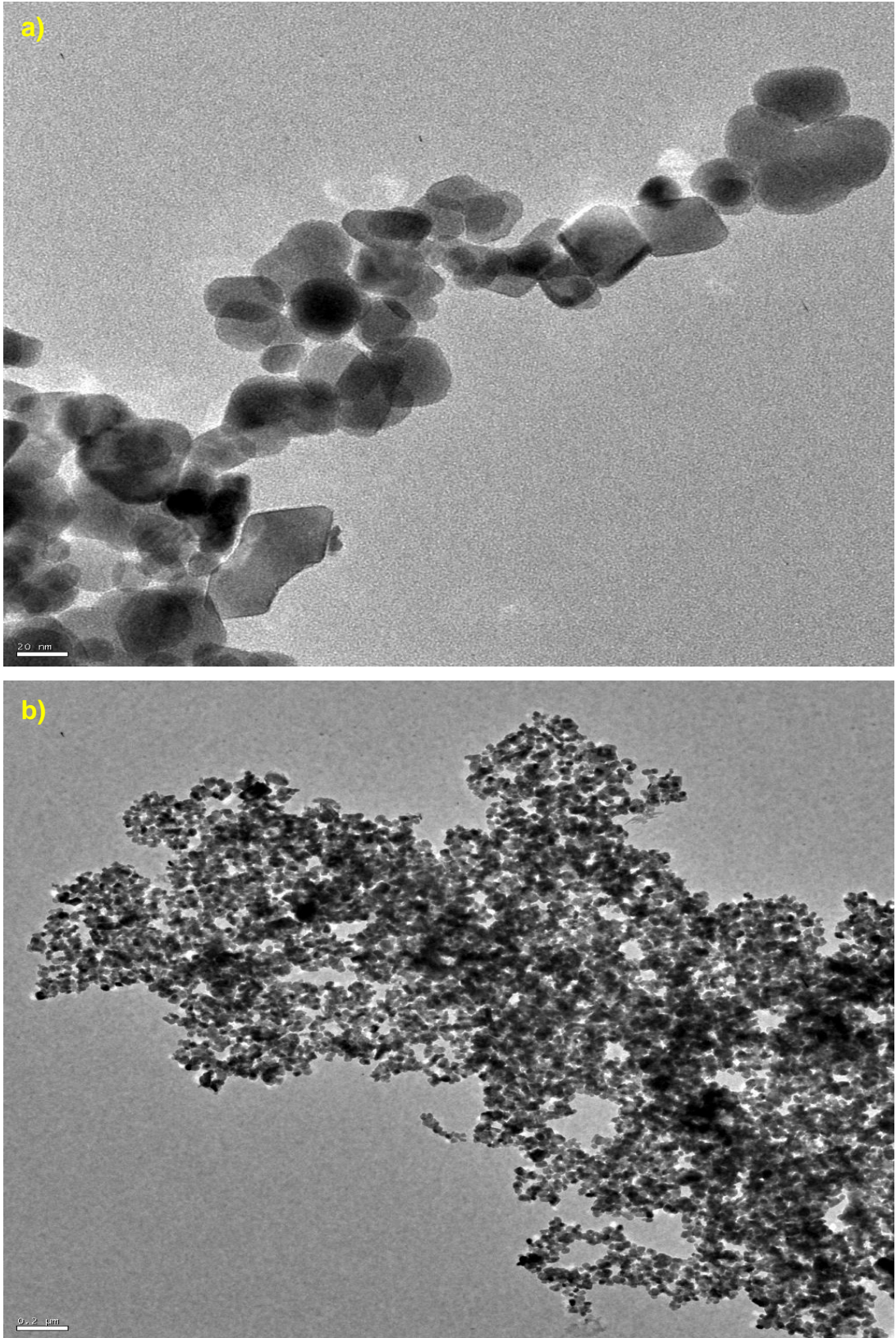
4.2.1. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)

Fe₃O₄ nanoparçacıklarının TEM görüntüleri Resim 4.1 ve Resim 4.2' de; Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının TEM görüntüleri ise Resim 4.3 ve Resim 4.4' te gösterilmiştir.

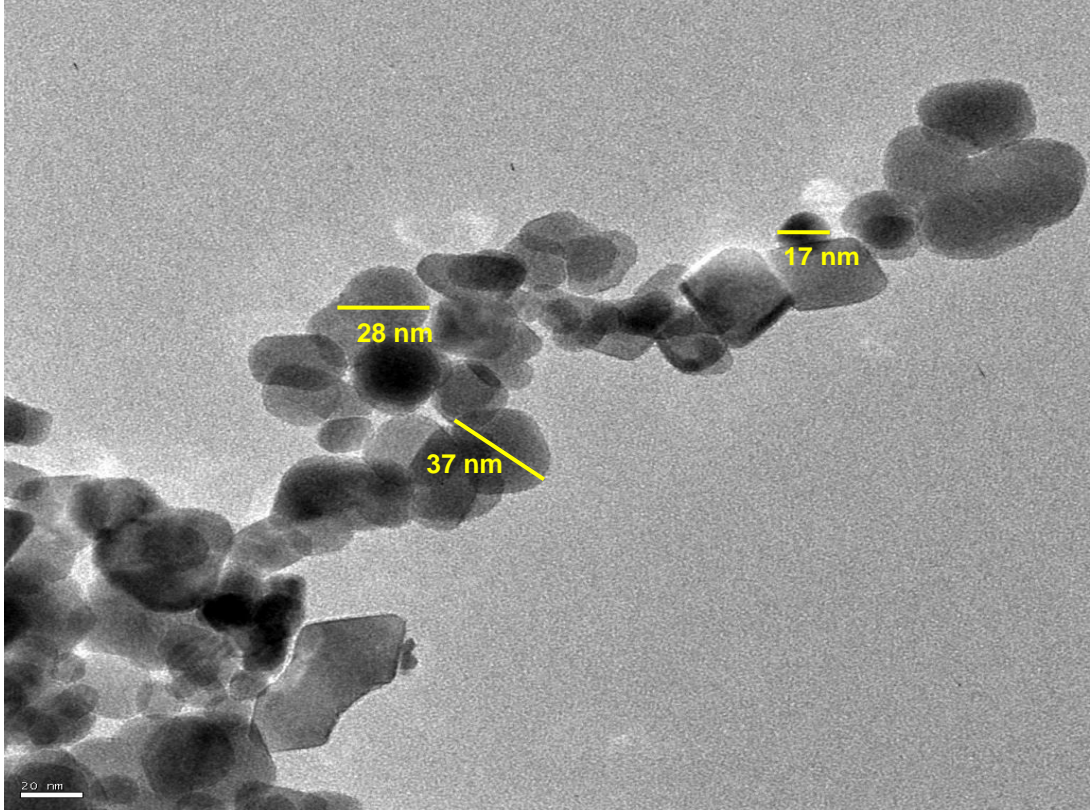
Resim 4.1. a' daki Fe₃O₄ nanoparçacıklarının 20 nm skalasında çekilmiş TEM görüntüsünde, 3 farklı Fe₃O₄ nanoparçacığının boyutu 17 nm, 28 nm ve 37 nm olarak tespit edilmiş ve Resim 4.2' de bu nanoparçacıkların boyutunu gösteren TEM görüntüsü verilmiştir. Resim 4.1. b' de görülen 0,2 µm skalasında TEM görüntüsünde, bu manyetik nanoparçacıkların biraraya gelmiş halde oldukları görülmektedir. Parçacıkların biraraya gelmelerinin, birbirleri arasındaki manyetik-dipol etkileşimlerden ve parçacık boyutlarının çok küçük, yüzey enerjilerinin çok büyük olmasından kaynaklandığı söylenebilir [21,116].

Resim 4.3. a, b, c ve d' deki Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına ait farklı skalalardaki TEM görüntülerinde, kitosanın Fe₃O₄ nanoparçacıklarının tüm yüzeyini ince bir tabaka halinde kapladığı görülmektedir. Kitosan kaplı bu manyetik nanoparçacıkların boyutlarını gösteren TEM görüntüleri, Resim 4.4. a, b ve c' de verilmiştir. Resim 4.4. a' da, boyutları 23 ve 34 nm olan iki farklı Fe₃O₄ nanoparçacığının üzerindeki kitosanla birlikte boyutu sırasıyla 27 nm ve 41 nm ölçülmüştür. Ayrıca, Resim 4.4. a, b ve c' deki görüntülerde, Fe₃O₄ nanoparçacığını çevreleyen kitosan tabakasının farklı bölgelerdeki kalınlığının 1,0 nm ile 4,8 nm arasında değiştiği tespit edilmiştir.

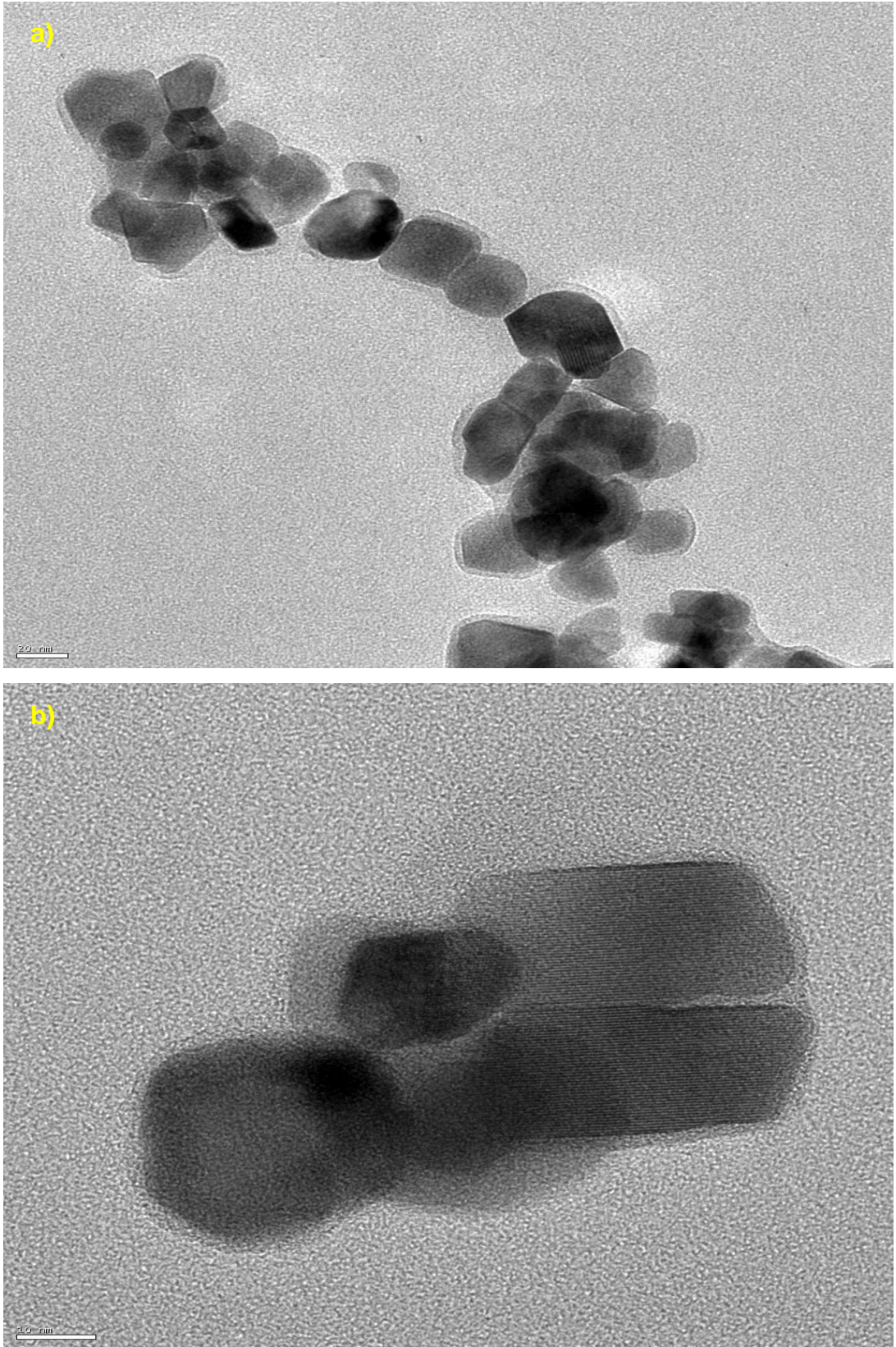
Resim 4.4. b' de görülen Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının 10 nm skalasındaki TEM görüntüsünde ise, çember içine alınmış bölgelerde, nanoparçacıkların kristal düzenlenimi görülebilmektedir.



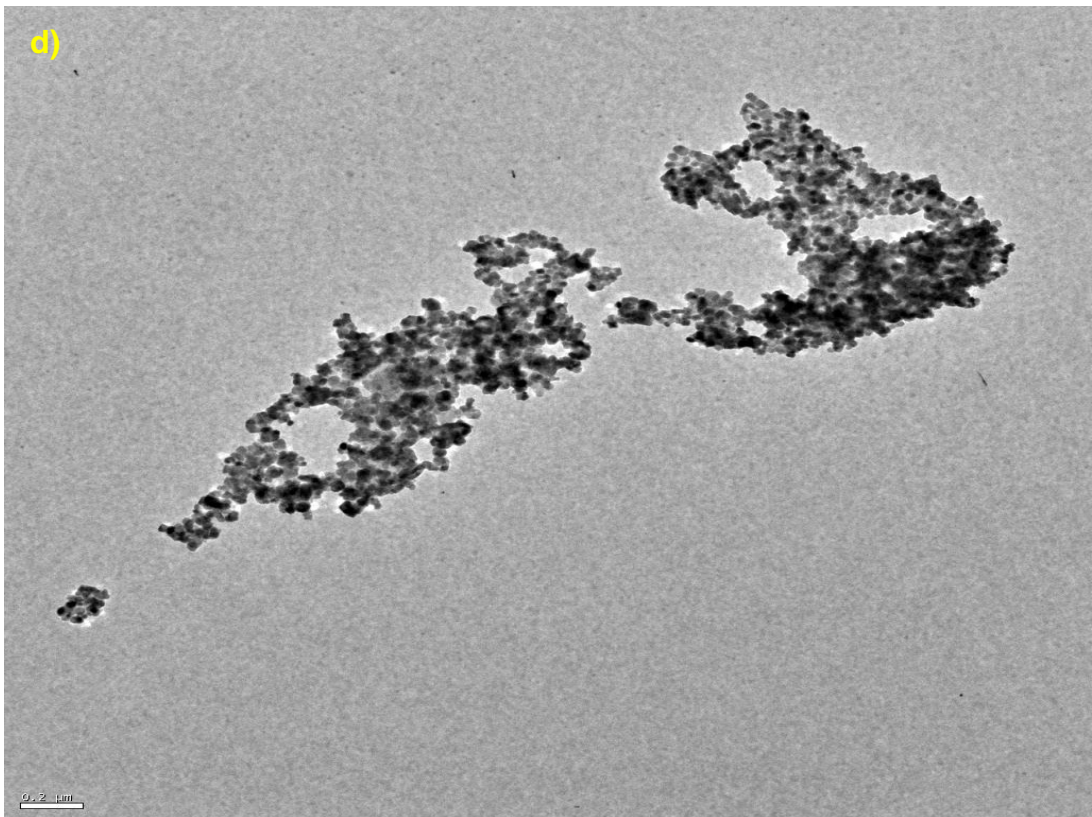
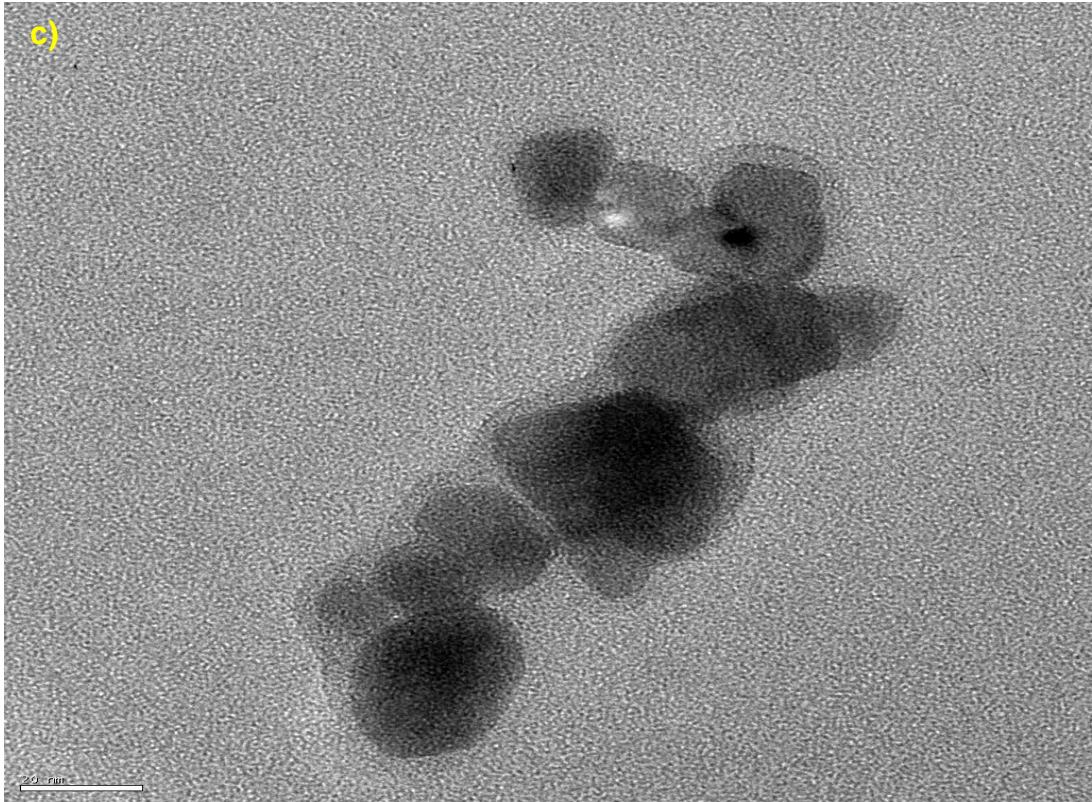
Resim 4.1. Fe_3O_4 nanoparçacıklarının TEM görüntüleri
a) 20 nm b) 0,2 μm



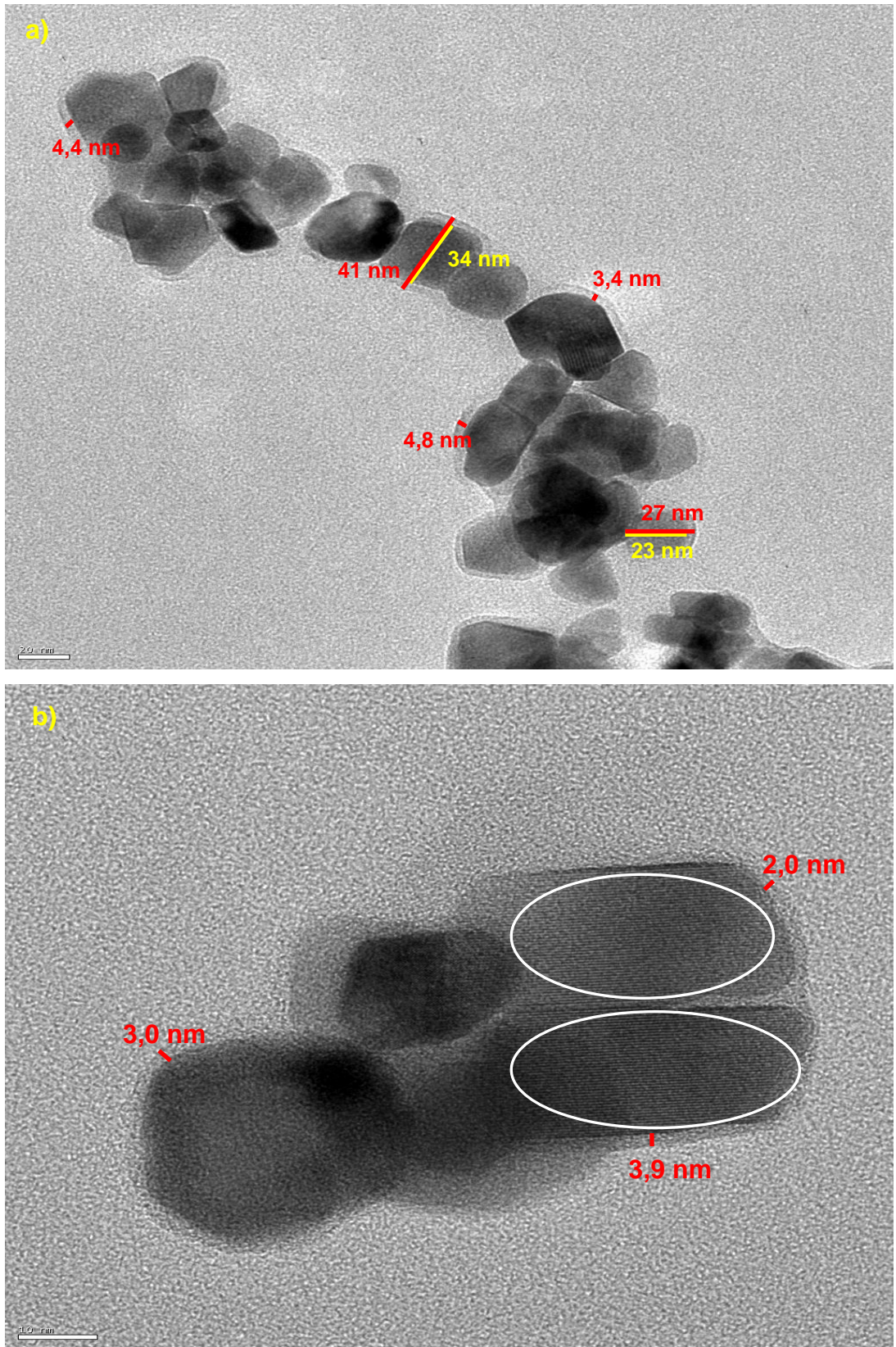
Resim 4.2. Resim 4.1. a' daki Fe_3O_4 nanoparçacıklarının boyutlarını gösteren TEM görüntüsü



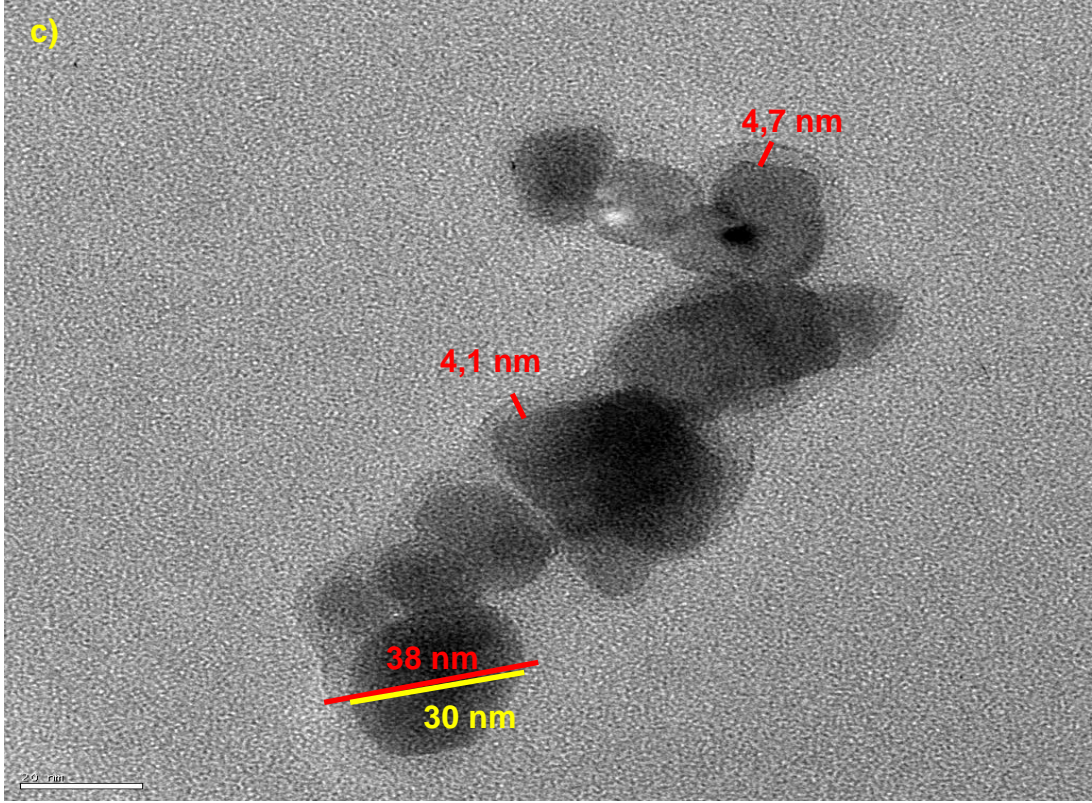
Resim 4.3. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının TEM görüntüleri
a) 20 nm b) 10 nm c) 20 nm d) 0,2 µm



Resim 4.3 (Devam) Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının TEM görüntüleri
a) 20 nm b) 10 nm c) 20 nm d) 0,2 μm



Resim 4.4. Resim 4.3. a, b ve c' deki Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının boyutlarını gösteren TEM görüntüleri a) 20 nm b) 10 nm c) 20 nm



Resim 4.4 (Devam) Resim 4.3. a, b ve c' deki Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının boyutlarını gösteren TEM görüntüleri
a) 20 nm b)10 nm c) 20 nm

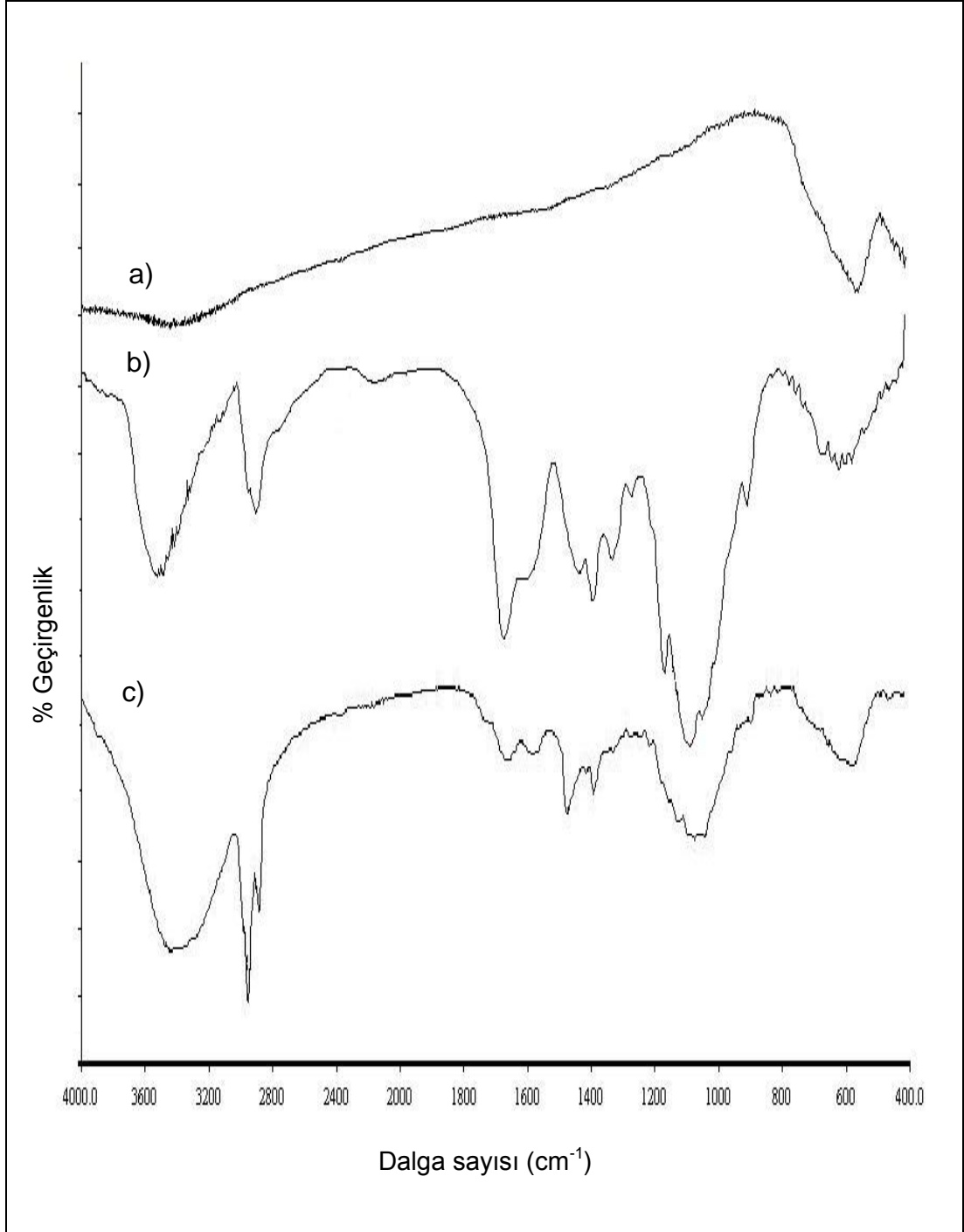
4.2.2. Fourier dönüümlü infrared spektroskopisi (FT-IR)

Fe_3O_4 , kitosan (CS) ve Fe_3O_4 -CS' in FT-IR spektrumları Şekil 4.2' de gösterilmiştir.

Fe_3O_4 nanoparçacıklarının Şekil 4.2. a' da verilen FT-IR spektrumunda, 550 cm^{-1} de Fe-O bağına ait gerilme titreşimi gözlenmiştir.

Kitosanın Şekil 4.2. b' de gösterilen FT-IR spektrumunda, $3650\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde -O-H ve N-H, 2870 cm^{-1} de C-H, 1659 cm^{-1} de deasetillenmemiş kısımdaki C=O ve 1074 cm^{-1} de C-O-C gerilme titreşim bandları ortaya çıkmıştır.

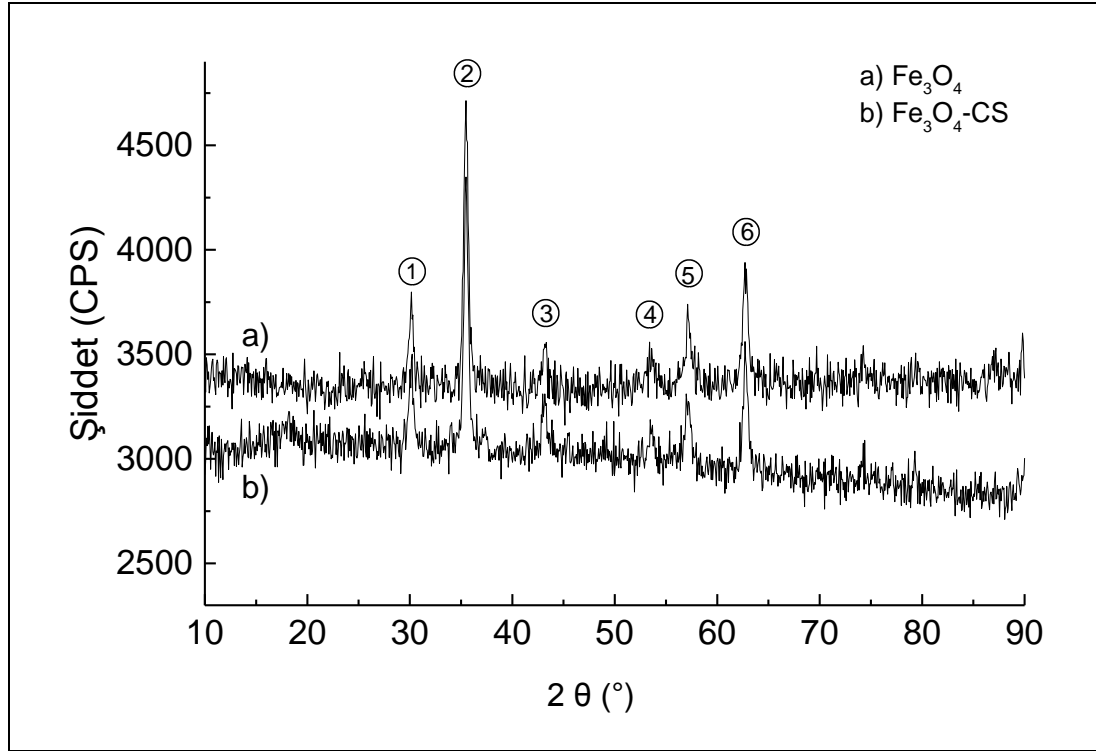
Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının Şekil 4.2. c' de gösterilen FT-IR spektrumunda, 566 cm^{-1} de ortaya çıkan Fe-O gerilme titreşimi, manyetik bileşenin yapıdaki varlığını göstermiştir. Ayrıca 3411 cm^{-1} de O-H, 2922 cm^{-1} ve 2852 cm^{-1} de C-H ve 1061 cm^{-1} de C-O-C gerilme titreşim bandları, manyetik nanoparçacıkların yapısında kitosanın bulunduğunu göstermiştir. Kitosanın amin gruplarının glutaraldehitte çapraz bağlanmasıyla oluşan Schiff bazına ait -C=N- gerilme titreşim bandı 1648 cm^{-1} de gözlenmiştir. Örneklerin FT-IR spektrumundan elde edilen bilgilerin, kitosan ve glutaraldehitte çapraz bağlanarak hazırlanmış manyetik ve manyetik olmayan kitosan mikroküreler için literatürde belirtilenler sonuçlarla uyumlu olduğu tespit edilmiştir [102,117].



Şekil 4.2. Fe₃O₄, CS ve Fe₃O₄-CS' in FT-IR spektrumları
a) Fe₃O₄ b) CS c) Fe₃O₄-CS

4.2.3. X-ışını kırınımı yöntemi (XRD)

Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının x-ışını kırınım desenleri Şekil 4.3' te gösterilmiştir.



