

**İNVERTAZIN DEĞİŞİK DESTEKLERE
İMMOBİLİZASYONU**

**CEYLAN HEPOKUR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
2007**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Dursun SARAYDIN

Üye: Prof. Dr. Mehmet Ali AKPINAR

Üye: Doç. Dr. H. Nursevin ÖZTOP



ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

.../.../2007

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. H.Hüseyin BAŞIBÜYÜK

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNVERTAZIN DEĞİŞİK DESTEKLERE
İMMOBİLİZASYONU**

CEYLAN HEPOKUR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

Danışman
H.Nursevin ÖZTOP

Anabilim Dalı-Ünvan
Kimya-Doç.Dr

İmza

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30.12.1993 tarihinde C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne hazırlanan ve yayınlanan “Yüksek Lisans ve Doktora tez yazım Kılavuzu” adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın seçiminde, planlanmasında ve yürütülmesinde bana yön veren, çalışmam boyunca yakın desteğini ve bilimsel yardımlarını bir an olsun eksiltmeyen, yerinde yaptığı uyarılar ile yol göstererek bana güç ve moral veren çok değerli hocam Doç.Dr.H.Nursevin ÖZTOP'a ;

Polimer sentezi sırasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın hocam Prof.Dr. Dursun SARAYDIN'a ;

Tez çalışmamın yürütülebilmesi için gerekli olan IR analizlerinin alınmasında yardımcı olan Prof. Dr. Dilek Şolpan'a ve TG analizlerinin alınmasında yardımcı olan Prof.Dr. Turgay SEÇKİN'e, çalışmamda her konuda yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Şenay ÇETİNUS'a ve Yrd. Doç. Dr. Yasemin IŞIKVER hocalarıma;

Her zaman ve her konuda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ailem ve eşim Dr. Ali İhsan HEPOKUR'a en içten duygularıyla;

teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
SUMMARY	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEMALAR DİZİNİ	XI
SİMGELER DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2.İNVERTAZ	3
2.1.İnvertaz Aktivite Analizi	4
3. ENZİM İMMOBİLİZASYONU	6
3.1.Yakalama	7
3.1.1. Jel Yakalama	7
3.1.2. Mikrokapsülleme	8
3.2. Bağlanma	8
3.2.1.Taşıyıcıya Bağlanma	8
3.2.1.1.Fiziksel Adsorpsiyon	9
3.2.1.2. İyonik Bağlanma	10
3.2.1.3.Kovalent Bağlanma	10
3.2.2. Çapraz Bağlanma	11
3.3. İmmobilizasyon Avantajları	11
4. KOMPOZİTLER	13
5.KİL	16
5.1. Sepiyolit	16

6.KOMPOZİT HİDROJELLERİN KARAKTERİZASYONU	22
6.1. Spektroskopik Özellikler	22
6.2. Isısal Özellikler	22
6.3.Şişme Davranışı ve Difüzyon Türü	22
7. GEREÇ VE YÖNTEM	24
7.1. DENEYLERİN YAPILDIĞI YER VE TARİH	24
7.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	24
7.3. KULLANILAN CİHAZLAR	24
7.4. KOMPOZİT HİDROJELLERİN HAZIRLANMASI	24
7.5. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA KOMPOZİT HİDROJELLERİNİN KARAKTERİZASYONU	25
7.5.1.Spektroskopik Analiz	25
7.5.2. Isısal Analiz	25
7.5.3. Şişme Deneyleri	25
7.5.3.1. Dinamik Şişme Deneyleri	25
7.5.3.2. pH Duyarlı Denge Şişme Deneyleri	26
7.5.3.3. pH Duyarlı Dönüştürümlü Denge Şişme Deneyleri	26
7.6. İNVERTAZIN AAm-Sep ve AAm-Sep-MA KOMPOZİT HİDROJELLERE İMMOBİLİZASYONU	26
7.7. SERBEST İNVERTAZ DENEYLERİ	27
7.7.1. Serbest İvertazın Aktivite Analizi	27
7.7.2. Serbest İvertazın Optimum pH'sının Belirlenmesi	27
7.7.3. Serbest İvertazın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi	28
7.7.4. Serbest İvertazın Kinetik Parametrelerinin Bulunması	28
7.7.5. Serbest İvertazın Termal Kararlılığı	28

7.7.6. Serbest İvertazın Saklama Kararlılığı	28
7.8. İMMOBİLİZE İNVERTAZ DENEYLERİ	29
7.8.1. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv Kompozit Hidrojellerinin Karakterizasyonu	29
7.8.2. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Aktivite Analizi	29
7.8.3. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'ın Optimum pH'sının Belirlenmesi	29
7.8.4. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi	30
7.8.5. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Kinetik Parametrelerinin Bulunması	30
7.8.6. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Termal Kararlılığı	30
7.8.7. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Saklama Kararlılığı	31
7.8.8. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın pH Kararlılığı	31
7.8.9. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Kullanım Kararlılığı	31
8. BULGULAR	32
8.1.KOMPOZİT HİDROJELLERİN HAZIRLANMASI	32
8.2. KOMPOZİT HİDROJELLERİN KARAKTERİZASYONU	36
8.2.1. Spektroskopik Analiz	36
8.2.2. Isısal Analiz (TG)	38
8.2.3. Şişme Deneyleri	39
8.2.3.1. Dinamik Şişme	39
8.2.3.2. pH Duyarlı Denge Şişme Deneyleri	46

8.2.3.3. pH Duyarlı Dönüştürümlü Denge Şişme Deneyleri	47
8.3. İNVERTAZIN AAm-Sep ve AAm-Sep-MA KOMPOZİT HİDROJELLERE İMMOBİLİZASYONU	48
8.4.SERBEST İNVERTAZ, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın AKTİVİTE DENEYLERİ	50
8.4.1. Serbest İvertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Optimum pH'sının Belirlenmesi	50
8.4.2. Serbest İvertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi	51
8.4.3. Serbest İvertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Kinetik Parametrelerinin Bulunması	52
8.4.4. Serbest İvertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Termal Kararlılığının Belirlenmesi	55
8.4.5. Serbest İvertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Saklama Kararlılığının Belirlenmesi	56
8.4.6. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın pH Kararlılığı	57
8.4.7. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv 'ın Kullanım Kararlılığı	58
9.TARTIŞMA VE SONUÇLAR	60
10. KAYNAKLAR	69
11.ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sukrozun invertazla hidroliz tepkimesi	3
Şekil 3.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri	7
Şekil 4.1. Akrilamid ve maleik asidin kimyasal yapısı	15
Şekil 5.1. a. Sepiyolitın yapısı	18
b. Sepiyolitdeki kanal ve tüneller	18
Şekil 8.1. Kuru ve şişmiş haldeki AAm-Sep kompozit hidrojellerin fotoğrafı	33
Şekil 8.2. Kuru ve şişmiş haldeki AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerin fotoğrafı	33
Şekil 8.3. AAm-Sep kompozit hidrojelinin FTIR spektrumu	37
Şekil 8.4. AAm-Sep-MA kompozit hidrojelinin FTIR spektrumu	37
Şekil 8.5. AAm-Sep kompozit hidrojelinin termogramı	38
Şekil 8.6. AAm-Sep-MA kompozit hidrojelinin termogramı	39
Şekil 8.7. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin 25 °C'ta şişme davranışının zamanla değişimi	40
Şekil 8.8. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin 60 °C'ta şişme davranışının zamanla değişimi	40
Şekil 8.9. AAm-Sep kompozit hidrojellerinin şişme davranışının sıcaklıkla değişimi	42
Şekil 8.10. AAm-Sep kompozit hidrojellerinin şişme davranışının sıcaklıkla değişimi	42
Şekil 8.11. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin 25 °C'ta şişme hız grafiği	43
Şekil 8.12. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin 60 °C'ta şişme hız grafiği	43
Şekil 8.13. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin 25 °C'taki şişme kinetik grafiği	45
Şekil 8.14. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin 60 °C'taki şişme kinetik grafiği	45
Şekil 8.15. AAm-Sep kompozit hidrojellerinin pH duyarlı şişme davranışı	46
Şekil 8.16. AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin pH duyarlı şişme davranışı	47

Şekil 8.17. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerin 25 °C'ta pH dönüşümlü denge şişme davranışları	48
Şekil 8.18. Serbest invertaz, AAm-Sep ve AAm-Sep-Inv'ın FTIR spektrumu	49
Şekil 8.19. Serbest invertaz, AAm-Sep-MA ve AAm-Sep-MA-Inv'ın FTIR spetrumu	49
Şekil 8.20. Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'ın optimum pH grafiği	50
Şekil 8.21. Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'ın optimum sıcaklık grafiği	51
Şekil 8.22. Serbest invertazın a) Michaelis-Menten ve b) Lineweaver-Burk grafiği	52
Şekil 8.23. AAm-Sep-Inv'ın a) Michaelis-Menten ve b) Lineweaver-Burk grafiği	53
Şekil 8.24. AAm-Sep-MA-Inv'ın a) Michaelis-Menten ve b) Lineweaver-Burk grafiği	54
Şekil 8.25. Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv, AAm-Sep-MA-Inv'ın 50 °C'ta termal kararlılığı	55
Şekil 8.26. Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv, AAm-Sep-MA-Inv'ın 70 °C'ta termal kararlılığı	56
Şekil 8.27. Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'ın Saklama Kararlılığı	57
Şekil 8.28. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'ın pH Kararlılığı	58
Şekil 8.29. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'ın Kullanım Kararlılığı	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5.1. Dünyadaki bazı sepiyolitlerin kimyasal bileşimleri	17
Çizelge 8.1. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin farklı sıcaklıklardaki şişme parametreleri	44
Çizelge 8.2. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin değişik sıcaklıklardaki şişme kinetik parametreleri	44
Çizelge 9.1. Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv için optimum sıcaklık, optimum pH, K_m , V_{max} değerleri	63

ŞEMALAR DİZİNİ

Şema 8.1. AAm'in polimerleşme mekanizması	34
Şema 8.2. AAm ve MA'in'in polimerleşme mekanizması	35
Şema 8.3. Kompozit hidrojel oluşumu	36

SİMGELER DİZİNİ

Simge	Açıklama
AAm	Akrilamid
MA	Maleik asit
F	Şişme kesri
FTIR	Fourier Dönüşümlü İnfrared
r_{max}	Maksimum bozunma hızı
r_o	Şişme başlangıç hızı
S	Şişme derecesi
T	Geçirgenlik
TG	Termogravimetri
İnv	İnvertaz
Sep	Sepiyolit

GİRİŞ

Enzimler; canlı hücrelerdeki biyokimyasal tepkimeleri hızlandıran protein molekülleridir. Bütün katalizörler gibi enzimlerde tepkimenin etkinleşme enerjisini düşürerek tepkimeyi hızlandırırlar. Enzimler son derece özgüdürlü bu yüzden bütün kimyasal tepkimelere katılmazlar, tepkime boyunca değiştirilemezler ve hızlı çalışırlar. Yapılarını oluşturan amino asitlerin primer dizilişi genler tarafından belirlenen sıraya göre oluşur. Hücre içinde gösterdikleri aktiviteyi hücre dışında da gösterebilmeleri nedeniyle enzimlerin birçoğu hücreden ayrılabilir ve değişik ortamlarda kullanılabilirler. Enzimlerin bu özellikleri onların pek çok kimyasal ve endüstriyel işlemlerde kullanılmasına olanak sağlar. Biyolojik deterjanlar, bira endüstrisi, süt endüstrisi, nişasta endüstrisi, tekstil endüstrisi, deri endüstrisi, tıp ve eczacılık alanları enzimlerin kullanıldığı alanlardır (Menteş ve Ersöz, 1993; Cengiz ve Cengiz, 1994; Işık ve ark., 2003; Kılıç, 2005).

Enzimler, tepkimedeki kimyasallarla aynı çözüldedir ve ayrılmaları için uzun saflaştırma işlemleri gerekir. Bu nedenle endüstriyel işlemlerde katalizör olarak immobilize enzimlerin kullanımı son zamanlarda büyük önem kazanmıştır. İmmobilizasyon hareketsizleştirme anlamına gelir. İmmobilize edilen enzim, katı destek üzerine fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanır. Pahalı bir katalizör olarak bir enzimin kullanılması, onun geri alınmasını ve ekonomik olarak uygun bir süreç sonra tekrar kullanılmasını gerektirir. Endüstriyel uygulamalarda immobilize enzimlerin kullanılması, kontrollü ürün oluşumu, elde edilen ürünlerin kolayca saflaştırılabilmesi ve tekrar kullanım gibi işlemi daha ekonomik hale getiren birçok avantaj sağlamaktadır. Enzim immobilizasyonu için adsorbsiyon, polimerik jeller ya da membranlar içerisine hapsedme, bifonksiyonel bir madde ile çapraz bağlama ya da kovalent bağlama gibi birçok kimyasal ve fiziksel yöntem kullanılmaktadır. Bunlar arasında polimerik matriks üzerine adsorbsiyon yapılması en eski ve en genel yöntemdir. Bu yöntemin en önemli avantajları

immobilize edilen enzimin aktifliğini büyük ölçüde veya tamamıyla koruması ve tersinir bir yöntem olduğundan destek maddesinin ve enzimin başka amaçlarla tekrar kullanımına olanak sağlamasıdır (Mateo ve ark., 2007).

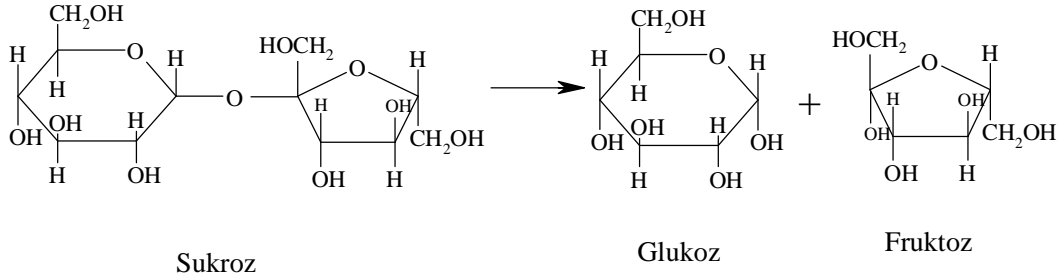
Önceleri immobilize enzimler için "suda çözünmeyen enzim", "bağlanmış enzim", "matrikse bağlı enzim", "tutuklanmış enzim" gibi terimler kullanılıyordu. 1971 yılında yapılan 3. Biyoteknoloji Biyomühendislik Sempozyumu ve 1. Enzim Mühendisliği Konferansı'nda "*immobilize enzim*" terimi önerilmiş ve böylece bu terimin kullanılması yaygınlaşmıştır (Cengiz ve Cengiz, 1994).

İmmobilize enzim çalışmalarında en önemli araştırma alanı uygun destek materyalinin bulunmasıdır. Doğal ve yapay polimerik materyaller değişik işlevsel gruplara sahip olmaları ve proteinlerin dış gruplarıyla kararlı bağlar oluşturabilmeleri nedeniyle yaygın olarak kullanılan desteklerdir. Polimer kompozitler makroskobik olarak birbirinden ayrı iki ya da daha fazla malzemenin bir araya getirilmesi ile imal edilen malzeme türüdür. Son yıllarda destek maddesi olarak ilgi çekmektedir. Kompozit malzeme teknolojisi bugün hızla gelişmektedir ve hemen her gün piyasaya yeni ürünler sunulmaktadır.

Bu çalışmada besin endüstrisinin önemli enzimi olan invertaz seçilmiştir. Destek materyal olarak kil-polimer kompozit hidrojelere (akrilamid-sepiyolit ve akrilamid-sepiyolit-maleik asit) hazırlanmış karakterizasyon çalışmalarından sonra invertaz immobilizasyonunda kullanılmışlardır. İmmobilize invertazın optimum pH, optimum sıcaklık, kinetik parametrelerinin bulunması, termal kararlılık, pH kararlılığı, saklama kararlılığı ve depolama kararlılığı deneyleri yapılmıştır.

İNVERTAZ

İnvertaz, (β -D-fruktofuranozidaz E.C.3.2.1.26) β -fruktofuranozitlerin indirgenmemiş β -fruktofuranozit ucundan hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. İnvertaz, hafif krem renkli, suda çözünebilir, zengin karboksilik gruplu asidik bir enzimdir. İnvertazın mol kütlesi elde edilmiş kaynağına göre değişmektedir. Yüksek mannoz içeriği nedeniyle maya hücre dışı glikoproteinleri mannoproteinler olarak adlandırılırlar. *Saccharomyces cerevisiae* invertazı bunlardan biridir (Lehle ve ark. 1979). Hidrolaz sınıfı bir enzimdir. Sukroz (sakkaroz) hidrolizinde kullanıldığında oluşan ürünler glukoz ve fruktozdur (Wisemann, 1994). Sukroz hidroliz tepkimesi Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Sukrozun invertazla hidroliz tepkimesi

İnvertazla sukroz hidrolizi sonucu oluşan fruktoz sukroza göre daha tatlı olması ve kolay kristallenmemesi nedeni ile gıda endüstrisinde tercih edilmektedir. Asit hidroliziyle de aynı ürünler elde edilebilir. Ancak bu yolla istenmeyen ara ürünler oluşabilir. İnvertazdan elde edilen invert şeker karışımı (glukoz ve fruktoz) asit hidrolizi ile elde edilen renkli ürünle karşılaştırıldığında, renksiz olduğu için önemli bir üstünlük sunmaktadır. Bu karışım yüksek derişimlerde bile sukroz gibi kristallenmez. Besin endüstrisinde kullanılacak ürünlerin uzun süre tazeliğini koruması sağlanmış olur. Kristallenmeyen kremalar, reçeller, suni bal ve sıvı şekerin endüstriyel üretiminde yaygın olarak kullanılır. (Chen ve ark., 2000; Kızılyar ve ark., 2000; Danışman ve ark., 2004; Sanjay ve

Sugunan, 2005; Emregül ve ark., 2006; Bagal ve Karve, 2006; Gancarz ve ark., 2006; Rebros ve ark. 2007; Yamada ve ark., 2007).

İnvertazın en önemli uygulamalarından biri, fruktoz şurubu üretimi için besin endüstrisinde kullanımınıdır. Fruktoz şurup, şekerlemelerde, konservelerde ve içeceklerin tatlandırıcısı olarak kullanıldığı için geniş kullanım alanı vardır (Santiago ve ark., 2006). İnvertaz enzimi temel biyosensör olarak kullanıldığında, ağır metal iyonlarının özellikle cıvanın saptanmasında kullanılır. İnvertaz kırmızı pancar, havuç, patates fabrikalarında temizlenme aşamasında kullanılır. İnvertaz doğal olarak da bulunabilir. Böceklerin fenomenlerinde, nektarlarda, bal, polen, bitki, mantar ve bakterilerde bulunur (www.wikipedia.org/wiki/Bal).

Serbest enzimlerin endüstride kullanımında karşılaşılan zorluklar invertaz için de geçerlidir. Bu nedenle değişik desteklere immobilizasyonu üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. İnvertaz immobilizasyonu için kovalent bağlanma, iyonik adsorpsiyon ve yakalama en yaygın kullanılan tekniklerdir (Delgado ve ark., 2006; Gancarz ve ark., 2006). Bu alanda yapılan çalışmalara polivinil alkol hidrojel kapsüllere immobilizasyon (Rebros ve ark., 2007) montmorillonite (Sanjay ve Sungunan, 2006), metal şelatlı desteklere adsorpsiyon (Osman ve ark., 2005), polietilenimin kullanarak pirinç kabukları üzerine immobilizasyon (D'Souza ve Godbole, 2002), kalsiyum aljinat jel kapsüllerine immobilizasyon (Tanrıseven ve Doğan, 2001), kovalent bağ ile modifiye edilen polianilin üzerine immobilizasyon (Chen ve ark., 2000), fonksiyonlu kopolimer (politetrahidrofuran-blok-polistiren) matrikslerine immobilizasyon (Erginer ve ark., 2000), poli (akrilamid-maleik asid) kopolimerlerine immobilizasyon (Arslan ve ark., 2000) örnek olarak verilebilir.

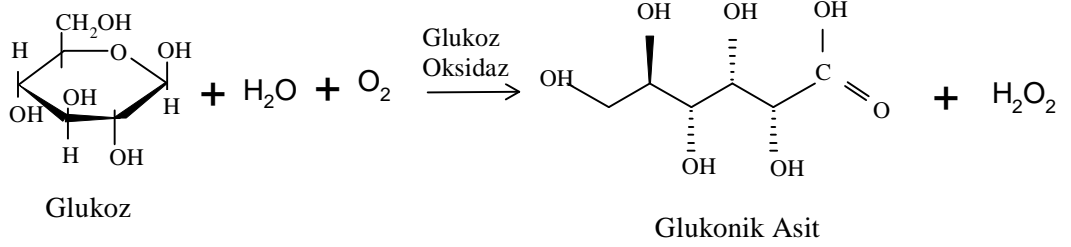
2.1. İnvertaz Aktivite Analizi

İnvertazın aktivitesinin bulunması için kullanılan yöntemlerden biri sukroz hidrolizi sonucu oluşan glukozun spektrofotometrik olarak saptanması yöntemidir.

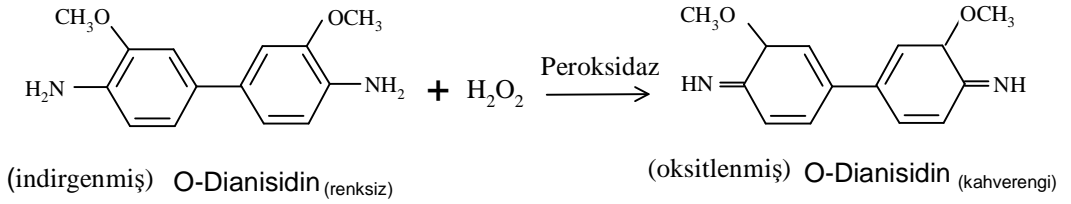
İnvertaz ile sukroz hidrolizi için belli sıcaklık ve pH'da dengeye getirilmiş sukroz çözeltisine eklenen enzim 5-15 dakika arasında inkübe edilir. Tepkimenin durdurulması için karışım kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilir. Bu süreçte Şekil 2.1 'de verilmiş olan tepkimeye göre sukroz glukoz ve fruktoza dönüştürülür

İnvertazla sukroz hidrolizi sonucu oluşan glukozun spektrofotometrik analizi için kullanılan glukoz deney kiti (Sigma GAGO-20) çalışma yönteminde glukoz oksidaz, peroksidaz enzimleriyle o-dianisidin ve H₂SO₄ kullanılmaktadır.

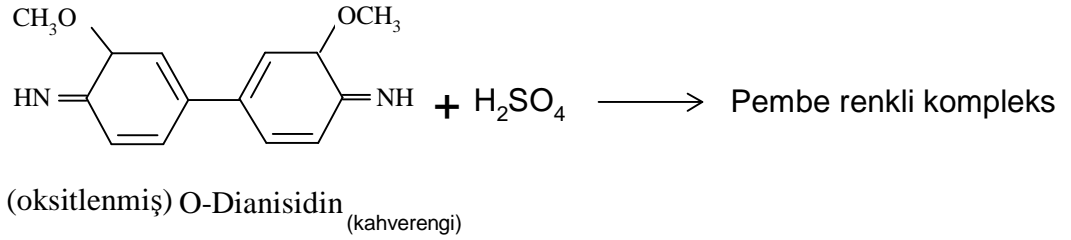
Glukoz oksidaz enzimi ile glukoz, glukonik asit ve H₂O₂'e çevrilir.



Hidrojen peroksit o-dianisidin ile peroksidaz varlığında tepkimeye girerek renkli ürün oluşturur.



Ortama eklenen sülfürik asit oksiteilmiş o-dianisidin ile tepkimeye girerek kararlı pembe renkli kompleks oluşturur.



Tepkime sonucunda oluşan pembe renkli kompleksin soğurumu UV-VIS spektrofotometrede 540 nm'de okunur. Oluşan glukoz miktarının saptanması için Eşitlik 1'den yararlanılır (www.sigmaaldrich.com/catalog).

$$Glukoz / mg = \frac{A_{540} (\text{örnek}) \times (\text{glukoz}) mg}{A_{540} (s \text{ tan dart})} \quad (1)$$

Bulunan glukoz miktarından enzim aktivitesi dakikada hidrolizlenen mikromol sukroz olarak hesaplanır.

ENZİM İMMOBİLİZASYONU

İmmobilizasyon enzim, hücre ve diğerlerinin tamamen ya da kısmen hareketlerinin sınırlandırılması yöntemi olarak tanımlanabilir. Biyokatalizörler olarak enzimler, kirlilik, inhibisyon, çözücüler, tuzlar, sıcaklık, pH gibi çevresel etkilerden korunmak için bir desteğe immobilize edilirler. İmmobilizasyon biyokatalizörün bulunduğu ortamdan geri kazanımını sağlar. Enzimler endüstriyel amaçlar için büyük miktarlarda üretilmektedir. Enzim immobilizasyonunun başlıca avantajları aşağıda sıralanmıştır.

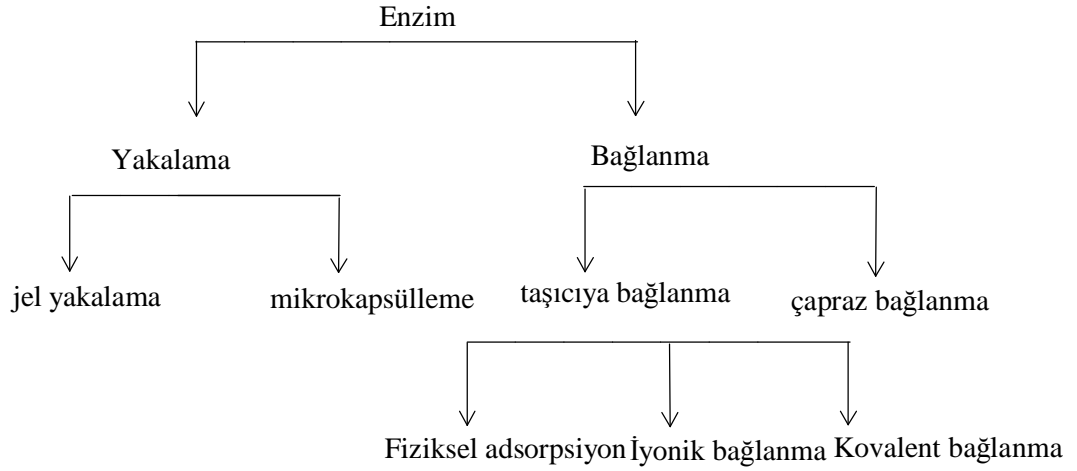
1. Enzimin katalitik gücü kayda değer ölçüde stabilize edilmiş olur.
2. Kolaylıkla tekrar tekrar kullanılabilir.
3. Ürünler saf olarak kolaylıkla elde edilir.
4. Sürekli üretim yapılabilir.
5. Üretim maliyeti düşer.

İmmobilize enzimlerin özellikleri, hem enzim hem de taşıyıcı materyalin özelliklerine bağlıdır. Bu ikisi ile immobilize enzim, kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikler kazanır.

İmmobilize enzimin verimi hem bağlanma sırasında olan kayıplardan dolayı, hem de enzim molekülünün gözeneklerden yavaş yavaş sızması ile azalır. Bu olaylar immobilizasyon verimini düşürür. Tepkime verimini artırmak için alınabilecek önlemler şöyle sıralanabilir;

- Taşıyıcının parçacık boyutlarını düşürmek
- Yüksek özgül aktivitesi olan enzimlerde enzim yükleme miktarını azaltmak
- Enzimi taşıyıcı materyalin dış yüzeyine bağlamaktır.

Pek çok değişik doğal veya sentetik matriksler enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmaktadır (Cengiz ve Cengiz, 1994; Öztöp ve ark., 2002; Çetinus ve Öztöp, 2003). Enzim immobilizasyonu için kullanılan yöntemler Şekil 3.1’de gösterilmiştir (Wisemann, 1994).



Şekil 3.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Wisemann, 1994).

3.1. Yakalama

3.1.1. Jel Yakalama

Yakalama ile immobilizasyon adsorpsiyon ve kovalent bağlanmadan farklıdır. Enzim molekülleri çözeltide serbesttir, fakat jelin kafes yapısı ile enzim hareketi sınırlandırılır. Jel kafesinin, enzim sızmasını engellemesi için yeterince sıkı yapıda olması önemlidir. Jel kafesi enzimin hareketini sınırlandırırken aynı zamanda substrat ve ürünün serbest hareketine izin verir (Gordon ve Bickerstaff, 1997). Polimerizasyon ve çapraz bağlanma sırasında ortamdaki enzim çapraz bağlanma sonucu oluşan odacıklara tutuklanmaktadır. En çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir. Yöntem yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme oluştuğunda, enzim molekülleri, çapraz bağlar arasında tutuklanmakta ve çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir. Çapraz bağ yüzdesi, enzim moleküllerinin tutuklanabileceği ve substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşabileceği oranda ayarlanmalıdır. Bu yöntemin yararları; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az bir enzimle gerçekleştirilebilmesi olarak sıralanabilir. Yöntemin sakıncaları ise; immobilizasyon işlemi sırasında deney koşullarından kaynaklanan inaktivasyon

ve immobilize edilmiş enzimin ancak küçük moleküllü substratlara aktivite göstermesidir. Substrat molekülü enzimlerin tutuklandığı kafeslerin çaplarından daha büyük ise enzim aktif merkezine ulaşamaz (Wisemann, 1994).

3.1.2. Mikroapsülleme

Mikroapsülleme enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasıdır. Çözeltide enzimlerin serbestliği yakalamaya benzerdir fakat boşluk sınırlıdır. Büyük proteinler veya enzimler kapsülün içine geçemez, küçük substratlar ve ürünler yarı geçirgen zardan kolayca geçebilir. Birçok materyal 10–100 µm çapında çeşitli mikroapsülleri oluşturmak için kullanılır (Gordon ve Bickerstaff, 1997).

Mikroapsülleme ile hapsedme yönteminde herhangi bir modifikasyon olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine çok yakındır. Bu yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır. Yüzey-hacim oranının büyük olması, mikroapsül içerisinde oluşan enzim substrat tepkimesini artırır. Bu yöntemin dezavantajı mikroapsül oluşumu sırasında yüksek protein derişimine gerek olması ve yüksek mol kütleli substrat ve ürünler için sınırlı olmasıdır (Wisemann, 1994).

3.2. Bağlanma

3.2.1. Taşıyıcıya Bağlanma

Enzim immobilizasyonunda doğal ya da sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membranı, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Taşıyıcının aranılan niteliklere sahip olması gerekir. Bu nitelikler;

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Kimyasal ve sıcaklık kararlılığı,
- Mikroorganizmalara karşı direç,

- Kovalent bağlanmada taşıyıcılar uygun tepkime verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı,
- Ucuzluk ve bol bulunmalı,
- Toksik özellikte olmamalı,
- Rejenere olabilmelidir.

Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanır. Molekül üzerindeki işlevsel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanmada rol oynarlar (Wisemann, 1994).

3.2.1.1. Fiziksel Adsorpsiyon

Enzim immobilizasyonun da en eski ve en basit yöntemidir. Yöntem; yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin fazlasının yıkanarak giderilmesi temeline dayanır. Enzim taşıyıcıya çoğunlukla Van der Waals kuvvetleri ile bağlanır.

Enzim tutuklanmasında en çok kullanılan destekler aktif karbon, gözenekli cam, kalsiyum karbonat, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta ve kalsiyum fosfattır. İyi bir tutunma sağlanabilmesi için genellikle taşıyıcı bir ön işlemde geçirilir.

Adsorpsiyon ile enzim immobilizasyonu pH, çözgen, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık koşullarına çok bağlıdır. Bu etmenlerin hepsi araştırılarak en iyi sonucu elde edebilecek optimum koşulların belirlenmesi gerekir. En önemli dezavantajı destekten biyokatalizörün sızıntısıdır. Desorpsiyon birçok koşulda oluşabilir. pH, sıcaklık ve iyonik bağdaki çevresel değişiklikler desorpsiyonu ilerletebilir. Bazı zamanlar bir enzim kolayca desorbe edilebilir. Akış hızı, kabarcık oluşması ve molekül-molekül sürtünmesi gibi fiziksel faktörler desorpsiyona yol açabilir. Özgül olmayan bağlanmada eğer substrat, ürün ve arta kalan kirlilikler destek ile etkileşirse sorunlar ortaya çıkabilir. V_{max} ve K_m parametrelerinin değişmesine yol açabilir. Ayrıca destek materyallerine protonların bağlanması optimum pH'ın 1-2 birim değişimiyle sonuçlanabilir. Desteğe fazla yükleme olduğunda düşük katalitik aktiviteye yol açabilir. Enzim molekülü ve destek arasındaki uygun alan yokluğunda sterik engele bağlı olarak sorunlar oluşabilir (Wisemann, 1994; Gordon ve Bickerstaff, 1997).

3.2.1.2. İyonik Bağlanma

Bu yöntem iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlanmanın yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır.

İyonik bağlanma çok ılıman koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişikliğe sebep olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur (Wisemann, 1994).

3.2.1.3. Kovalent Bağlanma

İmmobilizasyonun bu yöntemi enzim ve destek materyali arasındaki kovalent bağlanmanın oluşmasını içerir. Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiliye geçmesini engeller. Kovalent bağlanma genellikle enzimin yapısı ve işlevsel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır.

Kovalent bağlı destek-enzim kompleksinin aktifliği doğal enziminkinden farklı olabilir. Bu farkın büyüklüğü taşıyıcı materyalin biçim ve büyüklüğüne, etkinleşme yönteminin doğasına, taşıyıcı materyalin bileşimine, enzim yapısına ve tepkime sırasındaki özgül koşullara bağlıdır.

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir. Destek maddesi hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi işlevsel grup taşımalıdır. Amino asit işlevsel gruplarının çoğu kovalent bağ oluşumuna katılmak için uygundur. Bunlar; arjinin ve lizinin amino grupları, glutamat ve aspartatın karboksil grupları, serin ve tereoninin hidroksil grupları, trozinin aromatik zincirleri, histidinin imidazol halkası, triptofanın indol halkası ve sisteinin sülfidril gruplarıdır. İmmobilizasyon tepkimesinde taşıyıcıların içerdiği aktifleştiriciler olan diazonyum tuzu, asit azid, izosiyonat, imin, imido-ester ve halojenürler gibi reaktif gruplar enzimlerin bu işlevsel grupları ile kovalent bağ oluştururlar. Kovalent bağlanma için çeşitli destek materyalleri mevcuttur. Bu yüzden enzim immobilizasyonu için uygun yöntem düşünüldeğünde desteğin avantajı ve dezavantajı göz önünde tutulmalıdır (Wisemann, 1994).

3.2.2. Çapraz Bağlanma

Enzim molekülleri başka bir destek maddesi olmadan kendi aralarında molekül içi veya molekül arası çapraz bağlanarak immobilize olabilirler. Bu yöntem üç boyutlu çapraz bağlanmış enzim oluşumu temeline dayanmaktadır. Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına karşın enzimlerdeki özel işlevsel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken koşulların seçimi zordur. Bu yöntemin en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki ya da çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Bu yöntemin dezavantajı ise yüksek aktivite gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma tepkimesinin kontrol edilmesindeki zorluklardır. Çapraz bağlayıcı olarak enzim immobilizasyonunda diazobenzidin, glutaraldehit, 2,4-diizotiyosiyanotoluen gibi çok işlevli maddeler kullanılır. Çapraz bağlanma tepkimesi çok ılıman koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdır ve şimdiye kadar yalnızca immunolojik testlerde kullanılmıştır (Wisemann, 1994).

3.3. İmmobilizasyonun Avantajları

Enzimler canlı mikroorganizmalarda gösterdikleri kararlılığı laboratuvar koşullarında gösterememektedirler. Bunun nedeni enzimlerin kimyasal katalizörlerden daha az kararlı olması ve organik çözücülerde veya yüksek sıcaklıklarda kullanılmamasıdır. Enzimlerin immobilizasyonu, bu kararsızlıkların çoğu ortadan kaldırılırsa da tamamen yok edilememektedir. İmmobilizasyon ile enzimin kararlılığı artmakta, tekrar tekrar kullanımı bulunmakta, tepkimeler kontrol edilebilir olmakta, yüksek saflıkta ürünler elde edilmektedir. İmmobilize enzimler serbest hallerine göre inhibisyondan daha az etkilenirler. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilme özellikleri fiyatlarını önemli ölçüde düşürmekte ve substrat ölçümleri için uygun enzim kaynakları sağlamaktadır (Mateo ve ark., 2007).

Deneyisel uygulamalar için bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimler, endüstriyel uygulamalar için ise mikroorganizmalardan elde edilen enzimler kullanılmaktadır. Bunun nedeni; enzimlerin mikrobiyolojik kaynaklardan üretimi

bitki ve hayvanlardan elde edilmesinden daha düşük maliyetli olması, üretim zamanının kısa olması ve geniş aralıkta üretim yapılabilmesidir. Mikrobiyolojik hücrelerden enzimlerin saflaştırılması yerine hücrenin tamamının immobilize edilmesi daha avantajlıdır. Çünkü

1) Hücre içinde mevcut olan enzimler gerekli metabolik yollarda organize edilirler.

2) Doğal hücrenin yeniden oluşumuyla kullanım kararlılığı artar.

3) Hücre materyali saflaştırılmış enzimlerden daha ucuz ve daha bol miktarlarda bulunur.

4) Enzim özütleme veya saflaştırma işlemine gerek kalmaz.

5) Enzimin aktivitesi için gerekli koenzimler ve kofaktörler mevcut olup yeniden oluşma tepkimeleri hücrede mevcut metabolik yöntemlerle gerçekleştirilir,

6) Enzim kararlılığı genellikle artar (Gordon ve Bickerstaff, 1997; Mateo ve ark.,2007).

KOMPOZİTLER

İstenen amaç için tek başlarına uygun olmayıp farklı iki veya daha fazla malzemeyi istenen özellikleri sağlayacak şekilde belirli şartlar ve oranlarda fiziksel olarak, makro yapıda bir araya getirilerek elde edilen malzemeye kompozit malzeme denir. Kompozit malzemelerde yapıyı oluşturan bileşenler birbiri içerisinde çözünmezler, kimyasal olarak tepkimeye girmezler. Ancak özellikle metalik sistemlerde düşük oranlarda bile olsa, bir miktar çözünme bileşenler arasında kompozit özelliklerini etkileyebilen ara yüzey tepkimeleri görülebilir. Kompozit malzemelerde çekirdek olarak kullanılan bir fiber malzeme bulunmakta, bu malzemelerin çevresinde hacimsel olarak çoğunluğu oluşturan bir matris malzeme bulunmaktadır. Bu iki malzeme grubundan, fiber malzeme kompozit malzemenin dayanıklılık ve yük taşıma özelliğini, matris malzeme ise plastik deformasyona geçişte olabilecek çatlak ilerlemelerini önleyici rol oynamakta ve kompozit malzemenin kopmasını geciktirmektedir

Kompozit malzeme türleri metal kompozitler, seramik kompozitler ve polimer kompozitler olarak sınıflandırılabilirler.

Metal Kompozitler (metal matrisli birleşik malzemeler MMC); bir metalik faz ve bazı takviye malzemelerinden eritme vakum emdirme, sıcak presleme ve difüzyon kaynağı gibi ileri yöntemler uygulanmasıyla elde edilirler. MMC'ler daha çok uzay ve havacılık alanlarında kullanılır.

Seramik Kompozitler (seramik matrisli birleşik malzemeler CMC); yapısal ve işlevsel nitelikli yüksek teknoloji seramikleri içerirler. Başlıcaları Al_2O_3 , SiC, Si_3N_4 , B_4C , TiC' dir. Bu bileşikler değişik yapılarda olup amaca göre bir ya da bir kaçını beraber kullanılarak CMC'ler elde edilir. Sandviç zırhlar, çeşitli askeri amaçlı parçalar yapımı uzay araçları ve bu ürünlerin başlıca kullanım yerleridir.

Polimer Kompozitler; endüstride çok geniş kullanım alanına sahiptir. Pekiştirici olarak cam ve karbon kullanılır. Polimer kompozitlerde kullanılan en önemli bağlayıcı malzeme polyeester ve epoksidir. Pekiştirici liflerin miktarı arttıkça kompozitin dayanıklılığı yükselir. Polimer kompozitlerin en önemli

özellikleri yüksek dayanıklılığı ve elastikliğidir. Bu özelliklerden dolayı diğer malzemelere üstün durumdadırlar (www.wikipedia.org/wiki/kompozitmalzemeler).

Polimer, çok sayıda aynı ya da farklı atomik grupların kimyasal bağlarla az ya da çok düzenli biçimde bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli yüksek mol kütleli bileşiklerdir. Polimerler, hidrofilik ve hidrofobik olarak iki gruba ayrılırlar. Çapraz bağlı büyük oranda içine su alabilme yeteneğine sahip hidrofilik polimerler hidrojeller olarak adlandırılır. Bir ya da daha çok sayıda monomerin polimerleşmesi ile hazırlanırlar. Çapraz bağlı ağ yapısındaki bağlar kovalent ya da iyonik bağlardır. Hidrojellerin su çekme kapasitesi yalnızca pH, sıcaklık, ve şişmedeki iyonik güçlere bağlı değildir aynı zamanda zincir esnemesi gibi ağ yapının kimyasal yapısına, çapraz bağ yoğunluğuna, hidrofilik işleve bağlıdır (Öztop ve ark., 2003).

Kimyasal ve fiziksel yapılarına bağlı olarak nötral, iyonik ve içice geçmiş ağ yapılar olmak üzere üç tip hidrojel vardır. Bir polimerin hidrojel özelliği gösterebilmesi için ana zincir ya da dallarında hidroksil, karbonil, karboksil, amin, amid ve sülfonil gibi hidrojen bağı oluşturabilme özelliğine sahip susever grupların bulunması gerekir. Bu gruplardan dolayı bağlı duruma geçen su nedeniyle jelin hacmi ve kütlesi artar ve jel şişmeye başlar. Jeldeki susever grupların artması ile jelin şişmesi de artar. Şişmiş bir hidrojelde üç tür su bulunmaktadır.

Bağlı su; polimerin polar grupları ile hidrojen bağları yapan sudur.

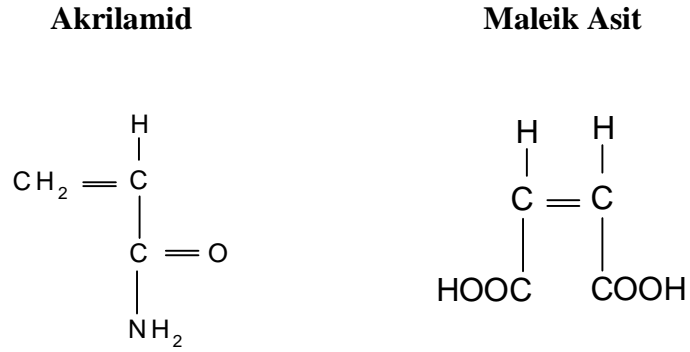
Ara yüzey suyu; polimerin su sevmez grubu çevresinde toplanan ve sıkıca bağlı olmayan sudur.

Serbest (kütlev) su; bir bağ olmaksızın fiziksel olarak gözenek içinde yer alan sudur (Ekici, 2002).

Son yüzyılda değişik özellikleri olan hidrojellerin biyotıp, biyoteknoloji ve ziraat gibi geniş alanda çok yönlü uygulamaları olduğundan dolayı hazırlanmasına ilgi artmıştır (Karadağ ve ark., 1997a). Biyomateryal olarak hidrojellerin faydaları yaşayan dokular ile fiziksel özelliklerinin benzerlikleridir. Bu benzerlikler su içermeleri, yumuşaklık, kıvam, su ve diğer biyolojik akışkanlar ile düşük yüzey gerilimine dayanır (Saraydın ve ark., 2004). Hidrojeller nontoksik olabilirler ve kimyasal olarak kararlıdırlar (Karadağ ve

ark., 1997b).

Akrilamid ve maleik asit, kompozit hidrojenlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Renksiz ve kokusuz kristallerden oluşan akrilamid, su, alkol, metanol, dimetil eter ve aseton içerisinde çözünebilirken, benzende ve heptanda çözünmeyen bir moleküldür. Akrilamid oda sıcaklığında kararlı halde iken; çözüldüğünde veya yükseltgen ajanlarla etkileştirildiğinde hızlı bir şekilde polimerleşir. Poliakrilamid (PAAm) amorf suda çözünen polimerdir, endüstri ve ziraat alanında yaygın olarak kullanılır. Poliakrilamid hidrojenler, farklı yan gruplar içermeleri nedeniyle buldukları ortamın sıcaklık, pH, iyonik şiddet ve çözücü bileşimine duyarlı olarak şişme, biyoyumlu olma, metal iyonlarını ve boyarmadde moleküllerini adsorplama, mekanik dayanıklılık gibi aranan özelliklere sahiptirler (Karadağ ve ark., 1997c; Saraydın ve ark., 2002; Şolpan ve ark., 2003). İki karboksil gruplu maleik asit de benzer özelliklere sahiptir. Akrilamidle birlikte polimerleştirilerek pek çok anda kullanılmaktadır (Saraydın ve ark.,1995; Karadağ ve ark., 2006;). Akrilamid ve maleik asidin kimyasal yapısı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Akrilamid ve maleik asidin kimyasal yapısı.