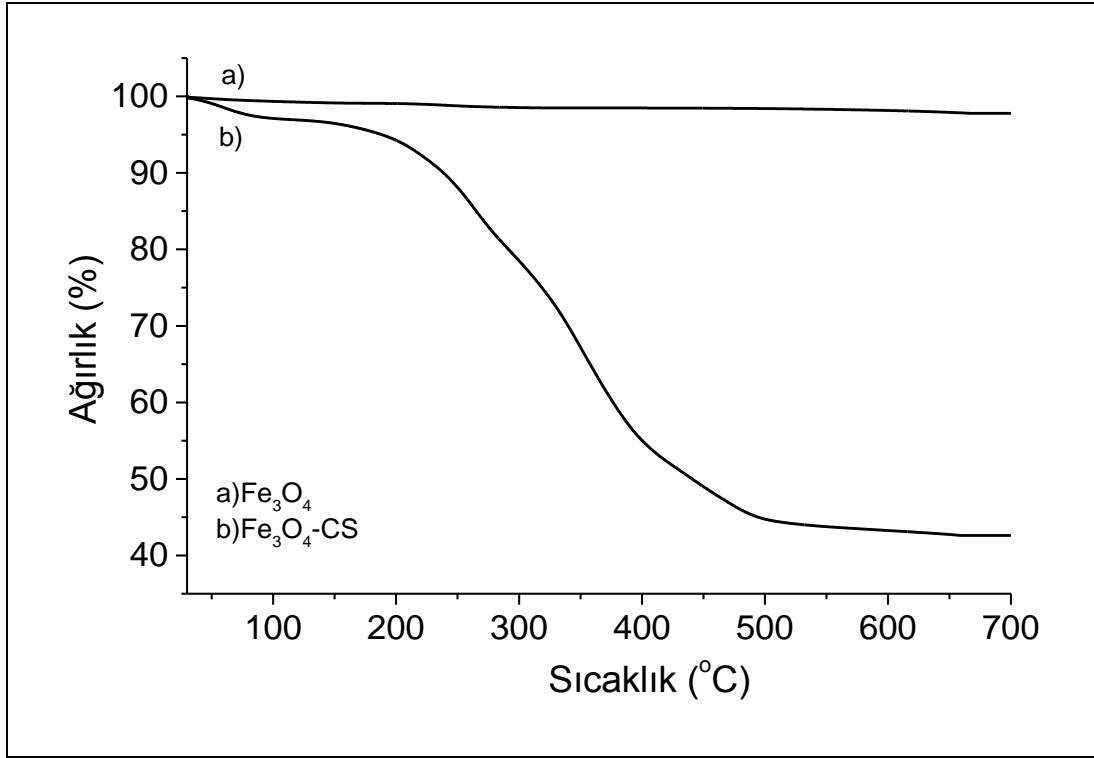
Şekil 4.3. Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının x-ışını kırınım desenleri

Fe_3O_4 nanoparçacıklarının x-ışını kırınım deseninde, $2\theta = 30,18^\circ(1)$, $35,47^\circ(2)$, $43,30^\circ(3)$, $53,42^\circ(4)$, $57,18^\circ(5)$ ve $62,70^\circ(6)$ ' de 6 adet pik gözlenmiştir. Cihazının veri tabanında bulunan ICDD veri kartlarının taratılması ile, Fe_3O_4 nanoparçacıklarının kırılma açılarının, kart numarası 65-3107 olan Fe_3O_4 ' in kırınım desenindeki açılara uyduğu tespit edilmiştir. X-ışını toz kırınımı ile incelenen bir örneğin parçacık boyutu, kırınım desenindeki en şiddetli pikin yarı genişliği kullanılarak hesaplanabilir [118]. Fe_3O_4 nanoparçacıklarının parçacık boyutu, bu nanoparçacıkların kırınım deseninde şiddeti maksimum olan ve $2\theta = 35,47^\circ$ ' de gözlenen pik kullanılarak (2 numaralı pik, pik yarı genişliği (β) = $9,07 \times 10^{-3}$ radyan), Eş. 2.17' de verilen Debye-Scherrer eşitliğinden, 16 nm olarak hesaplanmıştır.

Fe_3O_4 nanoparçacıklarının x-ışını kırınım deseninde tespit edilen 6 pik, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının kırınım deseninde de tespit edilmiştir. Bu sonuç, Fe_3O_4 nanoparçacıklarının kitosanla kaplanmasının Fe_3O_4 ' in kristalin yapısını değişime uğratmadığını, dolayısıyla Fe_3O_4 ' in spinel yapısını değiştirmedini göstermiştir. Literatürde de benzer sonuçlara rastlanmış ve oleik asit-oleil amin yüzey aktif maddesi ile sentezlenen [119] ve alfa-ketoglutarik asit kitosan [74] ve kitosan [113] ile kaplanan Fe_3O_4 nanoparçacıklarının kristal yapısının, saf Fe_3O_4 nanoparçacıklarınıninkine göre değişmediği tespit edilmiştir. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının parçacık boyutu ise, yine bu nanoparçacıkların kırınım deseninde şiddeti maksimum olan, $2\theta=35,44^\circ$ de gözlenen pik kullanılarak (pik yarı genişliği (FWHM)= $8,20 \times 10^{-3}$ radyan), Eş. 2.17' ye göre 18 nm olarak hesaplanmıştır. Bu durumda, yüzeydeki kitosan kaplama kalınlığı 1 nm olarak bulunmuştur. XRD analizleri ve TEM görüntülerinden hesaplanan parçacık boyutlarından, yüzeyin yaklaşık 1,0-4,8 nm kalınlıkta kitosanla kaplandığı belirlenmiştir.

4.2.4. Termogravimetrik analiz (TGA)

Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının TGA termogramları Şekil 4.4' te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Fe₃O₄ ve Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının TGA termogramları

Fe₃O₄ nanoparçacıkları 200°C olduğunda, başlangıç ağırlıklarının %0,8' ini kaybetmiş ve sıcaklığın 700°C' ye ulaşması sonucunda, ağırlıkta fazlaca bir değişme meydana gelmemiştir. 200°C' ye kadar olan ısıtma neticesinde ağırlıkta meydana gelen kaybın, nanoparçacıklara adsorplanan suyun uzaklaşmasından kaynaklandığı söylenebilir.

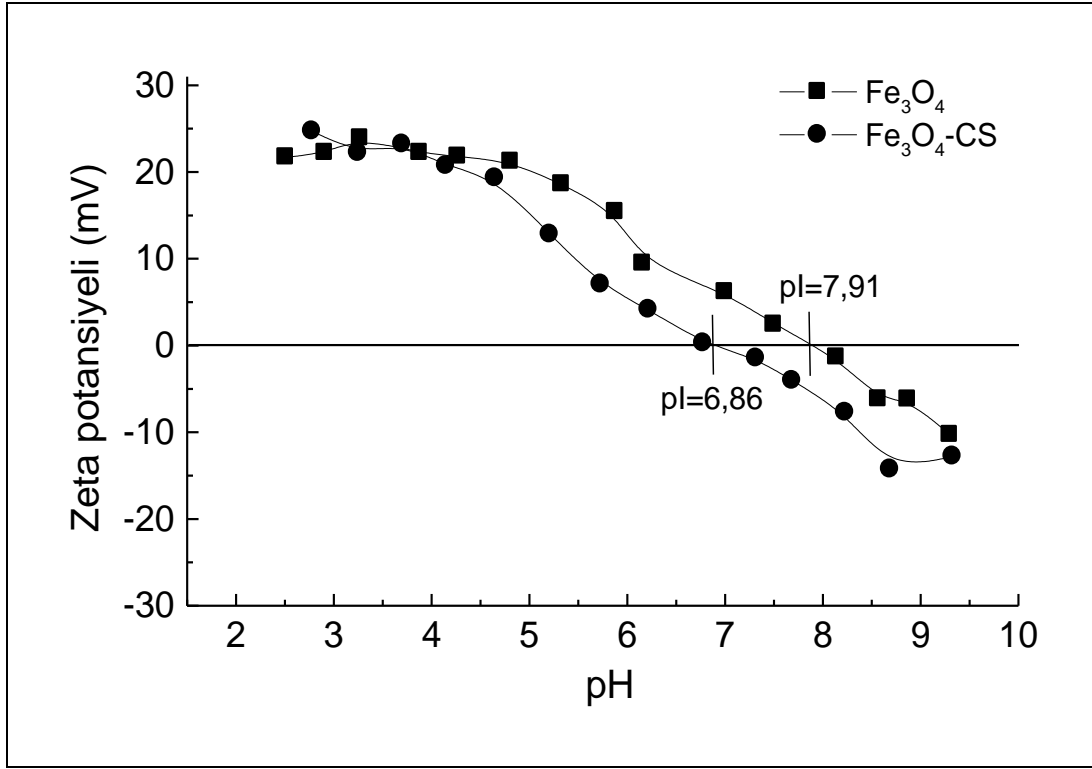
Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları için sıcaklık 200°C' ye ulaştığında, ağırlıkta %5,7' lik bir kayıp meydana gelmiştir. Ağırlıktaki bu azalmanın da, bu nanoparçacıklara adsorplanan suyun uzaklaşması nedeniyle meydana geldiği ve kitosanın hidrofilik özelliği nedeniyle bu nanoparçacıklara adsorplanan su miktarının daha fazla olduğu söylenilebilir. Bu nanoparçacıkların termogramında Fe₃O₄ nanoparçacıklarında gözlenmeyen ve 200°C' den 550°C' lere kadar süren ağırlık kaybı, kitosanın bu sıcaklık aralığında bozunmasından kaynaklanmaktadır ve 550°C' den sonra ağırlıkta önemsenecek bir değişme meydana gelmediği görülmektedir. Sıcaklık 700°C' ye ulaştığında ise, Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları başlangıç

ağırlığının %57,4' ünü kaybetmişlerdir. Bu bilgilere dayanarak, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının kütlece %51,7 kitosan, %42,6 Fe_3O_4 içerdiği söylenebilir.

Literatürde, 30°C' den 700°C' ye kadar TGA ile termogramı alınan ve glutaraldehitle çapraz bağlanarak üretilen Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarının kitosan içeriğinin %62,2 olduğu [113] ve ketoglutarik asit bağlı Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarının %61,5 ketoglutarik asit-kitosan içerdiği bildirilmiştir [74]. Yine 700°C' ye kadar termogramı alınan tripolifosfat ile çapraz bağlanarak üretilmiş Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarının Fe_3O_4 içeriği %34 olarak bildirilmiştir [21].

4.2.5. ζ -(Zeta) potansiyel analizi

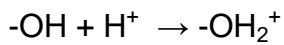
Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının farklı pH' lardaki yüzey potansiyelinin ve yükünün belirlenebilmesi için, bu nanoparçacıkların ζ -zeta potansiyelleri pH 2,51-9,33 aralığında ölçülmüş ve pH' ya karşı nanoparçacıkların ζ -potansiyellerinin değişim grafiği Şekil 4.5' te gösterilmiştir.



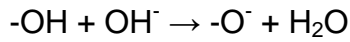
Şekil 4.5. Fe₃O₄ ve Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının ζ-potansiyelinin pH ile değişimi

Fe₃O₄ nanoparçacıkları üzerindeki net yükün sıfır olduğu pH değeri olan izoelektronik nokta (pI), 7,91 olarak tespit edilmiştir. ζ-potansiyelinin, pI değerinin altındaki pH' larda pozitif, üzerindeki pH' larda ise negatif değerlerde olması nedeniyle, bu nanoparçacıkların yüzeyi pH<7,91 olduğunda pozitif, pH>7,91 olduğunda ise negatif yüklüdür.

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının pI değeri ise, Fe₃O₄ nanoparçacıklarınıninkine göre 1,05 birim azalmış ve pI = 6,86 olarak ölçülmüştür. Ortam pH 'sı 6,86' dan küçük olduğunda, Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları yüzeyindeki kitosanın -OH gruplarının protonlanması nedeniyle, aşağıda gösterildiği gibi pozitif yük kazandığı düşünülmektedir.



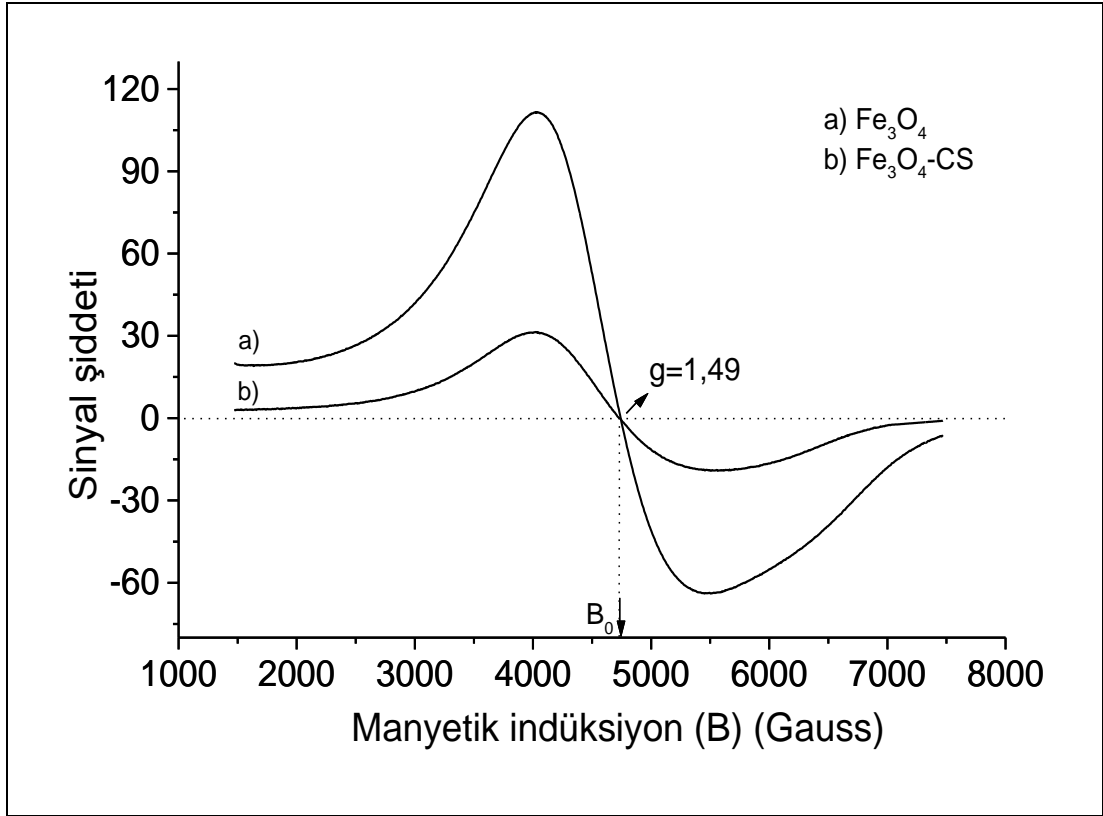
pH = 6,86 olduğunda, Fe₃O₄-CS yüzeyindeki pozitif ve negatif yük yoğunluğunun birbirine eşitlenmesi nedeniyle, bu nanoparçacıkların yüzey potansiyeli 0' a düşmüştür. pH>6,86 olduğunda ise, Fe₃O₄-CS yüzeyindeki -OH grupları ile ortamdaki OH⁻ iyonları arasındaki aşağıda gösterilen etkileşim nedeniyle, bu nanoparçacıkların yüzeyi negatif yüklü hale geldiği söylenebilir.



Literatürde de, çeşitli dispersiyon ortamlarında pI değeri 6,70 olarak ölçülen Fe₃O₄ nanoparçacıkları karboksimetil-kitosanla kaplandığında pI değerinin 5,95' e kaydığı [120] ve pI değeri 7,30 olarak belirlenen Fe₃O₄ nanoparçacıkları sodyum oleatla modifiye edildiğinde bu nanoparçacıkların pI değerinin 4,00' e düştüğü bildirilmiştir [121].

4.2.6. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR)

Fe₃O₄ ve Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının 9,854136 GHz sabit frekansta elde edilen EPR spektrumları Şekil 4.6' da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Fe_3O_4 ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarının EPR spektrumları

Fe_3O_4 ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarının EPR spektrumlarında, belirli bir sinyal şiddetine sahip olan soğurma eğrisinin gözlenmesi, her iki nanoparçacığın da paramanyetik özellik sergilediğini göstermiştir. Kitosanın yapıya dahil olması nedeniyle, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarının gösterdiği sinyal şiddetinin, Fe_3O_4 nanoparçacıklarınıninkine göre azaldığı gözlenmiştir. Bu durumun nedeni, Fe_3O_4 nanoparçacıklarının manyetik açıdan inaktif olan kitosana kaplanmasıyla, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarının birim hacimdeki etkin manyetik moment sayısının azalmasıdır [122,123]. Literatürde de, poli(metilmetakrilat-ko-akrilik asit) içine hapsedilmiş Fe_3O_4 nanoparçacıklarının EPR spektrumundaki sinyal şiddetinin, Fe_3O_4 nanoparçacıklarının sinyal şiddetine göre daha düşük değerde olduğunu gösteren bulgular yer almıştır [124].

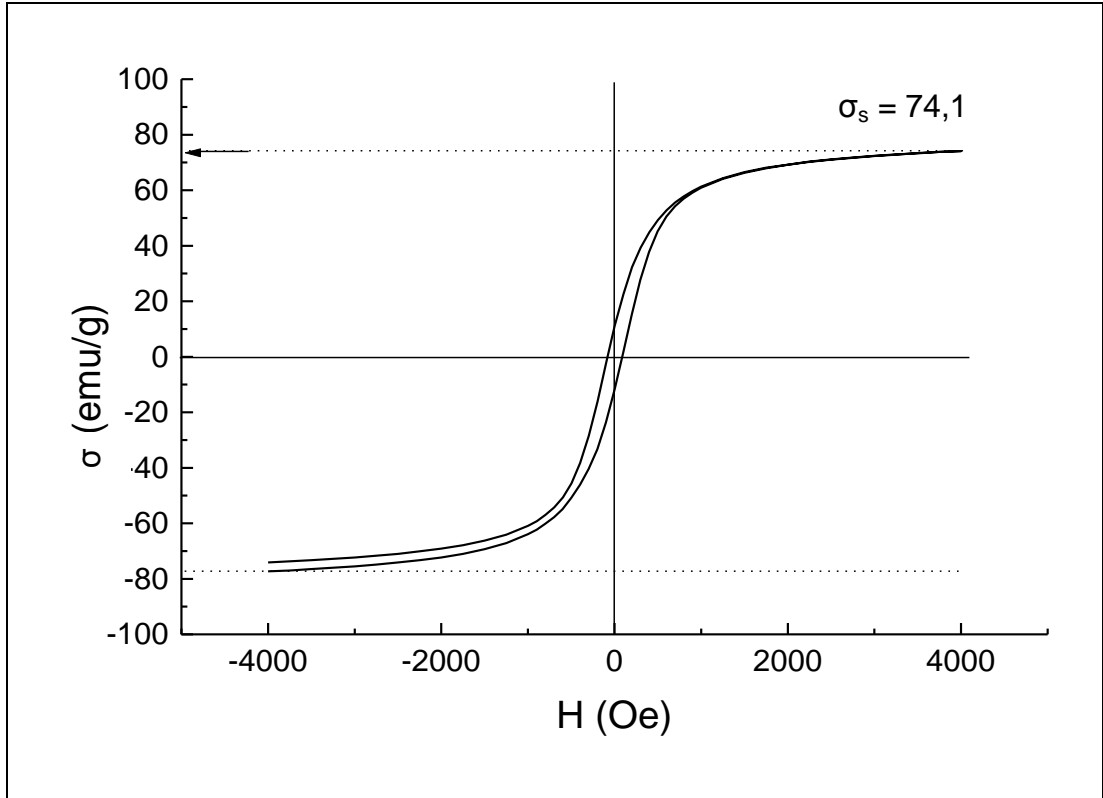
EPR spektrumunda sinyal şiddetinin sıfır olduğu, yani parçacıkların mikrodalga enerjisini maksimum olarak soğurduğu manyetik alan, rezonans alan olarak tanımlanır [125].

Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının EPR spektrumlarında rezonans alan, $B_0 = 4735$ G olarak tespit edilmiştir¹. Bu B_0 değeri kullanılarak, Eş. 2.20' ye göre, her iki nanoparçacığın g değeri 1,49 olarak hesaplanmıştır. g, değeri, her madde için karakteristik bir değer olan spektroskopik yarıлма çarpanıdır. Literatürde, Fe^{3+} katyonu için g değerleri, Fe^{3+} düşük spin kompleksi için 1,4-3,1 aralığında, yüksek spin kompleksi için 2,0-9,7 aralığında verilmektedir [126,127]. Dolayısıyla, bu çalışmada, Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıkları için belirlenen g değerinin, düşük spin Fe^{3+} kompleksi için verilen aralığa girdiği belirlenmiştir. Ayrıca, Fe_3O_4 yüklenmiş manyetik polimerik nanoparçacıkların ve mikrokürelerin EPR spektroskopisi ile incelendiği bazı çalışmalarda da, g değerleri 1,90-2,10 arasında bulunmuştur [125,127].

4.2.7. Titreşimli örnek manyetometrisi (VSM)

Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının manyetik alana (H) karşı kütle mıknatıslanmalarını (σ) gösteren mıknatıslanma eğrileri, sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8' de gösterilmiştir.

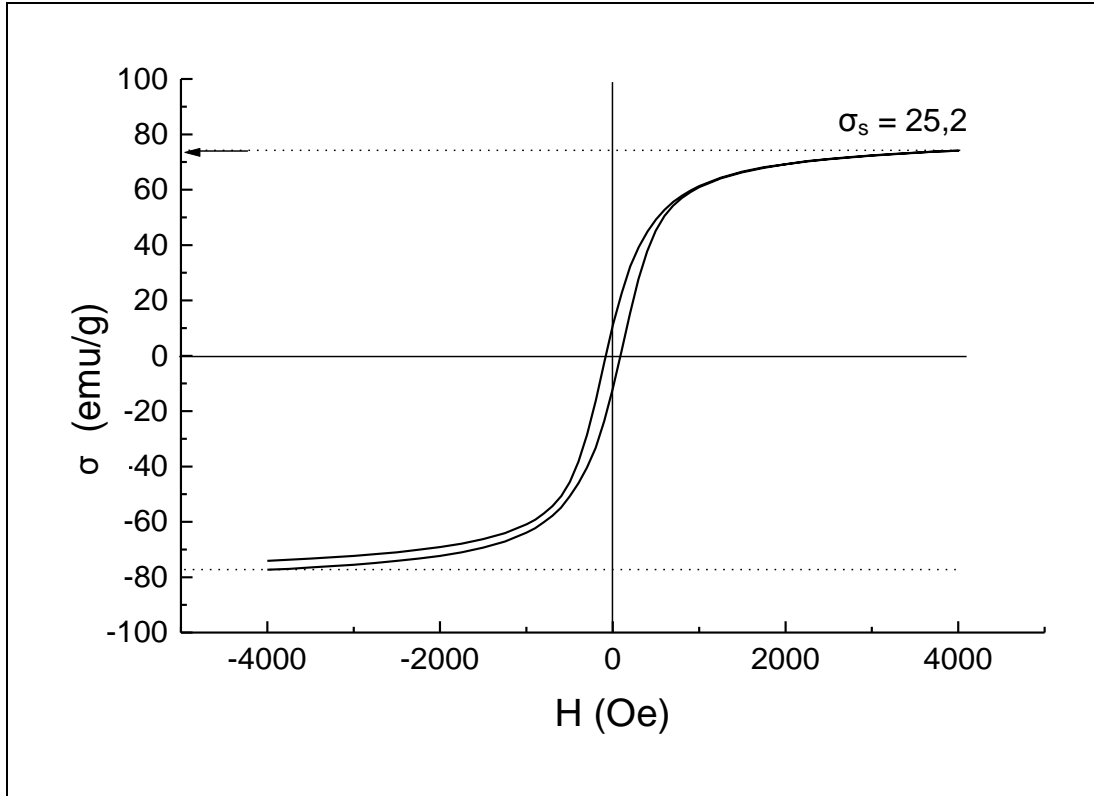
¹ Bu çalışmada kullanılan EPR cihazından manyetik indüksiyon cinsinden veri elde edilmektedir. Manyetik alan ve manyetik indüksiyon arasında, $B = \mu_0(H + M)$ ilişkisi vardır. (μ_0 =manyetik geçirgenlik)



Şekil 4.7. Fe_3O_4 nanoparçacıklarının manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi

Fe_3O_4 nanoparçacıklarının manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisinden, bu nanoparçacıkların doyum mıknatıslanması, $\sigma_s = 74,1$ emu/g olarak belirlenmiştir. σ_s değerinin büyüklüğü, nanoparçacıkların birim hacimdeki ya da kütledeki manyetik moment sayısına bağlıdır. Literatürde yer almış çalışmalarda, çeşitli yöntemlerle sentezlenen farklı boyutlardaki Fe_3O_4 nanoparçacıkları için σ_s değerleri, 63,2 emu/g ile 83,2 emu/g arasında değişmektedir [113,116,118,128,129].

Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının Şekil 4.8' de gösterilen manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi, bu nanoparçacıkların, Fe_3O_4 nanoparçacıklarının mıknatıslanma eğrisinde olduğu gibi, sürekli ve düzgün bir döngüye sahip olduğunu ve manyetik alana verdikleri tepkinin sürekli ve kararlı olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.8. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi

Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının mıknatıslanma eğrisinden, bu nanoparçacıkların σ_s değerinin 25,2 emu/g olduğu belirlenmiştir. Literatürde, çeşitli dispersiyon ortamları içerisinde değişik çapraz bağlayıcılar kullanılarak hazırlanmış Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarının σ_s değerleri için, 21,5 emu/g ile 35,54 emu/g arasında değişen değerlere rastlanılmıştır [21,113,116]. Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarının σ_s değerlerinin büyüklüğünün, bu nanoparçacıkların yüzeyini saran kitosan tabakasının kalınlığına, kitosanın bazı özelliklerine (molekül kütlesi, deasetilasyon derecesi gibi), Fe_3O_4 nanoparçacıklarının başlangıçtaki σ_s değerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, yine literatürde, yüzeyine poli(akrilik asit) bağlanan Fe_3O_4 nanoparçacıkları için $\sigma_s = 61,7$ emu/g [128] ve yüzeyi 3-(aminopropil) trietoksisilan ile silanlanmış Fe_3O_4 nanoparçacıkları için $\sigma_s = 62$ emu/g olarak bildirilmiştir [118]. Farklı polimerler ve modifiye edici bileşiklerle hazırlanan Fe_3O_4 nanoparçacıklarının σ_s değerlerinin büyüklüğünün, bu

nanoparçacıkların yüzeyini saran polimerlere ya da yüzey modifikasyonunda kullanılan maddelere bağlı olduğu söylenilebilir.

Fe_3O_4 nanoparçacıklarının kitosanla kaplanması, bu nanoparçacıkların birim kütledeki manyetik moment sayısının azalmasına ve σ_s değerinin 74,1 emu/g' dan 25,2 emu/g' a düşmesine neden olmuştur. Benzer şekilde, EPR analizlerinin sonuçlarında da, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıkların manyetik alana verdikleri tepkinin Fe_3O_4 nanoparçacıklarına göre azaldığı tespit edilmiştir. Fakat, Fe_3O_4 nanoparçacıklarının mıknatıslanma eğrisi ile (Bkz. Şekil 4.7), Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının mıknatıslanma eğrisi (Bkz. Şekil 4.8) karşılaştırıldığında; Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına ait eğrinin orijine yaklaştığı, yani kalıcı mıknatıslanma (M_r) ve zorlayıcı alan (H_c) değerlerinin sıfıra yaklaştığı görülmektedir (Ayrıca Bkz. Şekil 2.13 ve Şekil 2.15). Bu değişimin nedeni, Fe_3O_4 nanoparçacıkları yüzeyine kitosan kaplanmasıyla, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarındaki manyetik bölgelerin Fe_3O_4 nanoparçacıklarınıninkilere göre birbirinden uzaklaşması ve böylelikle, manyetik parçacıkların birbirlerine karşı uyguladıkları mıknatıslanmanın azalmasından kaynaklanmaktadır. Mıknatıslanma eğrisinde bu değişimin gözlenmesi nedeniyle, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının hemen hemen süperparamanyetik özellik gösterdikleri sonucuna varılmıştır. Benzer sonuçlara literatürde de rastlanılmıştır [113].

Yüzeyi çeşitli polimerlerle modifiye edilen manyetik nanoparçacıkların Bölüm 2.3' te anlatılan uygulamalarda kullanılmalarının en önemli nedenlerinden birisi de, bu manyetik nanoparçacıkların hemen hemen aynı manyetik alan varlığındaki mıknatıslanmalarının, manyetik polimerik mikrokürelere göre daha fazla olmasıdır. Bu özellikleri nedeniyle, enzim ve protein immobilizasyonu gibi uygulamalarda kullanılan manyetik nanoparçacıklar, manyetik ayırma ile daha kolay bir şekilde ortamdan ayrılabilirler. Literatürde yer alan bazı çalışmalarda, içinde Fe_3O_4 bulunan kitosan esaslı manyetik mikrokürelere için σ_s değerleri yaklaşık 3-4 emu/g civarındadır [130,131]. Bu

çalışmada da görüldüğü gibi, kitosan kaplı Fe_3O_4 nanoparçacıklarının σ_s değeri, polimerik mikrokürelerin σ_s değerlerinden en az 6 kat daha büyüktür.

4.3. Fe_3O_4 -Kitosan Nanoparçacıklarına Lakkaz İmmobilizasyonu

Lakkaz enzimi, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemleri ile immobilize edilmiştir. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyon, pH = 6,0' da gerçekleştirilmiştir. ζ -potansiyeli ölçümleriyle pl değeri 6,86 olarak belirlenen Fe_3O_4 -CS nanoparçacıkları (Bkz. Şekil 4.5), pH = 6,0' da pozitif yüklü olduğundan; pl değeri 3,0 olan [132], dolayısıyla pH = 6,0' da negatif yüklü olan *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkaz enzimi, bu nanoparçacıkların yüzeyine elektrostatik etkileşimler sonucunda adsorpsiyonla immobilize edilmiştir. Literatürde de, pl değeri 3,42 olan *Lentinula edodes*' ten elde edilen lakkazın pH 6,0' da kitosana adsorplandığı belirtmiştir [133].

Kovalent bağlanma ile immobilizasyonda, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının -OH grupları karbodiimit (EDAC) ve siyanürik klorür (SC) aktifleştircileri ile aktifleştirildikten sonra, lakkaz enzimi bu manyetik nanoparçacıklara immobilize edilmiştir. EDAC aktifleştircisi kullanılarak yapılan immobilizasyonda, Şekil 3.3' te gösterilen tepkimelere göre, kitosanın -OH grupları pH 4,0 - 6,0 arasında EDAC ile tepkimeye girmesiyle, kararsız bir kompleks olan "açilizoüre" oluşmakta ve bu ara ürün enzimin amin grupları ile tepkimeye girerek immobilize enzimi oluşturmaktadır [134]. SC aktifleştircisi ile gerçekleştirilen immobilizasyonda ise, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının -OH grupları, Şekil 3.4' te gösterilen tepkimeye göre siyanürik klorürle aktifleştirilmiş ve lakkaz enzimi bu nanoparçacıklara kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir.