Kil

Genelde kil terimi doğal, toprağa benzer, ince taneli ve belirli miktarda su ile karıştırıldığında plastikleşebilen materyalleri anlatmak için kullanılır. Killer, feldspatlı volkanik kayaların fiziksel ve kimyasal bozunmalarıyla, basit bir kimyasal formülle gösterilemeyen hidratize alüminyum silikatlardan oluşmuştur (Gültek,1998). Mineraloji kaynaklarında kil için üç ayrı tanım yan yana görülebilmektedir;

1. Yarıçapı 1 / 256 mm'den daha küçük olan minerallerin kesri,
2. Kil boyutunda olan sediment parçacıklarının tümü,
3. Fillosilikat grubunu içeren mineraller

Kil doğada bol miktarda bulunan minerallerdendir. Fakat saf kil bulmak oldukça zordur. Kilin içerisinde en çok kalker, silis, mika ve demir oksit bulunur. Genellikle 0,002 mm'den daha küçük taneli malzemeye kil adı verilmektedir. Kil sarımtırak, kırmızımtırak ve esmer olabilir. Bu özelliğini bileşiminde bulunan yanıcı maddeler verir. Kilin yapısı itibarıyla su çekme özelliği vardır. Bu nedenle kil daima nemlidir. Kili oluşturan maddeler sulu alüminyum silikatlardır. Kil, çok saf olduğu zaman hidrate alümin silikat (kaolinit) adını alır. Kaolinit'in kimyasal formülü, $Al_2O_3 \cdot SiO_2 \cdot 2H_2O$ 'dur (www.egitim.teknolojikarastirmalar.com).

Doğada yaygın oluşu, kolay bulunabilmesi, ucuzluğundan dolayı killerin kullanımı çok fazladır. Killer, üzerinde negatif yük taşırlar bundan dolayı pozitif yüklü türleri kolayca adsorplayabilirler. Bu adsorplama kilin yüzey alanı ve gözeneklerin büyüklüğüyle ilgilidir. Montmorillonit killer en fazla yüzey alanına ve en yüksek katyon değiştirme kapasitesine sahiptir. Bentonit, kaolinit gibi kil mineralleri hem organik hem de inorganik türleri adsorplayabildiği için dünyada geniş olarak incelenmektedir (Crini, 2006).

5.1. Sepiyolit

Killer tabaka yapılarındaki farklılıktan dolayı sınıflandırılabilirler. Bunlar montmorillonit, kaolinit, bentonit, sepiyolit'tir (Crini, 2006). Sepiyolit, yüksek yüzey alanı, lifsi ve gözenekli yapısı, fizikokimyasal aktivitesi vd. gibi

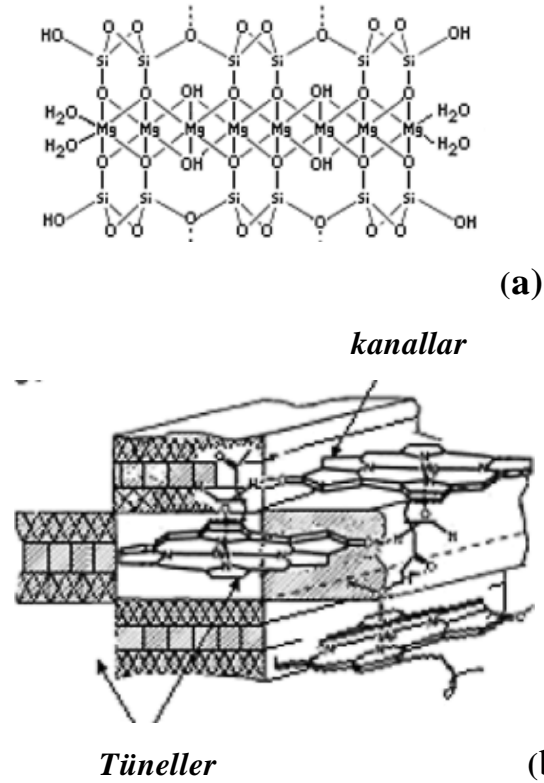
özelliklerinden dolayı adsorban killer arasında yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Sepiyolit magnezyum hidro silikattan ibaret bir kil minerali olup, yarım birim hücre için ideal formülü $Mg_8 Si_{12} O_{30} (OH)_6 (OH_2)_4 8H_2O$ şeklindedir (Rytwo ve ark., 2002; Bektaş ve ark., 2004; Cubillo ve ark., 2006; Sabah, 2007; Özdemir ve ark., 2007). Doğada saf olarak veya kil ya da kil dışı minerallerle (özellikle dolomit) karışık halde bulunabilir. Ortorombik yapıda kristallenen sepiyolit α ve β olmak üzere iki değişik polimorfik yapıda çökelmektedir. Sepiyolit'in içi ve dış yüzey alanları toplamı yaklaşık $700 m^2 g^{-1}$ 'dir. Yüzey alanının bu derece fazla olması sepiyolit'in indirgenme ve nitrülenme hızını önemli ölçüde artırmaktadır. Görünüm olarak bej, beyaz ve kahverengi olarak isimlendirilen sepiyolitler içerisinde endüstriyel önemi en fazla kahverengi sepiyolittir. Kahverengi sepiyolit silisyumu en fazla dolomiti en az olan sepiyolittir (www.tubitak.gov.tr/kulup/projeler/luletasi/gizemli_mineral.htm).

Türkiye'de Sivrihisar, Polatlı ve Eskişehir bölgesinde bol miktarda bulunur. Uzun yıllardan beri pipo yapımında kullanılmaktadır (Ünal ve Erdoğan 1998). Dünya'daki sepiyolit yatakları Somali, Tanzanya, Kenya ve Meksika'da bulunmaktadır Türkiye'deki sedimanter sepiyolitler ile dünyadaki bazı sepiyolitlerin kimyasal bileşimleri Çizelge 5.1'de verilmiştir (www.gurcanbanger.com/calismalarim/ag10.html).

Çizelge 5.1. Dünyadaki bazı sepiyolitlerin kimyasal bileşimleri.

% Bileşim	Konya	Eskişehir	İspanya	Japonya	Madagaskar
SiO ₂	53.70	55.97	60.60	52.05	52.50
MgO	23.31	22.81	22.45	23.74	21.31
Al ₂ O ₃	1.15	1.56	1.73	1.03	0.60
Na ₂ O	0.67	0.12	0.16	–	–
K ₂ O	0.61	0.27	0.58	–	–
Fe ₂ O ₃	0.64	0.77	0.62	0.40	2.99
FeO	0.02	–	–	0.01	0.70
MnO	–	0.22	–	–	–
TiO ₂	–	0.12	–	–	–
CaO	0.03	0.57	0.40	0.51	0.47

Sepiyolit, kristalize olmuş kil mineralleri arasında yaygın ve önemli bir yere sahip olan filikosilikatlar grubuna ait bir kil mineralidir. Sepiyolit, taban oksijen düzlemlerinden aşağı veya yukarı doğru yönelik şekilde düzenlenmiş Si-O tetrahedronları ile brüst benzeri oktahedral tabakalardan oluşan bir kristal yapısına sahiptir. Magnezyum içeren oktahedral tabakalı bir merkez ve iki tetrahedral silika yaprakından oluşur (Akyüz ve Akyüz, 2003; Alkan ve ark., 2004; Tekin ve ark., 2006). Yüzeyde silika yaprağın sürekliliği nedeniyle önemli miktarda Si-OH grupları yer alır. Yüzeyindeki fonksiyonel gruplar adsorpsiyon kapasitesinde rol oynar (Alkan ve ark., 2007). Tepe oksijenleri aynı yönde olan tetrahedronlar, x-eksenine paralel olarak uzanan şeritleri oluştururken, zıt yönde olanları da oktahedral katyonlara bağlanarak lif doğrultusunda (x-ekseni boyunca) sürekli, dik doğrultuda (y-ekseni boyunca) sınırlı boyutta 2:1 katmanlı yapı oluştururlar (Xie ve Ark., 2007). Şekil 5.1.'de Sepiyolitin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 5.1. a) Sepiyolitin yapısı b) Sepiyolitdeki kanal ve tüneller (Sabah,2007).

Şeritler arasındaki dikdörtgen kanallarda, Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları ile değişen miktarlarda zeolitik su molekülleri bulunur. Yapı formülünde (OH_2) olarak gösterilen su molekülleri ise şerit kenarlarındaki oktahedral Mg'a koordine olurlar.

Farklı konumlarda olmak üzere sepiyolit yapılarında dört çeşit su molekülü tanımlanmıştır. Bunlar;

Higroskopik su (kaba nem,): Sepiyolit yüzeyine adsorplanmış su molekülü.

Zeolitik su: Kendi aralarında ve bağlı su molekülleri ile hidrojen bağı yaparak kanal içlerinde veya yüzeyde yerleşmiş su molekülü.

Bağlı su (kristal suyu): Talk benzeri zincirlerin kenarlarında bulunan ve yapıdaki oktahedral tabakanın uç magnezyum koordinasyonunda yer alan su molekülü.

Hidroksil suyu (yapı suyu): Yapıdaki oktahedral tabakanın ortasında magnezyum koordinasyonunda hidroksil gruplarının bozunması sonucu oluşan su molekülü.

Kaygan görünümlü ince taneli, toprağımsı bir yapıya sahip tabakalı sepiyolit genellikle beyaz, krem, gri veya pembe renkli olabilmektedir. Organik madde içeriğine bağlı olarak, Sivrihisar Güneyi neojen havzasındaki bazı türlerde olduğu gibi, koyu kahverengi ve siyahımsı da olabilir. Madagaskar ve Çin sepiyolitleri gibi bazı uzun lifli formlar ise krizotil benzeri beyaz ve açık sarı renklidir.

Sedimenter oluşumlu, uzun lif demetleri şeklinde bulunan β -sepiyolit (tabakalı sepiyolit) lif uzunluğu 100 \AA° - $3-5 \mu\text{m}$, genişliği $100-300 \text{ \AA}^{\circ}$ ve kalınlığı $50-100 \text{ \AA}^{\circ}$ arasında değişebilmektedir. Bununla birlikte bu liflerin uzunlukları standart olmayıp, dünyanın pek çok yerinde farklı uzunluklara sahip sepiyolitler bulunmaktadır.

Sepiyolit, gözenekli bir yapıya sahiptir ve ortalama mikrogözenek çapı 15 \AA° , mezopor yarı çapı ise $15-45 \text{ \AA}^{\circ}$ arasında değişmektedir. Yoğunluğu $2-2.5 \text{ g cm}^{-3}$ arasında olup, çok gözenekli olan türlerin yoğunluğu zaman zaman birin altına düşebilmektedir; kurduğu zaman yoğunluğu düşeceğinden suda yüzme özelliği gösterir (Ekici, 2002).

Sepiyolit özelliklerine bağlı olarak değişik amaçlarla kullanılır. Sepiyolit absorpsiyon, katalitik ve reolojik (kalınlaştırma) özelliklerine sahiptir. Adsorpsiyon özelliğine bağlı olarak çiftlik ve ahırlarda koku giderici, tarım ve böcek ilacı taşıyıcısı, madeni ve bitkisel yağların arıtılması, atık su arıtma, karbonsuz kopya kağıdı ve sigara filtreleri, toksin ve bakteri emici mide ilaçları ile deterjan ve temizlik maddeleri üretiminde kullanılır. Katalitik özelliğine bağlı olarak bazı kimyasalların üretimi veya dönüştürülmesi, otomobil eksozu ve baca filtresi üretimi, bazı sıvı yakıt işlemlerinde kullanılır. Kalınlaştırma özelliğine bağlı olarak ise tarım ilaç ve gübreleri, kâğıt ve benzeri ürünlerin imalatı, yüksek teknoloji tuğla ve seramik üretimi ve deterjan imalatı gibi işlerde yararlanır (www.gürcanbanger.com).

Sepiyolit absorpsiyon kapasitesi, diğer killerden daha yüksektir. Mekanik direnç ile birlikte bu özellik su ve yağ adsorbanı olarak çok çeşitli alanlarda kullanımına olanak sağlar. Sepiyolit ayrıca yüksek oranda nem ve organik buharı emme kapasitesine sahiptir. Başlangıçta absorpsiyon hızı, silika jel veya aktif alüminaya göre daha düşük olmasına karşın hekzan, benzen ve metil alkol gibi organik sıvıları çok daha yüksek kapasitede absorbe edebilir.

Sepiyolit su veya diğer sıvılarıyla, nispeten düşük yoğunluklarda yüksek viskoziteli ve duyarlı süspansiyonlar oluşturur. Sepiyolitten yapılan süspansiyonlar tiksotropik özellik gösterdiğinden, kozmetik, yapıştırıcı ve gübre süspansiyonlarında kalınlaştırıcı olarak kullanılır. Sepiyolit ayrıca diğer killere göre tuzlu ortama daha duyarlıdır ve bu nedenle özellikle petrol sondajlarında çamur malzemesi olarak kullanılır. pH; 8'e kadar faydalı özelliklerini korur, ancak pH>9 olduğu koşullarda peptizasyon viskozitede ani bir düşüşe neden olur. Reolojik özelliklerinden dolayı kullanıldığı alanlar şunlardır

1. Çözelti kalınlaştırıcı ve tiksotropik özellikleri nedeniyle boya, asfalt kaplamaları, gres yağı ve kozmetik ürünlerde
2. Yüksek elektrolit derişimi ve sıcaklığa sahip derin sondajlarda çamur malzemesi olarak

3. Tarımda toprak düzenleyicisi olarak tohum kaplama ve gübre süspansiyonlarında haşere ve böcek ilaçları taşıyıcısı olarak
 4. Bağlayıcı özelliğinden dolayı eczacılıkta ve katalizör taşıyıcı pelet ve tablet olarak
 5. Kağıt, mukavva, filtre, duvar kağıdı ve kauçuk sanayilerinde dolgu maddesi olarak
 6. Tuğla ve seramik ürünlerinde
 7. Deterjan endüstrisinde
- (<http://journals.tubitak.gov.tr/engineering>)

KOMPOZİT HİDROJELLERİN KARAKTERİZASYONU

Farklı kimyasal yapıdaki iki ya da daha fazla sayıda malzemenin, sınırlarını ve özelliklerini koruyarak oluşturduğu malzemeler olan kompozit hidrojellerin hazırlandıktan sonra özelliklerinin araştırılması çalışmaları yapılmalıdır. Çünkü kompozit malzemeler kendisini oluşturan bileşenlerden birinin tek başına sahip olmadığı özelliklere sahiptir.

Kompozitler hidrojellerin karakterizasyonu için kullanılan en temel yöntemler spektroskopik ve ısıl özelliklerinin tanımlanmasına yönelik yöntemlerdir. Bunların yanı sıra şişme özelliklerinin, difüzyon türü ve difüzyon mekanizmasının araştırılması gerekir.

6.1. Spektroskopik Özellikler

Kompozit hidrojellerin karakterizasyonunda kullanılan spektroskopik yöntemlerden biri infrared (IR) spektroskopisidir. Günümüzde düşük derişimdeki örneklerle çalışabilen, en zayıf soğurumları bile duyarlılıkla ölçebilen Fourier dönüşümlü IR spektrofotometreleri (FTIR) kullanılmaktadır (Rabek, 1980).

6.2. Isıl Özellikler

Kompozit hidrojellerin ısıl kararlılığının incelenmesinde kullanılan yöntemlerden biri termogravimetrik (TG) analizdir. Polimerler ısıtıldıklarında fiziksel ve kimyasal değişikliklere uğrarlar. Isıl bozunma sırasında genellikle kütle kaybı ve ısı alış verişi olur. Isıl bozunma sırasında oluşan uçucu ürünler nedeniyle ortaya çıkan kütle kaybı termogravimetri ile incelenir. Kütle kaybı zamanın ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak kaydedilir.

6.3. Şişme Davranışı ve Difüzyon Türü

Çapraz bağlı ağ yapılı polimerler olan hidrojeller uygun çözücü ortamına konduktan sonra çözücünün yapıya girmesi ile şişerler. Kompozit hidrojellerin karakterizasyonunda şişme kinetiğinin incelenmesi difüzyon türü ve

mekanizmasının aydınlatılmasında önemlidir. Polimerik yapıların şişme kinetiği ve difüzyon türünün açıklanmasında kullanılan en temel yasalar Fick yasalarıdır. Polimerlerin şişme kinetiği;

$$F = kt^n \quad (2)$$

eşitliği yardımıyla incelenmektedir. Bu eşitlikte F; jelin t anında aldığı çözücü miktarının dengede alınan çözücü miktarına oranı, k; jelin ağ yapısına bağlı olarak değişen bir sabit, n; çözücünün difüzyon türünü gösteren difüzyon üstelidir ve şişme kesri olarak tanımlanır.

Polimerlerde çözücünün difüzyon hızı ve çözücü sisteminin durulma hızı şişmeyi denetleyen iki önemli parametredir. Difüzyon türü ve mekanizması bu parametrelere bağlı olarak aşağıdaki sınıflandırmaya göre yapılır;

1. Fick tipi difüzyon (Durum I): Durulma hızının difüzyon hızından daha büyük olduğu ve denge şişme değerine kısa sürede ulaşıldığı difüzyon türüdür. Bu durumdaki şişme difüzyon ile denetlenir ve polimerik yapıya giren ya da yapıdan çıkan türün miktarı zamanın karekökü ile orantılı olarak artar ($n=0,5$).

2. Süper durum II (Durum II): Difüzyon hızının durulma hızından daha büyük olduğu difüzyon türüdür ($n=1$).

3. Fick tipi olmayan ya da anormal tip difüzyon (Durum III): Şişme üzerinde difüzyon ve durulmanın aynı anda etkin olduğu difüzyon türüdür ($0,5 < n < 1$).

Difüzyon türünün belirlenmesi için n parametresinin bilinmesi gerekir. Difüzyon üsteli n, şişmenin henüz dengeye ulaşmadığı bölgede, jele giren çözücü kesrinin %60'lık kesimini oluşturduğu ($F < 0,6$) zaman aralığına kadar $\ln F - \ln t$ grafiğinin eğiminden hesaplanır (Peppas ve Ritger, 1987).

GEREÇ VE YÖNTEM

7.1. DENEYLERİN YAPILDIĞI YER VE TARİH

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma laboratuvarı, Hidrojel Araştırma Laboratuvarı, Hacettepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü ve İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Haziran 2005-Temmuz 2007 tarihleri arasında yapılmıştır.

7.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerden; CH_3COOH , CH_3COONa , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , H_2SO_4 , akrilamid (AAm), N,N'-metilenbisakrilamid (NNMBA), amonyum persülfat (APS), HCl, NaOH Merck (Darmstadt, Germany) firmasından, sukroz, invertaz (EC.3.2.1.26), glukoz deney kiti, maleik asit (MA), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) Sigma (St. Louis, USA) firmasından sağlandı.

7.3. KULLANILAN CİHAZLAR

Deneylerde Unicam 400 S UV-VIS spektrofotometre, Nicolet-520 Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometresi (FTIR), Shimadzu 50 model Termogravimetrik Analizör (TGA), Grant-W14 su banyosu, Selecta çalkalamalı karıştırıcı, Orion 250 A pH metre, Sartorius BA 110S terazi kullanıldı.

7.4. KOMPOZİT HİDROJELLERİN HAZIRLANMASI

İnvertaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere seçilen akrilamid bazlı kompozit hidrojel, akrilamid-sepiyolit (AAm-Sep) ve akrilamid-sepiyolit-maleik asit (AAM-Sep-MA) hidrojelidir. AAm-Sep kompozit hidrojellerinin hazırlanması için 14×10^{-3} mol AAm monomeri, 0.17 mmol NNMBA, 50 mg sepiyolit suda çözülmüş, başlatıcı olarak 0.307 mmol APS, eklendikten sonra, hızlandırıcı olarak da 25 mmol TEMED eklenip, 3-4 mm çapında pipetlere

doldurulmuş oda sıcaklığında (22 °C' ta) bekletilmiştir. AAm-Sep-MA kompozit hidrojenlerinin hazırlanması için ise; $3,44 \times 10^{-4}$ mol MA ve 14×10^{-3} mol AAm monomerleri, 50 mg sepiyolit, 0.17 mmol NNMBA suda çözülmüş, başlatıcı olarak 0.307 mmol APS, hızlandırıcı olarak da 25 mmol TEMED eklendikten sonra pipetlere doldurulmuş oda sıcaklığında (22 °C'ta) bekletilmiştir. Uzun silindirik yapıda elde edilen kompozit hidrojenler pipetlerden çıkarılarak 3–4 mm boyutlarında kesilmiş, çift damıtık suda yıkayıp havada ve vakum etüvünde kurutulmuştur.

7.5. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA KOMPOZİT HİDROJELLERİNİN KARAKTERİZASYONU

7.5.1. Spektroskopik Analiz

Hazırlanan kompozit hidrojenlerin spektroskopik analizi için Nicolet-520 marka FTIR kullanıldı. AAm-Sep, AAm-Sep-MA örnekleri öğütülerek KBr ile disk haline getirildikten sonra 500–4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında FTIR spektrumları alındı.

7.5.2. Isısal Analiz

Hazırlanan kompozit hidrojenlerin ısısal analizi için termogravimetrik analiz yapıldı. Yaklaşık 10 mg tartılarak öğütülen kuru örneklerin azot gazı (25 mL dk^{-1}) ortamında ve 10 °C dk^{-1} ısıtma hızında Shimadzu 50 termogravimetrik analizörde termogramları alındı.

7.5.3. Şişme Deneyleri

Hazırlanan kompozit hidrojenlerin dinamik şişme, pH duyarlı denge şişme ve dönüşümlü denge şişme denemeleri kütle ölçüm yöntemiyle yapıldı.

7.5.3.1. Dinamik Şişme Deneyleri

Şişme kinetiğinin incelenmesi için dinamik şişme denemeleri 25 °C ve 60 °C sıcaklıklarda yapıldı. 0,0125–0,0130 g aralığında kuru AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojenleri 30 mL çift damıtık suyun içine konarak şişmeye bırakıldı. Düzenli zaman aralıklarında kompozit hidrojenler sudan alınarak

yüzeyindeki su kurulanıp tartıldı ve yeniden damıtık su içine kondu. Bu işlemlere sabit bir kütle elde edilene kadar devam edildi.

7.5.3.2. pH Duyarlı Denge Şişme Deneyleri

Değişik pH'taki (pH; 3-11) denge şişme denemeleri için 50 mM CH₃COOH-CH₃COONa ve 50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ tamponları kullanıldı. Kuru kütlesi tartılan AAm-Sep ve AAm-Sep-MA örnekleri tampon çözeltilere konarak 25 °C ve 60 °C sıcaklıklarda dengeye gelmeleri beklendi. Dengeye şişen hidrojel çözeltilerden alınarak kurulanıp tartıldı.