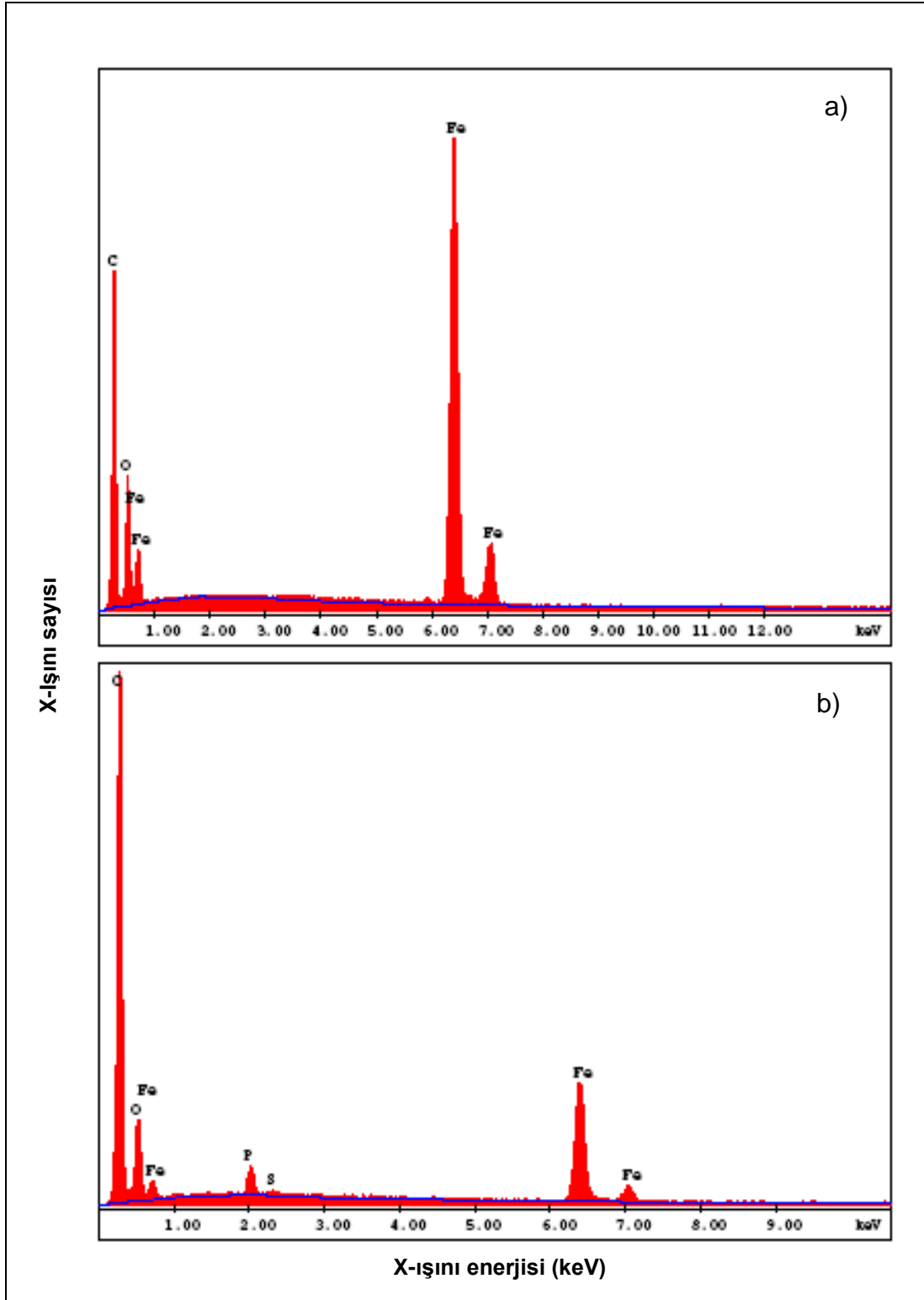
Literatürde kitosan kaplı manyetik mikrokürelerin ya da nanoparçacıkların EDAC ve SC ile aktifleştirilmesi ve enzim immobilizasyonuna ilişkin bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

4.3.1. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına immobilize edilen enzimlerin enerji dispersif x-ışını analizörlü taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS) ile tayini

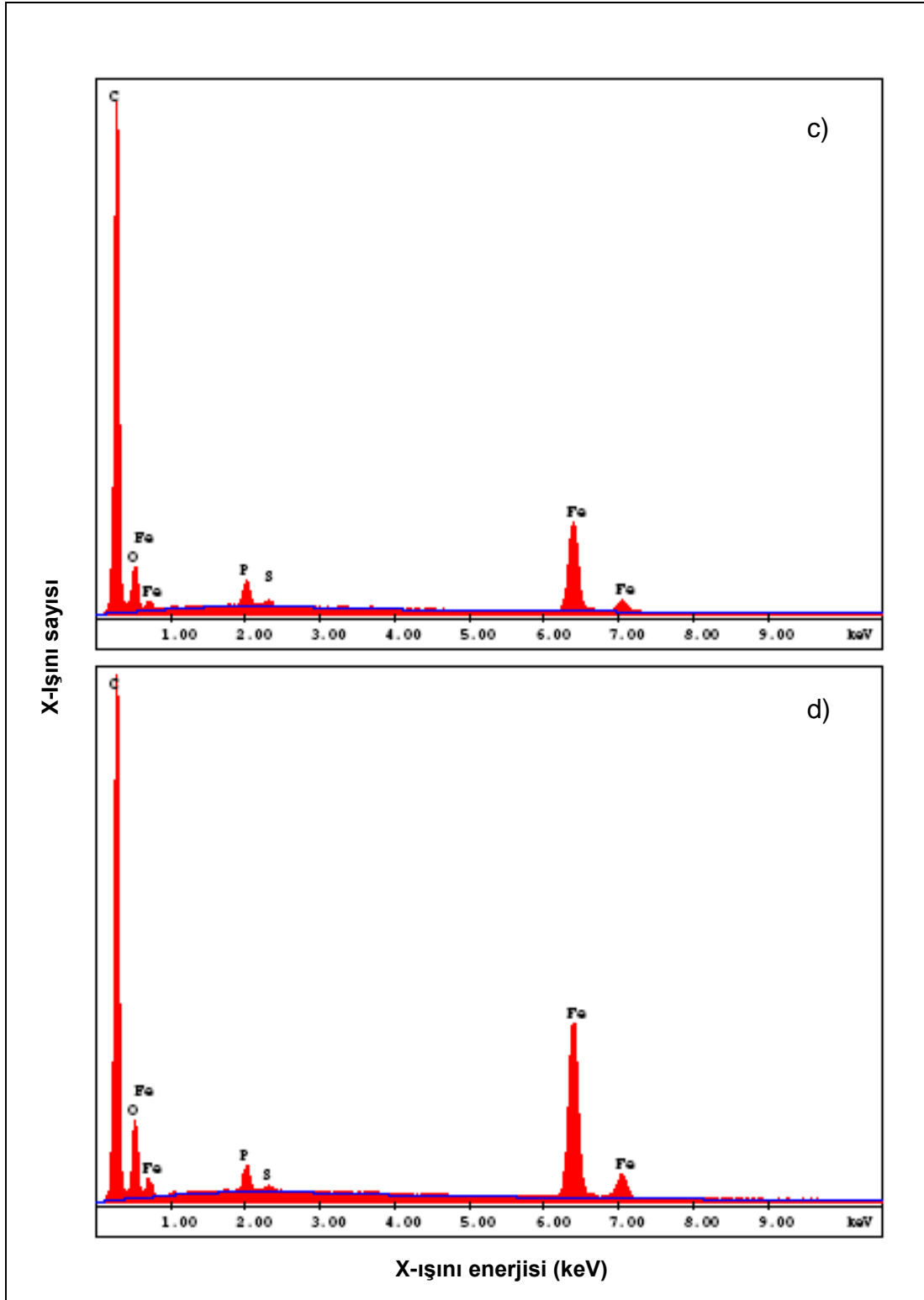
Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına adsorpsiyon, karbodiimitle ve siyanürik klorürle aktifleştirerek kovalent bağlama yöntemleri ile lakkaz enziminin immobilize edildiği, SEM/EDS analizleri ile araştırılmış ve Fe₃O₄-CS, Fe₃O₄-CS-L, Fe₃O₄-CS-EDAC-L ve Fe₃O₄-CS-SC-L örneklerine ait x-ışınları enerjisine (keV) karşı x-ışını sayısını gösteren SEM/EDS spektrumları Şekil 4.9' da gösterilmiştir. Ayrıca, Çizelge 4.1' de her bir örnekteki atomların % dağılımı gösterilmiştir.

Lakkaz immobilize edilmeyen Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının SEM/EDS spektrumunda, kitosanın ve Fe₃O₄ nanoparçacıklarının varlığını gösteren C, O ve Fe elementleri tespit edilmiş ve bu nanoparçacıkların C atomu içeriğinin %76,23 olduğu belirlenmiştir.

Fe₃O₄-CS-L, Fe₃O₄-CS-EDAC-L ve Fe₃O₄-CS-SC-L örneklerinin SEM/EDS spektrumunda ise, C,O ve Fe atomlarının yanında, S ve P atomlarına ait sinyaller gözlenmiştir. Bu örneklerin C atomu % değeri, Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarınıninkine göre en az %8,76 artış göstermiştir. C atomu % değerinin artması, lakkazın bu nanoparçacıklara immobilize olduğu göstermektedir. Lakkaz molekülünü oluşturan protein zincirlerinde sistein kalıntıları bulunmaktadır [135]. Lakkaz immobilize edilmiş örneklerin spektrumunda yer alan S atomuna ait sinyaller, lakkaz molekülündeki sistein kalıntılarında ileri gelmektedir ve dolayısıyla, lakkazın bu sistemler içerisinde bulunduğunu göstermiştir. P atomu ise, enzimlerin immobilize edildiği fosfat tamponu içerisindeki fosfor atomlarından dolayı bu örneklerin spektrumlarında yer almıştır.



Şekil. 4.9. Fe₃O₄-CS ve lakkaz immobilize edilmiş Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının SEM/EDS spektrumları
a) Fe₃O₄-CS b) Fe₃O₄-CS-L c) Fe₃O₄-CS-EDAC-L
d) Fe₃O₄-CS-SC-L



Şekil. 4.9 (Devam) Fe_3O_4 -CS ve lakkaz immobilize edilmiş Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının SEM/EDS spektrumları
a) Fe_3O_4 -CS b) Fe_3O_4 -CS-L c) Fe_3O_4 -CS-EDAC-L
d) Fe_3O_4 -CS-SC-L

Çizelge 4.1. Lakkaz immobilize edilmiş Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının SEM/EDS spektrumlarında tespit edilen atomlar ve atomların % dağılımı

Örnek	C (%)	O (%)	Fe (%)	P (%)	S (%)
Fe ₃ O ₄ -CS	76,23	17,16	6,61	0	0
Fe ₃ O ₄ -CS-L	88,96	9,31	1,42	0,26	0,05
Fe ₃ O ₄ -CS-EDAC-L	84,90	13,22	1,60	0,24	0,03
Fe ₃ O ₄ -CS-SC-L	85,61	11,82	2,31	0,21	0,04

4.3.2. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına immobilize edilen enzim miktarının Bradford metodu ile tayini

Fe₃O₄-CS-L, Fe₃O₄-CS-EDAC-L ve Fe₃O₄-CS-SC-L sistemlerine immobilize edilen lakkaz miktarı Bradford metoduna göre tayin edilmiş ve BSA kalibrasyon eğrisinden, bu sistemlere immobilize edilen enzim yüzdeleri sırasıyla %93,76, %94,22 ve %94,36 olarak bulunmuştur. Değerlerin hepsinin %90' dan büyük olması, lakkazın Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına hem adsorpsiyon hem de kovalent bağlanma ile yüksek bir oranda immobilize olduğunu göstermiştir.

4.4. Lakkazın Aktiflik Tayini

Serbest ve immobilize lakkazların aktifliği, çalışmalarımız için yeni bir substrat olan ve lakkaz aktifliğinin hızlıca tayin edilmesine imkan veren ABTS substratı ile tayin edilmiştir. Lakkaz aktifliği, 0-0,025 mM ABTS derişimi aralığında doğrusal olan ABTS kalibrasyon eğrisinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.6). 0,025 mM' dan daha yüksek ABTS derişimlerinde, enziminin substratı ile doygun hale gelmesinden dolayı, ABTS derişimi ile enzimatik tepkime hızının değişimi doğrusallıktan sapmaya başlamıştır (Şekil 3.8). Bu nedenle 0-0,025 mM ABTS derişimi aralığında oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğimi kullanılarak lakkaz aktifliği tayin edilmiş ve enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi incelenmiştir. Ayrıca, enzimatik tepkime

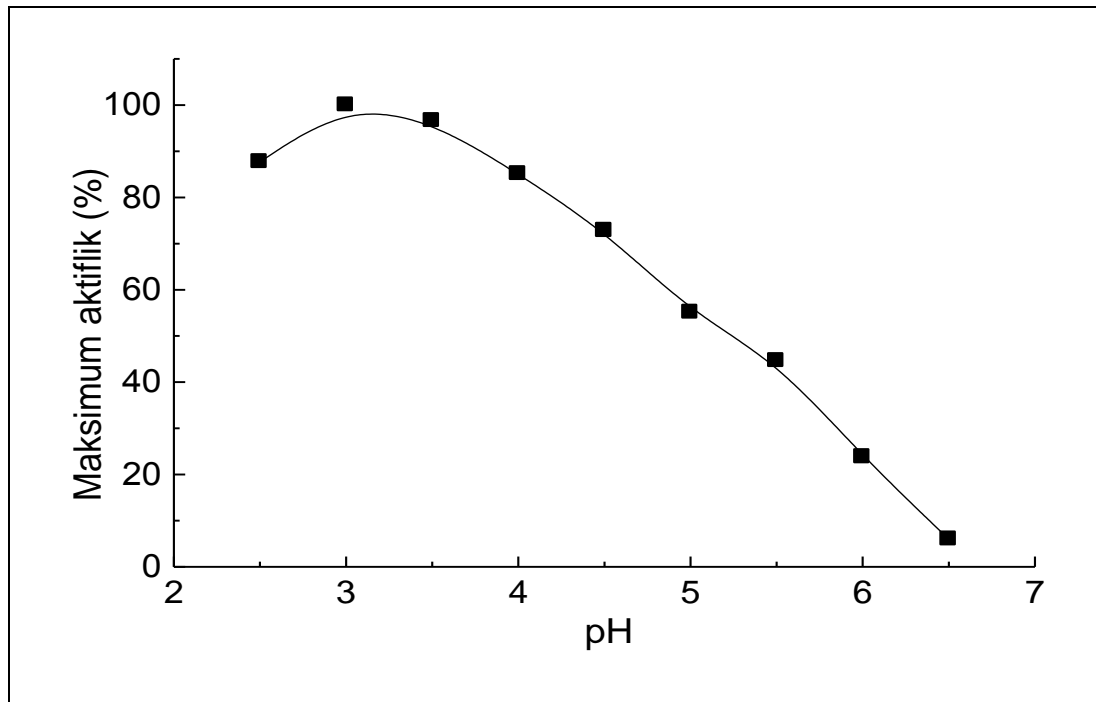
hızının, sabit ABTS derişiminde (0,025 mM), lakkaz derişimi ile doğrusal olarak değiştiği de belirlenmiştir (şekil 3.9).

4.5. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Etki Eden Parametreler

4.5.1. Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine pH etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine pH etkisi

Serbest lakkaz aktifliğinde, ortam pH' sının değişmesiyle meydana gelen değişimler, pH 2,5-6,5 aralığında 0,5 birim artışlarla incelenmiş ve enzim aktifliğinin pH ile değişimi şekil 4.10' da gösterilmiştir.



şekil 4.10. Serbest lakkaz aktifliğinin pH ile değişimi

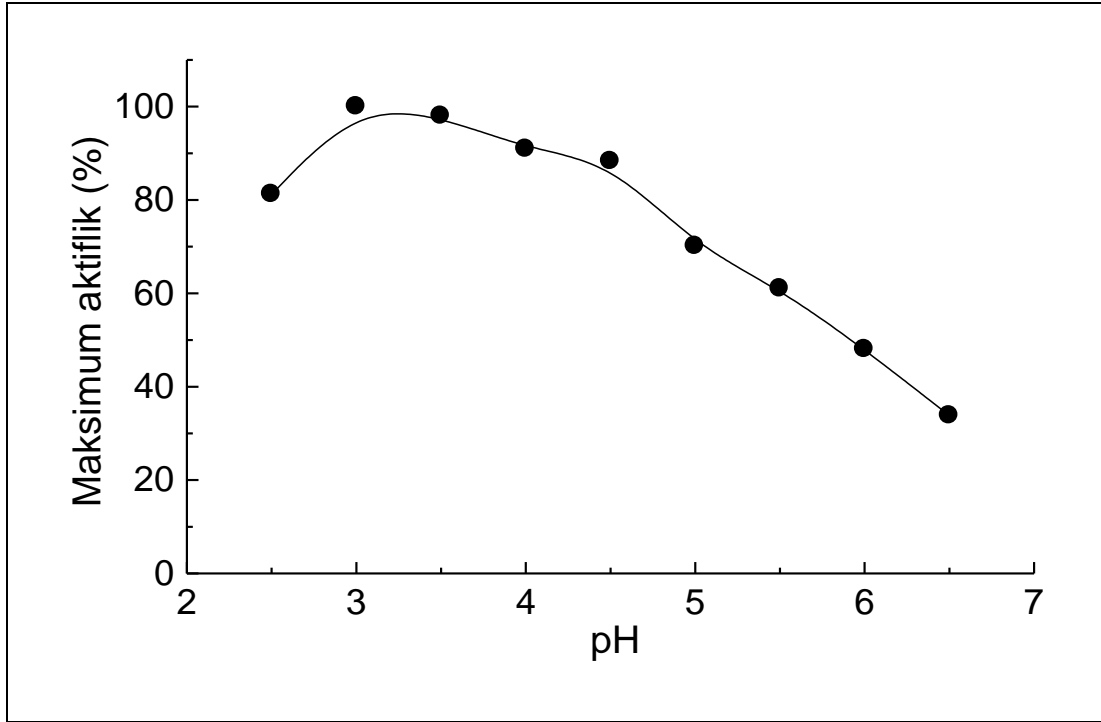
Serbest lakkazın optimum pH değerinin 3,0 olduğu belirlenmiştir. Literatürde de, *Trametes versicolor*' dan elde edilen serbest lakkazın ABTS substratına karşı optimum pH değeri 3,0 olarak bildirilmiştir [136]. Lakkazların aynı substrata karşı gösterdikleri optimum pH değeri, elde edildikleri kaynağa

bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. ABTS substratına karşı, *Daedalea quercina*' dan elde edilen serbest lakkazın optimum pH değerinin pH 2,0' nin altında olduğu [85] ve kaynağı *Pycnoporus coccineus* olan lakkazın optimum pH değerinin 3,5 olduğu bildirilmiştir [91]. Bunun yanı sıra, aynı kaynaktan elde edilen lakkazların, değişik substratlara karşı optimum pH' ları da farklı olabilmektedir. *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazın siringaldazin substratına karşı optimum pH değerinin 5,0 olduğu [137], 2,6-dimetoksifenol substratına karşı pH 3,3 olduğu bildirilmiştir [138].

Bu çalışmada serbest lakkaz, pH 3,0-5,0 aralığında maksimum aktifliğini %100-%55 civarında korumuş ve pH' nın artmasıyla aktifliğini yavaş yavaş yitirmeye başlamıştır. Ortam pH' sı 6,5 olduğunda ise, serbest lakkaz maksimum aktifliğinin %6' sını korumuştur.

Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH etkisi

Fe₃O₄-CS-L aktifliğinin pH 2,5-6,5 aralığındaki değişimi Şekil 4.11' de gösterilmiştir.



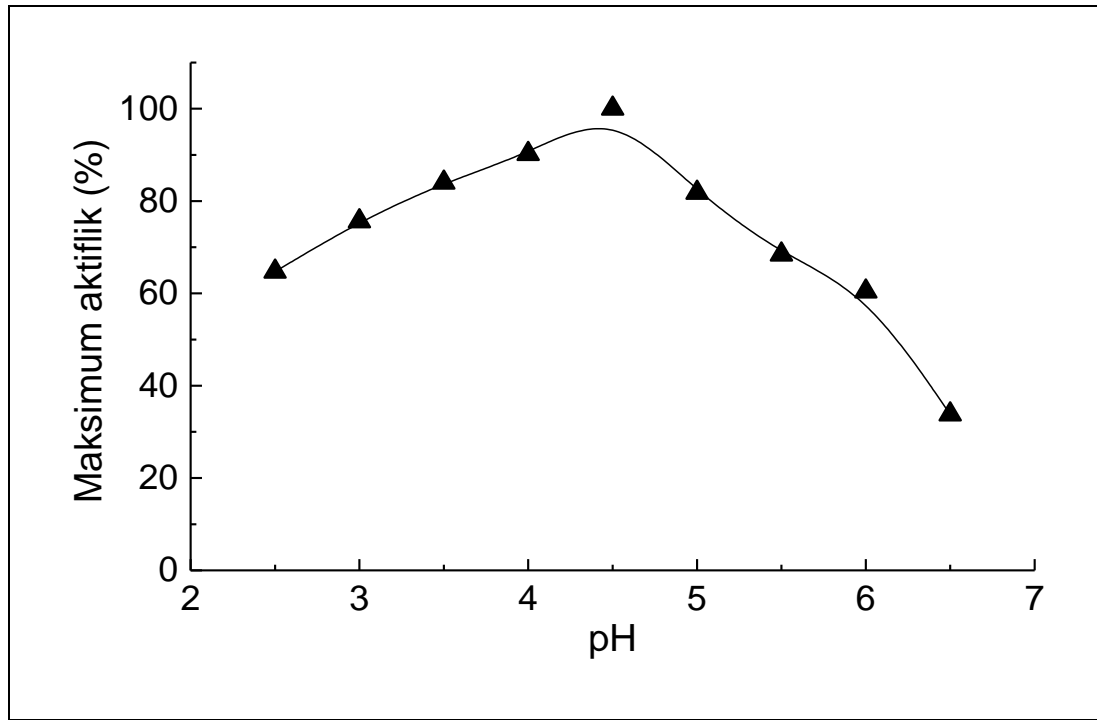
Şekil 4.11. Fe_3O_4 -CS-L aktifliğinin pH ile değişimi

Fe_3O_4 -CS-L için optimum pH değeri 3,0 bulunmuştur. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen bu immobilize lakkazın optimum pH değeri, serbest lakkazinkine göre bir değişim göstermemiştir. Literatürde, *Pycnopus sanguineus*' tan elde edilen lakkaz, manyetik kitosan mikrokürelere adsorpsiyon ve çapraz bağlama yöntemleri ile immobilize edildiğinde, immobilize lakkazın optimum pH değeri 3,0 olarak bildirilmiş ve bu değer serbest enzimle aynı olduğu belirlenmiştir [102].

Fe_3O_4 -CS-L, pH 3,0-5,0 aralığında maksimum aktifliğini %70' in üzerinde ve pH 6,5' te %34 oranında koruyarak, serbest lakkaza göre bu pH' larda daha yüksek bir aktiflik göstermiştir. Dolayısıyla, Fe_3O_4 -CS-L, asidik ve nötrale yakın pH değerlerinde yürütülen endüstriyel uygulamalarda, serbest lakkaza göre daha verimli bir şekilde kullanılabilen düşülmektedir.

Karbodiimitle aktiveştirilen Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH etkisi

Fe_3O_4 -CS-EDAC-L aktifliğinin pH 2,5-6,5 aralığındaki değişimi Şekil 4.12' de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Fe_3O_4 -CS-EDAC-L aktifliğinin pH ile değişimi

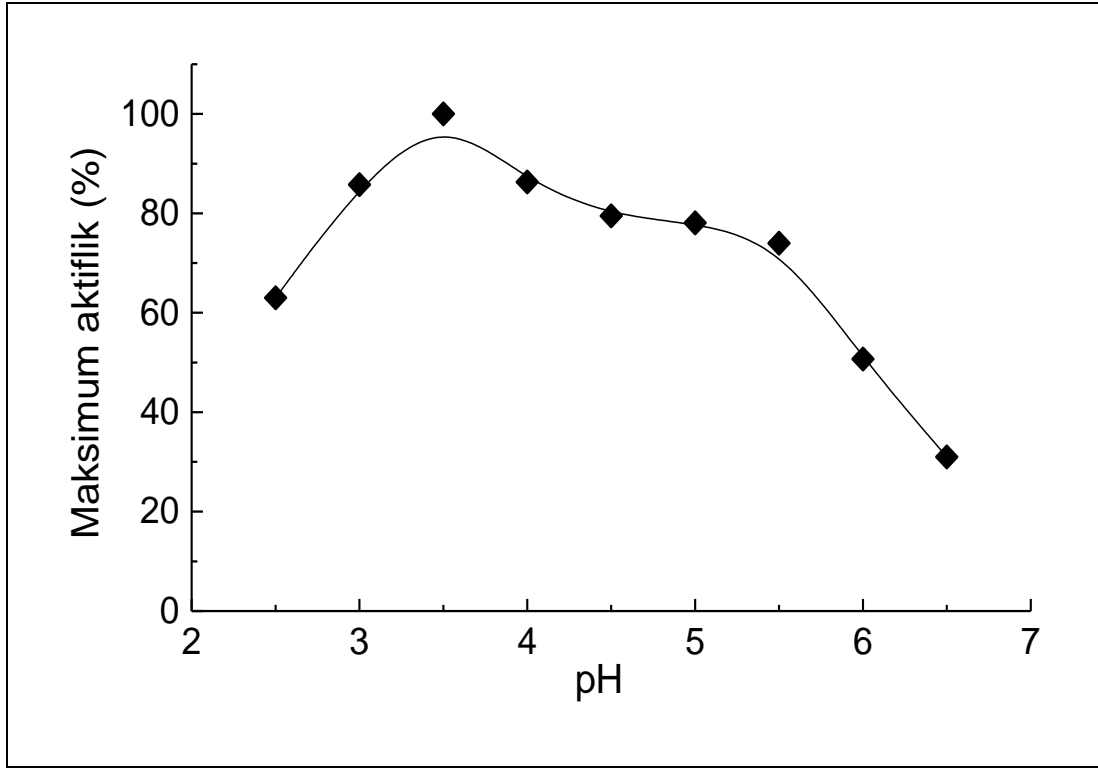
Fe_3O_4 -CS-EDAC-L için optimum pH değeri 4,5 bulunmuştur. pH 3,0-5,0 arasında bu immobilize lakkaz, maksimum aktifliğini %76' nın üzerinde korumuştur. pH 6,5' te ise, immobilize lakkazın maksimum aktifliğinin %34' ünü korunduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, Fe_3O_4 -CS-EDAC-L' in, serbest lakkaza göre, bu pH aralığında daha yüksek bir aktiflikle kullanılabileceğini göstermiştir.

Fe_3O_4 -CS-EDAC-L' in optimum pH değeri, optimum pH değeri 3,0 bulunan serbest lakkaza göre 1,5 birim artarak pH 4,5' e kaymıştır. Optimum pH değerindeki artma, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının yüzeyindeki kitosanın karbodiimitle aktiveştirilmesi sırasında, kitosanın anyonik hale gelmesi ve

bunun sonucunda enzimin optimum pH' sının daha yüksek pH' lara kayması ile açıklanabilir ve literatürde de karbodiimitle aktifleştirilen kitosan mikrokürelere *Candida rugosa*' dan elde edilen lipaz enziminin immobilize edildiği iki farklı çalışmada, immobilize lipazların optimum pH değerlerinin serbest lipaza göre göre daha yüksek pH' lara kaydığı bildirilmiştir [134,139]. Farklı polimerik desteklerin karbodiimitle aktifleştirilmesiyle, çeşitli enzimlerin immobilizasyonuna ilişkin literatürdeki çalışmalarda ise, immobilize enzimlerin optimum pH değeri, serbest enzimlere göre 1 birim değiştiği bildirilmiştir. Karbodiimitle aktifleştirilmiş poli(dimer asit-ko-alkil poliamin) parçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen α -amilazın optimum pH' sı serbest α -amilaza göre 1,0 birim azalmış [140]; kalsiyum aljinat jel küreciklerine hapsetme ve karbodiimitle aktifleştirerek kovalent bağlanma ile immobilize edilen asetilkolinesterazın optimum pH' sı serbest enzime göre 1,0 birim artmıştır [141]. Aynı aktifleştirici kullanılarak kovalent bağlanma ile immobilize edilen enzimlerin optimum pH değerindeki değişme; aktifleştirilmiş destek materyalin yapısına, enzim ve destek materyalin arasında oluşan kovalent bağlara ve immobilize edilen enzimin mikroçevresindeki etkilere bağlıdır.

Siyanürik klorürle aktifleştirilen Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz aktifliğine pH etkisi

Fe_3O_4 -CS-SC-L aktifliğinin pH 2,5-6,5 aralığındaki değişimi Şekil 4.13' te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Fe₃O₄-CS-SC-L aktifliğinin pH ile değişimi

Fe₃O₄-CS-SC-L için optimum pH değeri 3,5 bulunmuş ve bu immobilize lakkaz, pH 3,0-5,0 aralığında maksimum aktifliğini %78' in üzerinde ve pH 6,5' te %31,0 oranında korumuştur. Bu sonuçlar da, diğer immobilize lakkazlarda olduğu gibi, pH 3,5-6,5 aralığında Fe₃O₄-CS-SC-L' in, serbest lakkaza göre daha yüksek bir maksimum aktifliğe sahip olduğunu göstermiştir.

Literatürde, manyetik poli(stiren-ko-aseto-asetoksietil metakrilat) küreciklerinin β-diketon grubuna kovalent bağlanma ile immobilize edilen *Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın optimum pH değeri 4,0 bildirilmiştir [66]. Manyetik olmayan çeşitli destekler üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilen kaynakları farklı lakkazların optimum pH değerleri pH 3,2-4,0 arasında değişim göstermiştir [91,142]. Siyanürik klorürle aktifleştirilen kitosan esaslı bir destek materyal üzerine enzim immobilizasyonuna ilişkin bir çalışmaya literatürde rastlanılmamakla birlikte; bu çalışmada elde edilen sonuca benzer şekilde, siyanürik klorürle aktifleştirilmiş poli (2-hidroksietil

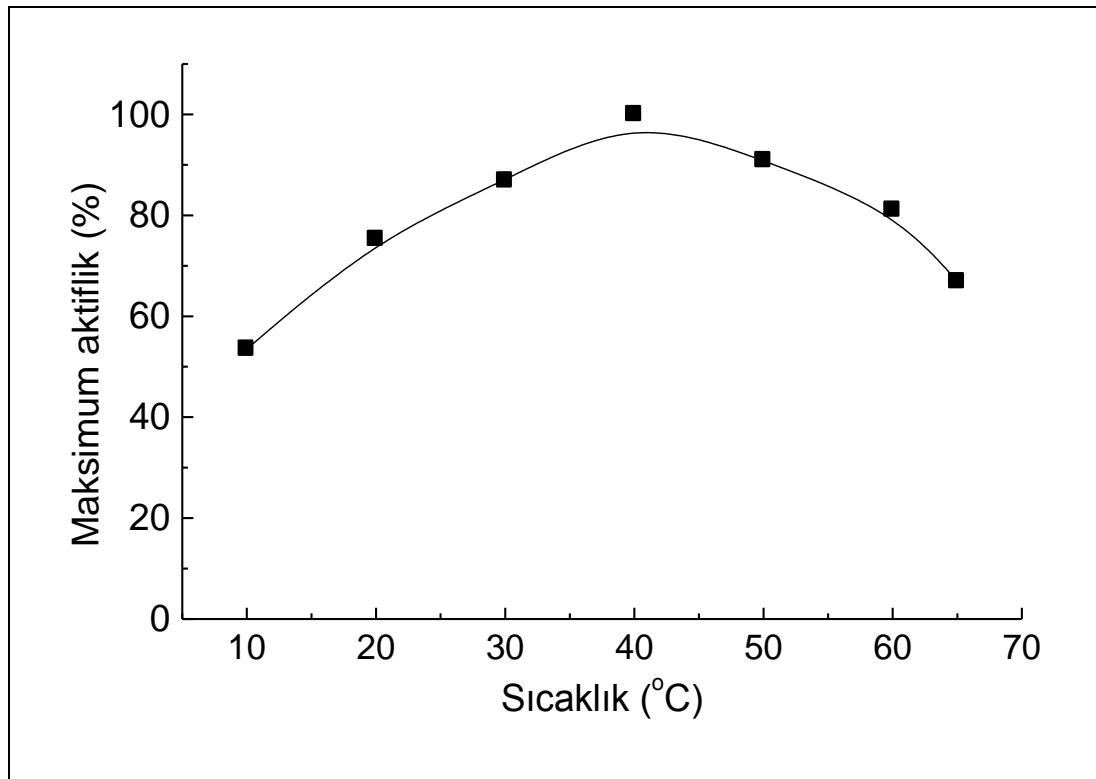
metakrilat) mikrokürelere immobilize edilen invertazın optimum pH değerinin, serbest invertaza göre 1 birim artarak pH 5,5' e kaydığı bildirilmiştir [143].

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, tüm immobilize lakkazların serbest lakkaza göre pH 3,0-6,5 aralığında daha yüksek bir aktiflikle kullanılabilir olduklarını göstermiştir.

4.5.2. Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi

Serbest lakkaz aktifliğinin 10-65°C aralığındaki değişimi, Şekil 4.14' te gösterilmiştir.



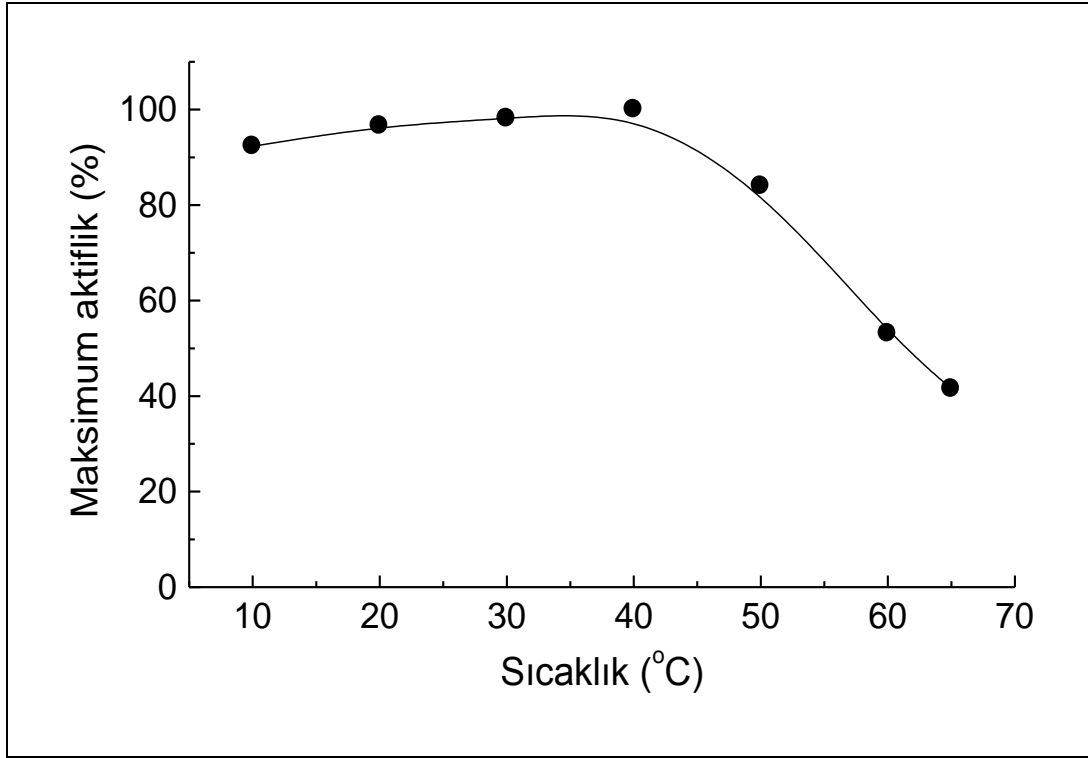
Şekil 4.14. Serbest lakkaz aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

Serbest lakkaz için optimum sıcaklık 40°C bulunmuştur. Maksimum aktiflik sıcaklık 40°C' ye ulaşıncaya kadar artmış, bu sıcaklığın üzerinde ise enzim molekülünün tersiyer yapısının bozulmaya başlamasıyla, enzimin denatüre olması nedeniyle aktiflik azalmıştır. Serbest lakkaz, maksimum aktifliğini 10-40°C arasında %54' ün, 40-65°C arasında ise %67' nin üzerinde korumuştur.

Literatürde *Trametes versicolor*' dan elde edilen serbest lakkazın ABTS substratına karşı maksimum aktifliğininin 20-30°C [66] ve 10-30°C aralığında yayıldığı [106] ve ayrıca optimum sıcaklığınının 40°C olduğu bildirilmiştir [93]. Bu farklılıkların, aktiflik tayininde kullanılan tamponlardan, ortam pH' sının farklı olmasından ve lakkazın aynı tepkimeyi katalizleyen fakat aminoasit kalıntıları ve tersiyer yapısında çok az farklılıkları bulunan izoenzimlerinin kullanılmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Kaynağı farklı lakkazlar için de, ABTS substratına karşı daha yüksek optimum sıcaklıklara rastlanılmış ve *Myceliophthora thermophila*' dan elde edilen lakkaz için optimum sıcaklık 60°C olarak bildirilmiştir [144].

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi

Fe₃O₄-CS-L aktifliğinin 10-65°C aralığındaki değişimi Şekil 4.15' te gösterilmiştir.

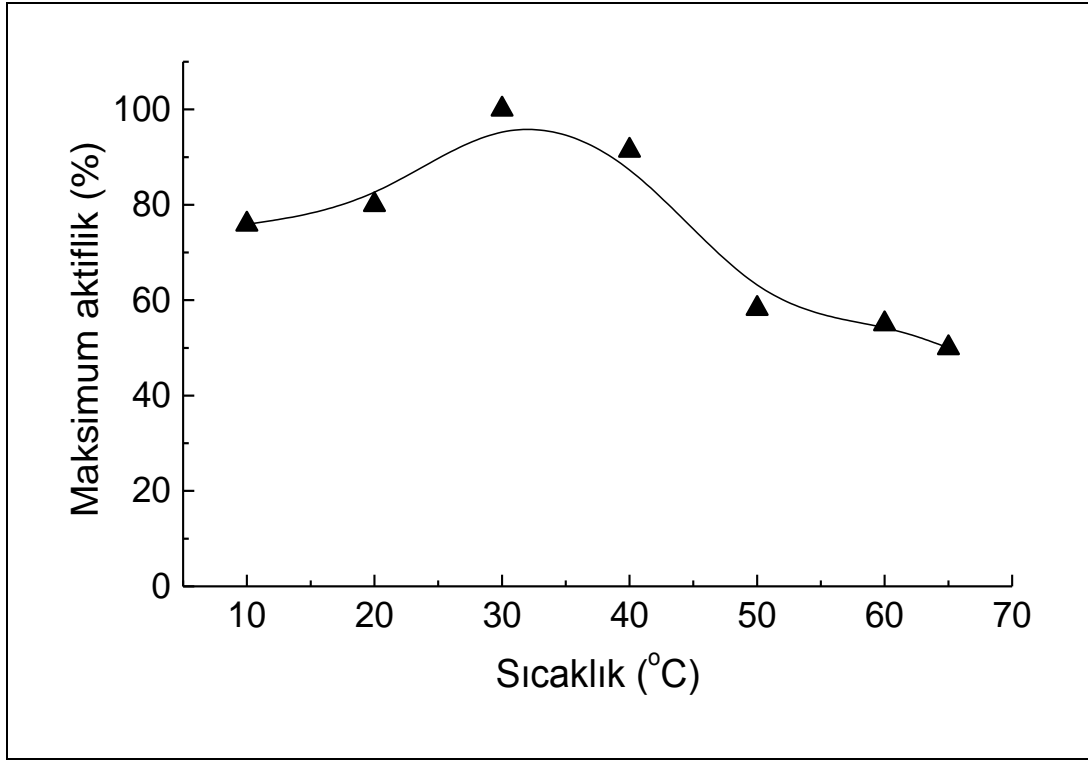


Şekil 4.15. Fe_3O_4 -CS-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

Fe_3O_4 -CS-L için optimum sıcaklık $40^\circ C$ bulunmuştur. $10-40^\circ C$ aralığında, Fe_3O_4 -CS-L, maksimum aktifliğini %92' nin üzerinde koruyarak, bu sıcaklık aralığında aktifliğini %54' ün üzerinde koruyan serbest lakkaza göre daha yüksek bir maksimum aktiflik göstermiştir. $40-65^\circ C$ aralığında ise, serbest lakkaz %67' nin üzerinde bir aktiflik gösterirken; Fe_3O_4 -CS-L maksimum aktifliğinin %42' nin üzerinde koruyabilmiştir. Bu sonuç, $40^\circ C$ altındaki sıcaklıkları gerektiren uygulamalarda, Fe_3O_4 -CS-L' in serbest lakkaza göre daha verimli bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

Karbodiimitle aktifleştirilen Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi

Fe_3O_4 -CS-EDAC-L aktifliğinin $10-65^\circ C$ aralığındaki değişimi Şekil 4.16' da gösterilmiştir.



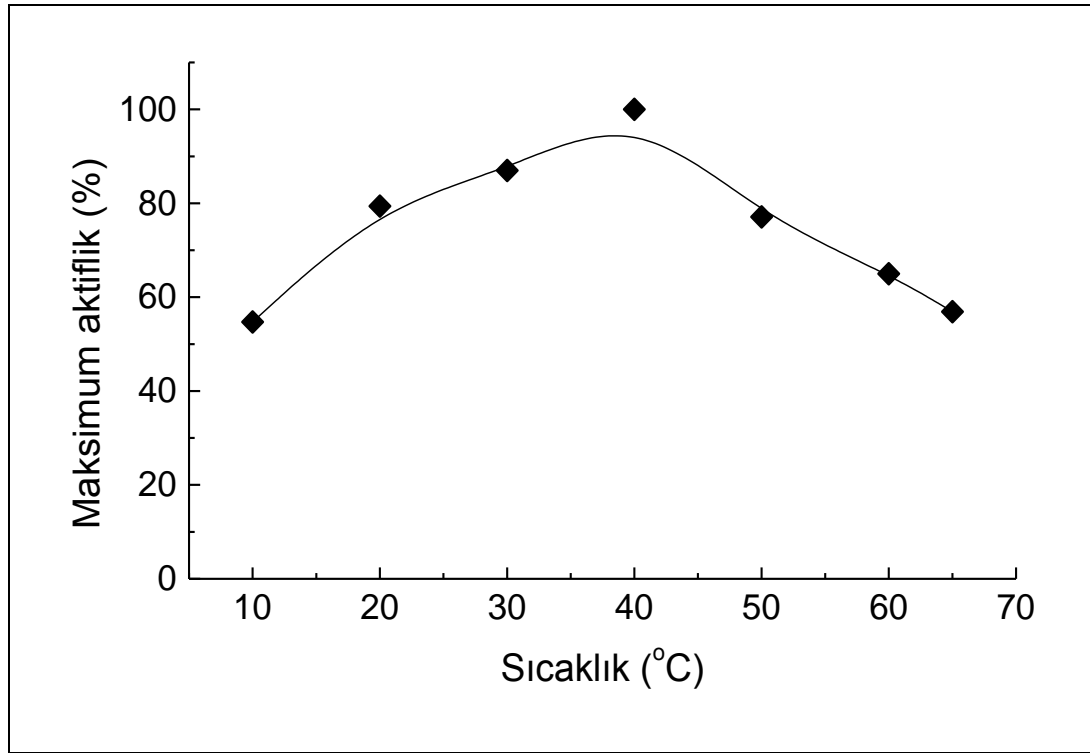
Şekil 4.16. Fe₃O₄-CS-EDAC-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

Fe₃O₄-CS-EDAC-L için optimum sıcaklık 30°C bulunmuş ve bu immobilize lakkaz, 10-40°C aralığında maksimum aktifliğini %76'nın üzerinde korumuştur. Fe₃O₄-CS-EDAC-L, serbest lakkaza göre bu sıcaklık aralığında daha yüksek bir maksimum aktiflik göstermiştir. Fakat, bu immobilize lakkazın optimum sıcaklığının, serbest lakkaza göre 10°C daha düşük olduğu belirlenmiştir. Optimum sıcaklıktaki bu düşmenin nedeni kesin olarak açıklanamamakla birlikte, karbodiimitle aktifleştirilerek Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları yüzeyine kovalent bağlanan lakkaz ve destek arasındaki etkileşmelerin bu duruma neden olduğu düşünülmektedir. Literatürdeki çalışmalarda genellikle immobilize lakkazların optimum sıcaklıklarının daha yüksek değerlere kaydığını gösteren bulgular yer almaktadır [133,145], fakat immobilizasyon yöntemine ve immobilize lakkazın özelliklerine bağlı olarak, bazı durumlarda immobilize lakkazın optimum sıcaklığı serbest lakkaza göre azalış gösterebilmektedir. *Pyricularia oryzae*' den elde edilen lakkaz, spiral sarımlı polietersülfon membranına immobilize edildiğinde, immobilize enzimin

optimum sıcaklığının serbest enzime göre 5°C daha azaldığı bildirilmiştir [146].

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

Fe_3O_4 -CS-SC-L aktifliğinin 10-65°C aralığındaki değişimi Şekil 4.17' de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Fe_3O_4 -CS-SC-L aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

Fe_3O_4 -CS-SC-L için optimum sıcaklık 40°C bulunmuş ve bu immobilize lakkaz, 10-40°C arasında maksimum aktifliğinin %55' in üzerinde koruyarak, bu sıcaklık aralığında serbest lakkaza göre daha yüksek bir maksimum aktiflik göstermiştir. Fe_3O_4 -CS-SC-L' in optimum sıcaklığında serbest lakkaza göre bir değişme meydana gelmemiştir ve 40-65°C arasında, bu immobilize lakkaz maksimum aktifliğini %57' nin üzerinde korumuştur. Fe_3O_4 -CS-SC-L' in da, diğer immobilize lakkazlarda olduğu gibi, 40°C altındaki sıcaklıklarda

serbest lakkaza göre daha yüksek bir maksimum aktiflikle kullanılabilceği söylenilebilir.

4.5.3. Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

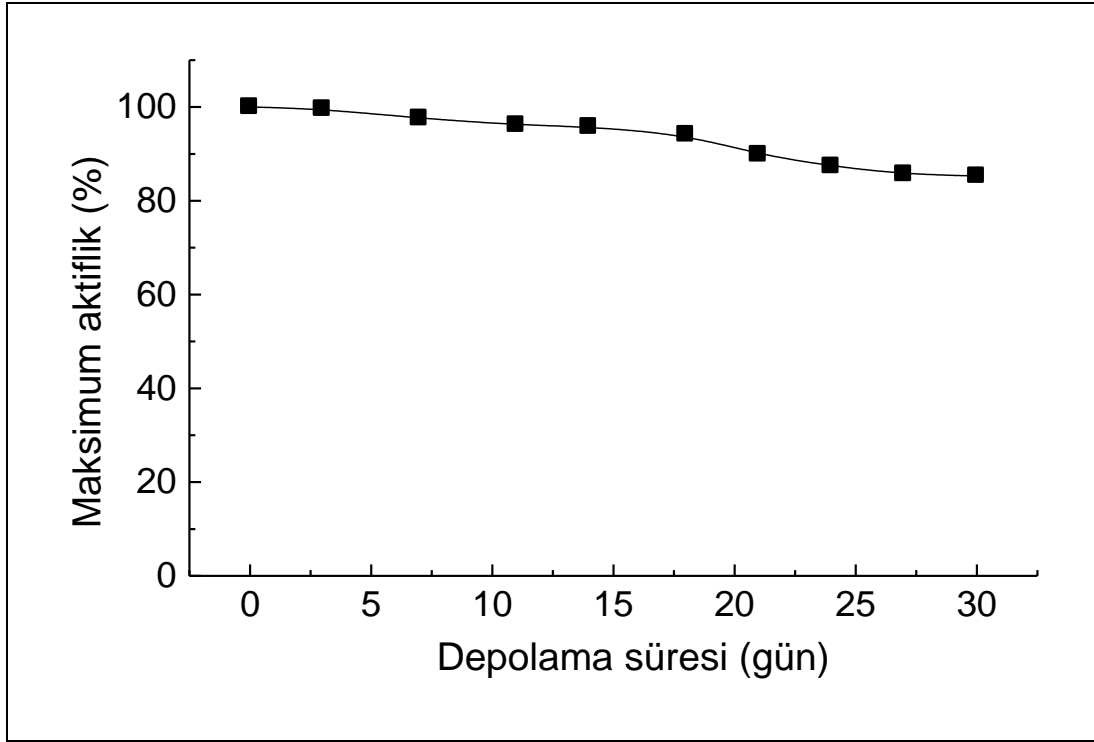
Enzim aktifliğinde depolama süresince meydana gelen değişmeler, enzimlerin yapısal özelliklerine ve depolama şartlarına (tampon çözelti ortamı, sıcaklık gibi) bağlıdır.

Serbest lakkazın aktifliğini en iyi şekilde koruduğu depolama koşullarının belirlenmesi amacıyla; lakkaz enzimi, pH' sı 5,0 olan 0,1 M Britton-Robinson tampon çözeltisinde ve pH' sı 5,0 olan FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) içerisinde çözülerek, 4°C' de saklanmıştır. Aktiflik tayinleri, serbest lakkazın aktifliğini en iyi şekilde pH=5,0 olan FST (0,1 M sitrat/0,2 M fosfat) içerisinde koruduğunu gösterdiği için, serbest lakkaz bu tampon çözelti içerisinde 4°C' de depolanmıştır.

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

Serbest lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Serbest lakkaz aktifliğinin depolama süresi ile değişimi Şekil 4.18' de gösterilmiştir.

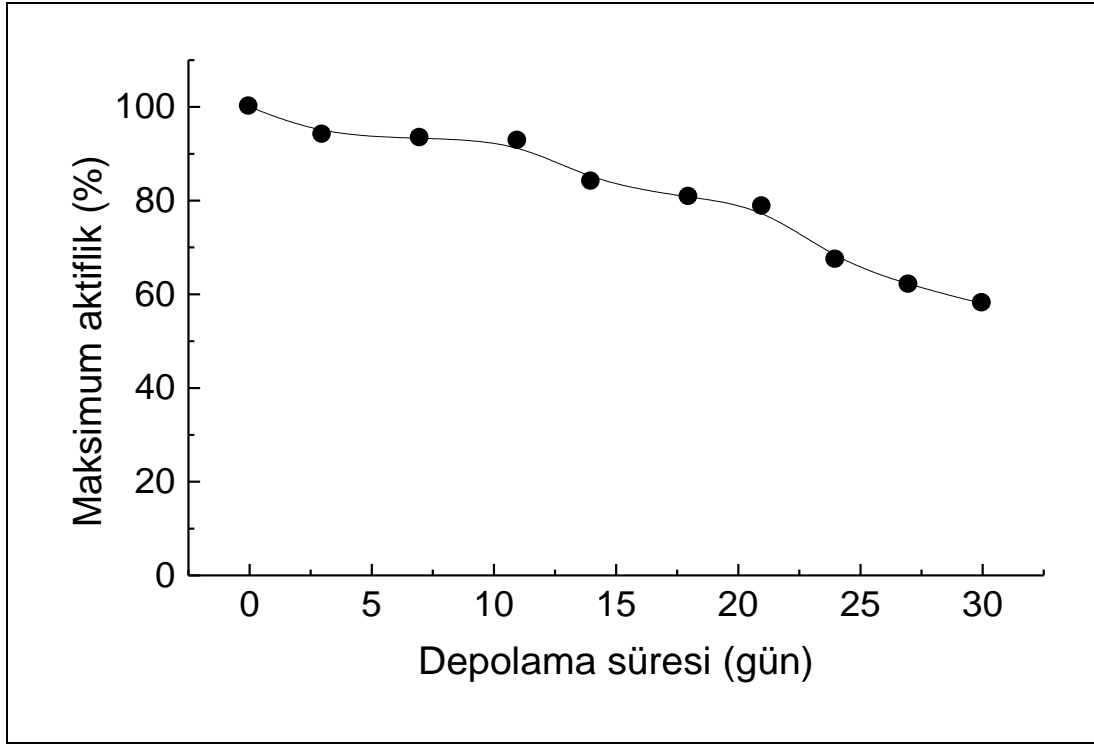


Şekil 4.18. Serbest lakkaz aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Depolanmanın 7. günü sonunda serbest lakkazın, başlangıç aktifliğinin %98' ini; 14. günü sonunda %96' sını; 21. günü sonunda %90' ını; 30. günü sonunda ise %85' ini koruduğu gözlenmiştir. Literatürde, *Trametes versicolor*' dan elde edilen serbest lakkazın 4°C' de depolanmasının 30. günü sonunda, maksimum aktifliğini yaklaşık %80 civarında korunduğunu gösteren bulgular yer almıştır [137]. Ayrıca, *Pycnoporus sanguineus*' dan elde edilen lakkazın 4°C' de depolanmasının 30 günü sonunda maksimum aktifliğinin %30' unu koruduğu bildirilmiştir [102].

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Fe₃O₄-CS-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi Şekil 4.19' da gösterilmiştir.

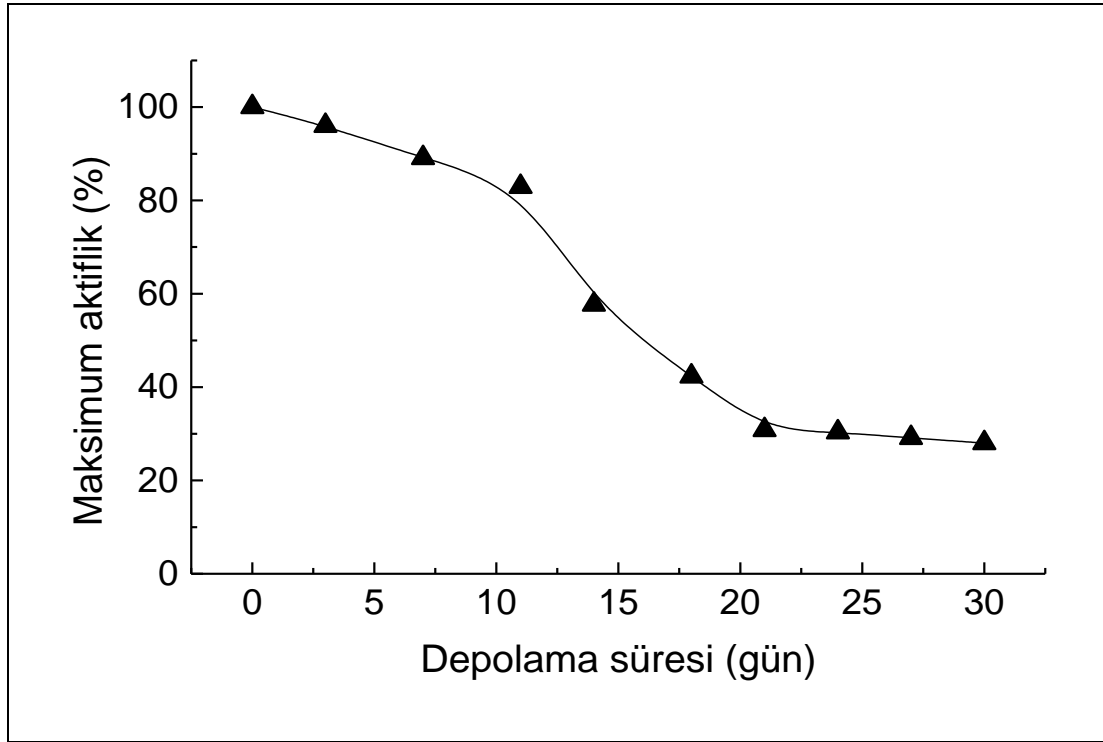


Şekil 4.19. Fe₃O₄-CS-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Fe₃O₄-CS-L, depolanmasının 7. günü sonunda başlangıç aktifliğinin %93' ünü; 14. günü sonunda %84' ünü; 21. günü sonunda %79' unu ve 30. günü sonunda ise %58' ini korumuştur.

Karbodiimitle aktifleştirilen Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Fe₃O₄-CS-EDAC-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi Şekil 4.20' de gösterilmiştir.

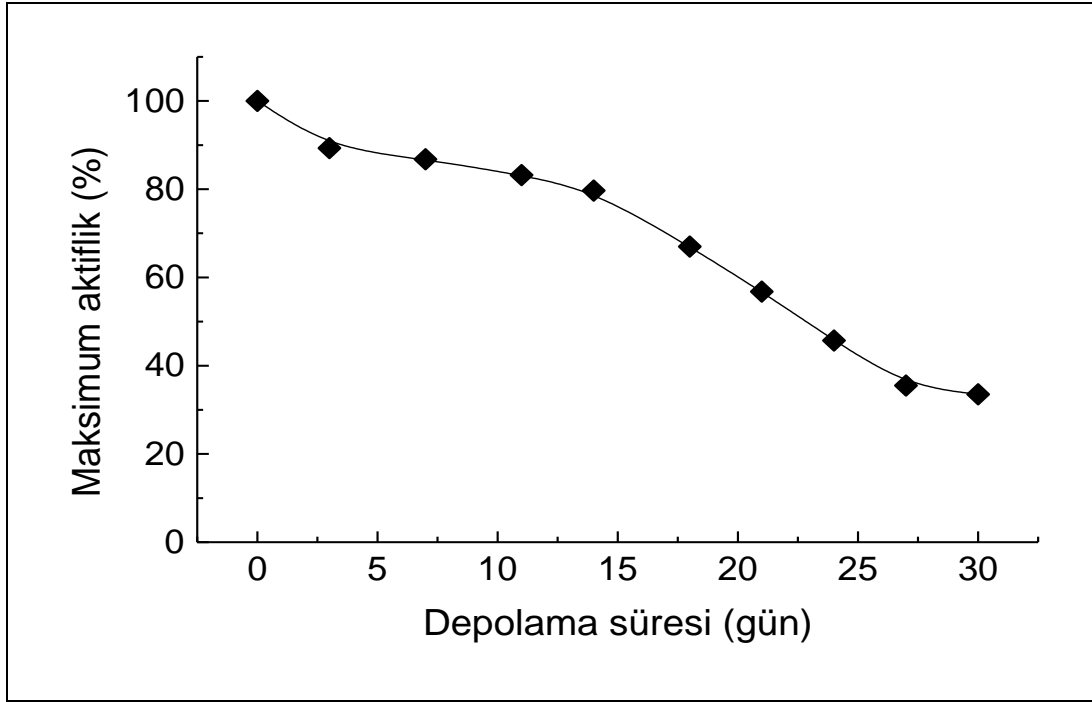


Şekil 4.20. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-EDAC-L}$ aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-EDAC-L}$, depolanmasının 7. günü sonunda başlangıç aktifliğinin %89' unu; 14. günü sonunda %58' ini; 21. günü sonunda %31' ini ve 30. günü sonunda ise %28' ini korumuştur.

Siyanürik klorürle aktive edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-SC-L}$ aktifliğinin depolama süresi ile değişimi Şekil 4.21' de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-SC-L}$ aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-SC-L}$, depolanmasının 7. günü sonunda başlangıç aktifliğinin %87' sini; 14. günü sonunda %80' ini; 21. günü sonunda %57' sini ve 30. günü sonunda ise %34' ünü korumuştur.

Serbest ve immobilize lakkazların aktifliğine depolama süresinin etkisinin değerlendirilmesi

Serbest ve immobilize lakkazların depolamasının 7., 14., 21. ve 30. günündeki maksimum aktiflikleri toplu olarak Çizelge 4.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize lakkazların depolama süresince maksimum aktiflikleri

	Maksimum aktiflik (%)			
	7.gün	14. gün	21. gün	30. gün
Serbest Lakkaz	98	96	90	85
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-L}$	93	84	79	58
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-EDAC-L}$	89	58	31	28
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-SC-L}$	87	80	57	34

30 gün depolama süresince, immobilize lakkazların serbest lakkaza göre daha düşük bir maksimum aktiflik gösterdikleri belirlenmiştir. Immobilize lakkazların aktifliklerini depolama süresince daha hızlı kaybetmeleri üzerinde, kitosanın ve manyetik çekirdeklerin etkili olmuş olabileceği düşünülmektedir. Literatürde, kitosanın sulu ortamda ağır metal iyonları ile şelat oluşturma özelliğinden dolayı, lakkazın aktif merkezdeki Cu (II) iyonlarıyla şelat oluşturarak enzimin denatüre olmasına neden olabileceği belirtilmektedir [147]. Ayrıca, manyetik selülozik mikrokürelere kovalent bağlanma ile galaktoz oksidaz ve nörominidaz enzimlerinin immobilize edildiği bir çalışmada, immobilize enzimlerin depolanmasının 21. günü sonucunda, immobilize galaktoz oksidazın aktifliğinin %98' ini, immobilize noraminidazın ise başlangıç aktifliğinin ancak %2' sini koruduğu bildirilmiştir. Manyetik selülozik destek üzerine immobilize olan nöronaminidazın aktiflik kaybının, manyetik çekirdeklerin bu enzim için toksik bir etki yaratmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir [14]. Başka bir çalışmada ise, manyetik kitosan mikrokürelere adsorpsiyon ve çapraz bağlanma ile immobilize edilen *Pycnopus sanguineus* kaynaklı lakkazın 30 gün sonunda serbest lakkaza göre aktifliğini %40 daha fazla koruduğu bildirilmiştir [102].

Depolama süresince enzim aktifliğinde gözlenen bu farklılıklar üzerinde, manyetik destek materyalin polimerik mikroküre ya da nanoparçacık boyutlarında olmasının ve enzimlerin yapısına bağlı olarak kararlılıklarının farklı olabilmesinin rol oynadığı düşünülmektedir. Analitik ve endüstriyel uygulamalarda, Fe₃O₄-CS-L, Fe₃O₄-CS-EDAC-L Fe₃O₄-CS-SC-L' in 1 hafta içerisinde kullanılmasının daha uygun olabileceği söylenebilir.

4.5.4. Serbest ve immobilize lakkazların aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Enzim ile substrat arasındaki tepkime aşağıdaki gibidir:



Burada, E, enzim; S, substrat; ES, enzim-substrat kompleksi ve Ü, ürünü göstermektedir.

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

$$V = (V_{\text{mak}} \times [S]) / K_m + [S] \quad (4.2)$$

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

$$K_m = (k_2 + k_3) / k_1 \quad (4.3)$$

Michaelis-Menten eşitliğinin (Eş. 4.2) düzenlenmesi ile aşağıdaki Lineweaver-Burk eşitliği elde edilir:

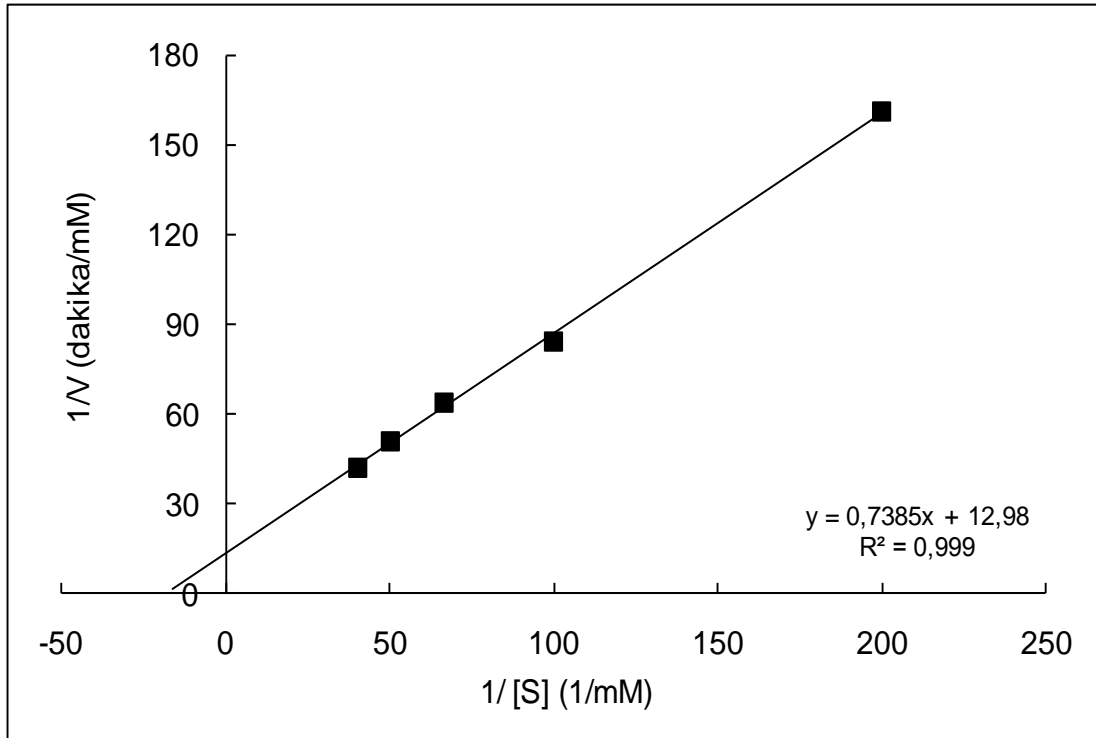
$$1/V = (K_m / V_{\text{mak}}) \times 1/[S] + 1/V_{\text{mak}} \quad (4.4)$$

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

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

Serbest lakkaz aktifliğinin substrat derişimi ile değişimi

Serbest lakkazın Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.22' de gösterilmiştir.

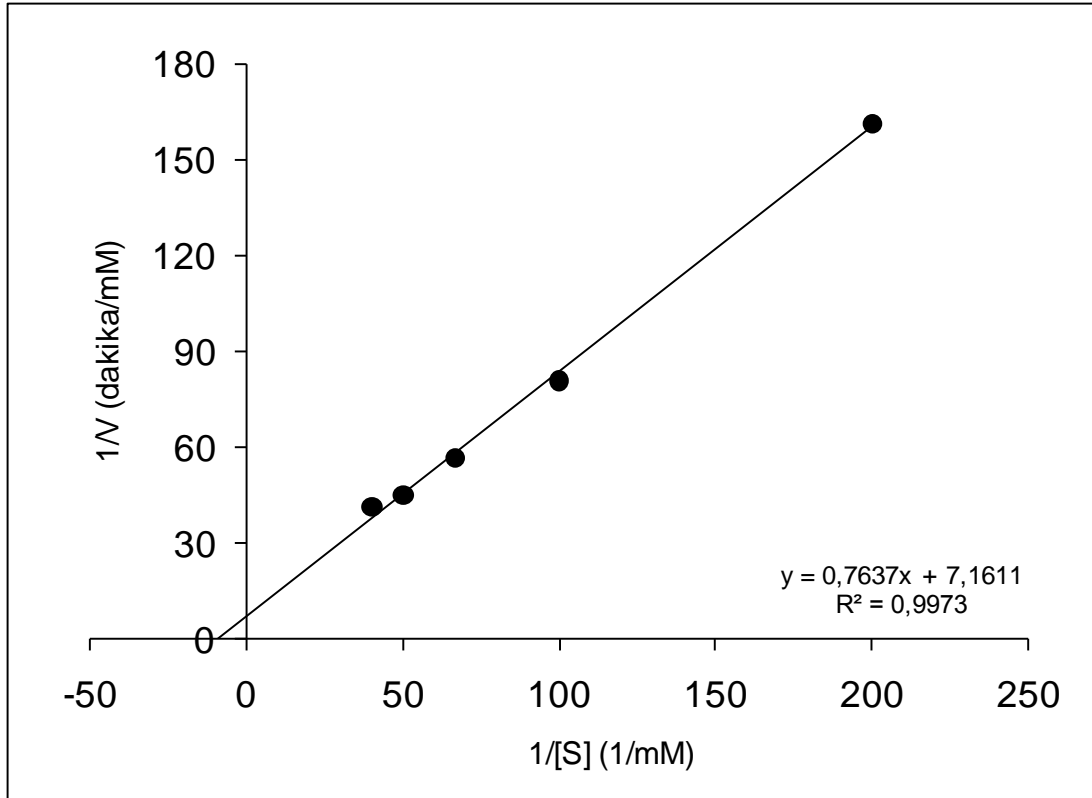


Şekil 4.22. Serbest lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği

Bu grafikteki doğru denklemi kullanılarak, serbest lakkaz için $K_m = 5,69 \times 10^{-2}$ mM, $V_{mak} = 7,70 \times 10^{-2}$ mM/dakika ve $V_{mak}/K_m = 1,35$ dakika⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz aktifliğinin substrat derişimi ile değişimi

Fe₃O₄-CS-L için Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.23' te gösterilmiştir.

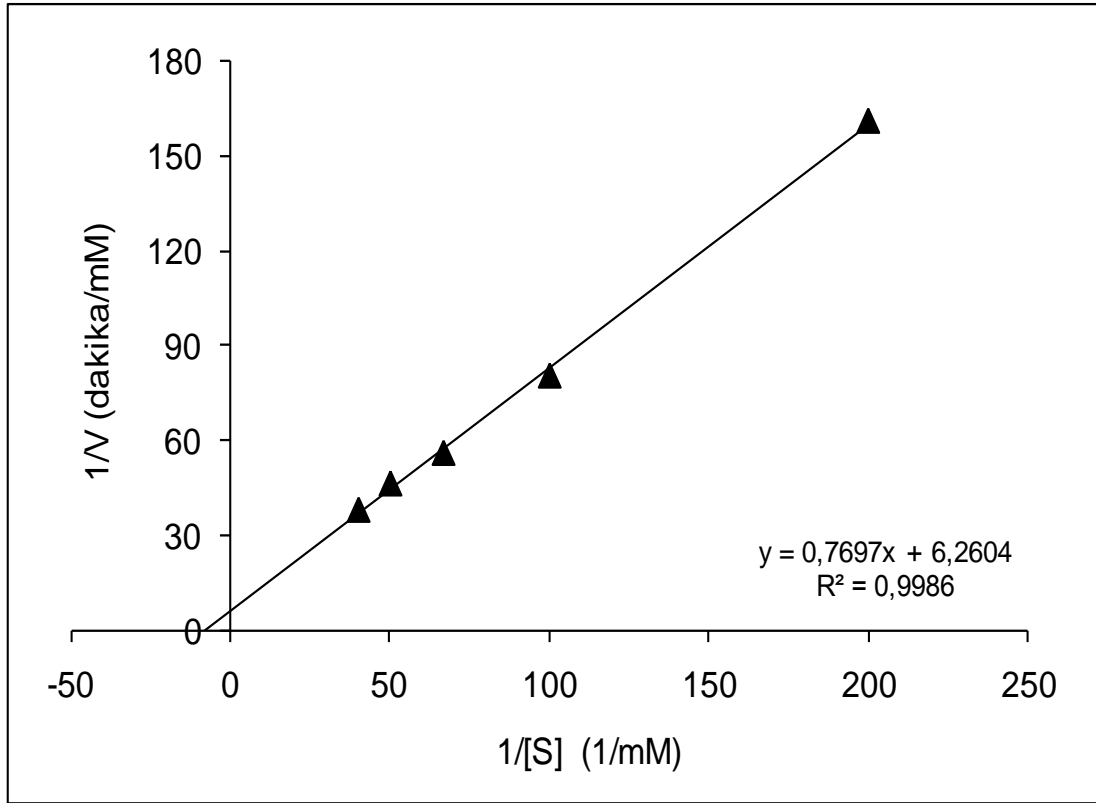


Şekil 4.23. Fe₃O₄-CS-L için Lineweaver-Burk grafiği

Fe₃O₄-CS-L için $K_m = 10,69 \times 10^{-2}$ mM, $V_{\text{mak}} = 14,00 \times 10^{-2}$ mM/dakika bulunmuş ve $V_{\text{mak}}/K_m = 1,31$ dakika⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Karbodiimitle aktiveştirilen Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz aktifiğinin substrat derişimi ile değışimi

Fe₃O₄-CS-EDAC-L için Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.24' te gösterilmiştir.