7.5.3.3. pH Duyarlı Dönüşümlü Denge Şişme Deneyleri

pH duyarlı dönüşümlü denge şişme denemeleri için pH; 3 ve 8 olan 50 mM asetat ve 50 mM fosfat tamponları kullanıldı. Kuru kütlesi tartılan AAm-Sep ve AAm-Sep-MA örnekleri pH; 3 tampon çözeltisinde; 25 °C sıcaklıkta dengeye ulaşana dek bekletildi. Şişmiş hidrojel kurulanıp tartıldıktan sonra pH; 8 tamponu içine konarak 25 °C sıcaklıkta dengeye ulaşana dek bekletildi. Dengeye gelen hidrojel kurulanıp tartıldıktan sonra pH; 3 içerisine tekrar atıldı. Bu şekilde denge şişme ölçümleri sürdürüldü.

7.6. İNVERTAZIN AAm-Sep ve AAm-Sep-MA KOMPOZİT HİDROJELLERE İMMOBİLİZASYONU

İnvertazın immobilizasyonu için uygun koşulların belirlenmesi amacıyla yapılması gerekli deneyler çözeltide protein analizinde karşılaşılan sorunlar nedeniyle gerçekleştirilemedi. Bunun yerine literatürde invertazın değişik desteklere immobilizasyonu için verilen koşullar uygulandı. Yapılan aktivite analizinde aralarında bir fark bulunamadı. Bu nedenle bu yöntemlerin içinden kompozitlerin damıtık su içindeki invertazla 22 °C'ta 3 saat bekletilmesiyle gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemi kullanıldı.

İnvertazın immobilizasyonu için; AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerden yaklaşık olarak 1 g tartıldı ve 50 mL 1 mg mL⁻¹ 'lık invertaz çözeltisi içine eklendi. Çalkalamalı karıştırıcıda 22 °C'ta 150 rpm karıştırma ile 3 saat bekletildi. AAm-Sep'e immobilize olmuş invertazlar (AAm-Sep-Inv) ve AAm-Sep-MA'e immobilize olmuş invertazlar (AAm-Sep-MA-Inv) damıtık su ve

50 mM asetik asit-asetat tamponunda (pH; 4,8) yıkandı. Denemelerde kullanılanlara dek AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv kompozit hidrojelleri +4 °C sıcaklıkta saklandı.

7.7. SERBEST İNVERTAZ DENEYLERİ

Serbest invertazla optimum pH ve optimum sıcaklığın belirlenmesi, kinetik parametreler olan K_m ve V_{max} 'ın bulunması, termal kararlılık ve saklama kararlılığının araştırılması deneyleri yapıldı. Serbest ve immobilize invertazın aktivitesi sukrozun invertaz katalizli hidrolizi sonucu birim zamanda oluşan glukoz miktarının spektrofotometrik yöntemle ölçümü ile saptandı (Bergmeyer,1974).

7.7.1. Serbest İvertazın Aktivite Analizi

Serbest invertazın aktivitesinin saptanması için diğer bölümlerde istenen amaca uygun pH değerindeki tampon çözeltilerde hazırlanmış değişik derişimlerdeki sukroz çözeltileri 37 °C'ta 5 dakika bekletilerek dengeye gelmeleri sağlandı. Bu çözeltilere 100 µL 1 mg ml⁻¹'lik invertaz eklenip 37 °C'ta 15 dakika inkübe edildi. Tepkimenin durdurulması için örnekler kaynar su banyosunda 5 dk bekletildi.

Sukroz hidrolizi sonucu oluşan glukoz miktarının saptanması için standart olarak % 0.1'lik benzoik asit içindeki 1 mg mL⁻¹ derişimde glukoz çözeltisi kullanıldı. Kör deneme için damıtık su kullanıldı. Örnekler, standart ve köre glukoz deney kiti (glukoz oksidaz, peroksidaz ve o-dianisidin içerir) eklendikten sonra 37 °C'ta 30 dakika bekletildi. Her bir örneğe 12 N H₂SO₄ eklenerek tepkime durduruldu. Örneklerin ve standartın soğurumu köre karşı UV-VIS spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okundu.

7.7.2. Serbest İvertazın Optimum pH'sının Belirlenmesi

Serbest invertazın optimum pH'sının belirlenmesi için farklı pH'larda (50 mM CH₃COOH-CH₃COONa pH; 3,4,5,5,5 ve 50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ pH; 6,7,8) tampon çözeltiler hazırlandı. Bu tampon çözeltilerden 100 mM 20 mL sukroz çözeltisi hazırlanarak 37 °C'ta 5 dakika bekletildi. 100 µL 1 mg ml⁻¹'lik

invertaz eklenip 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Tepkimenin durması için kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilen örneklerdeki glukoz miktarı Bölüm 7.7.1'deki yönteme göre saptandı.

7.7.3. Serbest İvertazın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

Serbest invertazın optimum sıcaklığının belirlenmesi için; 50 mM asetat (pH; 5) tamponunda hazırlanmış 100 mM 20 mL sukroz çözeltileri değişik sıcaklıklarda (20, 30, 35, 40, 50, 60, 70 °C) 5 dakika bekletildi. Bu çözeltilere 100 µL (1mg mL⁻¹) invertaz eklenerek her biri kendi sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Tepkimenin durması için kaynar su banyosunda 5 dakika beklendikten sonra örneklerdeki glukoz miktarı Bölüm 7.7.1'deki yönteme göre saptandı.

7.7.4. Serbest İvertazın Kinetik Parametrelerinin Bulunması

Serbest invertazın optimum sıcaklık ve optimum pH'ı belirlendikten sonra optimum pH'daki (pH; 5) tampon çözeltilerde değişik derişimlerde sukroz çözeltileri (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100, 200, 300 mM) hazırlandı. Bu çözeltilere invertaz eklenerek optimum sıcaklıkta (30 °C) sukroz hidrolizi ve glukoz analizi (Bölüm 7.7.1) uygulandı.

7.7.5. Serbest İvertazın Termal Kararlılığı

Serbest invertazın termal kararlılığının belirlenmesi amacıyla; 50 mM asetat (pH; 4,8) tamponunda 1 mg mL⁻¹'lik enzim çözeltisi hazırlanıp 50 °C ve 70 °C sıcaklıklarda bekletildi. Belli zamanlarda bu çözeltiden alınan 100 µL enzim 100 mM 20 mL sukroz çözeltilerine eklendi, optimum pH (pH; 5) ve sıcaklıkta (30 °C) sukroz hidrolizi gerçekleştirilerek glukoz analizi Bölüm 7.7.1'deki yönteme göre yapıldı.

7.7.6. Serbest İvertazın Saklama Kararlılığı

Serbest invertazın saklama kararlılığının belirlenmesi için; 10 mL 1 mg mL⁻¹ enzim çözeltisi hazırlandı ve +4 °C'de saklandı. Bu çözeltiden belli zaman aralıklarında 100 µL enzim alınarak 100 mM 20 mL sukroz çözeltilerine eklendi, optimum pH (pH; 5) ve sıcaklıkta (30 °C) sukroz hidrolizi gerçekleştirilerek glukoz analizi Bölüm 7.7.1'deki yönteme göre yapıldı.

7.8. İMMOBİLİZE İNVERTAZ DENEYLERİ

İmmobilize invertazın karakterizasyonu için AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv kompozit hidrojellerinin FTIR spektrumları alındı. Optimum pH ve optimum sıcaklığın belirlenmesi, kinetik parametreler olan K_m ve V_{max} 'ın bulunması, termal kararlılık, saklama kararlılığı, pH kararlılığı ve kullanım kararlılığının araştırılması deneyleri yapıldı. Serbest ve immobilize invertazın aktivitesi sukrozun invertaz katalizli hidrolizi sonucu birim zamanda oluşan glukoz miktarının spektrofotometrik yöntemle ölçümü ile saptandı.

7.8.1. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv Kompozit Hidrojellerinin Karakterizasyonu

Hazırlanan kompozit hidrojellerin karakterizasyonu için AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv örnekleri öğütülerek KBr ile disk haline getirildikten sonra 500–4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında FTIR spektrumları alınmıştır.

7.8.2. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Aktivite Analizi

AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in aktivitesinin saptanması için istenen pH değerindeki tampon çözeltilerde hazırlanmış değişik derişimlerdeki sukroz çözeltileri 37 °C'ta 5 dakika bekletilerek dengeye gelmeleri sağlandı. Bu çözeltilere yaklaşık 0.6 g şişmiş AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv eklenip 37 °C'ta 15 dakika inkübe edildi. Tepkimenin durdurulması için kompozitler ortandan uzaklaştırıldı. Örneklerdeki glukoz analizi Bölüm 7.7.1'deki yönteme göre yapıldı.

7.8.3. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Optimum pH'sının Belirlenmesi

AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in optimum pH'sının belirlenmesi için; farklı pH'larda (50 mM $CH_3COOH-CH_3COONa$ pH; 3, 4, 5, 5,5 ve 50 mM $KH_2PO_4-K_2HPO_4$ pH; 6, 7, 8) tampon çözeltiler hazırlandı. Bu tampon çözeltilerden 100 mM 20 mL sukroz çözeltisi hazırlanarak 37 °C'ta 5 dakika bekletilip dengeye gelmesi sağlandı. Yaklaşık 0,6 g şişmiş AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv hidrojelleri eklenip 37 °C'ta 15 dakika inkübe edildi. Sukroz

hidrolizi sonucu kompozit hidrojel­ler çö­zeltiden alındı. Oluşan glukoz miktarı Bölüm 7.7.1'deki yöntem­e göre bulundu.

7.8.4. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla; AAm-Sep-Inv için 50 mM CH₃COOH-CH₃COONa (pH; 5,5), AAm-Sep-MA-Inv için 50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH; 6) (optimum pH değerleri) tamponunda hazırlanmış 100 mM 20 mL sukroz çö­zeltileri de­ğişik sıcaklıklarda (20, 30, 40, 50, 60, 70 °C) 5 dakika bekletildi. Yaklaşık 0,6 g şişmiş AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv kompozit hidro­jelleri eklenip her biri kendi sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Sukroz hidrolizi sonucu kompozit hidro­jel­ler çö­zeltiden alındı. Oluşan glukoz miktarı Bölüm 7.7.1'deki yöntem­e göre bulundu.

7.8.5. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Kinetik Parametrelerinin Bulunması

AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in optimum sıcaklık ve optimum pH'ı belirlendikten sonra optimum pH'daki tampon çö­zelti­lerde de­ğişik derişimlerde sukroz çö­zelti­leri (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100, 200, 300 mM) hazırlandı. Bu çö­zelti­lere yaklaşık 0,6 g AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv hidro­jelleri eklenip optimum sıcaklıklarında sukroz hidrolizi ve glukoz analizi Bölüm 7.7.1'deki yöntem­e göre uygulandı.

7.8.6. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Termal Kararlılığı

AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in termal kararlılığının belirlenmesi için; şişmiş AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv kompozit hidro­jel­lerinden 2 g tartıldı ve 50 mL 50 mM asetat tamponuna (pH; 4,8) konarak 50 °C sıcaklıkta bekletildi. Belli zamanlarda bu kompozit hidro­jel­lerden yaklaşık 0,3 g alınarak tamponda (pH; 4,8) ve damıtık suda yıkandıktan sonra kendi optimum pH'sında hazırlanan 100 mM 20 mL sukroz çö­zelti­lerine eklendi. Sukroz hidrolizi yapıldıktan sonra hidro­jel­ler çö­zeltiden alınıp oluş­an glukoz miktarı Bölüm 7.7.1'deki yöntem­e göre bulundu. Aynı işlemler 70 °C sıcaklıkta tekrarlandı.

7.8.7. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Saklama Kararlılığı

Saklama kararlılığının belirlenmesi için; AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv kompozit hidrojellerinin optimum sıcaklık ve pH'ta sukroz hidrolizi ile aktivitesi belirlendikten sonra bu hidrojeller 50 mM asetat tampona (pH; 4,8) konarak +4 °C'ta bekletildi. Belli sürelerde bu çözültiden alınan hidrojeller sukroz hidrolizi ve glukoz analizi deneylerinde kullanıldı.

7.8.8. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in pH Kararlılığı

pH kararlılığının belirlenmesi için; yaklaşık 0,6 g AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv örnekleri tartılıp değişik pH'lardaki (50 mM CH₃COOH-CH₃COONa pH; 3, 4, 5, 5,5 ve 50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ pH; 6, 7, 8) tampon çözülti içine kondu ve 30 dakika bekletildi. Buradan çıkarılan kompozit hidrojellerin sukroz analizi kendi optimum pH tamponunda hazırlanmış 100 mM 20 mL sukroz çözülti ile optimum sıcaklıklarında yapıldı. Hidrojeller çözültiden alındıktan sonra oluşan glukoz miktarı Bölüm 7.7.1'deki yöntemle göre bulundu.

7.8.9. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Kullanım Kararlılığı

AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in kullanım kararlılığının belirlenmesi amacıyla; şişmiş AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv kompozit hidrojellerinden yaklaşık 0,3 g tartılarak 100 mM 20 mL sukroz çözültisi ile kendi optimum pH ve optimum sıcaklıklarında sukroz hidrolizi gerçekleştirilip glukoz analizi yapıldı. Aynı hidrojeller damıtık su ve 50 mM asetat tamponunda (pH; 4,8) yıkandıktan sonra 100 mM 20 mL sukroz çözültisi ile kendi optimum pH'sında ve optimum sıcaklıklarında yeniden sukroz ve glukoz analizinde kullanıldı. Bu işleme aktivite düşene kadar devam edildi.

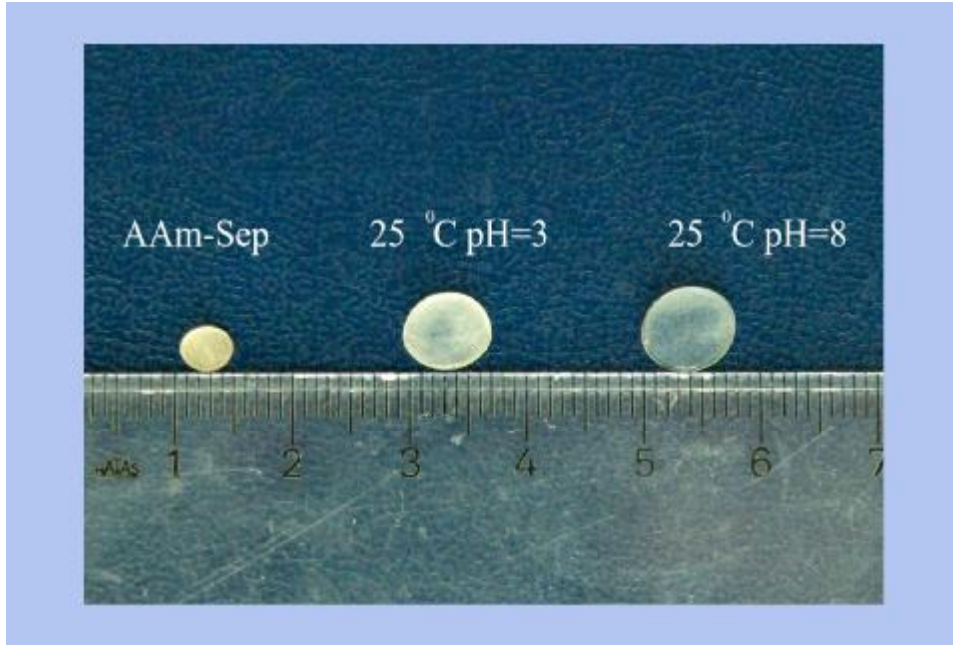
BULGULAR

8.1. KOMPOZİT HİDROJELLERİN HAZIRLANMASI

İnvertaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere akrilamid bazlı kompozit hidrojellerden akrilamid-sepiyolit (AAm-Sep) ve akrilamid-sepiyolit-maleik asit (AAm-Sep-MA) kompozit hidrojelleri seçilmiştir. AAm-Sep hidrojelleri, AAm monomer, sepiyolit, çapraz bağlayıcı olarak NNMBA, başlatıcı olarak APS ve hızlandırıcı olarak TEMED varlığında çözeltide radikalik katılma tepkimesi ile hazırlanmışlardır. AAm-Sep-MA kompozit hidrojelleri ise aynı karışıma MA monomeri eklenerek hazırlanmıştır.

Hazırlanan AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerin kuru halde ve 25 °C'ta pH; 3 ve 8'de şişmiş haldeki fotoğrafları Şekil 8.1 ve 8.2'de gösterilmiştir. Kuru iken sert olan hidrojeller şişirildiğinde yumuşamışlardır. Kompozit hidrojeller kuru ya da şişmiş halde silindirik kalıbın geometrisini korumuştur. Ayrıca şişme sonucu kopma ya da parçalanma olmamıştır.

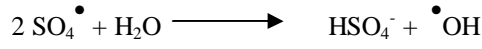
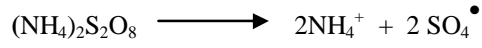
AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin çözeltide radikalik katılma tepkimesine ait olası polimerleşme mekanizması başlama, büyüme ve sonlanma basamakları halinde Şema 8.1, 8.2 ve 8.3'de sunulmuştur.



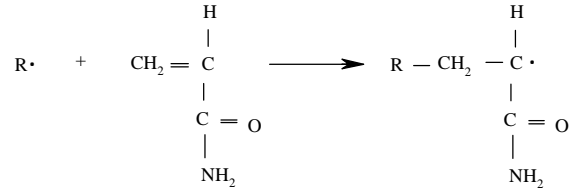
Şekil 8.1 Kuru ve şişmiş haldeki AAm-Sep kompozit hidrojellerin fotoğrafı



Şekil 8.2 Kuru ve şişmiş haldeki AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerin fotoğrafı

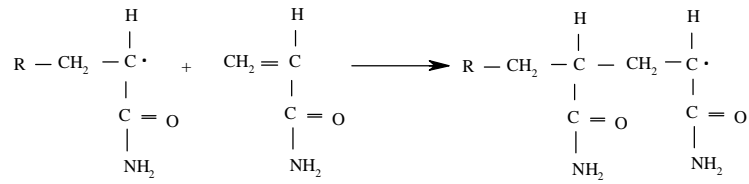


Radikal = $R^\bullet = SO_4^\bullet$ veya $\bullet OH$



AAm

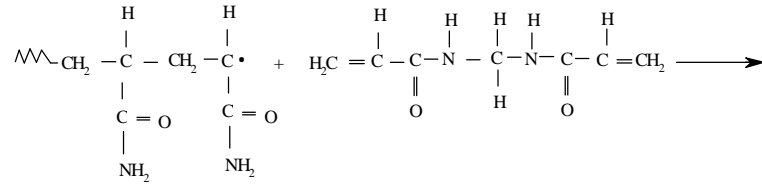
Momomerik radikal (MR)



MR

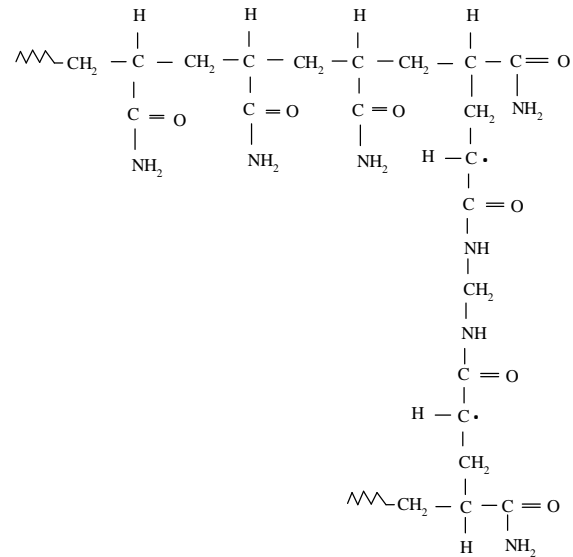
AAm

AAm radikal zinciri



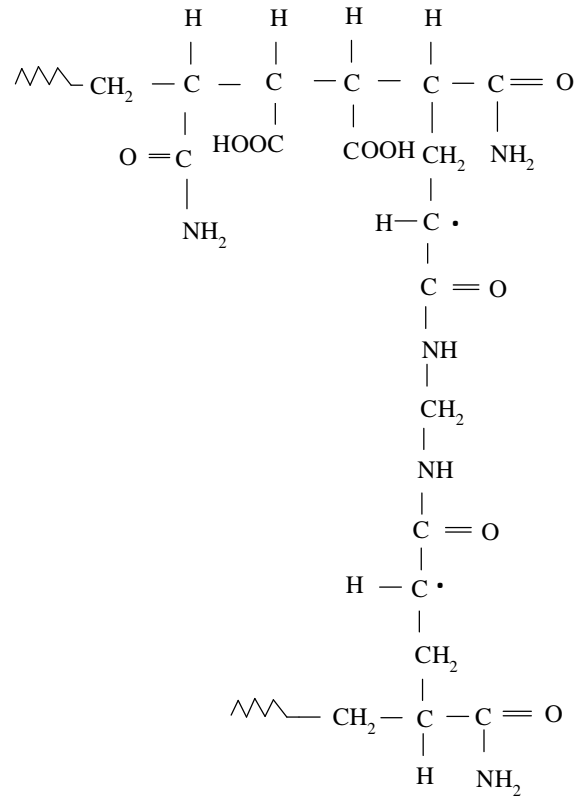
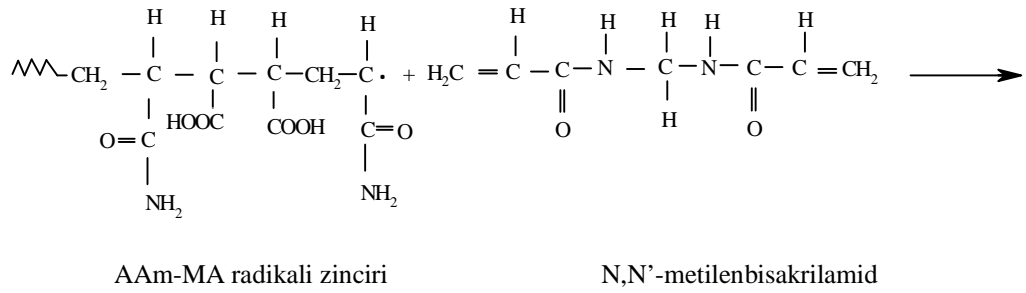
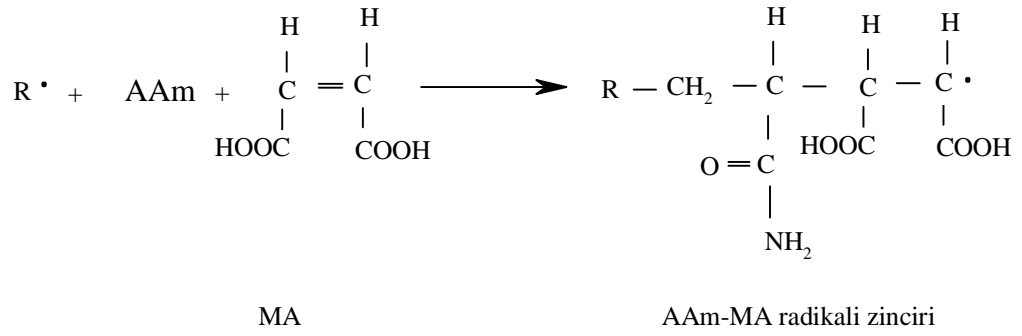
AAm radikal zinciri

N,N'-metilenbisakrilamid



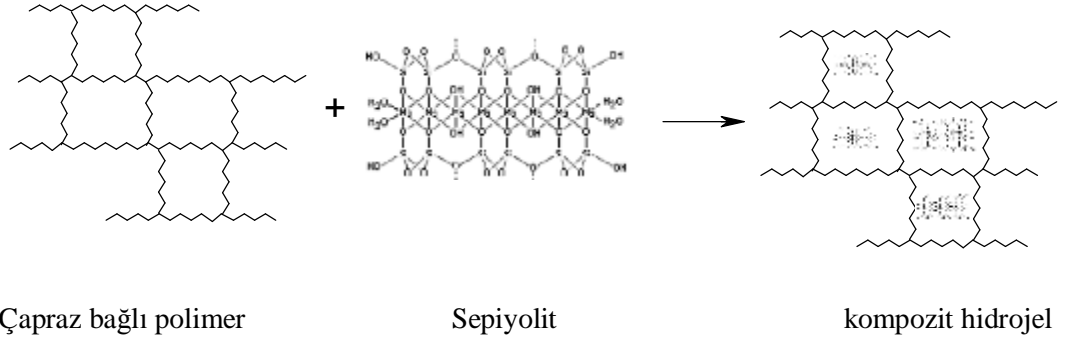
Çapraz bağlı polimer (PAAm)

Şema 8.1. AAm'in polimerleşme mekanizması



Çapraz bağlı polimer (PAAm-MA)

Şema 8.2. AAm ve MA'in'in polimerleşme mekanizması



Şema 8.3. Kompozit hidrojel oluşumu

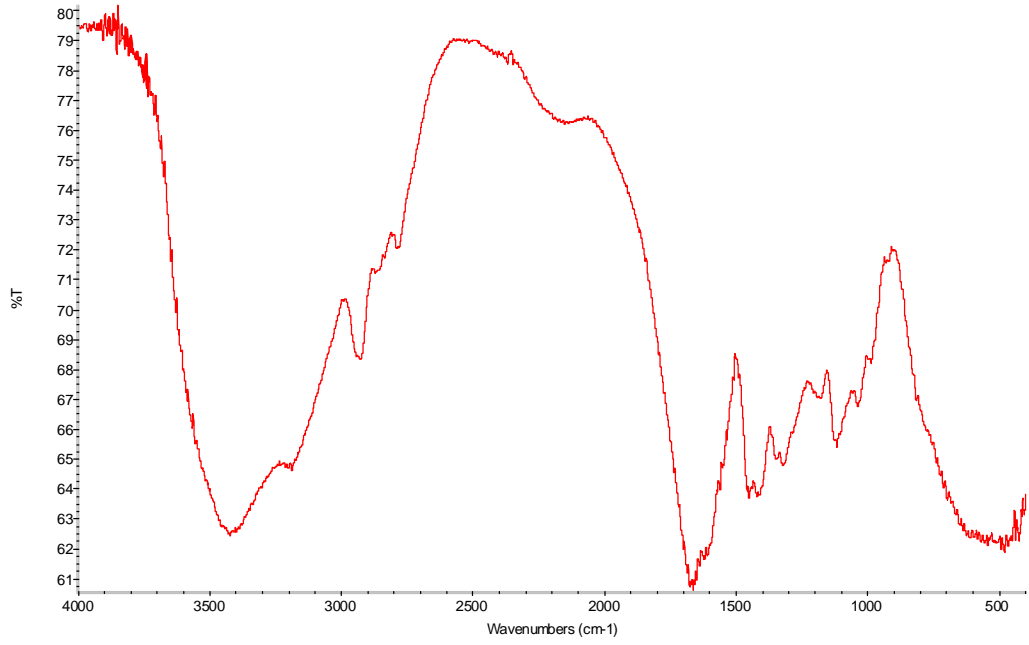
8.2. KOMPOZİT HİDROJELLERİN KARAKTERİZASYONU

İnvertaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere hazırlanan AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin karakterizasyonu için FTIR, TG analizleri ve şişme deneyleri yapılmıştır.

8.2.1. Spektroskopik Analiz

Hazırlanan kompozitlerin kimyasal yapılarını aydınlatmak için gerekli spektroskopik incelemeler, FTIR spektrofotometresi ile yapılmıştır. Kompozitlerin sentezinde kullanılan akrilamid, maleik asit, sepiyolit arasındaki etkileşimleri incelemek için AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozitlerinin FTIR spektrumları alınarak Şekil 8.3 ve 8.4'te sunulmuştur.

Kompozit hidrojellerin FTIR spektrumunda karakteristik bant olarak 3000-3500 cm^{-1} arasında AAm'teki -NH ve sepiyolitteki OH bandı, 1670 cm^{-1} 'de AAm'in CO-NH bandı 1030 cm^{-1} 'de sepiyolitin Si-O bandı görülmektedir. 8.4'te ayrıca 1710'da MA'in COOH bandı görülmektedir (Cai ve ark. 2007; Erbil ve ark., 2004; Kaşgöz 2005; Zhang ve Wang 2007).



Şekil 8.3 AAm-Sep kompozit hidrojelinin FTIR spektrumu

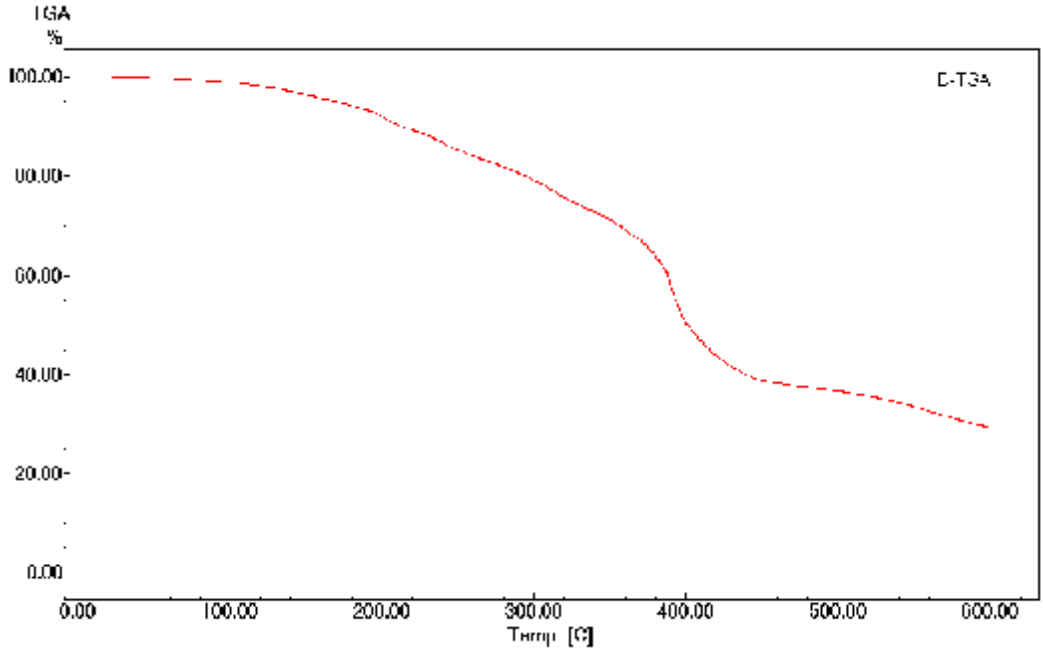


Şekil 8.4 AAm-Sep-MA kompozit hidrojelinin FTIR spektrumu

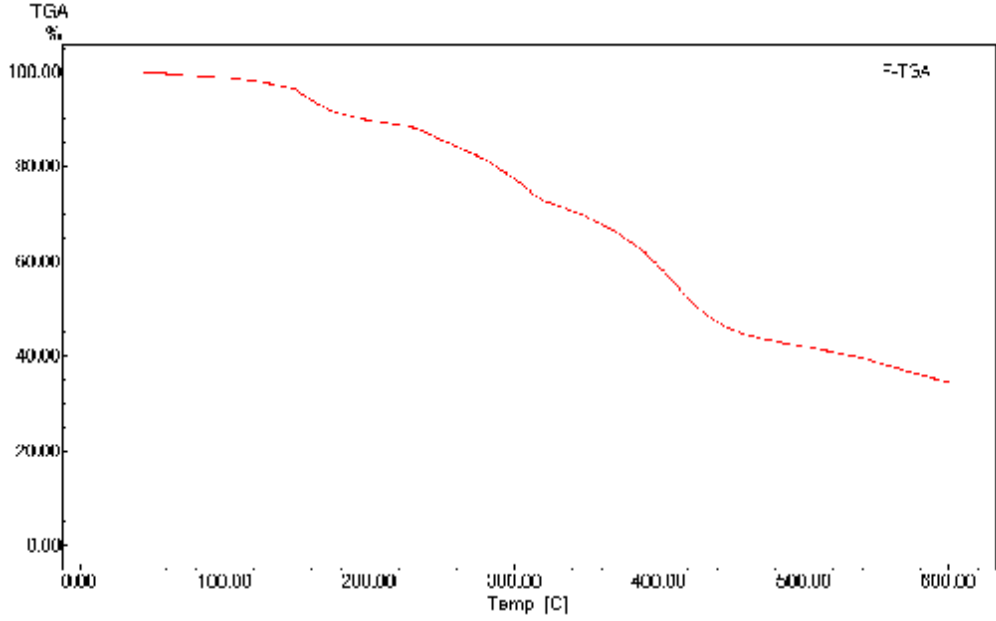
8.2.2. Isısal Analiz (TG)

Hazırlanan AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin ısısal bozunmalarının incelenmesi için $10\text{ }^{\circ}\text{C dk}^{-1}$ ısıtma hızında, azot atmosferinde termogramları alınmış ve Şekil 8.5 ile Şekil 8.6’da sunulmuştur.

Termogramlardan kompozitlerin çok basamaklı ısısal bozunma tepkimesi verdiği görülmektedir. Yaklaşık $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’a kadar ilk kütle kaybı yapıdaki bağlı suyun uzaklaşmasından ileri gelen su kaybını gösterir. Bu sıcaklığa kadar kompozitlerde yapısal bozunma gözlenmemektedir. $200\text{--}400\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasındaki bozunma sürecinde molekül içi ve moleküller arası bozunma ile imidleşme gerçekleşmiştir. $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ üzerine zincir kırılması gözlenmektedir. $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta hala kütle bulunması kompozitlerin ısısal kararlılığını göstermektedir.



Şekil 8.5 AAm-Sep kompozit hidrojelinin termogramı



Şekil 8.6 AAm-Sep-MA kompozit hidrojelinin termogramı

8.2.3. Şişme Deneyleri

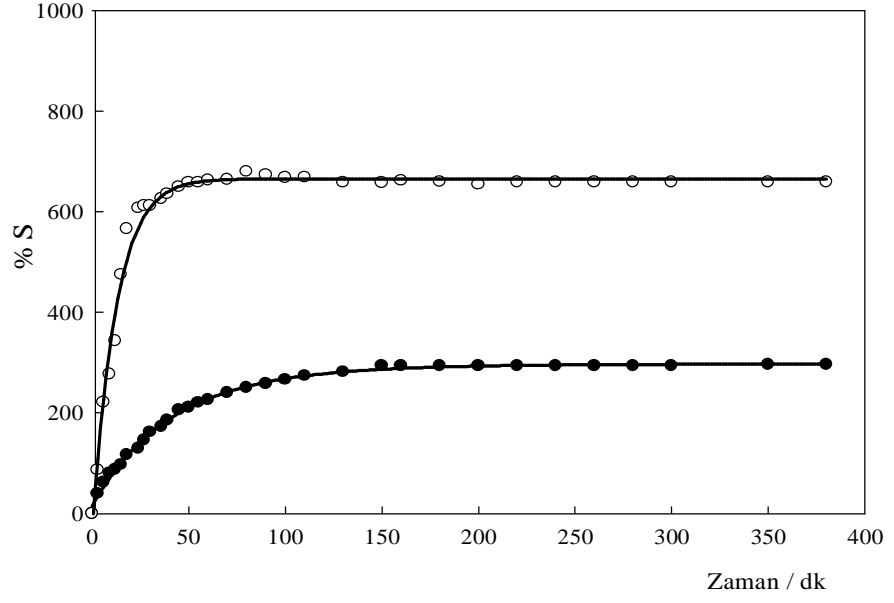
Hidrojellerin çözücü ortamında şişebilmeleri çözücü ve hidrojelın doğası ile yakından ilgilidir. Hazırlanan kompozit hidrojellerin şişme davranışının araştırılması için dinamik şişme, pH duyarlı denge şişme ve dönüşümlü denge şişme denemeleri kütle ölçüm yöntemiyle yapılmıştır.

8.2.3.1. Dinamik Şişme

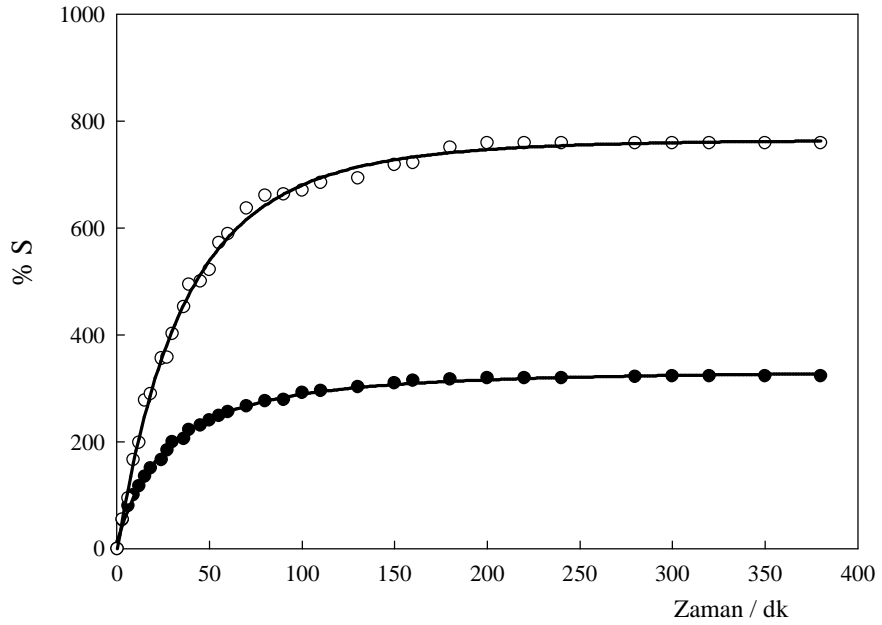
AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin dinamik şişme deneyleri kütlesi ölçülmüş (m_o) kuru kompozitlerin damıtık suya eklenmesi ile iki farklı sıcaklıkta (25 °C ve 60 °C) gerçekleştirilmiştir. Belli zaman aralıklarında kompozitler, sudan alınıp kurutulularak yüzey suyundan arındırılmış ve şişmiş kompozitlerin kütlesi (m_t) bulunmuştur. % şişme (% S) değerleri eşitlik 3'den hesaplanmıştır.

$$\%S = \frac{m_t - m_o}{m_o} \times 100 \quad (3)$$

Hesaplanan % S değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafikler Şekil 8.7. ve Şekil 8.8'de gösterilmiştir.



Şekil 8.7 AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin 25 °C'ta şişme davranışının zamanla değişimi (●; AAm-Sep, ○; AAm-Sep-MA)



Şekil 8.8 AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin 60 °C'ta şişme davranışının zamanla değişimi (●; AAm-Sep, ○; AAm-Sep-MA)

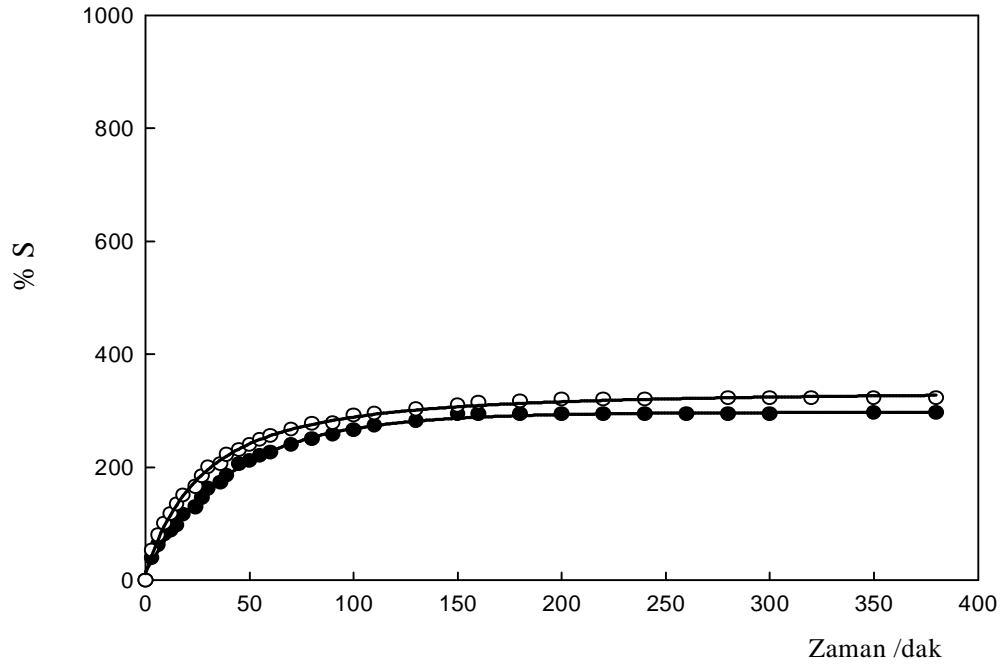
Şekil 8.7. ve 8.8'den görüldüğü gibi kompozit hidrojellerin şişmesi zamanla artmış ve belli bir süre sonunda sabit bir değere ulaşmıştır. Şişmenin bu değeri denge şişme değeri olarak tanımlanır. He iki şekilden görüleceği gibi AAm-Sep-MA kompozitleri AAm-Sep kompozitlerine göre daha fazla şişmiştir.

Sıcaklığın şişmeye etkinin incelenebilmesi için AAm-Sep kompozit hidrojellerinin 25 °C ve 60 °C'taki şişme eğrileri Şekil 8.9'da AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerininki ise Şekil 8.10'da gösterilmiştir. AAm-Sep kompozit hidrojellerinin şişmesini sıcaklık yükselmesi çok az bir fark yaratırken, AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin şişmesi sıcaklık yükselmesi ile yaklaşık % 20 oranında artmıştır.

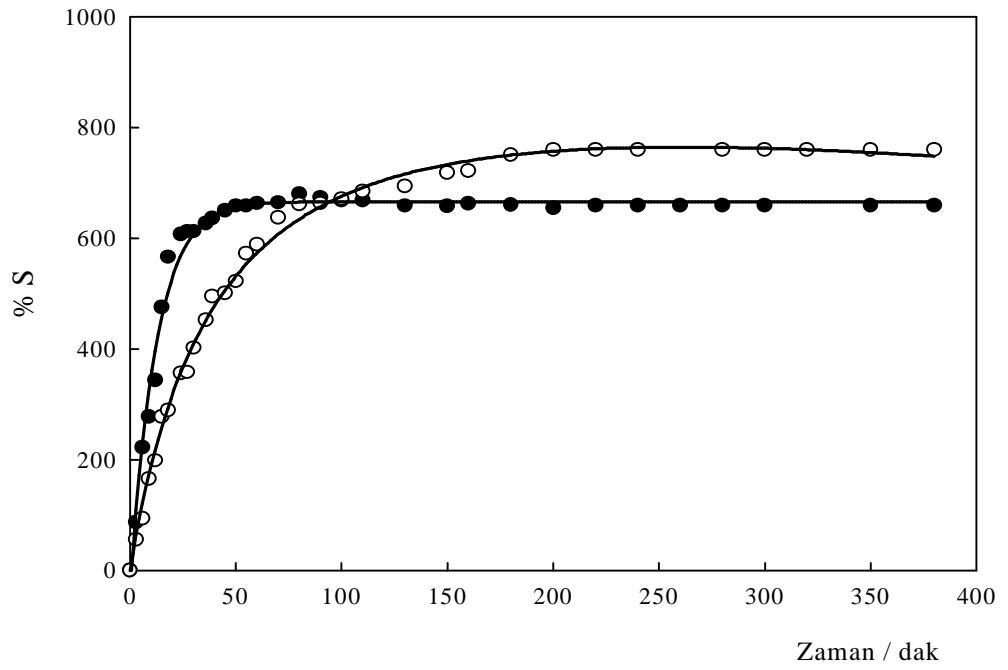
AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin şişmesi ikinci derece kinetiğe uygulanabilir.

$$t/S = A + Bt \quad (4)$$

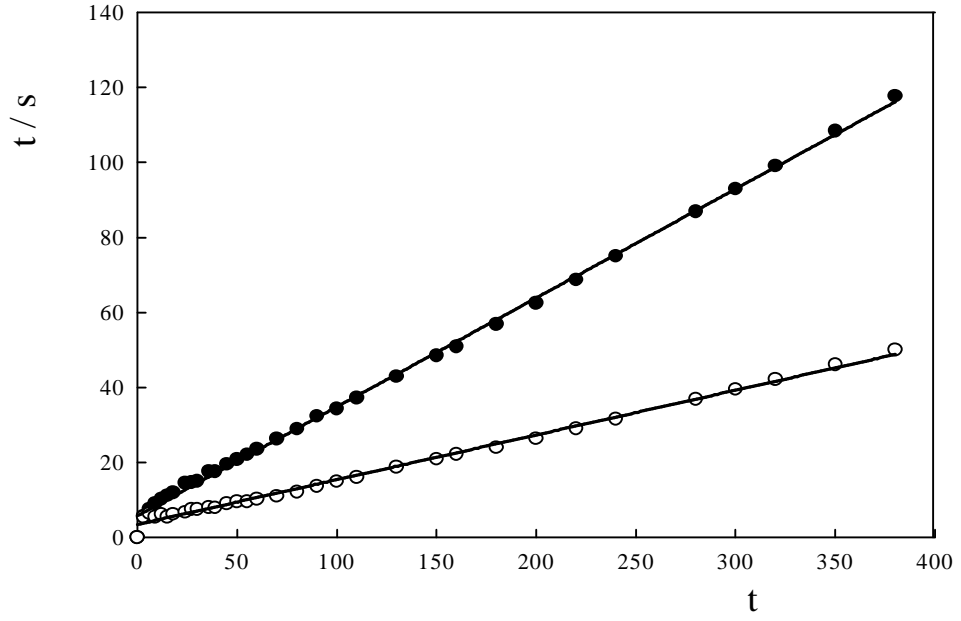
Burada $B=1/S_{\max}$; maksimum şişme veya denge şişmenin tersi, $A=1/k_s S_{\max}^2$; şişmenin başlangıç hızının tersidir ($1/r_0$) ve k_s şişme hız sabitidir (Saraydın ve ark., 1999). Eşitlik 4'e göre hidrojellerin $t/S-t$ grafiği çizilmiş ve Şekil 8.11 ve 8.12'de gösterilmiştir. Bu grafikten hesaplanan şişme hız sabiti değerleri Çizelge 8.1'de gösterilmiştir.