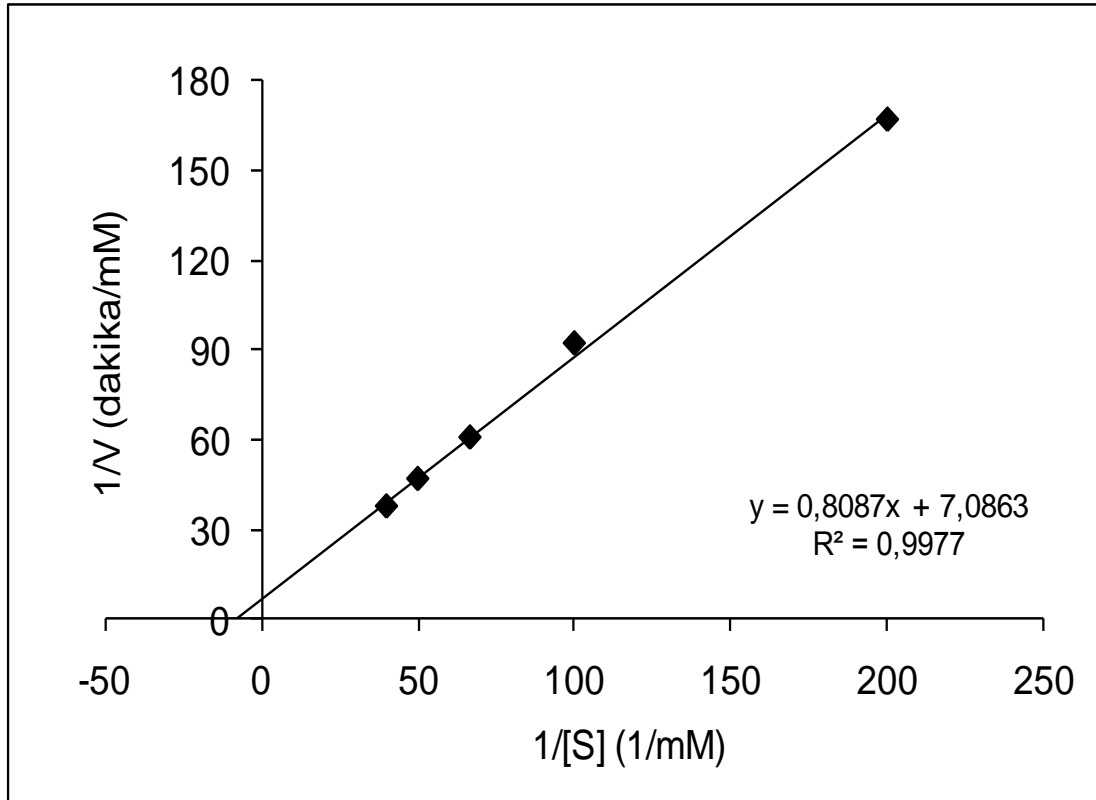


Şekil 4.24. Fe₃O₄-CS-EDAC-L için Lineweaver-Burk grafiği

Fe₃O₄-CS-EDAC-L için $K_m = 15,97 \times 10^{-2}$ mM, $V_{\text{mak}} = 12,29 \times 10^{-2}$ mM/dakika ve $V_{\text{mak}}/K_m = 1,30$ dakika⁻¹ olarak bulunmuştur.

Siyanürik klorürle aktifleştirilen Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına kovalent bağlanma immobilize edilen lakkaz aktifiğinin substrat derişimi ile değışimi

Fe₃O₄-CS-SC-L' in Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.25' te gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Fe₃O₄-CS-SC-L için Lineweaver-Burk grafiği

Fe₃O₄-CS-SC-L için $K_m = 11,41 \times 10^{-2}$ mM ve $V_{\text{mak}} = 14,11 \times 10^{-2}$ mM/dakika ve $V_{\text{mak}}/K_m = 1,24$ dakika⁻¹ olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize lakkazların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi

Serbest ve immobilize lakkazların K_m , V_{mak} ve katalitik etkinlik (V_{mak}/K_m) değerleri toplu olarak Çizelge 4.3' te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Serbest ve immobilize lakkazların kinetik parametreleri

	K_m (mM)	V_{mak} (mM/dakika)	V_{mak}/K_m (dakika ⁻¹)
Serbest Lakkaz	$5,69 \times 10^{-2}$	$7,70 \times 10^{-2}$	1,35
Fe ₃ O ₄ -CS-L	$10,69 \times 10^{-2}$	$14,00 \times 10^{-2}$	1,31
Fe ₃ O ₄ -CS-EDAC-L	$15,97 \times 10^{-2}$	$12,29 \times 10^{-2}$	1,30
Fe ₃ O ₄ -CS-SC-L	$11,41 \times 10^{-2}$	$14,11 \times 10^{-2}$	1,24

Michaelis-Menten sabiti, K_m , enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür. Bu çalışmada, *Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın ABTS substratına karşı K_m değeri 25°C ve pH 5,0' te $5,69 \times 10^{-2}$ mM bulunmuştur. K_m sabiti, enzimin elde edildiği kaynağa, çalışılan substrat derişimi aralığına ve sıcaklığa bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Literatürde, *Cerrena unicolor*, *Trametes hirsuta* ve *Pycnoporus sanguineus*' dan elde edilen serbest lakkazın ABTS substratına karşı farklı deney koşullarındaki K_m değerleri sırasıyla 0,183 mM [148], $7,5 \times 10^{-2}$ mM (75 μ M) [149] ve $3,68 \times 10^{-2}$ mM (36,8 μ m) [102] olarak bildirilmiştir. Enzim immobilize edildiğinde, K_m değeri artabilir ya da azalabilir. Immobilize enzimin K_m değerinin serbest enzime göre azalması, serbest enzime göre daha hızlı tepkime verme eğiliminde olduğunu; artması ise, serbest enzimle aynı reaksiyon hızına sahip olması için daha fazla miktarda substrata ihtiyacı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmadaki deney sonuçları, tüm immobilize lakkazların K_m değerinin, serbest lakkaza göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. K_m ' nin artması üzerinde, immobilize enzim-substrat kompleksinin oluşma ihtimalini düşüren protein molekülündeki konformasyonel değişimler ve sterik engellemeler rol oynamaktadır [145]. Literatürde, manyetik kitosan mikrokürelere adsorpsiyon ve çapraz bağlanma ile ve bakır tetraaminoftalosyanin manyetik nanokompozitine çapraz bağlanma ile immobilize edilen *Pycnoporus sanguineus* kaynaklı lakkazın ABTS substratına karşı K_m değerleri sırasıyla $17,11 \times 10^{-2}$ mM (171,1 μ m) [102] ve $2,38 \times 10^{-2}$ mM ($2,38 \times 10^{-5}$ M) olarak bildirilmiştir [105]. *Rhus vernicifera*' dan elde edilen lakkazın fenol substratına karşı K_m değeri 0,20 mM, bu enzim kromik asitle modifiye edilmiş polipropilen membran üzerine immobilize edildiğinde K_m değeri 0,36 mM bulunmuştur [148].

Bu çalışmada Fe_3O_4 -CS-L, Fe_3O_4 -CS-EDAC-L ve Fe_3O_4 -CS-SC-L için K_m değerleri serbest lakkaza göre sırasıyla, 1,88, 2,81 ve 2,00 kat artmış ve kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkazların, K_m değeri adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaza göre daha fazla artış göstermiştir. Kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkazların K_m değerinin daha fazla artmasının, enzimin tersiyer yapısının daha çok etkilenmesinden

kaynaklandığı düşünölmektedir. Literatürde, manyetik kitosan mikrokürelere adsorpsiyon ve çapraz bağlanma ile immobilize edilen *Pycnopus sanguineus* kaynaklı lakkazın K_m değeriinin serbest lakkaza göre 4,6 kat artış gösterdiği bildirilmiştir [102]. Bu tez çalışmasındaki immobilize enzimlerin, K_m değeriindeki artışın, literatürdeki bu bulguya oranla daha az olması nedeniyle, immobilize enzimin orijinal moleküler formunu daha fazla koruduğu söylenebilir.

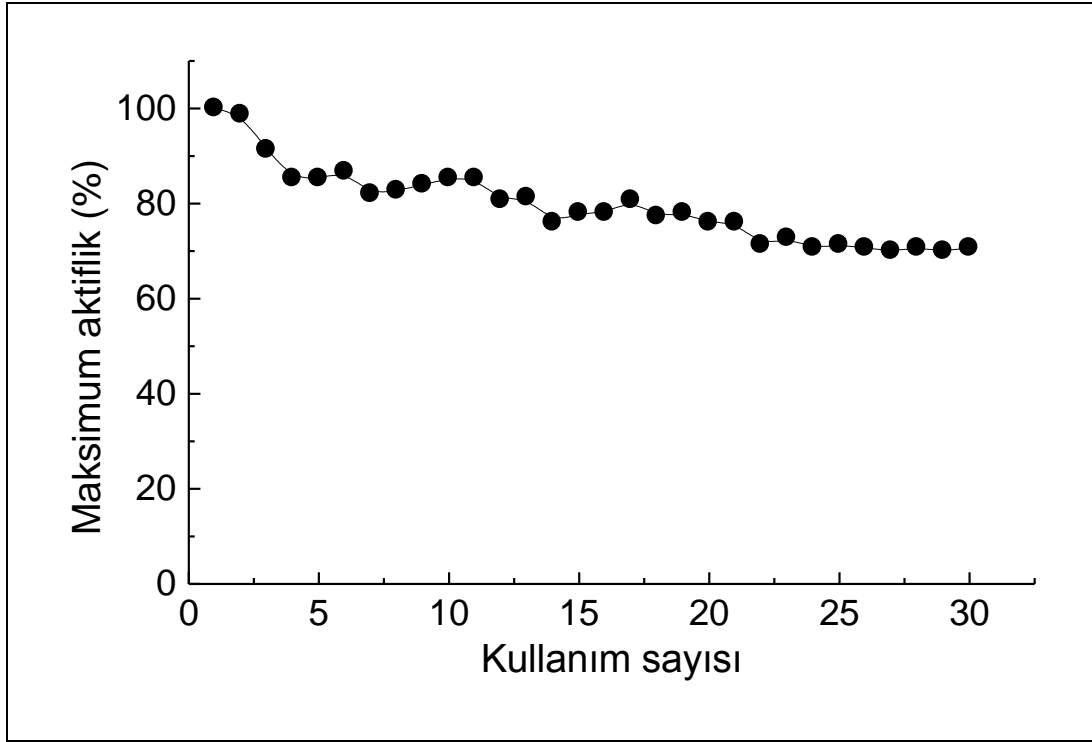
Ayrıca, Fe_3O_4 -CS-L, Fe_3O_4 -CS-EDAC-L ve Fe_3O_4 -CS-SC-L' ın katalitik etkinlik değeriilerinin, serbest lakkaza göre az da olsa azalış göstermesi, immobilize enzimlerin substratı katalizleme etkinliğinin enzimin 3-boyutlu yapısında meydana gelen değışmeler nedeniyle olduğu şeklinde yorumlanabilir.

4.5.5. İmmobilize lakkaz aktifliğine kullanım sayısının etkisi

İmmobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarda tekrar tekrar kullanıldıklarında aktifliklerini yitirmemeleri, en fazla aranılan özelliklerindendir. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına adsorpsiyon, karbodimitle aktifleştirerek kovalent bağlanma ve siyanürük klorürle aktifleştirerek kovalent bağlanma yöntemleri ile immobilize edilen lakkazların aktifliğine, kullanım sayısının etkisinin incelenmesi için, immobilize enzimler 1 gün içerisinde art arda 30 kez ABTS substratına karşı kullanılmış ve enzim aktifliğinin kullanım sayısı ile değışimi incelenmiştir.

Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değışimi

Fe_3O_4 -CS-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değışimi Şekil 4.26' da gösterilmiştir.

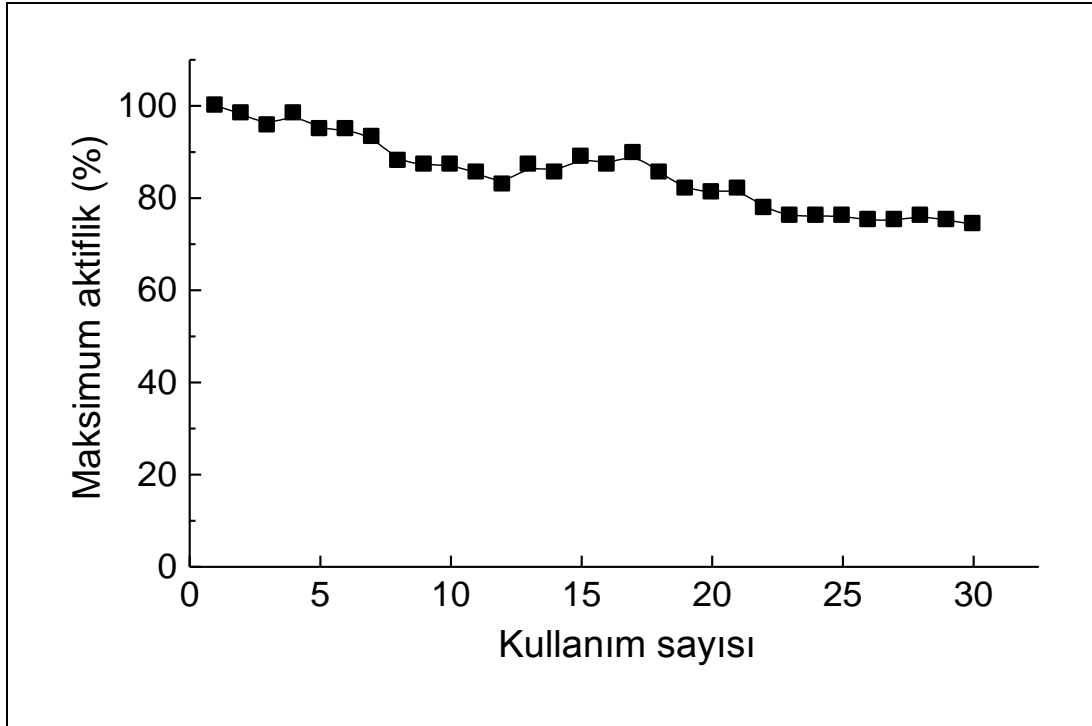


Şekil 4.26. Fe₃O₄-CS-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Fe₃O₄-CS-L, ABTS substratına karşı 10. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %85' ini, 20. kez kullanıldığında %76' sını, 30. kez kullanıldığında ise %71' ini koruyarak, yüksek bir aktiflikle tekrar tekrar kullanılabilmiştir. Literatürde, manyetik kitosan mikrokürelere adsorpsiyon ve çapraz bağlanma ile immobilize edilen lakkazın, ABTS substratına karşı 10. kez kullanıldığında maksimum aktifliğinin %80' ini koruduğu bildirilmiştir [102]. Dolayısıyla, Fe₃O₄-CS-L, bu manyetik kitosan mikrokürelere göre 10. kullanım sonunda aktifliğini daha yüksek oranda korumuştur.

Karbodiimitle aktive edilen Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Fe₃O₄-CS-EDAC-L aktifliğinin tekrar kullanım sayısı ile değişimi Şekil 4.27' de gösterilmiştir.

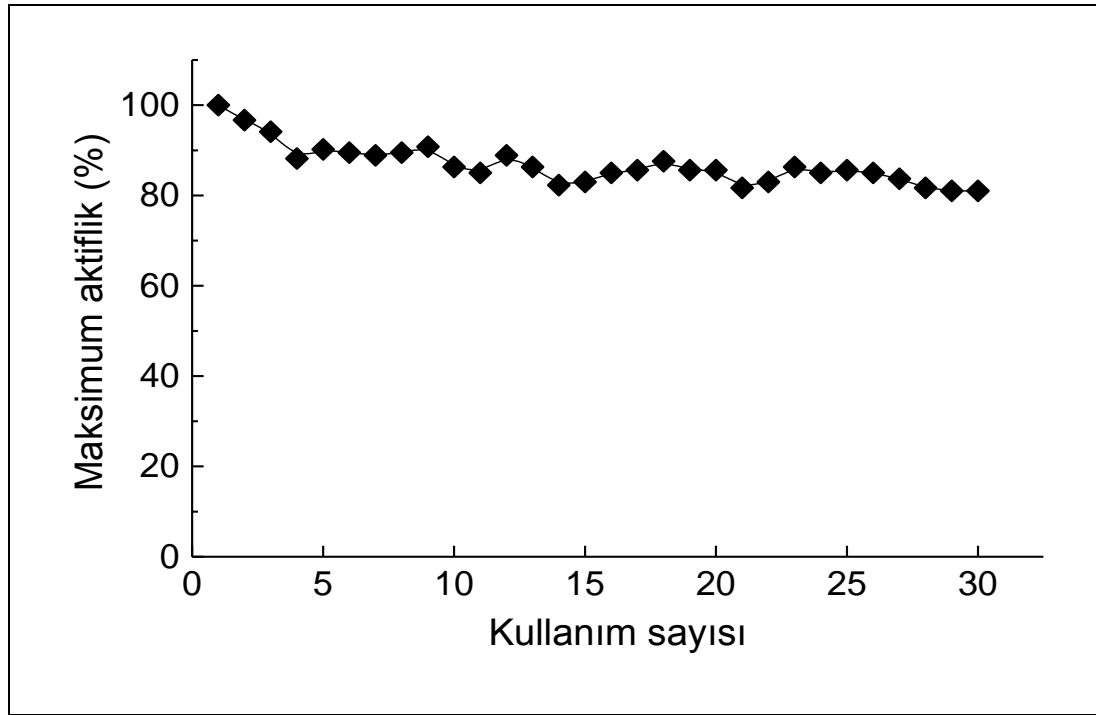


Şekil 4.27. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-EDAC-L}$ aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-EDAC-L}$, 10. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %87' sini, 20. kullanımda %81' ini, 30. kullanımda ise %74' ünü korumuştur. Bu yöntemle immobilize edilen lakkaz, adsorpsiyonla immobilize edilen lakkaza göre, her bir kullanımda daha yüksek bir maksimum aktiflik göstermiştir. Ayrıca, elde edilen sonuçların literatürde bildirilenlerin oldukça üzerinde olduğu görülmüştür. Manyetik kalsiyum aljinat nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz, 10. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %50' sini [18], manyetik bakır tetraaminoftalosyanin nanokompozitine çapraz bağlanma ile immobilize edilen lakkaz, 5. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %80' ini [105], manyetit içeren mezoporöz silika küreciklerine kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz 10. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %70' ini [106] ve N-hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş polivinil alkole kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz, 10. kullanım sonunda başlangıç aktifliğinin %60' ını korumuştur [142].

Siyanürük klorürle aktiveleştirilen Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Fe_3O_4 -CS-SC-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Şekil 4.28' de gösterilmiştir.



Şekil 4.28. Fe_3O_4 -CS-SC-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Fe_3O_4 -CS-SC-L, 10. ve 20. kez kullanıldığında başlangıç aktifliğinin %86' sını, 30. kullanımda ise %81' ini korumuş ve bu çalışmadaki immobilize enzimler içerisinde tekrar kullanıma karşı aktifliğini en fazla koruyan immobilize enzim olmuştur.

4.6. Fe_3O_4 -Kitosan Nanoparçacıklarına Boyarmadde Adsorpsiyonu

Reaktif Sarı 145 (RY145)' in Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına sulu ortamdan adsorpsiyonu incelenmiş ve belirli bir t süre sonunda, kuru haldeki Fe_3O_4 -CS

nanoparçacıklarının 1 gramı başına adsorplanan RY145 miktarı, q_t , Eş. 4.5' e göre hesaplanmıştır.

$$q_t = [((A_0 - A_t) / \text{eğim}) \times V] / m \quad (4.5)$$

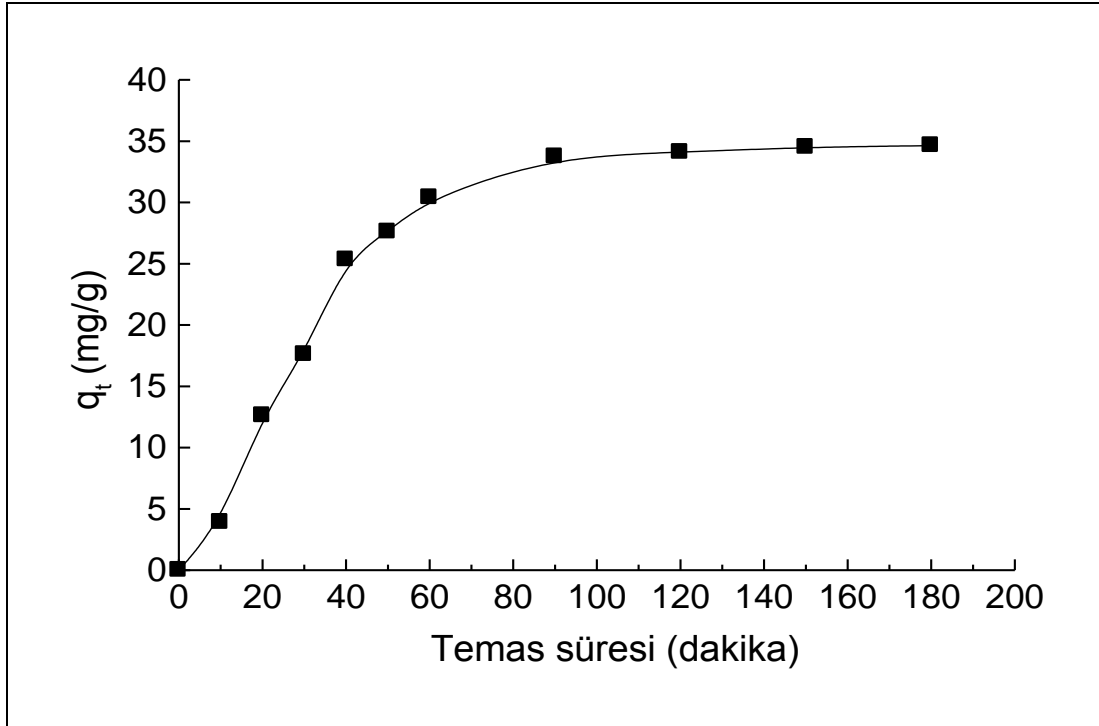
Bu bağıntıda, A_0 , RY145 çözeltisinin $t = 0$ anındaki absorbansını; A_t , t süre sonundaki absorbansını; eğim, RY145 kalibrasyon eğrisinin eğimini (L/mg); V , boyarmadde çözeltisinin hacmini (L) ve m , Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının gram cinsinden kütlesini göstermektedir. Bu eşitliğe göre, q_t , mg/g biriminde hesaplanmıştır (Bkz. EK-15).

4.6.1. Reaktif Sarı 145 kalibrasyon grafiğinin oluşturulması

RY145 kalibrasyon grafiği, boyarmadde sulu çözeltisinin görünür bölgede maksimum absorbansa sahip olduğu dalga boyu olan 419 nm' de, absorbansın derişimle doğrusal olarak arttığı derişim aralığı içerisinde (0-200 mg/L) oluşturulmuştur (Şekil 3.10).

4.6.2. Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna temas süresinin etkisi

Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına 10., 20., 30., 40., 50., 60., 90., 120. ve 180. dakikalarda adsorplanan RY145 miktarı Eş. 4.5.' e göre hesaplanmış ve q_t değerlerinin zamanla değişimi Şekil 4.29' da gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun temas süresi ile değişimi

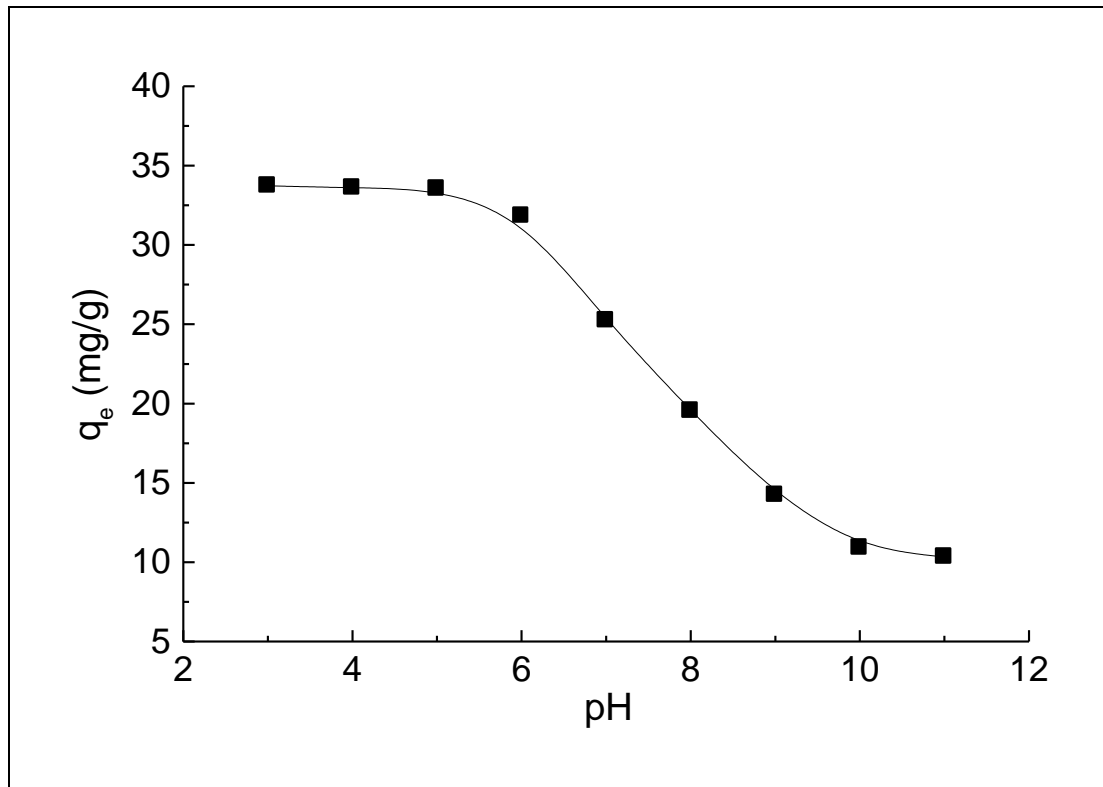
Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına adsorplanan RY145 miktarı, q_t , 0-90. dakikalar arasında artmış, 90. dakikadan sonra fazlaca değişmemiştir. Dolayısıyla adsorpsiyon, 90 dakikada dengeye ulaştığı söylenebilir. Bu nedenle, bundan sonraki tüm deneyler bu sürede yürütülmüş ve ölçümler bu süre sonunda alınmıştır. Ayrıca, q_t değerleri de, dengede 1 gram adsorplayıcı başına adsorplanan miktar cinsinden (q_e) verilmiştir.

90 dakika sonunda 1 gram Fe_3O_4 -CS nanoparçacıkları başına adsorplanan RY145 miktarı, $q_t = q_e = 33,73$ mg/g Fe_3O_4 -CS bulunmuştur. Boyarmadde adsorpsiyonunun dengeye gelme süresi, boyarmaddenin ve adsorplayıcının özelliklerine ve adsorpsiyon koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Literatürde, manyetik poli(oksi-2,6-dimetil-1,4-fenilen) kompozitine azo, trifenilmetan ve heteropolisiklik boyaların adsorpsiyonunun 60-90 dakika arasında [23], amin grupları ile modifiye edilmiş manyetik silika parçacıkları üzerine Asit Turuncu 10 adsorpsiyonunun 1 saatte [65], karboksimetil kitosan

manyetik nanoadsorplayıcısına Asit Turuncu 12 ve Asit Yeşil 25 adsorpsiyonunun 20-30 dakikada [110] ve iki farklı katyonik yüzey aktif madde ile modifiye edilmiş hektorit minerali üzerine Reaktif Turuncu 122 adsorpsiyonunun 2-3 saatte dengeye geldiği bildirilmiştir [150].

4.6.3. Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna pH etkisi

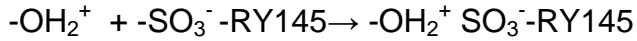
Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonuna pH etkisi pH 3,0 - 11,0 aralığında incelenmiş ve q_e değerlerinin pH ile değişimi Şekil 4.30' da gösterilmiştir.



Şekil 4.30. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun pH ile değişimi

Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına maksimum miktarda RY145 adsorpsiyonu, pH 3,0' te gözlenmiştir ($q_e = 33,73$ mg/g). pH 3,0-11,0 aralığında q_e değerleri 33,73 mg/g ile 10,33 mg/g arasında değişmiştir. Fe_3O_4 -CS

nanoparçacıklarının Bölüm 4.2.5' te verilen ζ -potansiyeli ölçümlerinde, bu nanoparçacıklarının yüzey potansiyeli pH 2,78-3,70 aralığında 24,7-23,2 mV arasında ölçülmüştür (Ayrıca *Bkz.* EK-8). pH 2,78-3,70 aralığındaki bu yüzey potansiyeli değerleri, ölçüm alınan tüm pH değerleri içerisindeki en yüksek pozitif değerlerdir ve dolayısıyla Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının pozitif yük yoğunluğu, bu pH aralığında en yüksektir. Bu nedenle, -SO₃⁻ grupları taşıyan RY145' in (-SO₃⁻-RY145), pH 3,0' te, Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının -OH₂⁺ gruplarına, aşağıda gösterilen elektrostatik etkileşmelerle tutunduğu düşünülebilir:

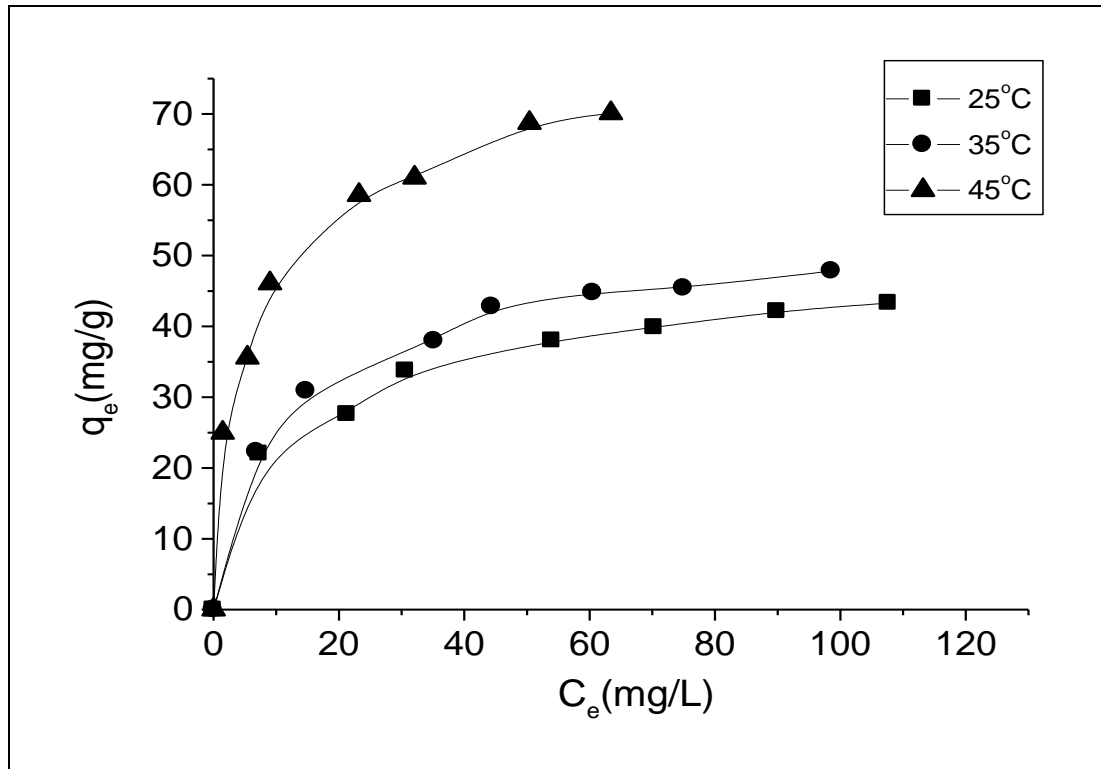


Şekil 4.31' de, pH = 6,0' dan yüksek pH değerlerinde, q_e değerlerinin giderek azaldığı görülmektedir. Bölüm 4.2.5' te anlatıldığı üzere, ζ -potansiyeli ölçümleri ile pI değeri 6,86 olarak belirlenen Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının yüzeyi, ortam pH' sı 6,86' dan yüksek olduğunda negatif yüklü hale gelmektedir. Dolayısıyla, boyarmaddenin -SO₃⁻ grupları ile bu nanoparçacıklar arasındaki elektrostatik itmelerin varlığı, adsorplanan RY145 miktarının azalmasına neden olmuştur.

Literatürde yer almış ve manyetik adsorplayıcılarla yapılmış çalışmalarda da, çeşitli iyonik gruplar taşıyan boyarmaddelerin adsorpsiyonu üzerinde, ortam pH' sının önemli rol oynadığını gösteren bulgulara rastlanılmıştır. Karboksimetil-kitosan manyetik nanoadsorplayıcısına anyonik azo boyarmaddelerden Asit Turuncu 12 ve Asit Yeşil 25 adsorpsiyonunun her iki boyarmadde için maksimum miktarda pH 3,0' te gerçekleştiği ve pH' nın artmasıyla adsorplanan boyarmadde miktarının azaldığı bildirilmiştir [110]. Ligninoselüloz esaslı manyetik nanoparçacıklara katyonik triarilmetan boyalarından kristal viyolenin adsorpsiyonunda ise, pH' nın 4,2' den 9,2' ye değişmesiyle yüzeyi negatif yüklü hale gelen ligninoselüloza adsorplanan kristal viyole miktarı artmıştır [25].

4.6.4. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi 25°C, 35°C ve 45°C' de incelenmiştir. Her bir sıcaklık değerinde, sıcaklık sabit tutularak, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ve 200 mg/L' lik RY145 çözeltileri ile adsorpsiyon başlatılmış ve adsorpsiyon dengeye ulaştıktan sonra, her bir RY145 çözeltisinin derişimine karşı (C_e), 1 gram Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları başına adsorplanan RY145 miktarı (q_e) grafiğe geçirilerek oluşturulan izoterm eğrileri Şekil 4.31' de gösterilmiştir.



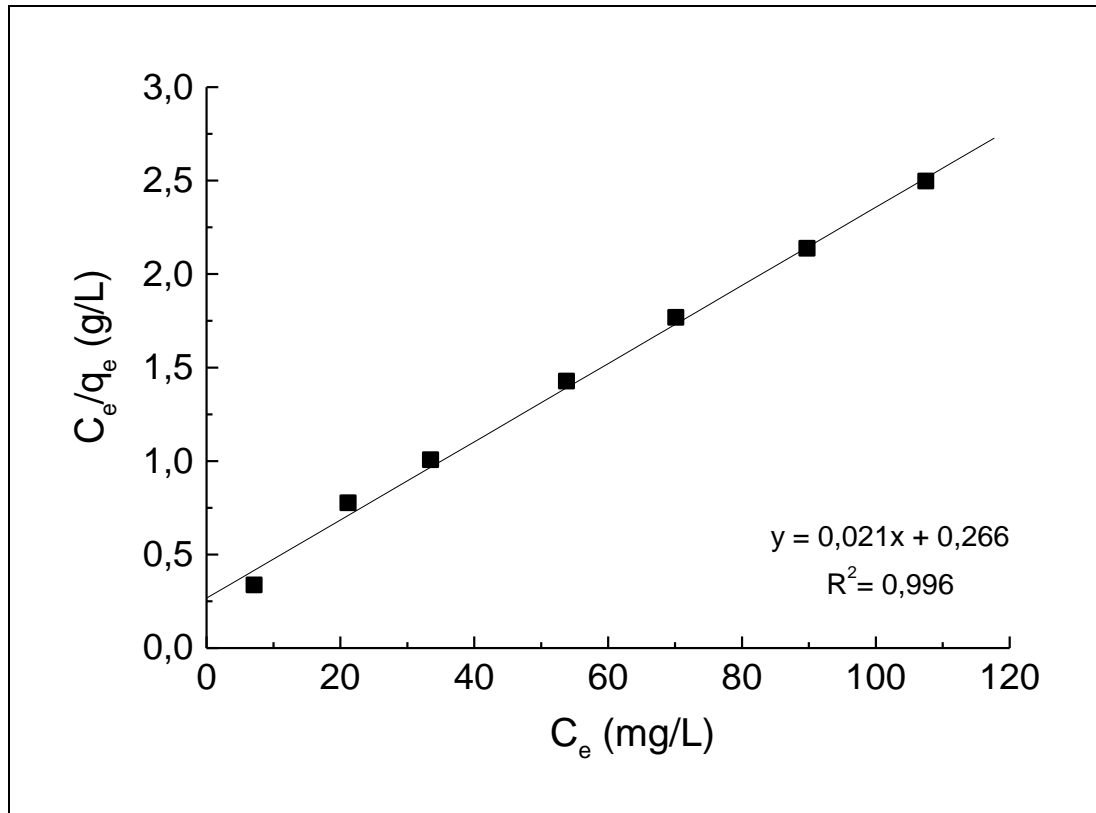
Şekil 4.31. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun farklı sıcaklıklardaki izoterm eğrileri

Sıcaklığın 25°C' den 45°C' ye artmasıyla, q_e değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Sıcaklığın yükselmesiyle boyarmadde adsorpsiyonunun artması, boyarmadde moleküllerinin hareketliliğinin ve adsorplayıcıya difüzyon hızının sıcaklıkla artması ve böylelikle, adsorplanan boyarmadde miktarının artış

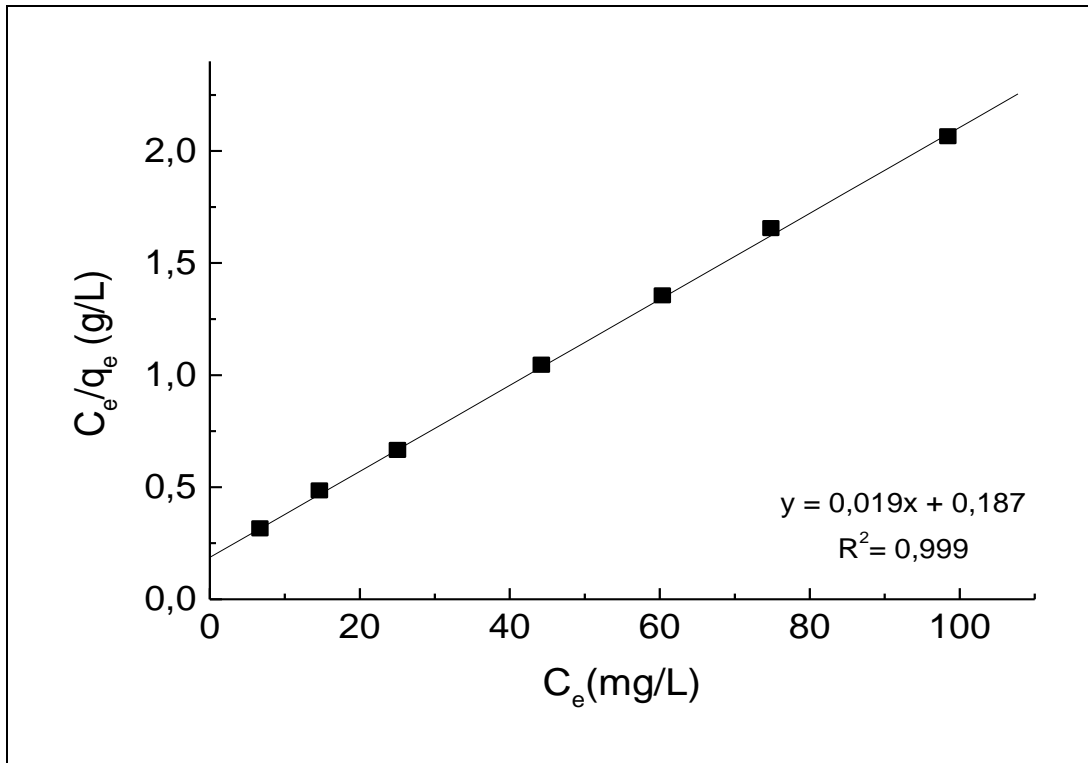
göstermesi ile açıklanabilir [60,61,151]. Literatürde, manyetik kitosan reçinelerine Reaktif Siyah 5 [112], poliakrilik asit bağlı manyetik demiroksit nanoparçacıklarına metilen mavisi [24] ve sepiyolite Reaktif Mavi 221 ve Asit Mavi 62' nin adsorpsiyonlarının sıcaklık arttıkça arttığı bildirilmiştir [151].

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun Langmuir modeline göre incelenmesi

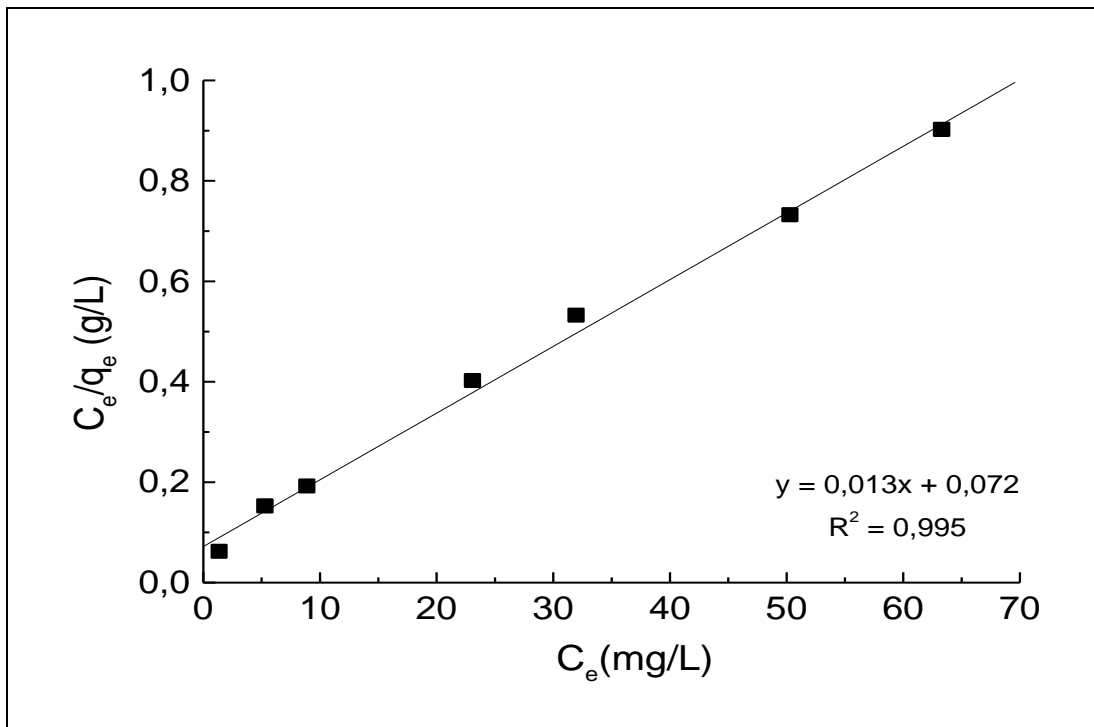
Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun Langmuir modeline uygunluğunun araştırılması için 25°C, 35°C ve 45°C' de, 90. dakika sonundaki (dengedeki) çözelti derişimlerine (C_e) karşı C_e/q_e değerleri grafiğe geçirilmiş ve her bir sıcaklık için oluşturulan grafikler, sırayla Şekil 4.32, Şekil 4.33 ve Şekil 4.34' te gösterilmiştir.



Şekil 4.32. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun C_e değerlerine karşı C_e/q_e grafiği (25°C)



Şekil 4.33. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun C_e değerlerine karşı C_e/q_e grafiği (35°C)



Şekil 4.34. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun C_e değerlerine karşı C_e/q_e grafiği (45°C)

Her bir sıcaklık için çizilen bu grafiklerde, C_e/q_e değerlerinin C_e değerleri ile doğrusal olarak değiştiği görülmüş ve Eş. 2.10' a göre, doğrunun eğimine eşit olan $1/q_{\text{mak}}$ değerinden maksimum adsorpsiyon kapasitesi, q_{mak} ve ayrıca $1/K_L q_{\text{mak}}$ değerine eşit olan y eksenini kesim noktasından Langmuir denge sabiti, K_L hesaplanmıştır. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun Langmuir modeline uygunluğu ile ilişkili olan ayırma faktörü (denge parametresi) (R_L) değerleri, Eş. 2.11' e göre hesaplanmış ve Çizelge 4.4' te verilmiştir.

Çizelge 4.4. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun Langmuir modeline göre belirlenen parametreleri ve model sabitleri

Sıcaklık (°C)	Doğru denklemleri	q_{mak} (mg/g)	K_L (L/mg)	R_L ($C_0 = 50\text{-}200$ mg/L)	r^2
25	$y = 0,021x + 0,266$	47,62	0,0789	0,20-0,06	0,996
35	$y = 0,019x + 0,187$	52,63	0,1016	0,16-0,05	0,999
45	$y = 0,013x + 0,072$	76,92	0,1806	0,10-0,03	0,995

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun 25°C , 35°C ve 45°C ' de Langmuir modeline göre çizilen doğruların r^2 değerleri 1,000' e yakın olması modele uyumluluğu göstermektedir. Şekil 4.31' de gösterilen izoterm eğrilerinde, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına maksimum miktarda adsorplanan RY145 miktarı 25°C , 35°C ve 45°C ' de deneysel olarak 43,30; 47,83 ve 70,10 mg/g bulunmuştur. Deneysel olarak bulununan q_{mak} değerleri, Çizelge 4.4' te verilen doğru denklemlerinden hesaplanarak bulunan değerlere yakındır fakat biraz altındadır. Bunun, ağırlıklı olarak tek tabaka olduğu düşünülen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun adsorbanın bazı bölgelerinde tek tabaka halinde olmadığını ve az da olsa heterojen bölgelerin olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, literatürde de benzer bir eğilime rastlanmış ve Langmuir modeline uyduğu belirtilen amin grupları ile modifiye edilmiş manyetik ve manyetik olmayan

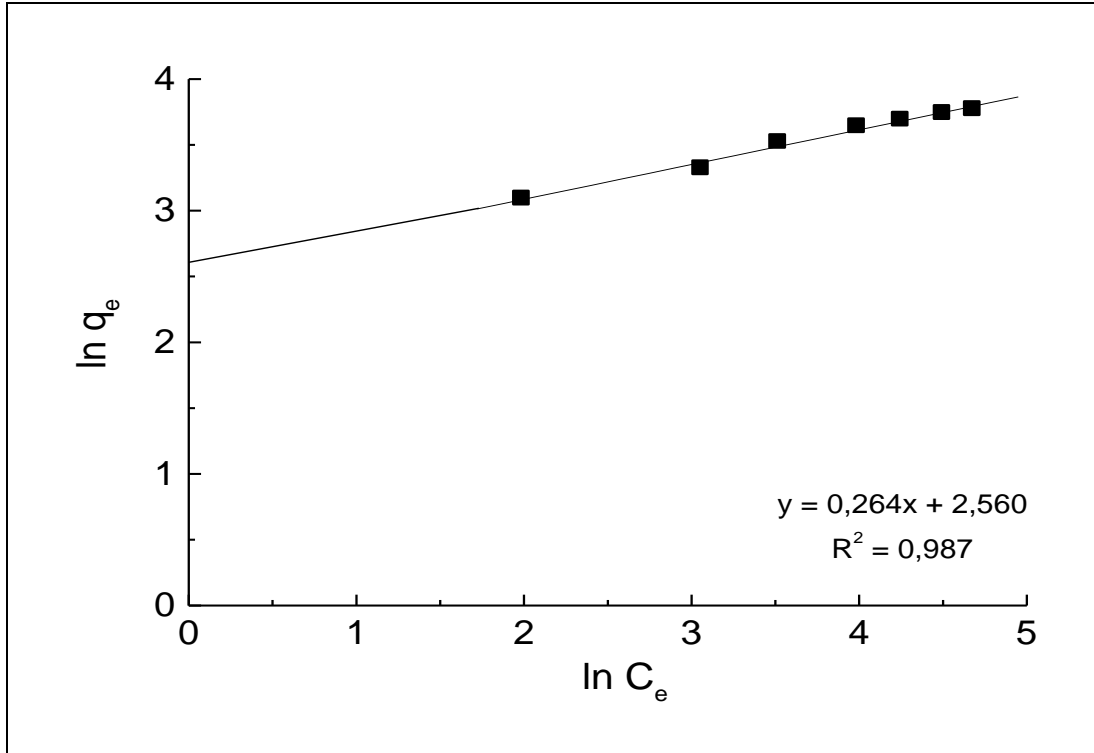
silika parçacıkları üzerine Asit Turuncu 10 adsorpsiyonu için maksimum adsorpsiyon kapasitesi 25°C' de sırasıyla 49,98 mg/g ve 61,33 mg/g bildirilmiş, bu değerler Langmuir modeline göre hesaplandığında ise 65,89 mg/g ve 61,14 mg/g bulunmuştur [65].

Bu çalışmada, sıcaklığın 25°C' den 45°C' ye değişmesi ile K_L değerleri, 0,0789 L/mg' dan ve 0,1806 L/mg' a artmıştır. K_L değerlerindeki artmanın, RY145 boyarmaddesinin Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına tutunma kuvvetinin, sıcaklıkla artış göstermesinden dolayı olduğu düşünülmektedir. Literatürde yer almış bir çalışmada da, iki farklı manyetik kitosan reçinesine Reaktif Siyah 5 adsorpsiyonu için, sıcaklığın 25°C' den 45°C' ye artmasıyla K_L değerlerinin arttığı bildirilmiştir [112].

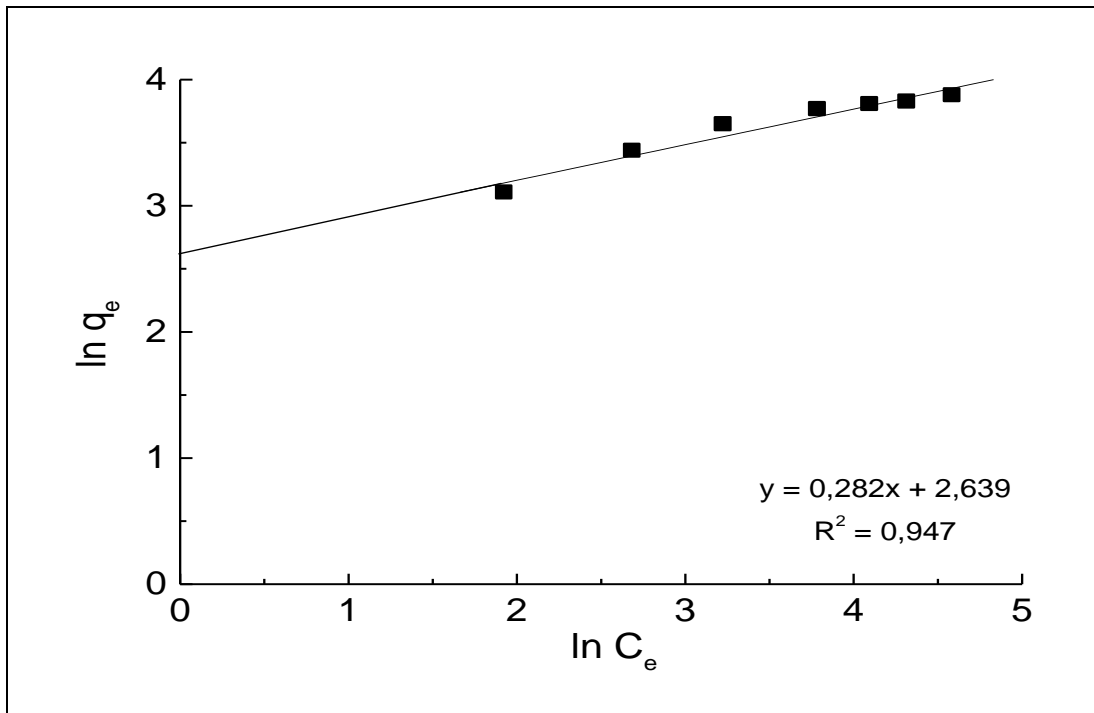
Çizelge 4.4' te verilen Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının RY145'e karşı ayırma faktörü (R_L) değerleri, 25°C, 35°C ve 45°C' de 0 ile 1 arasında değişim göstermiştir. Bu sonuç, Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermine uygun olduğunu göstermiştir.

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun Freundlich modeline göre incelenmesi

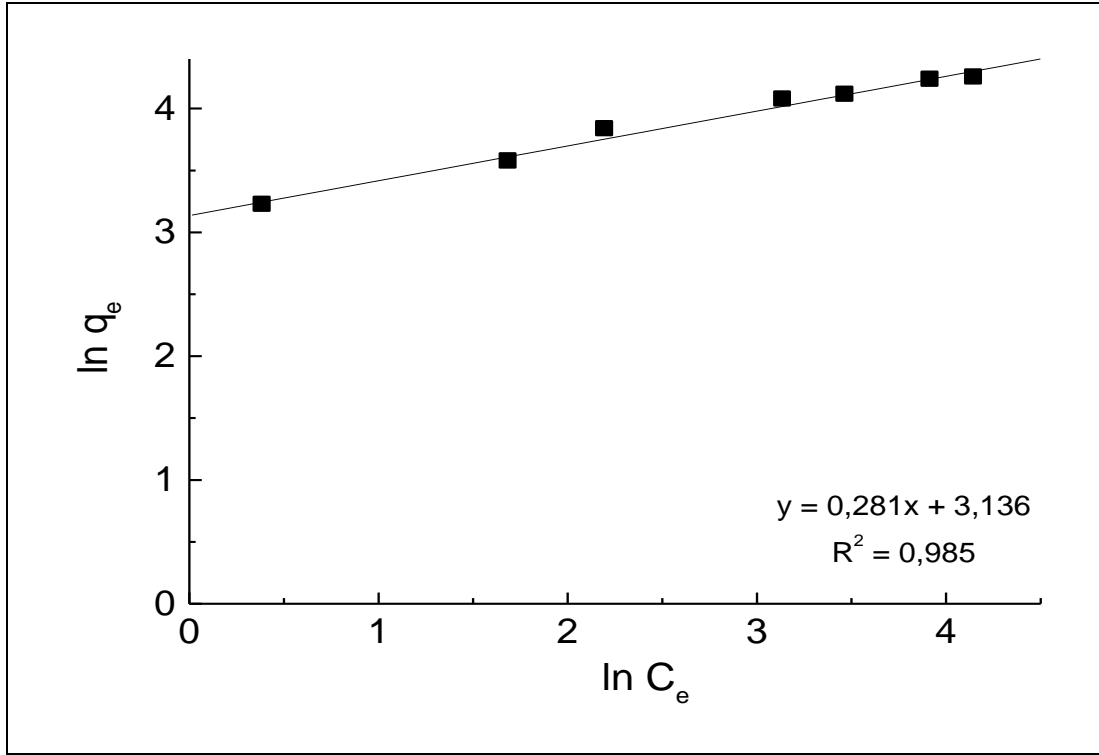
Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun Freundlich modeline uygunluğunun araştırılması için 25°C, 35°C ve 45°C' de; $\ln C_e$ değerlerine karşı $\ln q_e$ değerleri grafiğe geçirilmiş ve her bir sıcaklık için oluşturulan grafikler Şekil 4.35, Şekil 4.36 ve Şekil 4.37' de gösterilmiştir.



Şekil 4.35. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun $\ln C_e$ değerlerine karşı $\ln q_e$ grafiği (25°C)



Şekil 4.36. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun $\ln C_e$ değerlerine karşı $\ln q_e$ grafiği (35°C)



Şekil 4.37. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun ln C_e değerlerine karşı ln q_e grafiği (45°C)

Bu grafiklerde, ln q_e değerlerinin ln C_e değerleri ile doğrusal olarak değiştiği görülmüş ve Eş. 2.13' ten doğrunun eğimine eşit olan 1/n değerinden n sabiti; y eksenini kesim noktası olan ln K_F değerlerinden K_F değeri hesaplanarak Çizelge 4.5' te gösterilmiştir.

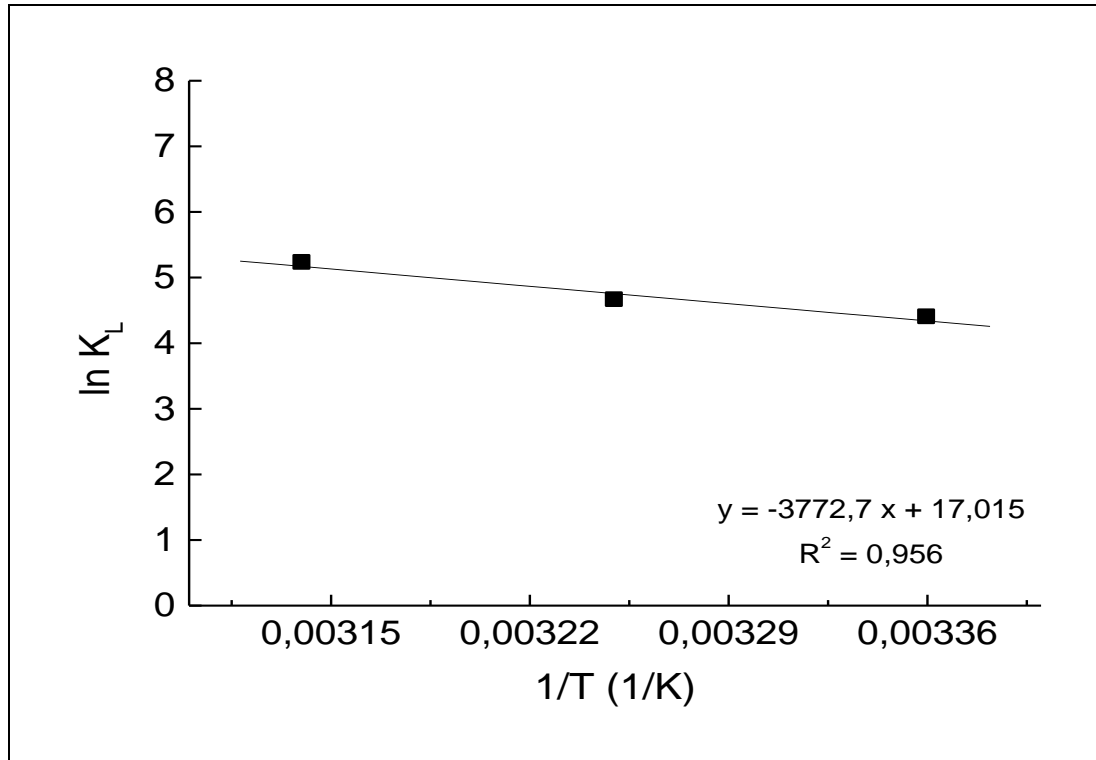
Çizelge 4.5. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun Freundlich modeline göre belirlenen parametreleri ve model sabitleri

Sıcaklık (°C)	Doğru denklemi	n	K _F (L/mg)	r ²
25	y = 0,264x+2,560	3,788	12,94	0,987
35	y = 0,282x+2,639	3,546	14,00	0,947
45	y = 0,281x+3,136	3,557	23,01	0,985

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun 25°C , 35°C ve 45°C ' de Freundlich modeline göre çizilen doğruların r^2 değerleri, Langmuir modeline göre elde edilen r^2 değerlerine göre (Bkz. Çizelge 4.4) 1,000' den daha uzaktır. Bu nedenle, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun Langmuir modeline daha uygun olduğu söylenebilir.

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun termodinamik açıdan incelenmesi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun ΔG° , ΔS° ve ΔH° değerlerinin hesaplanması için, RY145 adsorpsiyonuna en uyumlu model olan Langmuir modeline göre, 25°C , 35°C ve 45°C için hesaplanan K_L değerleri kullanılmış ve Çizelge 4.4' te L/mg biriminde verilen K_L değerleri mmol cinsinden hesaplandıktan sonra, Eş. 2.16' ya göre, $1/T$ değerlerine karşı $\ln K_L$ değerleri grafiğe geçirilerek Şekil 4.38' de gösterilmiştir.

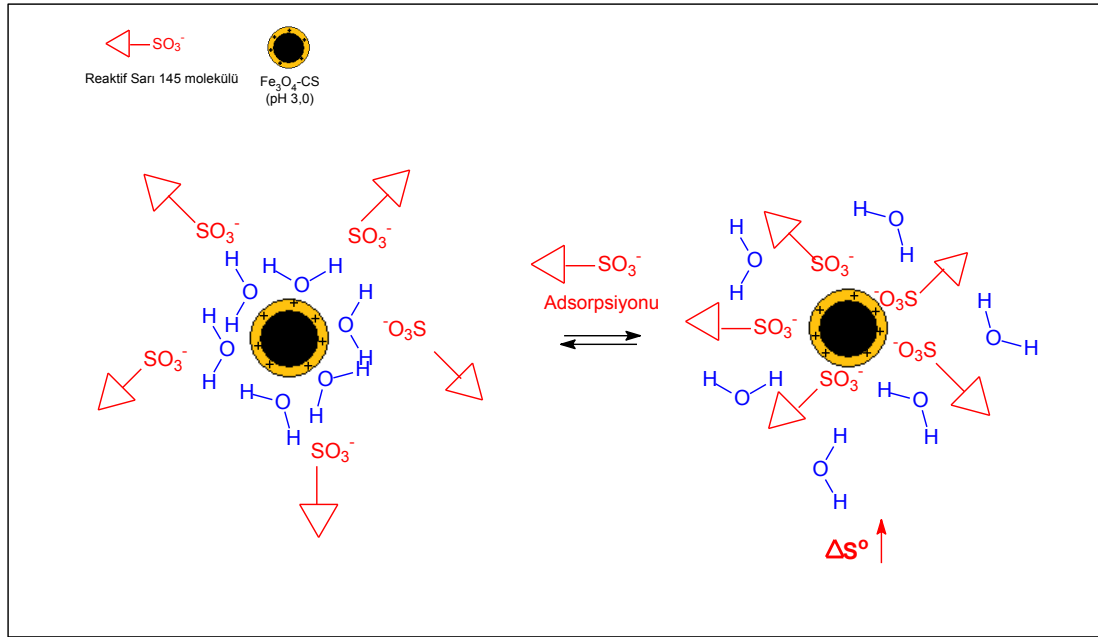


Şekil 4.38. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun $1/T$ değerlerine karşı $\ln K_L$ grafiği

1/T değerlerine karşı K_L değerleri için çizilen doğrunun eğimi $-\Delta H^\circ/R$ ve y eksenini kayması $\Delta S^\circ/R$ değerlerine eşittir. $R = 8,314 \text{ J/molK}$ alınarak; $\Delta H^\circ = 31,37 \text{ kJ/mol}$ ve $\Delta S^\circ = 141,46 \text{ J/molK}$ bulunmuştur. Hesaplanan ΔH° ve ΔS° değerleri kullanılarak, Eş. 2.15' ten adsorpsiyonun standart serbest enerjisi, $\Delta G^\circ = -10,79 \text{ kJ/mol}$ bulunmuştur.

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun ΔG° değerinin negatif olması, 25-45°C arasında adsorpsiyonun kendiliğinden gerçekleştiğini ve ΔH° değerinin pozitif olması, adsorpsiyonun endotermik olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Şekil 4.32' de verilen izoterm eğrilerinde de, sıcaklık arttıkça q_e değerlerinin arttığı görülmüştür.

Adsorpsiyon entalpisinin büyüklüğü, adsorpsiyonun türü hakkında bilgi vermektedir. ΔH° değeri yaklaşık 40 kJ/mol' ün altında olan adsorpsiyonlar genellikle fiziksel, bu değerlerin üzerindeki adsorpsiyonlar genellikle kimyasaldır [57]. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun, bu bilgiye dayanarak, fiziksel olduğu söylenilebilir. ΔS° değerinin 0' dan büyük olması, adsorpsiyon sırasında düzensizliğin arttığını gösterir. Düzensizlikteki artmanın nedeni, Şekil 4.40' ta gösterildiği gibi, hidratlaşmış bir kabukla sarılmış adsorplayıcı yüzeyine boyarmaddenin adsorpsiyonu sırasında su moleküllerinin adsorplayıcıdan uzaklaşması ve böylelikle entropinin artmasına dayandırılabilir [112].



Şekil 4.39. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonu sırasında RY145 ve su moleküllerinin durumu

Elwaakel ve arkadaşları, iki farklı manyetik kitosan reçinesine 25-45°C' de incelenen Reaktif Siyahı 5 adsorpsiyonunu inceledikleri çalışmalarında, adsorpsiyonun endotermik olduğunu belirlemişler ve farklı yöntemlerle modifiye edilmiş kitosan esaslı için iki adsorplayıcı için, ΔH° değerlerini sırasıyla 7,39 kJ/mol ve 9,75 kJ/mol olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada, adsorpsiyonun türü konusunda herhangi bir bilgi verilmemesine rağmen, ΔH° değerlerinin adsorpsiyonun fiziksel olduğuna işaret ettiği düşünülmektedir. Ayrıca yine bu çalışmada, adsorpsiyon sırasında entropi artmış ve ΔS° değerleri 132,99 J/molK ve 129,1 J/molK ve ΔG° değerleri -29,88 kJ/mol ve -31,08 kJ/mol bulunmuştur [112]. Alkan ve arkadaşları sepiyolit üzerine Asit Kırmızı 57 adsorpsiyonunu 25-55°C arasında inceledikleri çalışmalarında, adsorpsiyonun ΔH° ve ΔG° değerini sırasıyla -26 kJ/mol ve -36,8 kJ/mol, ve $\Delta S^\circ = 36,6$ J/molK olduğunu belirlemişlerdir. Entropi artışının adsorplayıcı yüzeyindeki su moleküllerinin boyarmaddenin adsorpsiyonu sırasında yüzeyden ayrılması nedeniyle gerçekleştiğini bildirmişlerdir [64].

Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun 25-45°C arasındaki ΔG° ve $T\Delta S^\circ$ değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.6' da toplu olarak gösterilmiştir.