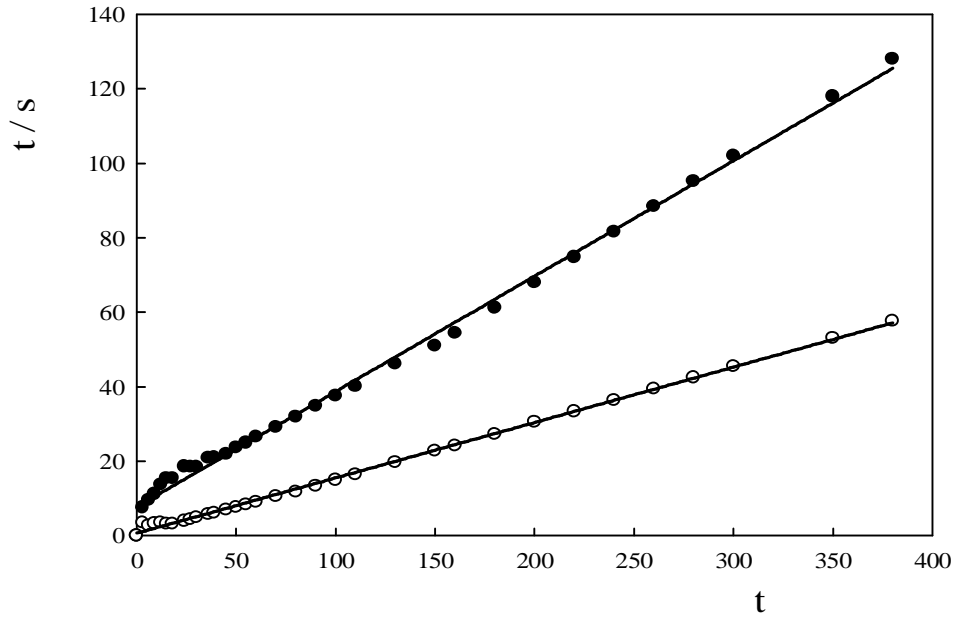
Şekil 8.9 AAm-Sep kompozit hidrojellerinin şişme davranışının sıcaklıkla değişimi (●;25 °C , ○; 60 °C)



Şekil 8.10 AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin şişme davranışının sıcaklıkla değişimi (●;25 °C , ○; 60 °C)



Şekil 8.11 AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin 25 °C'ta şişme hız grafiği (●; AAm-Sep, ○; AAm-Sep-MA)



Şekil 8.12 AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin 60 °C'ta şişme hız grafiği (●; AAm-Sep, ○; AAm-Sep-MA)

Çizelge 8.1. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin farklı sıcaklıklardaki şişme parametreleri

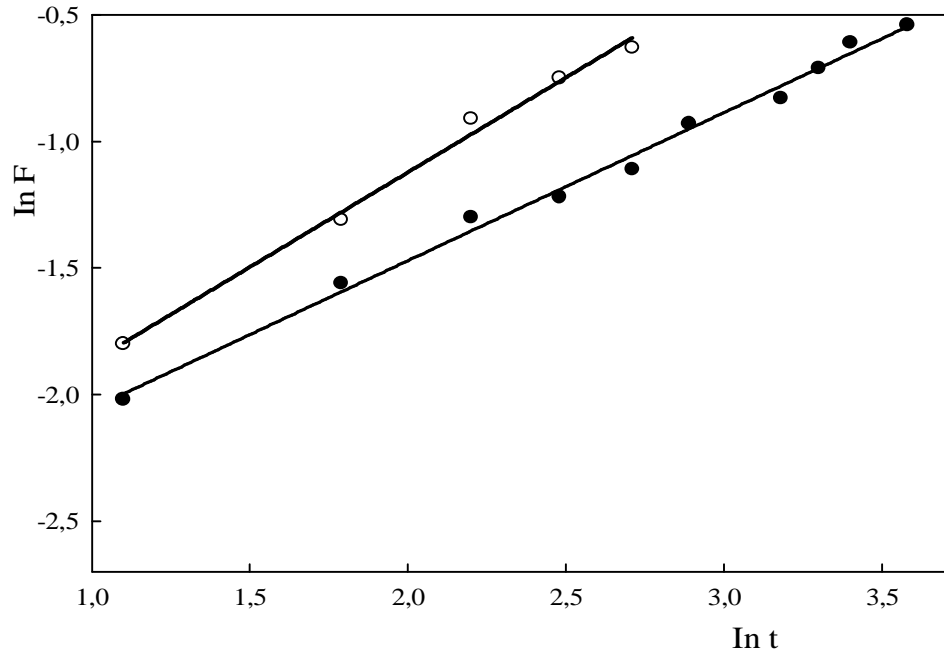
		AAm-Sep	AAm-Sep-MA
25 °C	$r_o / g su (g jel dk)^{-1}$	0,13	1,59
	$S_{max} / g su (g jel)^{-1}$	3,23	6,72
	$k / g jel dk (g su)^{-1}$	$1,2 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-2}$
60 °C	$r_o / g su (g jel dk)^{-1}$	0,18	0,29
	$S_{max} / g su (g jel)^{-1}$	3,44	8,38
	$k / g jel dk (g su)^{-1}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$4,1 \times 10^{-3}$

Çizelge 8.1’de grafiksel olarak bulunan denge şişme değerlerinin (S_{max}) deneysel olarak bulunan denge şişme değerleri (S_d) ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca sıcaklık artışının AAm-Sep kompozit hidrojellerin şişmesini çok az etkilerken AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerin şişmesini daha çok etkilediği görülmektedir.

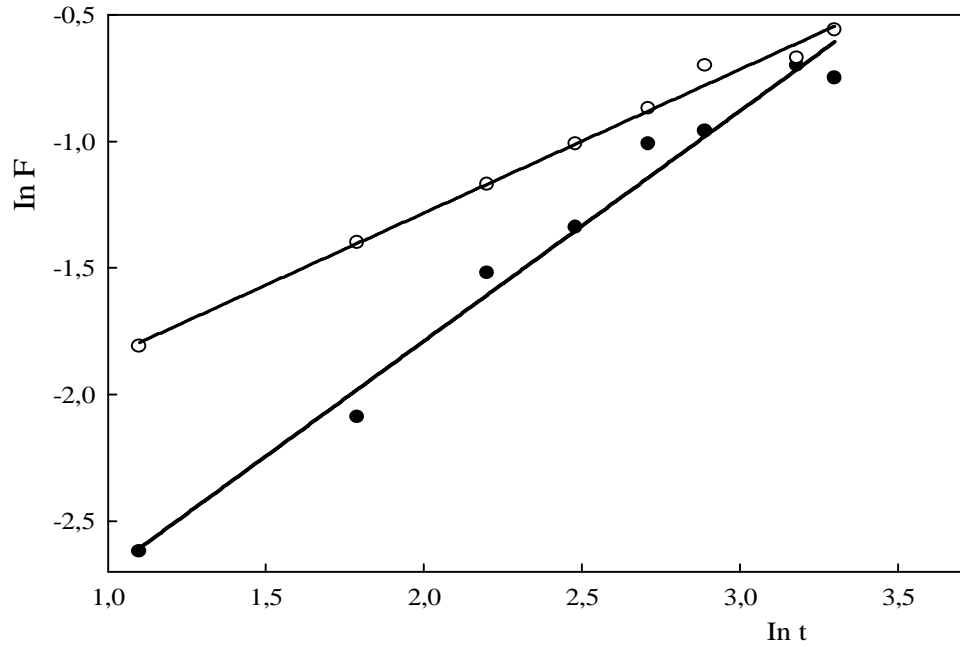
AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerine suyun difüzyonunun doğasını inceleyebilmek için Bölüm 6’daki Eşitlik 2’den yararlanılmıştır. Eşitlik 2, şişme kinetiği eğrilerindeki kütleli artışın ilk % 60’lık bölümüne uygulanmıştır. 25 °C ve 60 °C’ta şişme için $\ln F - \ln t$ grafikleri oluşturulmuş ve Şekil 8.13 ile 8.14’de gösterilmiştir. Bu doğruların eğiminden n , kesim noktasından k bulunmuş ve Çizelge 8.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 8.2 AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin değişik sıcaklıklardaki şişme kinetik parametreleri

T / °C	AAm-Sep		AAm-Sep-MA	
	n	K x 10⁴	n	K x 10⁴
25	0,59	713	0,75	728
60	0,91	271	0,57	889



Şekil 8.13 AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojenlerinin 25 °C'taki şişme kinetik grafiği (●; AAm-Sep, ○; AAm-Sep-MA)

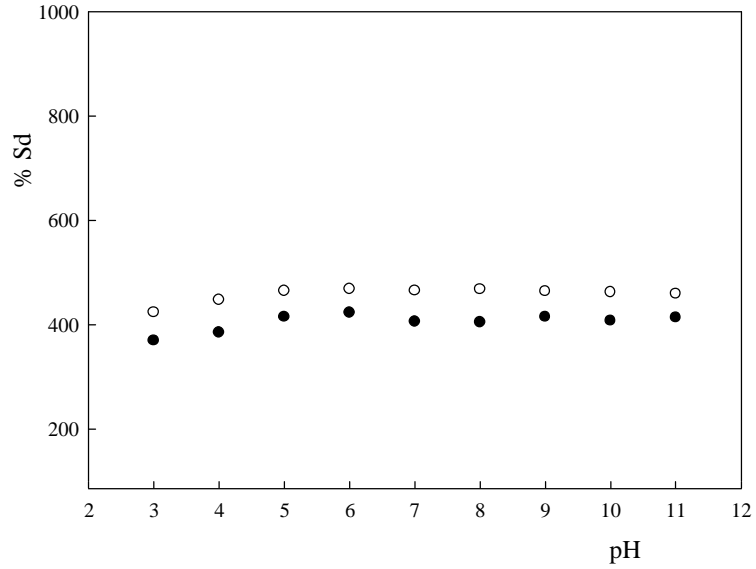


Şekil 8.14 AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojenlerinin 60 °C'taki şişme kinetik grafiği (●; AAm-Sep, ○; AAm-Sep-MA)

8.2.3.2. pH Duyarlı Denge Şişme Deneyleri

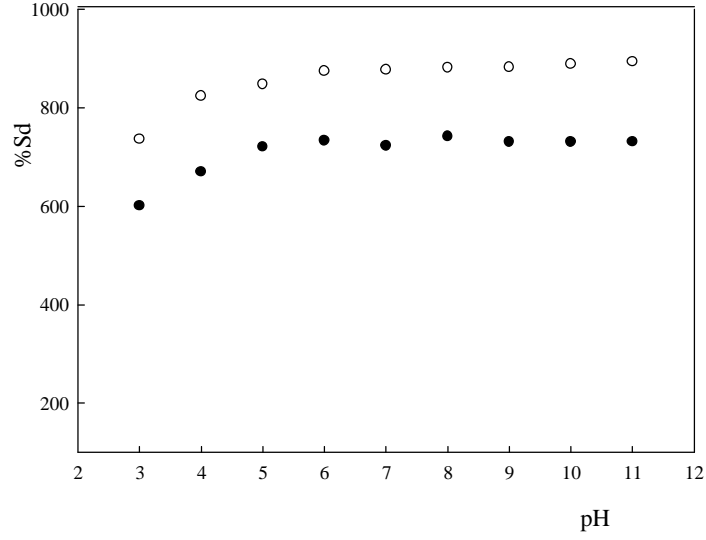
Hazırlanan AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin şişme davranışlarının pH duyarlı olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla pH 3-11'e ayarlanmış asetat ve fosfat tamponları içinde 25 ve 60 °C'ta denge şişme denemeleri yapılmıştır. Kuru kütleleri (m_o) tartılan hidrojeller farklı pH'lardaki çözeltilerde 24 saat bekletilmiştir. Şişmiş hidrojeller tartılarak denge kütlesi (m_d) bulunmuş ve bu değerlerden Eşitlik 5'e göre denge şişme yüzdesi; % S_d değerleri hesaplanmıştır. Şişmenin pH ile değişimi Şekil 8.15 ve 8.16'da gösterilmiştir.

$$\%S_d = \frac{md - mo}{mo} \times 100 \quad (5)$$



Şekil 8.15 AAm-Sep kompozit hidrojellerinin pH duyarlı şişme davranışı

(●; 25 °C, ○; 60 °C)

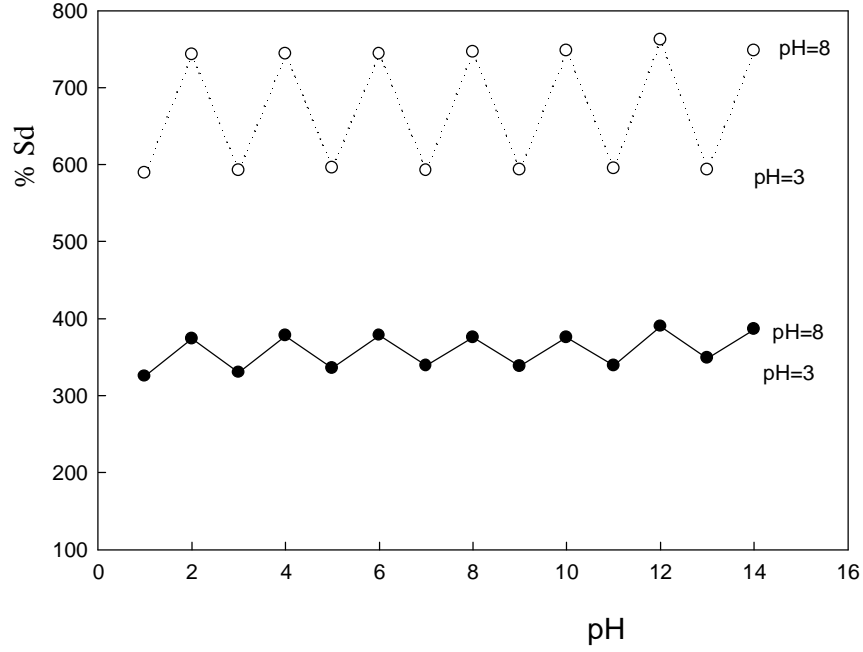


Şekil 8.16 AAm-Sep-MA kompozit hidrojenlerinin pH duyarlı şişme davranışı
(●;25 °C, ○; 60 °C)

Şekil 8.15'ten her iki sıcaklıkta AAm-Sep kompozit hidrojenlerinin şişmesinin pH ile fazla değişmediği görülmektedir. AAm-Sep-MA kompozit hidrojenlerinin ise pH 6'ya kadar şişmesi artmış ve daha sonra değişmemiştir (Şekil 8.16).

8.2.3.3. pH Duyarlı Dönüşümlü Denge Şişme Deneyleri

Hazırlanan kompozitlerin pH duyarlı olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla, 50 mM K_2HPO_4 - KH_2PO_4 ve 50 mM CH_3COOH - CH_3COONa tamponlar ile hazırlanmış pH=3 pH=8'e ayarlanmış çözeltilerde 25 °C'ta dönüşümlü denge şişme çalışmaları uygulanmış ve % S_d değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler zamana karşı grafiğe geçirilmiş ve Şekil 8.17'de gösterilmiştir.



Şekil 8.17 AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerin 25 °C'ta pH dönüşümlü denge şişme davranışları (●;AAm-Sep, ○; AAm-Sep-MA)

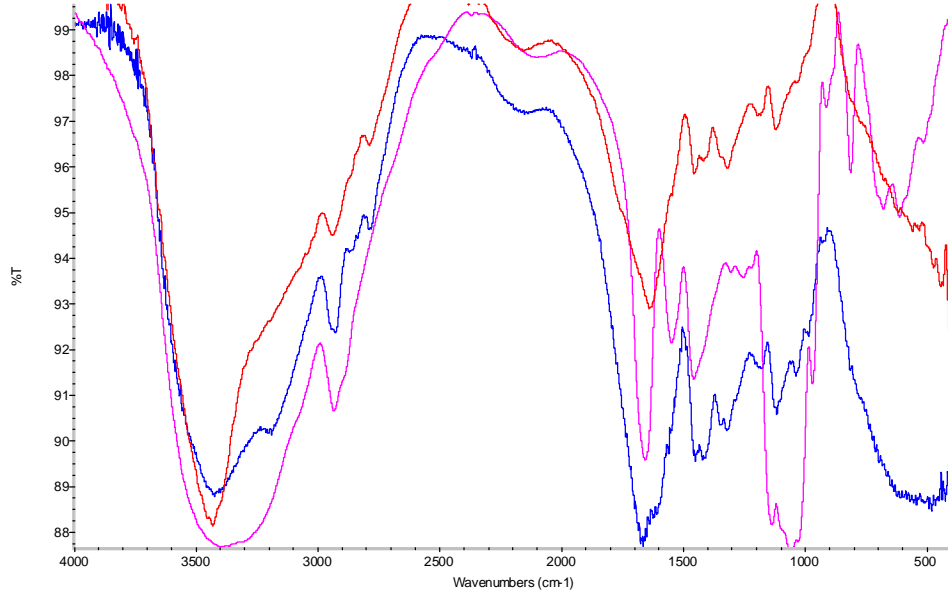
Şekil 8.17'den görüleceği gibi S_d değerleri pH; 3 tamponu içinde veya pH ; 8 tamponu içinde değişmeden kalmıştır. Her iki hidrojel de mekanik olarak dayanıklıdır. 14 gün boyunca tekrarlanan denemelerde herhangi bir parçalanma göstermemişlerdir.

8.3. İNVERTAZIN AAm-Sep ve AAm-Sep-MA KOMPOZİT HİDROJELLERE İMMOBİLİZASYONU

İnvertazın immobilizasyonu için hazırlanan ve karakterizasyonu yapılan AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojelleri invertaz ile etkileştirilerek AAm-Sep'e immobilize edilmiş invertaz (AAm-Sep-Inv) ile AAm-Sep-MA'e immobilize edilmiş invertaz (AAm-Sep-MA-Inv) kompozit hidrojeller oluşturulmuştur. Yapılan ön aktivite çalışmaları bu hidrojellerin invertaz aktivitesinin bulunduğunu göstermiştir.

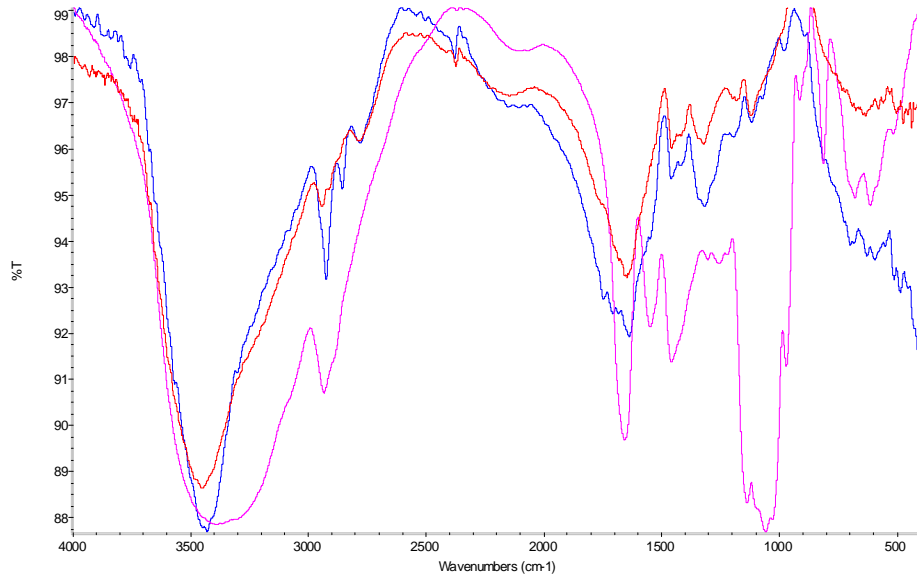
İmmobilize ve serbest invertazın kimyasal yapılarını aydınlatmak için gerekli spektroskopik incelemeler, FTIR spektrometresi ile yapılmıştır. Serbest

İnvertaz ile kompozitlerin arasındaki etkileşimleri incelemek için serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve Am-Sep-MA-Inv kompozit hidrojellerinin FTIR spektrumları alınarak Şekil 8.18 ve 8.19’da sunulmuştur.



Şekil 8.18 Serbest invertaz, AAm-Sep ve AAm-Sep-Inv’in FTIR spektrumu

(---; invertaz, ---; AAm-Sep, ---; AAm-Sep-Inv)



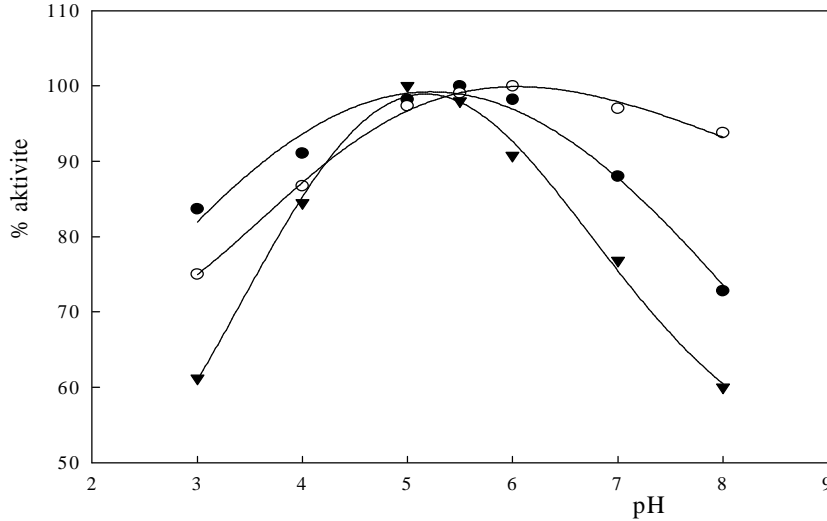
Şekil 8.19 Serbest invertaz, AAm-Sep-MA ve AAm-Sep-MA-Inv’in FTIR spektrumu (---; invertaz, ---; AAm-Sep-Inv, ---; AAm-Sep-MA-Inv)

8.4. SERBEST İNVERTAZ, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in AKTİVİTE DENEYLERİ

Serbest ve immobilize invertazın özelliklerinin araştırılması için optimum pH, optimum sıcaklık, kinetik parametreler olan V_{max} ve K_m değerlerinin bulunması, termal kararlılık, saklama kararlılığı, pH kararlılığı ve kullanım kararlılığı deneyleri yapılmıştır.

8.4.1. Serbest İvertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Optimum pH'sının Belirlenmesi

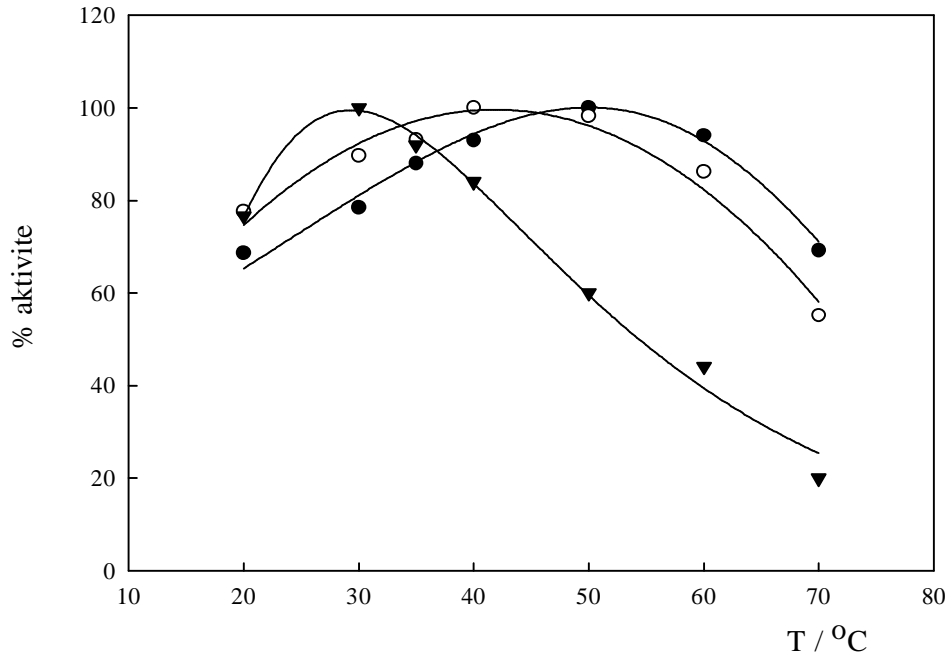
Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in optimum pH'sının belirlenmesi için enzim miktarı, substrat derişimi ve sıcaklık sabit tutularak 50 mM $CH_3COOH-CH_3COONa$ ve 50 mM $KH_2PO_4-K_2HPO_4$ tampon çözeltilerde (pH; 3-8) invertaz aktivite deneyleri yapılmış, bulunan aktivite değerleri % aktivite cinsinden alınıp pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 8.20). Bu grafiklerden görüleceği gibi serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in optimum pH değerleri sırasıyla 5.0, 5.5 ve 6.0 olarak bulunmuştur.



Şekil 8.20 Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in optimum pH grafiği (▼;Serbest invertaz, ●; AAm-Sep-Inv, ○; Am-Sep-MA-Inv)

8.4.2. Serbest İvertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

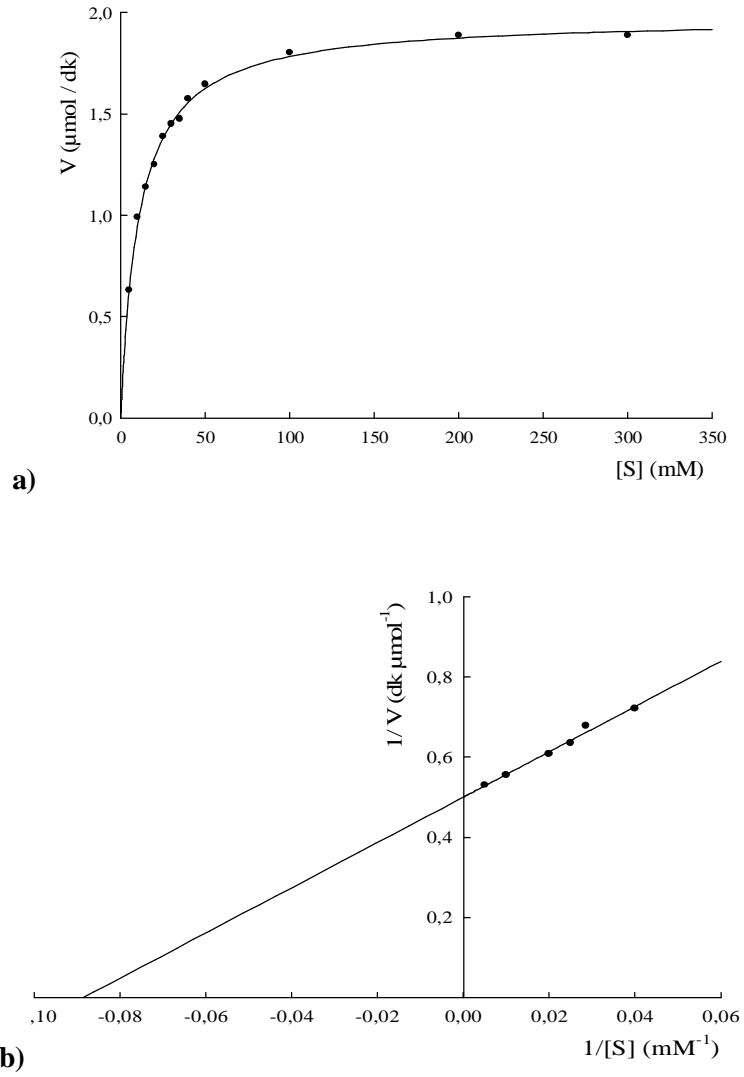
Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla enzim miktarı, substrat derişimi ve pH sabit tutularak değişen sıcaklıklarda (20, 30, 35, 40, 50, 60, 70 °C) enzim aktivitesi bulunmuştur. Aktivite değerleri % aktivite cinsinden alınarak sıcaklıkla değişim Şekil 8.21'de sunulmuştur. Şekil 8.21'den görüleceği gibi serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 30 °C, 50 °C ve 40 °C olarak bulunmuştur.



Şekil 8.21 Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in optimum sıcaklık grafiği (▲;Serbest invertaz, ●; AAm-Sep-Inv, ○; AAm-Sep-MA-Inv)

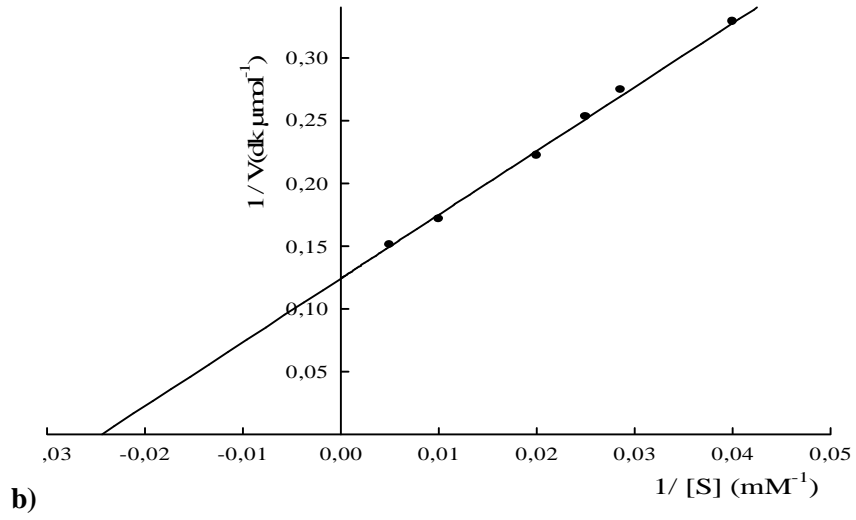
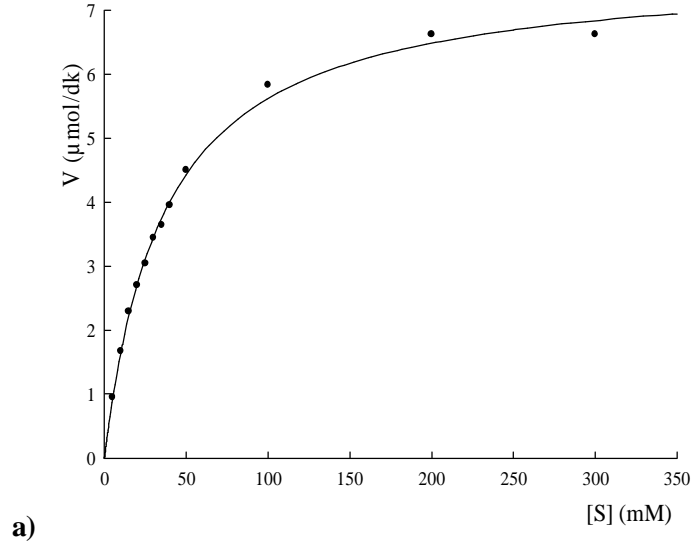
8.4.3. Serbest İvertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Kinetik Parametrelerinin Bulunması

Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in optimum sıcaklık ve pH değerlerinde enzim miktarı sabit tutularak değişen substrat derişimlerinde enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Michaelis-Menten grafiği ve bu grafiklerin doğrusal kısmından Lineweaver-Burk grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafikler serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv için sırasıyla Şekil 8.22, 8.23 ve 8.24'te gösterilmiştir..



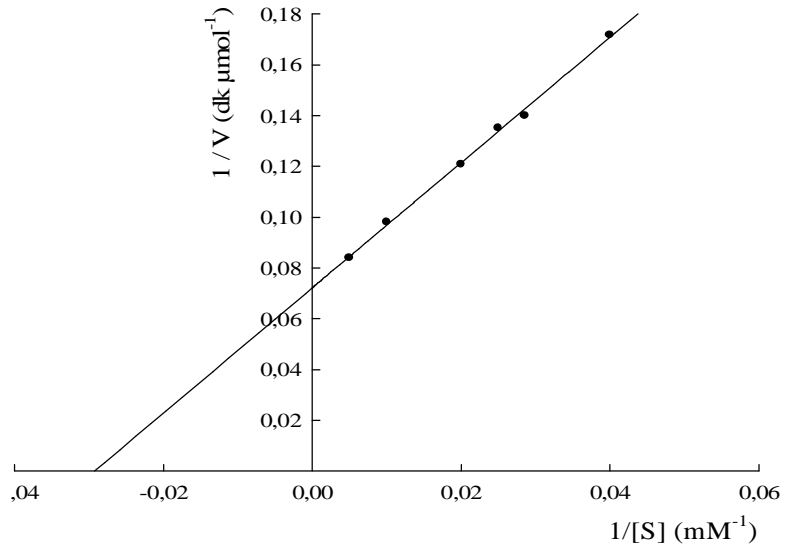
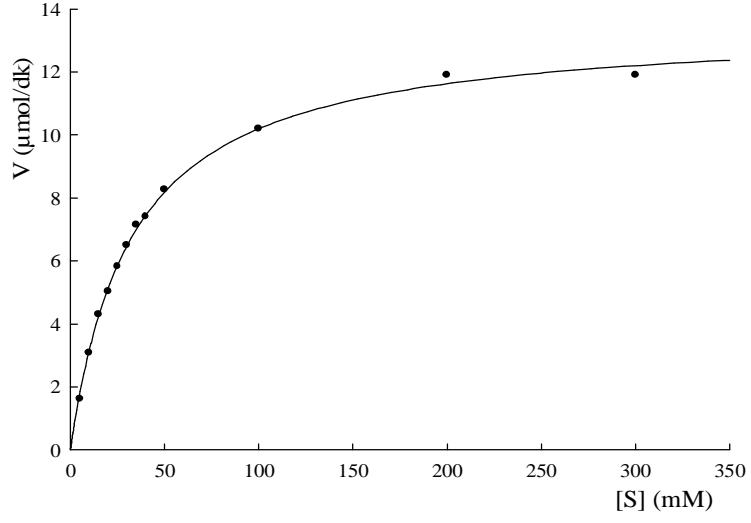
Şekil 8.22 Serbest invertazın a) Michaelis-Menten ve b) Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 8.22'deki grafikten serbest enzimin V_{\max} değeri $2 \mu\text{mol dk}^{-1}$, K_m değeri $11,3 \text{ mM}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 8.23 AAm-Sep-Inv'nin a) Michaelis-Menten ve b) Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 8.23'deki grafikten AAm-Sep-Inv'nin V_{\max} değeri $8,1 \mu\text{mol dk}^{-1}$, K_m değeri $41,0 \text{ mM}$ olarak bulunmuştur.

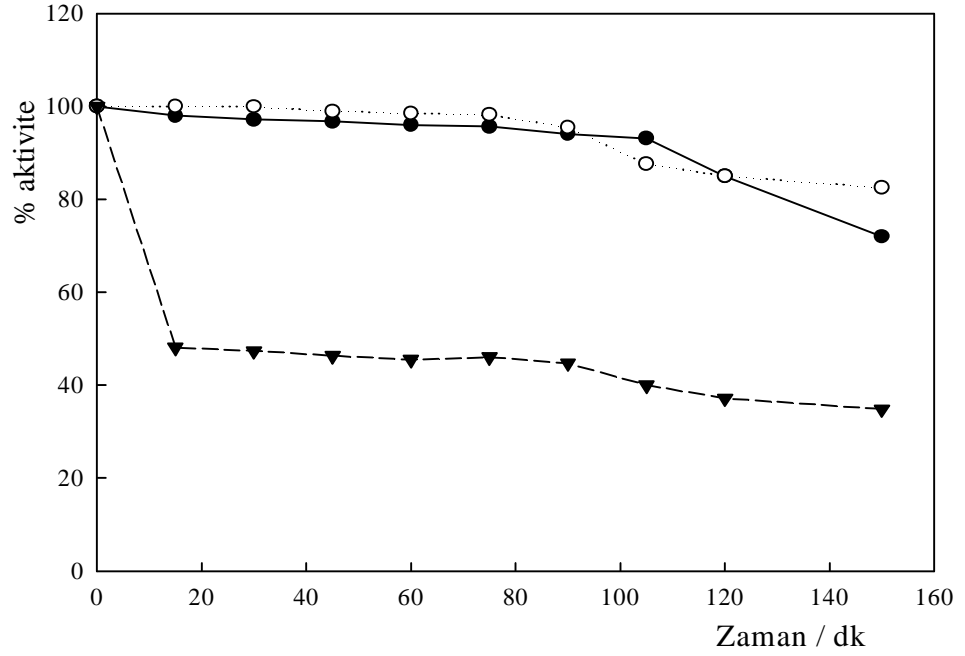


Şekil 8.24 AAm-Sep-MA-Inv'ın a) Michaelis-Menten ve b) Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 8.24'deki grafikten AAm-Sep-MA-Inv'ın V_{max} değeri $13.9 \mu\text{mol dk}^{-1}$, K_m değeri 34.1 mM olarak bulunmuştur.

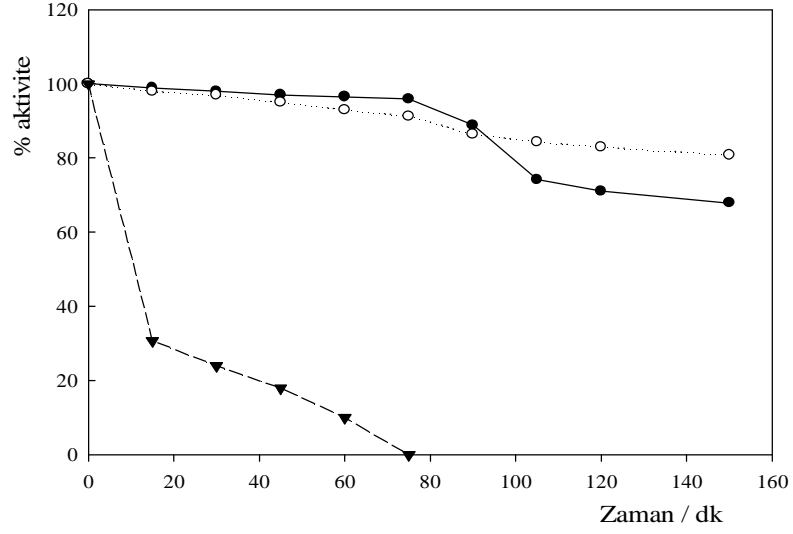
8.4.4. Serbest İvertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in termal kararlılığının belirlenmesi için 50 °C ve 70 °C sıcaklıklarda bekletilen örneklere 150 dakika inkübasyon süresinde belli zamanlarda aktivite analizi yapılmıştır. Bulunan aktivite değerleri % aktivite olarak hesaplanıp zamana karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 8.25-8.26).



Şekil 8.25. Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv, AAm-Sep-MA-Inv'in 50 °C'ta termal kararlılığı (▲; Serbest invertaz, ●;AAm-Sep-Inv ○;AAm-Sep-MA-Inv)

Şekil 8.25'ten görüleceği gibi 50 °C'ta serbest enzim ilk 10 dakikada aktivitesinin % 50 sini kaybetmiştir. AAm-Sep-Inv, AAm-Sep-MA-Inv ise 150. dakikada bile aktivitelerinin % 70'ini korumuştur.

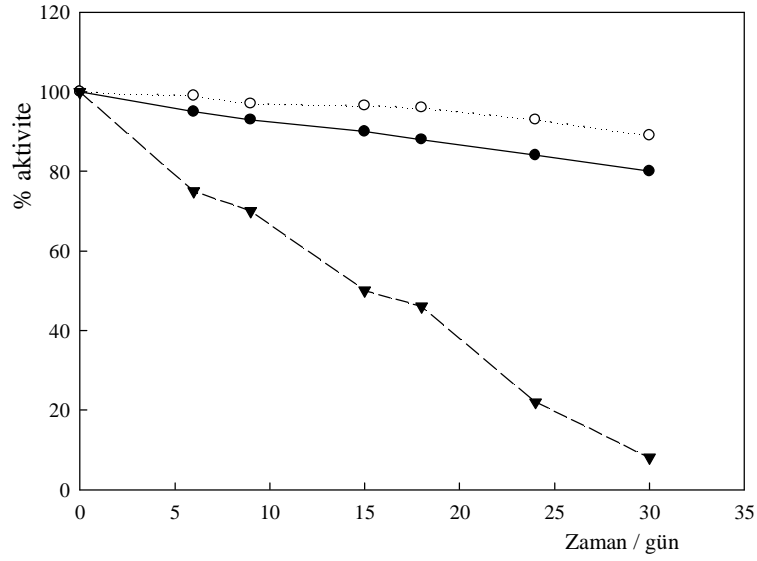


Şekil 8.26. Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv, AAm-Sep-MA-Inv'in 70 °C'ta termal kararlılığı (▲; Serbest invertaz, ●;AAm-Sep-Inv ○;AAm-Sep-MA-Inv)

Şekil 8.26'dan görüleceği gibi 70 °C'ta serbest enzim ilk 10 dakikada aktivitesinin % 70 sini kaybetmiş ve 70. dakikadan itibaren hiç aktivite göstermemiştir. 150. dakikada AAm-Sep-Inv aktivitesinin % 70'ini korurken AAm-Sep-MA-Inv % 80 aktiviteye sahiptir.

8.4.5. Serbest İvertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Saklama Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in saklama kararlılığının belirlenmesi amacıyla optimum sıcaklık ve pH değerlerinde sukroz hidrolizi ile aktivitesi belirlendikten sonra asetat tampona (pH; 4,8) konarak +4 °C'de saklanmıştır. İvertaz, AAm-Sep-Inv, AAm-Sep-MA-Inv ile belli zaman aralıklarında aktivite analizi yapılmıştır. Bulunan aktivite değerleri % aktivite cinsinden hesaplanıp zamana karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 8.27).

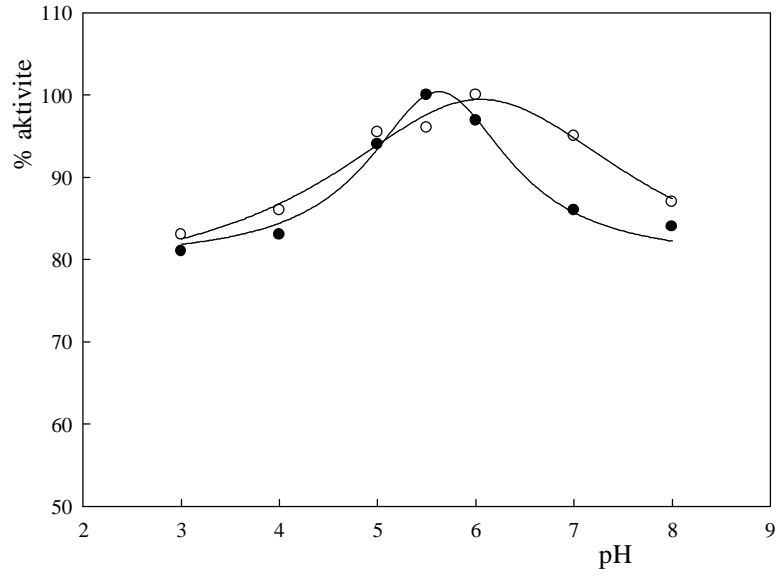


Şekil 8.27 Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Saklama Kararlılığı (▲; Serbest invertaz, ●;AAm-Sep-Inv ○;AAm-Sep-MA-Inv)

Serbest enzim saklama koşullarında 30. günün sonunda aktivitesini tamamen kaybetmişken AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv bu sürede oldukça yüksek aktivite göstermişler ve sırasıyla aktivitelerinin % 80 ve % 90'ını korumuşlardır.

8.4.6. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in pH Kararlılığı

AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in pH kararlılığını belirlenmesi amacıyla değişik pH'larda (3-8) 30 dk bekletilen hidrojellerle kendi optimum pH ve sıcaklıklarında sukroz hidrolizi yapılmıştır. Bulunan aktivite değerlerinden % aktivite hesaplanıp pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 8. 28).



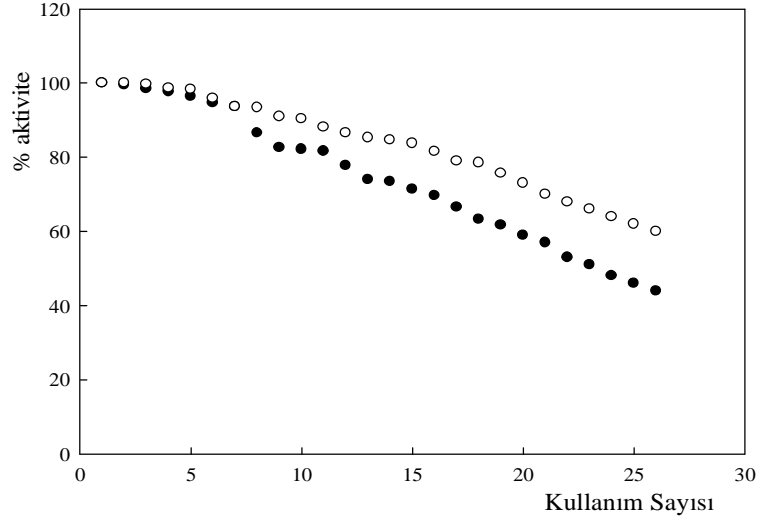
Şekil 8.28 AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in pH Kararlılığı

(●;AAm-Sep-Inv ○;AAm-Sep-MA-Inv)

AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv pH; 5 ile pH; 7 arası % 90 ve üzeri aktiviteye sahiptir. pH 3 ve 8 arasında da önemli düzeyde aktivite kaybı gözlenmemiştir.