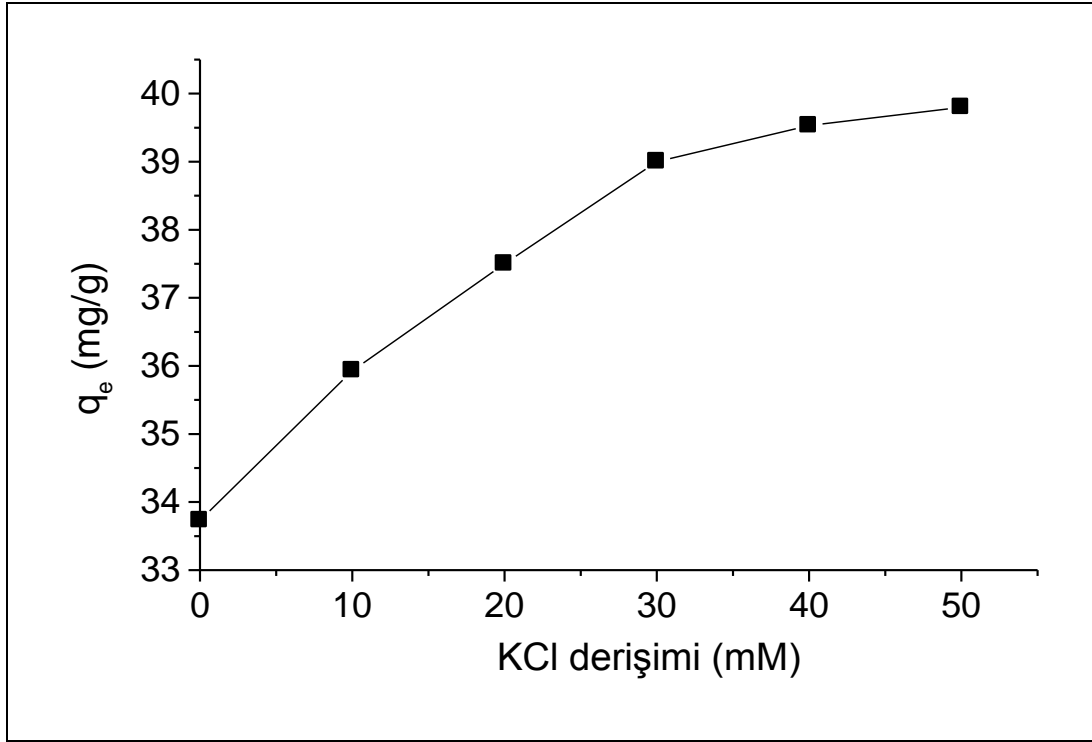
Çizelge 4.6. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun 25°C, 35°C ve 45°C' de ΔG° ve $T\Delta S^\circ$ değerleri

t (°C)	T (K)	ΔG° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)
25	298	-10,79	42,16
35	308	-12,20	43,57
45	318	-13,61	44,98

Sıcaklığın 25°C' den 45°C' değişmesiyle, $T\Delta S^\circ$ değerleri artış göstermiş ve her bir sıcaklıkta sıcaklıkta $|T\Delta S^\circ| > |\Delta H^\circ|$ bulunmuştur. Bu sonucun, adsorpsiyon prosesi üzerinde, entropi değişiminin entalpi değişimine göre daha etkili olduğunu gösterdiği düşünülmektedir.

4.6.5. Fe_3O_4 -kitosan nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonuna tuz derişiminin etkisi

RY145' in Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına adsorpsiyonuna KCl derişiminin etkisi 0-50,0 mM KCl derişimi aralığında incelenmiş ve q_e değerlerinin KCl derişimi ile derişimi Şekil 4.40' ta gösterilmiştir.

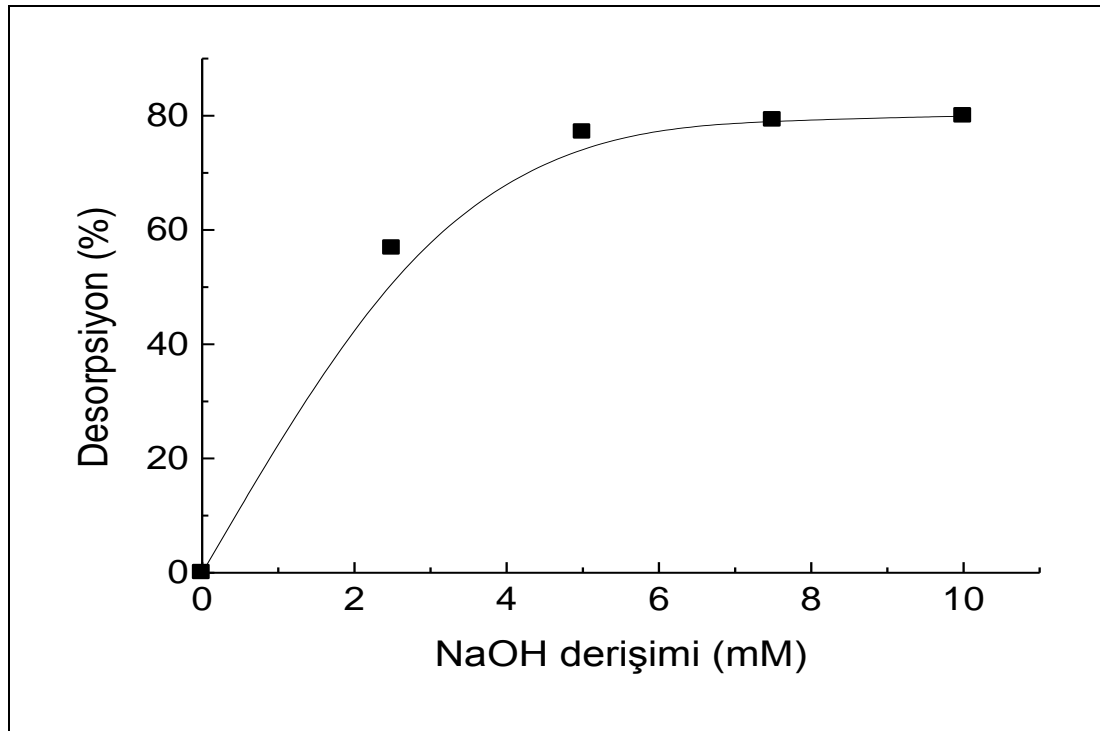


şekil 4.40. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun KCl derişimi ile değişimi

Adsorpsiyon ortamındaki KCl derişiminin 0 mM' dan 50 mM' a atmasıyla, q_e değeri 33,73 mg/L' den 39,8 mg/g' a artmıştır. Tuz derişiminin artması ile adsorplanan boyarmadde miktarındaki artma, adsorpsiyon ortamındaki toplam iyon sayısının artmasından dolayı, elektriksel çift tabaka kalınlığının azalması ve böylelikle boyarmadde anyonlarını tutuklama etkinliğinin artması ile açıklanabilir [150]. Literatürde, sepiyolit üzerine Reaktif Mavi 221 ve Asit Mavi 62 anyonik boyalarının adsorpsiyonunun, sepiyolit izoelektronik noktasının altındaki pH' larda tuz derişiminin artmasıyla arttığı [151] ve iki farklı katyonik yüzey aktif madde ile modifiye edilmiş hektorit mineraline Reaktif Turuncu 122' nin adsorplanan miktarının tuz derişimi arttıkça arttığı bildirilmiştir [150].

4.6.6. Fe₃O₄-kitosan nanoparçacıklarından Reaktif Sarı 145' in desorpsiyonu

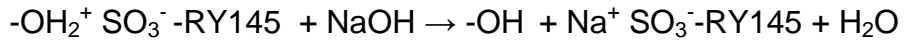
Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının ve boyarmaddenin adsorpsiyon sonrasında geri kazanılması, endüstriyel uygulamalar için oldukça önemlidir. Bu amaçla, bu nanoparçacıklarına adsorplanan RY145 miktarının bazik ortamda azalması nedeniyle (Bkz. Şekil 4.31), Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına adsorplanan RY145 bazik ortamda desorbe edilmiştir. RY145' in Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarından desorpsiyonuna NaOH derişiminin etkisi 2,5-0,10,0 mM NaOH derişimi aralığında 1 çevrim için incelenmiş ve % desorpsiyonun NaOH derişimi ile değişimi Şekil 4.41' de gösterilmiştir.



Şekil 4.41. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarından RY145' in desorpsiyonuna NaOH derişimi ile değişimi

RY145' in Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarından desorpsiyonunun NaOH derişiminin 5,0 mM oluncaya kadar arttığı ve bunun üzerindeki NaOH derişimlerinde fazlaca değişmediği gözlenmiştir. [NaOH] = 10,0 mM olduğunda

RY145'in %80' i desorplanmıştır. RY145' in bazik ortamda Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarından desorpsiyonunun aşağıda gösterilen elektrostatik etkileşmeler sonucunda gerçekleştiği söylenilebilir [65]:



Bu tepkimeye göre, Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına adsorplanan RY145, NaOH varlığında bu nanoparçacıkların yüzeyinden ayrılmaktadır.

Literatürde, amin grupları ile modifiye edilmiş manyetik ve manyetik olmayan silika parçacıklarından Asit turuncu 10' un desorpsiyonunun pH 7, 8, 9 ve 10' da gerçekleştirildiği ve 3 çevrim sonunda boyarmaddenin %98,1' inin desorplandığı bildirilmiştir [65].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ters-faz süspansiyon metodu ile Fe_3O_4 nanoparçacıklarının yüzeyi kitosanla kaplanmıştır.

Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının TEM görüntüleri ve XRD sonuçları, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının 1,0-4,8 nm kalınlığında kitosan tabakasıyla kaplandığını; FT-IR analizleri, kitosanın bu nanoparçacıkların yapısına katıldığını; XRD analizleri Fe_3O_4 nanoparçacıklarının kitosanla kaplandıktan sonra spinel yapısının değişmediğini; TGA analizleri bu nanoparçacıkların %51,7 kitosan içerdiğini; ζ -potansiyel analizleri Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının pl değerlerinin sırasıyla 7,91 ve 6,86 olduğunu göstermiştir. Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının EPR analizleri, bu nanoparçacıkların paramanyetik özellikte olduğunu göstermiştir. Her iki nanoparçacık için spektroskopik yarıma çarpanı $g = 1,49$ bulunmuş, Fe^{3+} katyonunun düşük spin kompleksi halinde olduğu belirlenmiştir. Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının VSM ile elde edilen manyetik alana karşı mıknatıslama grafiklerinden, nanoparçacıkların σ_s değerleri sırasıyla 74,1 emu/g ve 25,2 emu/g bulunmuş ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının hemen hemen süperparamanyetik özellik gösterdikleri belirlenmiştir.

Lakkaz enzimi, Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemleri ile immobilize edilmiştir. SEM/EDS analizleri, Fe_3O_4 -CS-L, Fe_3O_4 -CS-EDAC-L ve Fe_3O_4 -CS-SC-L sistemlerinin lakkaz enzimini içerdiğini göstermiştir.

Serbest lakkaz, Fe_3O_4 -CS-L, Fe_3O_4 -CS-EDAC-L ve Fe_3O_4 -CS-SC-L için optimum pH sırasıyla 3,0, 3,0, 4,5 ve 3,5 bulunmuştur.

Serbest lakkaz, Fe_3O_4 -CS-L, Fe_3O_4 -CS-EDAC-L ve Fe_3O_4 -CS-SC-L için optimum sıcaklık sırasıyla 40°C, 40°C, 30°C ve 40°C bulunmuştur ve

immobilize lakkazların, 40°C' den düşük sıcaklık gerektiren endüstriyel ve analitik uygulamalarda serbest lakkaza göre daha yüksek bir aktiflikle kullanılabilir oldukları belirlenmiştir.

Serbest lakkaz, Fe₃O₄-CS-L, Fe₃O₄-CS-EDAC-L ve Fe₃O₄-CS-SC-L' in depolanmalarının 7. günü sonunda başlangıç aktifliklerinin %98, %93, %89 ve %87' sini; 30. günü sonunda ise, %85, %58, %28 ve %34' ünü korumuştur. İmmobilize lakkazların 1 hafta içerisinde, daha yüksek bir aktiflikle kullanılabilir oldukları belirlenmiştir.

Serbest lakkaz, Fe₃O₄-CS-L, Fe₃O₄-CS-EDAC-L ve Fe₃O₄-CS-SC-L için K_m değerleri sırasıyla 5,69x10⁻² mM, 10,69x10⁻² mM, 15,97x10⁻² mM ve 11,41x10⁻² mM bulunmuştur.

Fe₃O₄-CS-L, Fe₃O₄-CS-EDAC-L ve Fe₃O₄-CS-SC-L' in, ABTS substratına karşı 30 kez kullanıldıklarında başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %71, %74 ve %81' ini korudukları gözlenmiştir. Dolayısıyla, hazırlanan immobilize lakkaz sistemleri, yüksek bir aktiflikle tekrar tekrar kullanılabilirler.

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun maksimum miktarda pH=3,0' te meydana geldiği belirlenmiş ve 90 dakika sonunda 1 gram Fe₃O₄-CS nanoparçacıkları başına adsorplanan RY145 miktarı, q_t = 33,73 mg/g Fe₃O₄-CS bulunmuştur.

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun sıcaklığın 25°C' den 45°C' ye değişmesiyle arttığı belirlenmiştir.

Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun 25°C, 35°C ve 45°C' de Langmuir modeline uyduğu belirlenmiş ve her bir sıcaklık için K_L değerleri sırasıyla 0,0789 L/mg, 0,1016 L/mg ve 0,1806 L/mg ve q_{mak} değerleri 47,62 mg/g, 52,63 mg/g ve 76,92 mg/g olarak hesaplanmıştır.

Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun 25-45°C arasında istemli ve endotermik olduğu belirlenmiştir.

Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarına RY145 adsorpsiyonunun tuz derişimi ile arttığı ve $[\text{KCl}] = 50 \text{ mM}$ olduğunda, $q_e = 39,8 \text{ mg/g}$ olduğu belirlenmiştir.

Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarından RY145' in NaOH derişimi arttıkça arttığı ve $[\text{NaOH}] = 10 \text{ mM}$ olduğunda, bu nanoparçacıklardan RY145' in %80' inin desorplandığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Uskokovic V., "Nanotechnologies: What we do not know", **Technology in Society**, 29: 43-61 (2007).
2. Wang L. Z., "Characterization of Nanophase Materials", **WILEY-VCH Verlag GmbH**, Weinheim, 1-12 (2001).
3. Kasapoğlu N., "Manyetik spinel bileşiklerin sentezi, Karakterizasyonu ve ESR çalışması", Yüksek Lisans Tezi, **Fatih Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, 22 (2007).
4. Gupta A. K., Gupta M., "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications", **Biomaterials**, 26: 3995-4021 (2005).
5. Salata O. V., "Applications of nanoparticles in biology and medicine", **Journal of Nanobiotechnology**, 2: 3-8 (2004).
6. Safarik I., Safarikova M., "Magnetic nanoparticles in biosciences", **Monatshefte für Chemie**, 133: 737-759 (2002).
7. Liu X., Qiyang H., Zhen F., Xiaojun Z., Beibei Z., "Magnetic chitosan nanocomposites: A useful recyclable tool for heavy metal ion removal", **Langmuir**, 25: 3-8 (2009).
8. Safarik I., Safarikova M., "Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water", **Water Research**, 36: 196-200 (2002).
9. Buchholz K., Kasche V., Bornscheuer U. T., "Biocatalysis and Enzyme Technology", **WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**, Weinheim, 2,30, 197-227,243-275 (2005).
10. Worsfold P. J., "Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes" (Technical report), **Pure Applied Chemistry**, 67: 597-600 (1995).
11. Sheldon R. A., "Enzyme immobilization: The quest for optimum performance", **Advanced Synthesis & Catalysis**, 349: 1289-1307 (2007).
12. İman A., Çelebi S. S., Özdural A. R., "Preparation of photooxidized magnetic polystyrene beads for enzyme immobilization", **Reactive Polymers**, 17: 325-330 (1992).

13. Tanyolaç D., Özdural A. R., "Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads", *Reactive & Functional Polymers*, 45: 235-242 (2000).
14. Bilkova Z., Slovákova M., Horák D., Lenfeld J., Churayek J., "Enzymes immobilized on magnetic carriers: efficient and selective system for protein modification", *Journal of Chromatography B*, 770: 177-181 (2002).
15. Liu X, Guan Y, Shen R, Liu H., "Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads", *Journal of Chromatography B*, 822: 91-97 (2005).
16. Zhang S., Gao S., Gao G., "Immobilization of β -Galactosidase onto magnetic beads", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (2009).
17. Liao M.-H., Chen D.-H., "Fast and efficient adsorption/desorption of protein by a novel magnetic nano-adsorbent", *Biotechnology Letters*, 24: 1913-1917 (2002).
18. Zhao M., Wang W., Yang C., "Immobilization of laccase by surface modified magnetic nanoparticles", *Journal of Biotechnology*, 136: S435 (2008).
19. Yong Y., Bai Y., Yanfeng L., Lin L., Cui Y., Xia C., "Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilization", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 320: 2350-2355 (2008).
20. Konwarh R., Karak N., Rai S. K., Mukherjee A. K., "Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase", *Nanotechnology*, 20: 1-10 (2009).
21. Wu Y., Wang Y., Luo G., Dai Y., "In situ preparation of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution", *Bioresource Technology*, 100: 3459-3464 (2009).
22. Gupta V. K., Suhas, "Application of low-cost adsorbents for dye removal- A review", *Journal of Environmental Management*, 90: 2313-2342 (2009).
23. Safarik I., Safarikova M., Buricova V., "Sorption of water soluble organic dyes on magnetic poly(oxy-2,6-dimethyl-1,4-phenylene)", *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 60: 1448-1456 (1995).

24. Mak S.-Y., Chen D.-H., "Fast adsorption of methylene blue on polyacrylic acid-bound iron oxide magnetic nanoparticles", ***Dyes and Pigments***, 61: 93-98 (2004).
25. Safarik I., Lunackova P., Mosiniewicz-Szablewska E., Weyda F., Safarikova M., "Adsorption of water-soluble organic dyes on ferrofluid-modified sawdust", ***Holzforschung***, 61: 247-253 (2007).
26. Rocher V., Siaugue J.-M., Cabuil V., Bee A., "Removal of organic dyes by magnetic alginate beads", ***Water Research***, 42: 1290-1298 (2008).
27. Luo X., Zhang L., "High effective adsorption of organic dyes on magnetic cellulose beads entrapping activated carbon", ***Journal of Hazardous Materials***, 171: 340-347 (2009).
28. Bayrak M., "Temel Elektrik ve Mağnetizma", ***Atlas Yayın Dağıtım***, İstanbul, 13-15 (2002).
29. Jiles D., "Introduction to Magnetism and Magnetic Materials 2nd ed.", ***Taylor & Francis***, Boca Raton, 44, 86, 68-71, 94, 95, 228, 234-237, 376 (1997).
30. Pankhurst Q. A., Connolly J., Jones S. K., Dobson J., "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine", ***Journal of Physics D: Applied Physics***, 36: 167-181 (2003).
31. Bushcow K. J. H. "Physics of Magnetism and Magnetic Materials", ***Kluwer Academic /Plenum Publishers***, New York, 77 (2003).
32. Horak D., Babic M., Mackova H., Banes M. J., "Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations", ***Journal of Separation Science***, 30: 1751-1772 (2007).
33. Cornell R. M., Schwertmann U., "The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses", ***WILEY-VCH Verlag GmbH***, Weinheim, 32 (2003).
34. Yuan Q., Williams R.A., "Large scale manufacture of magnetic polymer particles using membranes and microfluidic devices", ***China Particuology***, 5: 26-42 (2007).
35. Tartaj P., del Puerto Morales M., Veintemillas-Verdaguer S., Gonzalez-Carreno T., Serna C. J., "The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine", ***Journal of Physics D: Applied Physics***, 36: 182-189 (2003).

36. Stratulat R., Calugaru G., Badescu V., "Magnetic carriers particles for selective separation in environmental and industrial processes", *Analele Stiintifice Ale Universitatii "Al.I.Cuza" IASI, Tomul XLV-XLVJ, s. Fizica Starii Condensate*, 45-50 (1999-2000).
37. Selim K. M. K., Ha Y.-S., Kim S.-J., Chang Y., Kim T.-J., Lee G. H., Kang I.-K., "Surface modification of magnetite nanoparticles using lactobionic acid and their interaction with hepatocytes", *Biomaterials*, 28: 710-716 (2007).
38. Huang S.-H., Liao M.-H., Chena D.-H., "Fast and efficient recovery of lipase by polyacrylic acid-coated magnetic nano-adsorbent with high activity retention", *Separation and Purification Technology*, 51: 113-117 (2006).
39. Gupta A. K, Wells S., "Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterisation and cytotoxicity studies", *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 31: 66-73 (2004).
40. Lee Y. H., Lim N. H., Seo J. A., Yuk H. S., Kwak B. K., Kahng G., Lee H. B., Cho S. H., "Preparation and magnetic resonance imaging effect of polyvinylpyrrolidone-coated iron oxide nanoparticles", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 79B: 142-150 (2006).
41. Sipos P., "Manufacturing of size controlled magnetite nanoparticles potentially suitable for the preparation of aqueous magnetic fluids", *Romanian Reports in Physics*, 58: 269-272 (2006).
42. Berry C.C., Wells S., Charles S., Curtis A. S. G., "Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro", *Biomaterials*, 24: 4551-4557 (2003).
43. Gaihre B., Khil M. S., Lee R.D., Kim H. Y., "Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: Drug loading and *in vitro* drug release study", *International Journal of Pharmaceutics*, 365: 180-189 (2009).
44. Denkbaş E. B., Kilişay E., Birlikseven C., Öztürk E., "Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization", *Reactive & Functional Polymers*, 50: 225-232 (2002).

45. Kumagai M., Imai Y., Nakamura T., Yamasaki Y., Sekino M., Ueno S., Hanaoka K., Kikuchi K., Nagano T., Kaneko E., Shimokado K., Kataoka K., "Iron hydroxide nanoparticles coated with poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer as novel magnetic resonance contrast agents for *in vivo* cancer imaging", ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, 56: 174-181 (2007).
46. Dresco P. A., Zaitsev V. S., Gambino R. J., Chu B., "Preparation and properties of magnetite and polymer magnetite nanoparticles", ***Langmuir***, 15: 1945-1951 (1999).
47. Tüzün C., "Biyokimya-Güncelleştirilmiş ve Yenilenmiş Beşinci Baskı", ***Palme Yayıncılık***, 81,82 (2005).
48. Cavaco-Paulo A., Gübitz G. M., "Textile processing with enzymes", ***Wordhead Publishing Ltd.***, Cambridge, 1-2 (2003).
49. Makas Y. G., "Poli(akrilamit-akrilik asit)/aljinat, poli(akriamit-itakonik asit)/aljinat, poli(akriamit-akrilik asit)/κ-karragenan, poli(akrilamit-itakonik asit)/κ-karragenan hidrojellerinde lakkaz immobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 8-10 (2008).
50. Kasavi C., "Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorpsiyon metotları ile proteaz enziminin immobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, ***İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, İstanbul, 12 (2006).
51. Hızır M., "Poli(2-hidroksietil metakrilat-itakonik asit taneciklerine kovalent bağlanma ile invertazın immobilizasyonu", ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 4,5,11,12 (2006).
52. Bickerstaff G. F., "Immobilization of Enzymes and Cells", ***Humana Press***, New Jersey, 1-12 (1997).
53. Zaborsky O. R., "Immobilized Enzymes", ***CRC Press***, Cleveland, (1973).
54. Şahin E., "Poli(metil metakrilat-2-hidroksietilmetakrilat) mikrobuncuklarına kovalent bağlanma ile glukoz izomerazın immobilizasyonu", ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, 15-22, (2007).
55. Hermanson G. T., "Bioconjugate Techniques", ***Academic Press***, California, 697-609 (1996).
56. Sarıkaya Y., "Fizikokimya-Genişletilmiş 6. Baskı", ***Gazi Kitabevi***, Ankara, 633-648 (2004).

57. Masel R. I., "Principles of Adsorption and Reaction on Solid Surfaces", **John Wiley & Sons, Inc.**, New York, 109-113 (1996).
58. Eren H. A., Anış P., "Tekstil boyama atık sularının ozonlama ile renk giderimi", **Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi**, 11: 83-91 (2006).
59. Karaca H., "Tekstil boyarmaddelerinin mikrobiyal giderimi", Yüksek Lisans Tezi, **Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Eskişehir, 1-2 (2006).
60. Crini G., Badot P.-M., "Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature", **Progress in Polymer Science**, 33: 399-447 (2008).
61. Bernardin Jr., F. E., "Experimental design and testing of adsorption and adsorbates", Adsorption Technology: a step by step approach to process evaluation and application", Slejko F.L, **Marcel Dekker**, New York, 37-90 (1985).
62. Atkins P. W., "Fizikokimya- 2.Baskı.", Yıldız S., Yılmaz H., Kılıç E., **Bilim Yayıncılık**, Ankara, 858,859 (2005).
63. Demirbaş Ö., "Kil mineralleri yüzeyine bazı biyomoleküllerin immobilizasyonu ve elektrokinetik özellikleri", Doktora Tezi, **Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Balıkesir, 38-40 (2006).
64. Alkan M., Demirbaş Ö., Çelikçapa S., Doğan M., "Sorption of acid red 57 from aqueous solution onto sepiolite", **Journal of Hazardous Materials**, 116B: 134-145 (2004).
65. Atia A. A., Donia A. M., Al-Amrani W. A., "Adsorption/desorption behavior of acid orange 10 on magnetic silica modified with amine groups", **Chemical Engineering Journal**, 150: 55-62 (2009).
66. Pich A., Bhattacharya S., Adler H.-J.P., Wage T., Taubenberger A. , Li Z., van Pee K.-H., Böhmer U., Bley T., "Composite magnetic particles as carriers for laccase from *Trametes versicolor*", **Macromolecular Biosciences**, 6: 301-310 (2006).
67. Rinaudo M., "Chitin and chitosan: Properties and applications", **Progress in Polymer Science**, 31: 603-632 (2006).
68. Krajewska B., "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review", **Enzyme and Microbial Technology**, 35: 126-139 (2004).

69. Guibal E., "Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review", **Separation and Purification Technology**, 38: 43-74 (2004).
70. Erkoç Ş., "Nanobilim ve Nanoteknoloji", **ODTÜ Yayıncılık**, Ankara, 72-77 (2008).
71. Skoog D. A., Holler J. F., Nieman T. A., "Enstrümental Analiz İlkeleri", Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., **Bilim Yayıncılık**, Ankara, 272-296 (1998).
72. Tekerek A. Ş., "LaMnSi₂ alaşımının nanoparçacıklarının manyetik ve yapısal özellikleri", Yüksek Lisans Tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 4,18 (2007).
73. Can M. M., "Manyetik nanoparçacıkların fiziksel özelliklerinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 36, 39 (2005).
74. Li G., Huang K., Jiang Y., Ding P., Yang D., "Preparation and characterization of carboxyl functionalization of chitosan derivative magnetic nanoparticles", **Biochemical Engineering Journal**, 40: 408-414 (2008).
75. Gündüz T., "Enstrümental Analiz", **Gazi Kitabevi**, Ankara, 509 (2004).
76. Korkmaz E., "Eskişehir yöresi sepiyoliti'nin zeta potansiyellerinin tayini", Yüksek Lisans Tezi, **Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Eskişehir, 28-32 (2008).
77. Teja A. S., Koh P.-Y., "Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles", **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, 55: 22-45 (2009).
78. Suh W. H., Suslick K.S., Stucky G. D., Suh Y.-H., "Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience", **Progress in Neurobiology**, 87: 133-170 (2009).
79. Thurston C. F., "The structure and function of fungal laccases", **Microbiology**, 140: 19-26 (1994).
80. Morozova O. V., Shumakovich G. P., Shleev S. V., Yaropalov Y. I., "Laccase-mediator systems and their applications: a review", **Applied Biochemistry and Microbiology**, 43: 523-535 (2007).
81. Yoshida H., "Chemistry of lacquer (Urushi), part 1", **Journal of the Chemical Society**, 43: 472- 486 (1883).

82. Alcalde M., "Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications", *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, Polania J., Mac Cabe A.P., **Springer**, Dordrecht, 461-476 (2007).
83. Claus H., "Laccases and their occurrence in prokaryotes", ***Archives of Microbiology***, 179: 145-150 (2003).
84. Kramer K. J., Kanost M. R., Hopkins T. L., Jing H., Zhu Y. C., Xu R., Kerwin J. L., Turecek F., "Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems", ***Tetrahedron***, 57: 385-392 (2001).
85. Baldrian P., "Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme", ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 63: 560-563 (2004).
86. Mansur M., "The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities", ***Mycologia***, 95: 1013-1020 (2003).
87. Tzanov T., Basto C., Gübitz G. M., Cavaco-Paulo A., "Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton", ***Macromolecular Materials and Engineering***, 288: 807-810 (2003).
88. Bourbonnais R., Paice M. G., "Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)", ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 36: 823-827 (1992).
89. Minnussi R. C., Rossi M., Bologna L., Rotilio L., Pastore G. M., Duran N., "Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase", ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 45: 102-107 (2007).
90. Zille A. "Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent", ***Biotechnology Letters***, 25: 1473-1477 (2003).
91. Berrio J., Plou F. J., Ballesteros A., Martínez Á. T., Martínez M. J., "Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit C: Stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters", ***Biocatalysis and Biotransformation***, 25: 130-134 (2007).
92. Majcherczyk A., Johannes C., Hüttermann A., "Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*", ***Enzyme and Microbial Technology***, 22: 335-341 (1999).

93. Dodor D. E., Hwang H.-M., Ekunwe S. I. N., "Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*", ***Enzyme and Microbial Technology***, 35: 210-217 (2004).
94. Barrière F., Kavanagh P., Dónal L., "A laccase–glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer", ***Electrochimica Acta***, 51: 5187-5197 (2006).
95. Yaropolov A. I. , Shleev S. V., Morozova O. V. , Zaitseva E. A., Marko-Varga G., Emneus J., Gorton L., "An amperometric biosensor based on laccase immobilized in polymer matrices for determining phenolic compounds", ***Journal of Analytical Chemistry***, 60: 553-557 (2005).
96. Solís-Oba M., Ugalde-Saldívar V. M., Gonzalez I., Viniegra-González G., "An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase", ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, 579: 59-66 (2005).
97. Shinkai M., Honda H., Kobayashi T., "Preparation of fine magnetic particles and application for enzyme immobilization", ***Biocatalysis***, 5: 61-69 (1991).
98. Liao M.-H., Chen D.-H., "Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability", ***Biotechnology Letters***, 23: 1723-1727 (2001).
99. An X., Su Z., Zeng H., "Preparation of highly magnetic chitosan particles and their use for affinity purification of enzymes", ***Journal of Chemical Technology and Biotechnology***, 78: 596-600 (2003).
100. Guo Z., Bai S., "Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres", ***Enzyme and Microbial Technology***, 32: 776-782 (2003).
101. Lei H., Wang W., Chena L-L., Li X-C., Yi B., Denga L., "The preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magnetic composite microspheres", ***Enzyme and Microbial Technology***, 35: 15-21 (2004).
102. Jiang D.-S., Long S.-Y., Huang J., Xiao H.-Y., Zhou J.-Y., "Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres", ***Biochemical Engineering Journal***, 25: 15-23 (2005).

103. Feng T., Du Y., Yang J., Li J., Shi X., "Immobilization of a nonspecific chitosan hydrolytic enzyme for application in preparation of water-soluble low-molecular-weight chitosan", *Journal of Applied Polymer Science*, 101: 1334-1339 (2006).
104. Yang C., Liua H., Guan Y., Xing J., Liu J., Shan G., "Preparation of magnetic poly(methylmethacrylate-divinylbenzene-glycidylmethacrylate) microspheres by spraying suspension polymerization and their use for protein adsorption", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293: 187-192 (2005).
105. Xiao H.-Y., Huang J., Liu C., Jiang D.-S., "Immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutaraldehyde crosslinking method", *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 16: 414-418 (2006).
106. Zhu Y., Kaskel S., Shi J., Wage T., van Pée K.-H., "Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetically separable mesoporous silica spheres", *Chemistry of Materials*, 19: 6408-6413 (2007).
107. Wang Y., Wang X., Luo G., Dai Y., "Adsorption of bovin serum albumin (BSA) onto the magnetic chitosan nanoparticles prepared by a microemulsion system", *Bioresource Technology*, 99: 3881-3884 (2008).
108. Rotková J., Šuláková R., Korecká L., Zdražilová P., Jandová M., Lenfeld J., Horák D., Bílková Z., "Laccase immobilized on magnetic carriers for biotechnology applications", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321: 1325-1340 (2009).
109. Zollinger H., "Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments, 2nd ed.", *VCH Publishers*, Weinheim, 167-168 (1991).
110. Chang Y.-C., Chen D.-H., "Adsorption kinetics and thermodynamics of acid dyes on a carboxymethylated chitosan-conjugated magnetic nano-adsorbent", *Macromolecular Bioscience*, 5: 254-261 (2005).
111. Wu R., Qu J., Chen Y., "Magnetic powder MnO-Fe₂O₃ composite-a novel material for the removal of azo dye from water", *Water Research*, 39: 630-638 (2005).
112. Elwakeel K. Z., "Removal of Reactive Black 5 from aqueous solutions using magnetic chitosan resins", *Journal of Hazardous Materials*, 167: 383-392 (2009).

113. Li G., Jiang Y., Huang K., Ding P., Chen J., "Preparation and properties of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles", ***Journal of Alloys and Compounds***, 466: 451-456 (2008).
114. Bradford M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", ***Analytical Biochemistry***, 72: 248-254 (1976).
115. Niku-Paavola M. L., "Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain", ***Mycological Research***, 94: 27-31 (1990).
116. Zhao D.-L., Wang X.-X., Zeng X.-W., Xia Q.-S., Tang J.-T., "Preparation and inductive heating property of Fe₃O₄-chitosan composite nanoparticles in an AC magnetic field for localized hyperthermia", ***Journal of Alloys and Compounds***, 477: 739-743 (2009).
117. Zhang J., Xu Z., Chen H., Zong Y., "Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*", ***Biochemical Engineering Journal***, 45: 54-59 (2009).
118. Yamamura M., Camilo R. L., Sampai L. C., Macedo, M. A., Nakamura M., Toma H. E., "Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles", ***Journal of Magnetism and Magnetic Materials***, 279: 210-217 (2004).
119. Ye X. R., Daraio C., Wang C., Talbot J. B., Jin S., "Room temperature solvent-free synthesis of monodisperse magnetite nanocrystals", ***Journal of Nanoscience and Nanotechnology***, 6: 852-856 (2006).
120. Chang Y.-C., Chen D.-H., "Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for removal of Cu(II) ions", ***Journal of Colloid and Interface Science***, 283: 446-451 (2005).
121. Pich A., Bhattacharya S., Ghosh A., Adler H.-J.P., "Composite magnetic particles: 2. Encapsulation of iron oxide by surfactant-free emulsion polymerization", ***Polymer***, 46: 4596-4603 (2005).
122. Kang B., Chang S., Dai Y., Chen D., "Radiation synthesis and magnetic properties of novel Co_{0.7}Fe_{0.3}/Chitosan compound nanoparticles for targeted drug carrier", ***Radiation Physics and Chemistry***, 76: 968-973 (2007).
123. Köseoğlu Y., "Effect of surfactant coating on magnetic Fe₃O₄ nanoparticles: ESR study", ***Journal of Magnetism and Magnetic Materials***, 300: e327-e330 (2006).

124. Sayar F., Güven G., Pişkin E., "Magnetically loaded poly(methyl methacrylate-co-acrylic acid) nano-particles", ***Colloid and Polymer Science***, 284: 965-978 (2006).
125. Güven G., "Eş boyutlu katyonik fonksiyonel grup içeren/içermeyen manyetik yüklü nanopartiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve nükleik asit uygulamaları", Doktora Tezi, ***Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 134-138 (2005).
126. Swartz, H. M., Bolton, J. R., Borg, D. C., "Biological Applications of Electron Spin Resonance" , ***Wiley***, New York, (1972).
127. Erdem Çetin F. B., "Enzim immobilizasyonu için manyetik polimerik taşıyıcıların hazırlanması ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, ***Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 61,62 (2007).
128. Liao M-H., Chen D.-H., "Preparation and characterization of a novel magnetic nano-adsorbent", ***Journal of Materials Chemistry***, 12: 3654-3659 (2002).
129. Wu Y., Jia G., Yang W., Wang C., Fu S., "Preparation and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) polymer magnetic microspheres", ***Polymer***, 47: 5287-5294 (2006).
130. Lei Z., Pang X., Li N., Lin L., Li Y., "A novel two-step modifying process for preparation of chitosan-coated Fe₃O₄/SiO₂ microspheres", ***Journal of Materials Processing Technology***, 209: 3218-3225 (2009).
131. Zhang J., Zhang S., Wu G., Wang W., Gao S., Zhang J., Wang Y., "An investigation of two kinds of magnetic chitosan composite microspheres", ***Journal of Bioactive and Compatible Polymers***, 22: 429-441 (2007).
132. Claus H., Faber G., König H., "Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases", ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 59: 672-678 (2002).
133. D'Annibale A., Stazi S. Rita, Vinciguerra V., Di Mattia E., Giovannozzi Sermanni G., "Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment", ***Process Biochemistry***, 34: 697-706 (1999).
134. Chiou S.-H., Wu W.-T., "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups", ***Biomaterials***, 25: 197-204 (2004).

135. Piontek K., Antorini M., Choinowski T., "Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers", ***The Journal of Biological Chemistry***, 227: 37663-37669 (2002).
136. Jolivalt C., Brenon S., Caminade E., Mougín C., Pontié M., "Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater", ***Journal of Membrane Science***, 180: 103-113 (2000).
137. Yamak O., Kalkan N. A., Aksoy S., Altinok H., Hasirci N., "Semi-interpenetrating polymer networks (semi-IPNs) for entrapment of laccase and their use in Acid Orange 52 decolorization", ***Process Biochemistry***, 44: 440-445 (2009).
138. Leonowicz A., Sarkar J. M., Bollag J.-M., "Improvement in stability of an immobilized fungal laccase", ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 29: 129-135 (1988).
139. Hung T.-C., Giridhar R., Chiou S.-H., Wu W.-T., "Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan", ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 26: 69-78 (2003).
140. Hasirci N., Aksoy S., Tümtürk H., "Activation of poly(dimer acid-co-alkyl polyamine) particles for covalent immobilization of α -amylase", ***Reactive & Functional Polymers***, 66: 1546-1551 (2006).
141. Tümtürk H., Şahin F., Demirel G., "A new method for immobilization of acetylcholinesterase", ***Bioprocess and Biosystems Engineering***, 30: 141-145 (2007).
142. Yinghui D., Qiuling W., Shiyu F., "Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier", ***Letters in Applied Microbiology***, 35: 451-456 (2002).
143. Altinok H., Aksoy S., Tümtürk H., Hasirci N., "Covalent immobilization of invertase on chemically activated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) microbeads", ***Russian Chemical Bulletin***, 55: 1860-1864 (2006).
144. Kunamneni A., Ghazi I., Camarero S., Ballesteros A., Plou F. J., Alcalde M., "Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers", ***Process Biochemistry***, 43: 169-178 (2008).

145. Georgieva S., Godjevargova T., Portaccio M., Lepore M., Mita D. G., "Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*", ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 55: 177-184 (2008).
146. Lante A., Crapisi A., Krastanov A., Spettoli P., "Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor", ***Process Biochemistry***, 36: 51-58 (2000).
147. Delanoy G., Li Q., Yu J., "Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan", ***International Journal of Biological Macromolecules***, 35: 89-95 (2005).
148. Bryjak J., Kruczkiewicz P., Rekúć A., Peczyńska-Czoch W., "Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate", ***Biochemical Engineering Journal***, 35: 325-332 (2007).
149. Almansa E., Kandelbauer A., Pereira L., Cavaco-Paulo A., Guebitz G. M., "Influence of structure on dye degradation with laccase mediator systems", ***Biocatalysis and Biotransformation***, 22: 315-324 (2004).
150. Baskaralingam P., Pulikesi M., Ramamurthi V., Sivanesan S., "Modified hectorites and adsorption studies of a reactive dye", ***Applied Clay Science***, 37: 207-214 (2007).
151. Alkan M., Çelikçapa S., Demirbaş Ö., Doğan M., "Removal of reactive blue 221 and acid blue 62 anionic dyes from aqueous solutions by sepiolite", ***Dyes and Pigments***, 65: 251-259 (2005).

EKLER

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

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

Manyetik terim	Sembol	SI birimi	CGS birimi	Çevirme faktörü
Mıknatıslanma	M	A/m	emu/cm ³	1 A/m = 10 ⁻³ emu/cm ³
Manyetik moment	<i>m</i>	Am ²	emu	1 Am ² = 10 ³ emu
Kütle mıknatıslanması	σ	Am ² /kg	emu/g	1 Am ² /kg = 1 emu/g
Manyetik indüksiyon	B	T	G	1T=10 ⁴ G
Manyetik alan	H	A/m	Oe	1 A/m = 4 π /10 ³ Oe
Boşluğun manyetik geçirgenliği	μ_0	H/m	birimsiz	4 π x10 ⁻⁷ H/m = 1 (CGS)
A = Amper, emu = elektromanyetik birim, T = Tesla, G = Gauss, H = Henry, Oe = Oersted				

EK-2 Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Asetik asit çözeltisi

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

Kitosan (CS) çözeltisi

1,0 g kitosan, 100 mL asetik asitte (%5,0 v/v) çözülmüştür (%1,0 w/v).

Glutaraldehit çözeltisi

5,0 mL glutaraldehit saf suyla 10 mL'ye tamamlanmıştır (%25,0 v/v).

Fosfat tamponu (FT)

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

Fosfat-sitrat tamponu (FST)

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

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

EK-2 (Devam) Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Karbodiimit (EDAC) çözeltisi

0,0250 g karbodiimit 10 mL fosfat tamponunda FT' da (pH 6,0, 0,04 M) çözülmüştür (%2,5 w/v). Çözelti 4°C' de saklanmıştır.

Siyanürik klorür (SC) çözeltisi

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

Lakkaz çözeltisi

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

b) 0,0100 g lakkaz enzimi 100 mL FST 'da çözülmüştür ve lakkaz aktifliğinin tayininde kullanılmıştır (0,1 mg/mL). Çözeltiler 4°C' de saklanmıştır.

ABTS çözeltisi

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

Reaktif Sarı 145 çözeltileri

0,2500 g Reaktif Sarı 145 deiyonize suyla 250 mL' ye tamamlanmış (1000 mg/L) ve bu çözeltiden seyrelme ile 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 ve 200 mg/L'lik çözeltiler hazırlanmıştır.

EK-3 BSA kalibrasyon grafiğine ait veriler

Çizelge 3.1. BSA derişimi ile absorbans değişimi

BSA derişimi (mg/mL)	Absorbans (A_{595})
0	0
0,000454	0,025
0,000909	0,049
0,001360	0,068
0,001820	0,088

EK-4 ABTS kalibrasyon grafiğine ait veriler

Çizelge 4.1. ABTS derişimi ile absorbens değişimi

ABTS derişimi (mM)	Absorbans (ΔA_{414})
0	0
0,005	0,134
0,010	0,257
0,015	0,341
0,020	0,428
0,025	0,516

EK-5 Substrat derişimi ile tepkime hızının değişimine ait veriler

Çizelge 5.1. Substrat derişimi ile tepkime hızının değişimi

ABTS derişimi (mM)	Absorbans (ΔA_{414})	Tepkime hızı (Aktiflik) ($\times 10^{-2}$ mM/dakika)
0	0	0
0,005	0,134	0,618
0,010	0,257	1,185
0,015	0,341	1,600
0,020	0,428	1,973
0,025	0,516	2,379
0,030	0,570	2,629
0,050	0,655	3,025
0,070	0,709	3,270
0,100	0,740	3,413
0,150	0,833	3,842
0,200	0,916	4,223

EK-6 Lakkaz derişimi ile tepkime hızının değişimine ait veriler

Çizelge 6.1. Lakkaz derişimi ile tepkime hızının değişimi

Lakkaz derişimi ($\times 10^{-4}$ mg/mL)	Absorbans (ΔA_{414})	Tepkime hızı ($\times 10^{-3}$ mM/dakika)
0	0	0
2,5	0,146	0,673
5,0	0,281	1,295
7,5	0,400	1,845
10,0	0,516	2,380

EK-7 İmmobilize edilen enzim miktarı tayinine ait veriler

Çizelge 7.1. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına immobilize edilen lakkaz süzüntüleri ve yıkama sularının Bradford yöntemi ile okunan absorbanları

İmmobilize lakkaz	Absorbans (A ₅₉₅)
Fe ₃ O ₄ -CS-L	0,052
Fe ₃ O ₄ -CS-EDAC-L	0,048
Fe ₃ O ₄ -CS-SC-L	0,047

EK-8 Fe₃O₄ ve Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarının nanoparçacıklarının
ζ-potansiyelinin pH ile değişimine ait veriler

Çizelge 8.1. Fe₃O₄ nanoparçacıklarının zeta potansiyelinin pH ile değişimi

pH	Zeta potansiyeli (mV)
2,51	21,7
2,91	22,2
3,27	23,9
3,88	22,2
4,27	21,8
4,81	21,2
5,33	18,6
5,88	15,4
6,16	9,45
7,00	6,16
7,50	2,40
8,14	-1,37
8,57	-6,19
8,87	-6,21
9,30	-10,3

EK-8 (Devam) Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının nanoparçacıklarının ζ -potansiyelinin pH ile değişimine ait veriler

Çizelge 8.2. Fe_3O_4 -CS nanoparçacıklarının zeta potansiyelinin pH ile değişimi

pH	Zeta potansiyeli (mV)
2,78	24,7
3,25	22,2
3,70	23,2
4,15	20,7
4,65	19,3
5,21	12,8
5,73	7,04
6,22	4,13
6,78	0,253
7,32	-1,48
7,69	-4,07
8,23	-7,72
8,69	-14,3
9,33	-12,8

EK-9 Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine pH etkisine ait veriler

Çizelge 9.1. Serbest lakkaz aktifliğinin pH ile değişimi

pH	Absorbans (A_{414})	Tepkime hızı (Aktiflik) ($\times 10^{-2}$ mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
2,5	0,728	3,36	87,7
3,0	0,831	3,83	100
3,5	0,802	3,70	96,6
4,0	0,706	3,26	85,1
4,5	0,604	2,79	72,8
5,0	0,458	2,11	55,1
5,5	0,371	1,71	44,6
6,0	0,197	0,91	23,8
6,5	0,051	0,23	6,0

Çizelge 9.2. Fe_3O_4 -CS-L aktifliğinin pH ile değişimi

pH	Absorbans (A_{414})	Tepkime hızı (Aktiflik) ($\times 10^{-2}$ mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
2,5	0,272	1,25	81,2
3,0	0,335	1,54	100
3,5	0,328	1,51	98,0
4,0	0,303	1,40	90,9
4,5	0,294	1,36	88,3
5,0	0,235	1,08	70,1
5,5	0,205	0,94	61,0
6,0	0,161	0,74	48,0
6,5	0,113	0,52	33,8

EK-9 (Devam) Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine pH etkisine ait veriler

Çizelge 9.3. Fe₃O₄-CS-EDAC-L aktifliğinin pH ile değişimi

pH	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 ⁻² mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
2,5	0,385	1,78	64,7
3,0	0,451	2,08	75,6
3,5	0,500	2,31	84,0
4,0	0,537	2,48	90,2
4,5	0,596	2,75	100
5,0	0,489	2,25	81,8
5,5	0,407	1,88	68,4
6,0	0,359	1,66	60,4
6,5	0,201	0,93	33,8

Çizelge 9.4. Fe₃O₄-CS-SC-L aktifliğinin pH ile değişimi

pH	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 ⁻² mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
2,5	0,297	1,38	63,0
3,0	0,407	1,88	85,8
3,5	0,474	2,19	100
4,0	0,410	1,89	86,3
4,5	0,378	1,74	79,5
5,0	0,371	1,71	78,1
5,5	0,352	1,62	74,0
6,0	0,242	1,11	50,7
6,5	0,147	0,68	31,0

EK-10 Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisine ait veriler

Çizelge 10.1. Serbest lakkaz aktifliğinin sıcaklıkla değişimi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A_{414})	Tepkime hızı (Aktiflik) ($\times 10^{-2}$ mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
10	0,320	1,47	53,5
20	0,450	2,07	75,3
30	0,518	2,39	86,9
40	0,597	2,75	100
50	0,542	2,50	90,9
60	0,497	2,23	81,1
65	0,399	1,84	66,9

Çizelge 10.2. Fe_3O_4 -CS-L aktifliğinin sıcaklıkla değişimi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A_{414})	Tepkime hızı (Aktiflik) ($\times 10^{-2}$ mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
10	0,414	1,91	92,3
20	0,434	2,00	96,6
30	0,440	2,03	98,1
40	0,448	2,07	100
50	0,377	1,74	84,0
60	0,238	1,10	53,1
65	0,187	0,86	41,5

EK-10 (Devam) Serbest lakkaz ve immobilize lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisine ait veriler

Çizelge 10.3. Fe₃O₄-CS-EDAC-L aktifliğine sıcaklık etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 ⁻² mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
10	0,362	1,67	75,9
20	0,382	1,76	80,0
30	0,477	2,20	100
40	0,452	2,01	91,4
50	0,277	1,28	58,2
60	0,262	1,21	55,0
65	0,238	1,10	50,0

Çizelge 10.4. Fe₃O₄-CS-SC-L aktifliğine sıcaklık etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 ⁻² mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
10	0,264	1,22	54,7
20	0,384	1,77	79,4
30	0,421	1,94	87,0
40	0,483	2,23	100
50	0,373	1,72	77,1
60	0,314	1,45	65,0
65	0,275	1,27	56,9

EK-11 Serbest lakkaz ve immobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisine ait veriler

Çizelge 11.1. Serbest lakkaz aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Depolama süresi (gün)	Absorbans (A_{414})	Tepkime hızı (Aktiflik) ($\times 10^{-2}$ mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,516	2,38	100
3	0,514	2,37	99,6
7	0,504	2,32	97,6
11	0,496	2,29	96,2
14	0,494	2,28	95,8
18	0,486	2,24	94,1
21	0,465	2,14	89,9
24	0,451	2,08	87,4
27	0,442	2,04	85,7
30	0,441	2,03	85,3

Çizelge 11.2. Fe_3O_4 -CS-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Depolama süresi (gün)	Absorbans (A_{414})	Tepkime hızı (Aktiflik) ($\times 10^{-2}$ mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,325	1,50	100
3	0,306	1,41	94,0
7	0,304	1,40	93,3
11	0,302	1,39	92,7
14	0,274	1,26	84,0
18	0,262	1,21	80,7
21	0,256	1,18	78,7
24	0,219	1,01	67,3
27	0,202	0,93	62,0
30	0,189	0,87	58,0

EK-11 (Devam) Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisine ait veriler

Çizelge 11.3. Fe₃O₄-CS-EDAC-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Depolama süresi (gün)	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 ⁻² mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,379	1,75	100
3	0,365	1,68	96,0
7	0,339	1,56	89,1
11	0,315	1,45	82,9
14	0,219	1,01	57,7
18	0,160	0,74	42,3
21	0,118	0,54	30,8
24	0,116	0,53	30,3
27	0,111	0,51	29,1
30	0,106	0,49	28,0

Çizelge 11.4. Fe₃O₄-CS-SC-L aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

Depolama süresi (gün)	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 ⁻² mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
0	0,428	1,97	100
3	0,381	1,76	89,3
7	0,371	1,71	86,8
11	0,356	1,64	83,2
14	0,340	1,57	79,7
18	0,286	1,32	67,0
21	0,243	1,12	56,8
24	0,198	0,90	45,7
27	0,152	0,70	35,5
30	0,144	0,66	33,5

EK-12 Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisine ait veriler

Çizelge 12.1. Serbest lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği verileri

ABTS derişimi [S] x 10 ⁻² mM	1/[S] (1/mM)	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (V) (x10 ⁻² mM/dakika)	1/V (dakika/mM)
2,5	40,00	0,516	2,38	42,03
2,0	50,00	0,428	1,97	50,68
1,5	66,67	0,341	1,57	62,50
1,0	100,00	0,257	1,18	84,39
0,5	200,00	0,134	0,62	161,29

Çizelge 12.2. Fe₃O₄-CS-L için Lineweaver-Burk grafiği verileri

ABTS derişimi [S] x 10 ⁻² mM	1/[S] (1/mM)	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (V) (x10 ⁻² mM/dakika)	1/V (dakika/mM)
2,5	40,00	0,525	2,42	41,32
2,0	50,00	0,483	2,23	44,84
1,5	66,67	0,384	1,77	56,49
1,0	100,00	0,268	1,24	80,64
0,5	200,00	0,134	0,62	160,29

Çizelge 12.3. Fe₃O₄-CS-EDAC-L için Lineweaver-Burk grafiği verileri

ABTS derişimi [S] x 10 ⁻² mM	1/[S] (1/mM)	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (V) (x10 ⁻² mM/dakika)	1/V (dakika/mM)
2,5	40,00	0,568	2,62	38,17
2,0	50,00	0,467	2,15	46,51
1,5	66,67	0,385	1,78	56,18
1,0	100,00	0,270	1,24	80,65
0,5	200,00	0,134	0,62	161,29

EK-12 (Devam) Serbest ve immobilize lakkaz aktifliğine substrat derişiminin etkisine ait veriler

Çizelge 12.4. Fe₃O₄-CS-SC-L için Lineweaver-Burk grafiği verileri

ABTS derişimi [S] x 10 ⁻² mM	1/[S] (1/mM)	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (V) (x10 ⁻² mM/dakika)	1/V (dakika/mM)
2,5	40,00	0,576	2,66	37,62
2,0	50,00	0,463	2,14	46,82
1,5	66,67	0,357	1,64	60,72
1,0	100,00	0,235	1,08	92,28
0,5	200,00	0,130	0,60	167,29

EK-13 İmmobilize lakkazların aktifliğine kullanım sayısının etkisine ait veriler

Çizelge 13.1. Fe₃O₄-CS-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım Sayısı	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 ⁻² mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
1	0,325	1,50	100
2	0,320	1,48	98,7
3	0,297	1,37	91,3
4	0,277	1,28	85,3
5	0,277	1,28	85,3
6	0,282	1,30	86,7
7	0,267	1,23	82,0
8	0,269	1,24	82,7
9	0,273	1,26	84,0
10	0,277	1,28	85,3
11	0,277	1,28	85,3
12	0,262	1,21	80,7
13	0,264	1,22	81,3
14	0,247	1,14	76,0
15	0,253	1,17	78,0
16	0,253	1,17	78,0
17	0,262	1,21	80,7
18	0,251	1,16	77,3
19	0,253	1,17	78,0
20	0,247	1,14	76,0
21	0,247	1,14	76,0
22	0,232	1,07	71,3
23	0,236	1,09	72,7
24	0,230	1,06	70,7
25	0,232	1,07	71,3
26	0,230	1,06	70,7
27	0,228	1,05	70,0
28	0,230	1,06	70,7
29	0,228	1,05	70,0
30	0,230	1,06	70,7

EK-13 (Devam) İmmobilize lakkazların aktifliğine kullanım sayısının etkisine ait veriler

Çizelge 13.2. Fe₃O₄-CS-EDAC-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım Sayısı	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 ⁻² mM/dakika)	Maksimum aktiflik (%)
1	0,252	1,17	100
2	0,249	1,15	98,3
3	0,244	1,12	95,7
4	0,249	1,15	98,3
5	0,241	1,11	94,9
6	0,241	1,11	94,9
7	0,237	1,09	93,2
8	0,223	1,03	88,0
9	0,221	1,02	87,2
10	0,221	1,02	87,2
11	0,218	1,00	85,5
12	0,211	0,97	82,9
13	0,222	1,02	87,2
14	0,218	1,00	85,5
15	0,225	1,04	88,9
16	0,222	1,02	87,2
17	0,227	1,05	89,7
18	0,219	1,00	85,5
19	0,208	0,96	82,0
20	0,207	0,95	81,2
21	0,209	0,96	82,0
22	0,197	0,91	77,8
23	0,193	0,89	76,1
24	0,194	0,89	76,1
25	0,193	0,89	76,1
26	0,191	0,88	75,2
27	0,192	0,88	75,2
28	0,194	0,89	76,1
29	0,190	0,88	75,2
30	0,189	0,87	74,3

EK-13 (Devam) İmmobilize lakkazların aktifliğine kullanım sayısının etkisine ait veriler

Çizelge 13.3. Fe₃O₄-CS-SC-L aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Tekrar Kullanım Sayısı	Absorbans (A ₄₁₄)	Tepkime hızı (Aktiflik) (x10 ⁻² mM/dakika)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,331	1,53	100
2	0,320	1,48	96,7
3	0,312	1,44	94,1
4	0,292	1,35	88,2
5	0,298	1,38	90,2
6	0,297	1,37	89,5
7	0,295	1,36	88,9
8	0,297	1,37	89,5
9	0,301	1,39	90,8
10	0,287	1,32	86,3
11	0,282	1,30	85,0
12	0,295	1,36	88,9
13	0,286	1,32	86,3
14	0,273	1,26	82,3
15	0,276	1,27	83,0
16	0,282	1,30	85,0
17	0,285	1,31	85,6
18	0,290	1,34	87,6
19	0,283	1,31	85,6
20	0,285	1,31	85,6
21	0,272	1,25	81,7
22	0,276	1,27	83,0
23	0,286	1,32	86,3
24	0,282	1,30	85,0
25	0,285	1,31	85,6
26	0,282	1,30	85,0
27	0,277	1,28	83,7
28	0,271	1,25	81,7
29	0,270	1,24	81,0
30	0,270	1,24	81,0

EK-14 Reaktif Sarı 145 kalibrasyon eğrisine ait veriler

Çizelge 14.1. RY145 derişimi ile absorbens değişimi

RY145 derişimi (mg/L)	Absorbans (A₄₁₉)
0	0
25	0,391
50	0,787
75	1,149
100	1,517
125	1,917
150	2,301
175	2,591
200	2,914

EK-15 Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun temas süresi ile değişimine ait veriler

Çizelge 15.1. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun temas süresi ile değişimi

t (dakika)	A _t	q _t (mg/g)
0	1,517	0
10	1,400	3,90
20	1,139	12,60
30	0,989	17,60
40	0,757	25,33
50	0,689	27,60
60	0,605	30,40
90	0,505	33,73
120	0,494	34,10
150	0,482	34,50
180	0,478	34,63

Örnek hesaplama:

10. dakikadaki q_t değeri şöyle hesaplanabilir:

t=0 anındaki absorbans (A₀ = 1,517)

t=10. dakikadaki absorbans (A_t =1,400)

m_{adsorplayıcı} = 50 mg = 0,05 g

V_{RY145} = 25 mL = 25 x 10⁻³ L

Kalibrasyon eğrisinin eğimi = 0,015

q_t = [((A₀ - A_t) / eğim) x V] / m

q_t = [((1,517 - 1,400) / 0,015) x 25x10⁻³] / 0,05

q_t = 3,90 mg/g

EK-16 Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun pH ile değişimine ait veriler

Çizelge 16.1. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun pH ile değişimi

pH	A_t	q_e (mg/g)
3,0	0,505	33,73
4,0	0,509	33,60
5,0	0,511	33,53
6,0	0,562	31,83
7,0	0,760	25,23
8,0	0,931	19,53
9,0	1,090	14,23
10,0	1,190	10,90
11,0	1,207	10,33

EK-17 Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun sıcaklık ile değişimine ait veriler

Çizelge 17.1. 25°C' deki adsorpsiyon izotermine ait veriler

A₀	A_t	C_e (mg/L)	q_e (mg/g)
0,771	0,110	7,33	22,03
1,148	0,320	21,33	27,60
1,517	0,505	33,67	33,73
1,950	0,810	54,00	38,00
2,251	1,055	70,33	39,87
2,613	1,349	89,93	42,13
2,914	1,615	107,67	43,30

Çizelge 17.2. 35°C' deki adsorpsiyon izotermine ait veriler

A₀	A_t	C_e (mg/L)	q_e (mg/g)
0,771	0,103	6,87	22,27
1,148	0,222	14,80	30,87
1,517	0,378	25,20	37,97
1,950	0,666	44,40	42,80
2,251	0,908	60,53	44,77
2,613	1,125	75,00	45,42
2,914	1,479	98,60	47,83

Çizelge 17.3. 45°C' deki adsorpsiyon izotermine ait veriler

A₀	A_t	C_e (mg/L)	q_e (mg/g)
0,771	0,022	1,47	24,97
1,148	0,081	5,40	35,57
1,517	0,135	9,00	46,07
1,950	0,348	23,20	58,55
2,251	0,481	32,07	61,00
2,613	0,756	50,40	68,72
2,914	0,951	63,40	70,10

EK-18 Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına 25,35,45°C' de Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonu için Langmuir modeline göre oluşturulan grafiklere ait veriler

Çizelge 18.1. 25°C' de C_e ve C_e/q_e değerleri

C _e (mg/L)	q _e (mg/g)	C _e /q _e (mg/g)
7,33	22,03	0,33
21,33	27,60	0,77
33,67	33,73	1,00
54,00	38,00	1,42
70,33	39,87	1,76
89,93	42,13	2,13
107,67	43,30	2,49

Çizelge 18.2. 35°C' de C_e ve C_e/q_e değerleri

C _e (mg/L)	q _e (mg/g)	C _e /q _e (mg/g)
6,87	22,27	0,31
14,80	30,87	0,48
25,20	37,97	0,66
44,40	42,80	1,04
60,53	44,77	1,35
75,00	45,42	1,65
98,60	47,83	2,06

Çizelge 18.3. 45°C' de C_e ve C_e/q_e değerleri

C _e (mg/L)	q _e (mg/g)	C _e /q _e (mg/g)
1,47	24,97	0,06
5,40	35,57	0,15
9,00	46,07	0,19
23,20	58,55	0,40
32,07	61,00	0,53
50,40	68,72	0,73
63,40	70,10	0,90

EK-19 Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına 25,35,45°C' de Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonu için Freundlich modeline göre oluşturulan grafiklere ait veriler

Çizelge 19.1. 25°C' de ln C_e ve ln q_e değerleri

C _e (mg/L)	q _e (mg/g)	ln C _e	ln q _e
7,33	22,03	1,99	3,09
21,33	27,60	3,06	3,32
33,67	33,73	3,52	3,52
54,00	38,00	3,99	3,64
70,33	39,87	4,25	3,69
89,93	42,13	4,50	3,74
107,67	43,30	4,68	3,77

Çizelge 19.2. 35°C' de ln C_e ve ln q_e değerleri

C _e (mg/L)	q _e (mg/g)	ln C _e	ln q _e
6,87	22,27	1,93	3,10
14,80	30,87	2,69	3,43
25,20	37,97	3,23	3,64
44,4	42,80	3,79	3,76
60,53	44,77	4,10	3,80
75,00	45,42	4,32	3,82
98,60	47,83	4,59	3,87

Çizelge 19.3. 45°C' de ln C_e ve ln q_e değerleri

C _e (mg/L)	q _e (mg/g)	ln C _e	ln q _e
1,47	24,97	0,39	3,22
5,40	35,57	1,69	3,57
9,00	46,07	2,20	3,83
23,20	58,55	3,14	4,07
32,07	61,00	3,47	4,11
50,40	68,72	3,92	4,23
63,40	70,10	4,15	4,25

EK-20 Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun termodinamik açıdan incelenmesi için $\ln K_L-1/T$ değerleri

Çizelge 20.1. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun termodinamik açıdan incelenmesi için $\ln K_L-1/T$ değerleri

t (°C)	T (K)	1/T	K_L (L/mg)	K_L (L/mmol)	$\ln K_L$
25	298	0,00336	0,0789	79,73	4,39
35	308	0,00325	0,1016	103,85	4,65
45	318	0,00314	0,1806	184,61	5,22

($M_{RY145} = 1022,2$ g/mol)

EK-21 Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun tuz derişimi ile değişimine ait veriler

Çizelge 21.1. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarına Reaktif Sarı 145 adsorpsiyonunun KCl derişimi ile değişimi

KCl derişimi (mM)	A_t	q_e (mg/g)
0	0,505	33,73
10	0,438	35,93
20	0,392	37,50
30	0,347	39,00
40	0,331	39,53
50	0,323	39,80

EK-22 Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarından Reaktif Sarı 145' in desorpsiyonuna ait veriler

Çizelge 22.1. Fe₃O₄-CS nanoparçacıklarından Reaktif Sarı 145 desorpsiyonunun NaOH derişimi ile değişimi

NaOH derişimi (mM)	A _t	Desorpsiyon (%)
0	0	0
2,5	0,574	56,8
5,0	0,780	77,1
7,5	0,801	79,2
10,0	0,809	79,9

EK-23 Yararlanılan internet adresleri

<http://www.msm.cam.ac.uk/doitpoms/tlplib/ferromagnetic/printall.php>

<http://www.psc.edu/science/Wang/>

http://www.tf.uni-kiel.de/matwis/amat/elmat_en/kap_4/backbone/r4_1_3.html

<http://www.ruf.rice.edu/~natelson/research.html>

http://www.irm.umn.edu/hg2m/hg2m_a/hg2m_a.html

http://www.irm.umn.edu/hg2m/hg2m_b/hg2m_b.html

<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/HBASE/solids/hyst.html>

http://yunus.hacettepe.edu.tr/~polat/TURKISH/ELEKTRON_SPIN_REZONANS.html

www2.aku.edu.tr/~evcin/powder/powder.pdf

<http://www.chem.ox.ac.uk/icl/faagroup/fuelcell.html>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : Nüzhet Ayça KALKAN
Uyruğu : TC
Doğum yeri ve tarihi : Ankara, 16.12.1985
Medeni Durumu : Bekar
Telefon : 0312 2843836
e-posta : nuzhetayca.kalkan@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı	2010
Lisans	Gazi Üniv. Fen-Edb. Fakültesi Kimya Bölümü	2007
Lise	Ankara Cumhuriyet Lisesi (Y. Dil Ağırlıklı)	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2008-2009	Gazi Üniv. Fen-Edb. Fakültesi Kimya Bölümü	Öğr. Asistan
2006	Türk Standartları Enstitüsü, Ankara	Stajyer
2005	Unilever Sanayi ve Ticaret Türk A.Ş., Kocaeli	Stajyer

Yabancı Dil

İngilizce

Uluslararası Dergilerde Yayımlanmış Makaleler

1. Yamak O., Kalkan N. A., Altınok H., Aksoy S., Hasirci N., “Semi-interpenetrating polymer networks for entrapment of laccase and their use in Acid Orange 52 decolorization”, *Process Biochemistry*, 44: 440-445 (2009).

Ulusal Kongre ve Sempozyumlarda Sunulan Bildiriler

1. Makas Y. G., Köklükaya Z., Kalkan N. A., Aksoy S., Hasirci N., “Poli(akrilamit-akrilik asit)/sodyum aljinat ve poli(akrilamit-itakonik asit)/sodyum aljinat hidrojellerine hapsedme yöntemi ile lakkaz immobilizasyonu”, II. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi ve Sergisi, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa, 124 (2008).

Uluslararası Kongre ve Sempozyumlarda Sunulan Bildiriler

1. Makas Y. G., Kalkan N. A., Aksoy S., Altınok H., Hasirci N., “Entrapment of laccase in κ -carrageenan based semi-IPNs”, 15th International Biomedical Science and Technology Symposium: Biomed 2009, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kuzey Kıbrıs Kampüsü, Güzelyurt, KKTC, 122 (2009).

Katıldığı Ulusal ve Uluslararası Kongre, Sempozyum ve Konferanslar

1. II. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi ve Sergisi, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa (2008).
2. 5. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir (2009).
3. 15. Uluslararası Biyomedikal Bilim & Teknoloji Sempozyumu, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kuzey Kıbrıs Kampüsü, Güzelyurt, KKTC (2009).

Projeler

1. Aksoy S. (Proje Yürütücüsü), Kalkan N. A. (Yardımcı Araştırmacı), “Lakkazın Polimerik Desteklerde Tutuklanması”, Gazi Üniv. BAP Projesi, 05/2009-29 (Devam ediyor).

Dereceler

Mezuniyet Onur Derecesi, Gazi Üniv. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü,
2007.

Hobiler

Müzik