8.4.7. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Kullanım Kararlılığı

AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in kullanım kararlılığının bulunması amacıyla sukroz hidrolizi yapılan örnekler tekrar tekrar kullanılmıştır. Bulunan aktivite değerleri % aktivite cinsinden alınarak kullanım sayısına karşı grafiğe geçirilmiş ve Şekil 8.29'te sunulmuştur.



Şekil 8.29 AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv’ın Kullanım Kararlılığı
(●;AAm-Sep-Inv ○;AAm-Sep-MA-Inv)

AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv için ilk 5 kullanımda aktivite kaybı gözlenmemiştir. 25 kullanım sonucu AAm-Sep-Inv aktivitesinin yaklaşık % 50’sini kaybetmişken AAm-Sep-MA-Inv yaklaşık % 40’ini kaybetmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

İmmobilize enzimler serbest enzime göre daha iyi termal kararlılık, saklama ve kullanım kararlılığı gibi özelliklere sahiptir. Buldukları ortamdaki kolayca ayrılabilirler. Bu nedenle endüstriyel uygulamalarda serbest enzime tercih edilmektedirler.

İmmobilize enzim hazırlanmasında destek materyalin seçimi oldukça önemlidir. Çünkü desteğin yapısına bağlı olarak dezavantajlar ortaya çıkabilir. Destek malzemenin enzimin kullanılacağı ortamda kararlı olmak, yüksek mekanik dayanıklılığa sahip olmak, substrat ve ürün difüzyonuna olanak sağlamak gibi özellikleri bulunmalıdır.

Besin endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir enzim olan invertazın değişik desteklere immobilizasyonu üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Besin endüstrisi için önemi nedeniyle bu çalışmada invertazın immobilizasyonunda kullanılacak uygun desteklerin hazırlanıp karakterizasyonunun yapılması ve immobilize enzimin özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Kompozitler iki veya daha fazla farklı materyalden oluşur. Böylece fiziksel, mekanik ve biyolojik özellikleri iyileştirilmiş olur. Hidrojeller çapraz bağlı büyük oranda içine su alabilme yeteneğine sahip hidrofilik polimerlerdir. Enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan hidrojeller kompozit hazırlanışında da kullanılmaktadır. Kille karıştırıldıklarında yeni bir sınıf kompozit materyal oluşturulur. Böylece kilin farklı bileşenleri adsorplama yeteneğiyle jellerin elastik ve geçirgenlik özellikleri birleştirilmiş olur. Polimer silikat kompozitler iyileştirilmiş mekanik ve materyal özelliklerine sahiptir. Killer süper adsorplayıcı olarak kompozitlerde kullanılırlar. Hem maliyeti düşürürler hem de şişme yeteneğini, termal kararlılığı ve mekanik kararlılığı artırırlar. (Zhang ve Wang 2007).

Bu çalışmada kil-polimer kompozit hidrojellerinin hazırlanması düşünülmüş ve bu amaçla akrilamid (AAm), maleik asit (MA) monomerleri ile kil olarak sepiyolit (Sep) seçilmiştir. Çapraz bağlayıcı varlığında radikalik katılma tepkimesi ile AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojeller hazırlanmıştır.

Hazırlanan kompozitlerin kimyasal yapılarını aydınlatmak için gerekli spektroskopik incelemeler, FTIR spektrofotometresi ile yapılmıştır. Şekil 8.3-8.4'te sunulan FTIR spektrumunda 3500-3000 cm^{-1} aralığında gözlenen geniş pik AAm'teki primer amin gruplarının N-H titreşim bandını gösteren karakteristik band olup sepiyolitteki hidroksil gruplarının varlığıyla genişlemiştir. AAm-Sep ve AAm-Sep-MA'de AAm'in karakteristik bantları her ikisinde de görülmektedir 1670 cm^{-1} 'de AAm'in CO-NH bandı 1030 cm^{-1} 'de sepiyolit Si-O ve 1710'da MA'in -COOH bandı görülmektedir (Cai ve ark. 2007; Erbil ve ark., 2004; Kaşgöz, 2005; Zhang ve Wang 2007).

AAm-Sep, AAm-Sep-MA kompozitlerinin ısıl bozunmalarını incelemek için TG termogramları alınmış, Şekil 8.5 ve 8.6'da sunulmuştur. Sunulan termogramlarda hazırlanan kompozitlerin çok basamaklı ısıl bozunma tepkimesi verdiği görülmektedir. 600 °C'ta AAm-Sep ve AAm-Sep-MA'in her ikisinde de kütlece yaklaşık % 30'unun kaldığı gözlenmektedir. 600 °C sıcaklıkta hala kütle bulunması kompozitlerin ısıl kararlılığını göstermektedir. Bu durum kompozit oluşumunda kullanılan sepiyolit'in ısıl kararlılığından kaynaklanmaktadır.

Termogramlardaki yaklaşık 70-180 °C'a kadar ilk kütle kaybı yapıdaki nem kaybını gösterir. Bu sıcaklığa kadar kompozitlerde yapısal bozunma gözlenmemektedir. Sepiyolit için 200-350 °C arası su kaybı olduğu bildirilmiştir (Ünal ve Erdoğan, 1998). 330 °C dolayında dehidroksilasyon gerçekleşir (Lemic ve ark., 2005). 300-450 °C arası AAm ve çapraz bağlayıcıdaki amid yan grupları, 450 °C'tan sonra poliakrilamid temel zincirlerinin bozunması ve imidleşme gerçekleşir (Zhang ve Wang, 2007). 350 °C üzerinde ısıtıldığında sepiyolitte koordinasyon suyu uzaklaşır ve sepiyolit yapısında kalsinasyon nedeniyle faz transformasyonu oluşur. Yüzey alanı azalır (Valentin ve ark. 2007).

Polimerlerin çözücü ortamlarında şişmeleri; çözücü ve polimerin doğası ile ilgilidir. Çözücü ve polimerin kimyasal yapılarının birbirine benzemesi; polimer-polimer ve çözücü molekülleri arasındaki etkileşim kuvvetlerinin, polimer-çözücü molekülleri arasındaki etkileşim kuvvetlerine yakın olması anlamına gelmektedir. Bu nedenle şişme çalışmaları; polimerin şişme özelliği gösterebileceği çözücülerde yapılır (Ekici, 2002). Bir polimerin hidrojel özelliği gösterebilmesi için ana zincir ya da yan dallarında hidroksil, karbonil, karboksil, amin ve amid gibi hidrojen bağı oluşturabilme özelliğine sahip su sever grupların bulunması gerekir. Bu gruplardan dolayı bağlı duruma geçen su nedeniyle jelin hacmi ve kütlesi artar ve jel şişmeye başlar. Jeldeki su sever grupların artması ile de jelin şişmesi artar. Şekil 8.7 ve 8.8'deki 25 °C ve 60 °C için AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozitlerinin şişme eğrileri, şişmenin dengeye ulaşana dek zamanla arttığını göstermiştir. AAm-Sep-MA kompozitleri her iki sıcaklıkta da AAm-Sep'ten daha fazla şişmiştir AAm monomerden hazırlanan hidrojeller suda fazla şişmez. AAm'e sepiyolit eklenmesi OH grupları nedeniyle şişmeyi arttırmıştır. AAm-Sep'in yapısına MA eklenmesiyle susever gruplar olan karboksil grupları katılmıştır. Karboksil grubunun pK_{a1} değeri 1.83, pK_{a2} değeri 6.07 olduğu için damıtık suda bu gruplar iyonlaşmış durumdadır. Anyonik grupların artması kompozit içine daha fazla suyun girmesine ve kompozitin daha fazla şişmesine neden olmuştur.

AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerin şişmesi ikinci dereceden kinetiğe uyar. Şekil 8.11 ve 8.12'deki şişme hız grafiklerinden hesaplanan ve Çizelge 8.1. de verilen ikinci dereceden tepkime hızı değerleri AAm-Sep-MA'in AAm-Sep'ten daha hızlı şiştiğini göstermiştir. Ayrıca sıcaklık ile AAm-Sep kompozitlerinin şişmesinde çok az bir fark gözlenirken AAm-Sep-MA kompozitlerinde şişmenin sıcaklıkla yaklaşık %20 oranında arttığı bulunmuştur (Şekil 8.9-8.10 ve Çizelge 8.1.).

AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerine suyun difüzyonunun incelenmesi için $\ln F - \ln t$ grafikleri oluşturulmuş (Şekil 8.13 ile 8.14) ve bu grafiklerden çözücünün difüzyon türünü gösteren difüzyon üsteli (n) hesaplanmıştır. Her iki hidrojin n değeri 0.5 ile 1 arasında bulunmuştur (Çizelge

8.2). Bu değer difüzyonun anormal tip difüzyon olduğunu göstermiştir. Bu difüzyon tipinde, difüzlenen türün difüzyon hızı ile durulma hızı birbirine eşittir (Peppas ve Ritger, 1987).

AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin şişme davranışlarının pH duyarlı olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda her iki sıcaklıkta AAm-Sep kompozit hidrojellerinin şişmesinin pH ile fazla değişmediği bulunmuştur (Şekil 8.15). AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin ise pH 6'ya kadar şişmesi artmış ve daha sonra değişmemiştir (Şekil 8.16).

pH duyarlı dönüşümlü şişme deneylerinde AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerin çok iyi yeniden şişme yeteneğine sahip olduğu ve pH'a az da olsa duyarlı oldukları bulunmuştur (Şekil 8.17). 14 gün boyunca gerçekteşen denemelerde kompozit hidrojelleri yapısı sağlamlılığını korumuştur

AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojelleri karakterizasyon çalışmalarından sonra invertaz immobilizasyonunda kullanılmışlardır. İmmobilizasyon sonucu elde edilen immobilize invertazların (AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv) FTIR spektrumları alınmış, Şekil 8.18 ve 8.19'da sunulmuştur. Bu spektrumlardan immobilizasyon sonucu 1553 cm^{-1} 'deki invertazın karakteristik amid pikinin kaybolduğu görölmektedir. AAm-Sep-MA kompozitindeki 1710 cm^{-1} 'deki COOH piki de AAm-Sep-MA-Inv spektrumunda görölmemektedir. Bu sonuçlar enzim ile kompozitler arasında bir etkileşim olduğunu göstermektedir.

Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv ile optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametreler olan K_m ve V_{max} değerleri bulunmuş ve Çizelge 9.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 9.1. Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv için optimum sıcaklık, optimum pH, K_m , V_{max} değerleri

	Optimum Sıcaklık / °C	Optimum pH	K_m / mM	V_{max} $\mu\text{mol dk}^{-1}$
Serbest Inv	30	5.0	11.3	2.0
AAm-Sep-Inv	50	5,5	41.0	8.1
AAm-Sep-MA-Inv	40	6.0	34.1	13.9

pH enzim aktivitesi üzerine etkili olan bir parametredir. Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv aktivitesi üzerine pH etkisi araştırılmış ve pH profili Şekil 8.20’de sunulmuştur. Serbest invertaz ve diğerlerinin optimum pH değerleri farklıdır. Optimum pH’daki değişim enzim veya desteğin yüküne bağlıdır. Yaygın bir pH skalası immobilizasyon süresinde enzim ve polimer matriksin arasındaki ikincil etkileşimlerin (iyonik ve polar etkileşimler, hidrojen bağları) bir sonucudur. Yayvanlaşma immobilize enzimin düşük pH’larda kullanımına olanak sağlayan bir avantajdır. Böylece uzun süreli işlemlerde mikrobiyal bulaşma olmaz (Rebros ve ark., 2007). Enzim çok asidik veya bazik ortamda denatüre olacağı için tepkime hızı azalır ve sifıra kadar düşebilir (Arıca ve Bayramoğlu, 2006 , Emregül ve ark., 2006). İvertazın pH 3 ve 8’deki aktivite kaybının en fazla serbest enzimde ve % 40 olduğu görülmektedir. Bu durum invertazın pH ile aşırı oranda etkilenmediğini göstermektedir.

Yapılan değişik çalışmalarda invertaz için optimum pH değerlerinin 4,5, 4,8, 5, 5,5 gibi farklı değerler aldığı gözlenmiştir. Bu durum serbest invertazın kaynağına, saflaştırma yöntemine v.d bağlıdır (Erginer ve ark., 2000; Melo ve D’Souza, 2000; Sanjay ve Sugunan, 2005). Polivinil alkol mikroküreciklere kovalent bağlanma ile immobilizasyonda serbest invertaz için optimum pH 5,5 immobilize invertaz için 6.0 olarak bulunmuştur (Akgöl ve ark., 2001).

Enzim aktivitesi üzerine etkili olan bir diğer parametre sıcaklıktır. Bütün kimyasal tepkimeler gibi enzimatik tepkimelerde de tepkime hızı sıcaklıkla artar. Ancak 50-60 °C’ta enzim yapısında meydana gelen denatürasyon nedeniyle

aktivitede düşüş gözlenir. Sıcaklık artıkça önce tersiyer yapı, sonra ikincil yapı bozulur (Kılıç, 2005). Bu olaylardan enzim aktif merkezi de etkilenir ve enzim aktifliğini yitirir. Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in Şekil 8.21'de gösterilen optimum sıcaklık grafiği incelenecek olursa; sıcaklık artışıyla serbest invertaz aktivitesinde optimum sıcaklıktan sonra hızlı bir düşüş görülmektedir. Enzim sıcaklıkla hızla denatüre olmaktadır. İmmobilizasyon bu denaturasyonu azaltmış ve geniş bir sıcaklık aralığında enzimin aktivite göstermesini sağlamıştır.

Yapılan iki ayrı çalışmada Laktam-amit aşı kopolimerlerine ve p(HEMA) membranına immobilize edilen invertazın optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 60 °C, 50 °C olarak bulunmuştur (Tümtürk ve ark, 2000; Alvaro ve ark, 2002).

Serbest invertaz, AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'in enzim kinetiği çalışmaları sonucu kinetik parametreler olan K_m ve V_{max} değerleri oluşturulan Lineweaver-Burk grafiklerinden (Şekil 8.22, 8.23, 8.24) bulunmuştur. İmmobilizasyon her iki değerde de değişikliğe neden olmuştur (Çizelge 9.1).

K_m değişimi enzim konformasyonundaki değişimden çok sterik engelleme ve difüzyonal kısıtlamalara bağlıdır. Yapılan çalışmalarda immobilize invertazın V_{max} değerlerinin serbest enzime göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum enzimin aktif merkezinin immobilizasyondan etkilenmediğini göstermektedir.

Sanjay ve Sugunan (2005) yaptıkları bir çalışmada invertazı montmorillonit K10'a immobilize etmişlerdir. Serbest enzimin K_m değeri 4.5 g L^{-1} , V_{max} değeri $6.63 \text{ mol mL}^{-1} \text{ dk}^{-1}$ olarak, immobilize invertazın K_m değeri 37 g L^{-1} , V_{max} değeri $3.25 \text{ mol mL}^{-1} \text{ dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Diğer bir çalışmalarında ise kovalent bağla immobilizasyonun adsorpsiyonla immobilizasyona göre daha iyi olduğu bulunmuştur (Sanjay ve Sugunan, 2007).

Milovanoviç ve arkadaşlarının (2007) bir çalışmasında invertaz kalsiyum aljinat jele immobilize edilmiştir. Sıcaklık artışıyla aktivitede hızlı bir düşüş saptanmıştır. Serbest enzimin K_m değeri 28.4 mM, V_{max} değeri 4.5 mM dk^{-1} olarak, immobilize invertazın K_m değeri 72 mM, V_{max} değeri 0.42 mM dk^{-1} olarak bulunmuştur.

Naylon 6 mikrokürelere immobilizasyonda serbest invertazın K_m değeri 0.024 M, V_{max} değeri 1.06 mol dk⁻¹ olarak, immobilize invertazın K_m değeri 0.029 M, V_{max} değeri 1.37 mol dk⁻¹ olarak bulunmuştur (Delgado ve ark., 2006).

Tanrıseven ve Doğan (2001) invertazı kalsiyum aljinat jel kapsüle immobilize etmişlerdir. K_m değeri serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla 46 ve 50 mM olarak, V_{max} değeri ise 45ve 38 mg fruktoz (dk mg enzim)⁻¹ olarak bulunmuştur.

Işık ve arkadaşları (2003) invertazın 2-metil bütül-2-(3-trienil)asetat/polipirol matrikse immobilizasyonunu araştırmışlardır. Serbest enzimin K_m değeri 59 mM, V_{max} değeri 82.3 μ mol dk⁻¹ olarak, immobilize invertazın K_m değeri 33 mM, V_{max} değeri 2.6 μ mol dk⁻¹ olarak bulunmuştur.

AAM-Sep-MA-Inv'ın K_m değerinin AAM-Sep-Inv'ın K_m değerinden küçük çıkması (Çizelge 9.1.) AAM-Sep-MA desteğinin enzime ilgisinin AAM-Sep kompozitine göre daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu nedenle AAM-Sep-MA kompoziti AAM-Sep kompozitine göre daha iyi bir destek olduğu söylenebilir..

Serbest ve AAM-Sep-Inv, AAM-Sep-MA-Inv'ın termal kararlılığın belirlenmesi için iki farklı sıcaklıkta bekletilen örneklerde aktivite analizi yapılmıştır. İmmobilize ve serbest İvertaz için Şekil 8.25-8.26'da gösterilen termal kararlılık grafiği incelenecek olursa bekleme süresi arttıkça serbest enzimin aktivitesinde belirgin bir düşme olduğu görülmektedir Serbest enzim 50°C'ta ilk 10 dakikada aktivitesinin % 50'sini kaybetmişken 70 °C 'ta bu süre sonunda serbest enzimin başlangıç aktivitesi % 30'a düşmüştür. 70 °C'ta; serbest enzim 70. dakikada aktivitesinin tamamını kaybederken, 150. dakikada AAM-Sep-Inv % 70, AAM-Sep-MA-Inv % 80 aktiviteye sahiptir. Bu sonuçlar AAM-Sep-Inv, AAM-Sep-MA-Inv için ısıyla inaktivasyonun oldukça yavaş olduğunu ve yüksek sıcaklıklarda oldukça kararlı olduklarını göstermiştir. İmmobilizasyonla hareketi engellenen enzim sıcaklık artışı ile konformasyonel değişime uğramamış ve aktivite kaybetmemiştir.

Naylon 6 mikrokürelere immobilize edilen invertazın 60 °C'ta 160. dakikada aktivitesinin % 80'ini, 70 °C'ta ise 40. dakikada aktivitesinin tamamını kaybettiği bulunmuştur (Delgado ve ark., 2006).

Enzimler genellikle uzun süreli depolanmaya uygun değildir ve zamanla aktivite kaybına uğrarlar. Immobilize enzimler serbest enzimden daha karardır. Serbest ve immobilize invertazın Şekil 8.27'de gösterilen saklama kararlılığı grafiği incelenecek olursa; serbest enzimin +4 °C'ta 30. günün sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv'n ise % 80 ve % 90'ını aktivite gösterdiği bulunmuştur. Saklama kararlılığının yüksek olması immobilizasyon sonucu invertazın termal inaktivasyonunun engellendiğini göstermektedir.

Polivinilalkole immobilize edilen invertaz 28. günde aktivitesinin % 62'sini kaybetmiştir (Akgöl ve ark., 2001). PHEMA-GMA immobilizasyonunda 32. günde % 22 aktivite kaybı bulunmuştur (Danışman ve ark., 2004).

AAm-Sep-Inv, AAm-Sep-MA-Inv'ın Şekil 8.28'de gösterilen pH kararlılık grafiği incelendiğinde immobilize enzimin pH profili optimum pH'nın her iki yanında kararlılığının artırıldığını göstermektedir. Bu da immobilizasyon yönteminin geniş bir pH aralığında enzimin aktivitesini koruduğunu gösterir.

Serbest enzim çalışmalarında enzim çözeltide çözülmüş olduğu için yeniden kullanılması saflaştırma işlemleri gerektirir. Bu nedenle yalnız bir kez kullanılabilir. Immobilize enzimlerin tekrar tekrar kullanılabilmesi serbest enzime karşı bir üstünlükleridir. AAm-Sep-Inv ve AAm-Sep-MA-Inv için ilk 5 kullanımda aktivite kaybı gözlenmemiştir (Şekil 8.29). 25 kullanım sonucu AAm-Sep-Inv aktivitesinin yaklaşık % 50'sini kaybetmişken AAm-Sep-MA-Inv yaklaşık % 40'ini kaybetmiştir.

3-metil metakrilata immobilize invertazla çok az bir aktivite kaybıyla 20'den fazla ölçüm yapılmıştır (Cirpan ve ark., 2003).

Sonuç olarak invertaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere hazırlanan AAm-Sep ve AAm-Sep-MA kompozit hidrojellerinin şişme özelliklerinin iyi

olduğu bulunmuştur. Bu durum immobilize enzimin mikroçevredeki değişikliklerde bile substrat ve ürünün enzimle karşılaşabilmesinde bir avantaj sağlayacaktır. İmmobilizasyon invertazın termal, pH, saklama ve kullanım kararlılığını arttırmıştır. K_m değerindeki artış immobilizasyon çalışmasının doğal bir sonucudur. Ayrıca V_{max} değerinin artması enzim aktif merkezinin immobilizasyondan etkilenmediğini göstermiştir. AAm-Sep-MA kompozit hidrojeli daha küçük K_m ve daha yüksek V_{max} gösterdiği için AAm-Sep'e göre daha avantajlıdır. Her ikisi de Biyoteknolojik süreçlerde ve endüstriyel uygulamalarda önerilebilir.

KAYNAKLAR

Akgöl S., Kaçar Y., Denizli A. And Arıca M.Y., 2001, Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres, *Food Chemistry*, 74, 281-288.

Akyüz S., Akyüz T., 2003, FT-IR spectroscopic investigations of surface and intercalated 2-aminopyrimidine adsorbed on sepiolite and montmorillonite from Anatolia, *Journal of Molecular Structure*, 205-210.

Alkan M., Demirbaş Ö., Çelikçapa S., Doğan M., 2004, Sorption of acid red 57 from aqueous solution onto sepiolite, *Journal of Hazardous Materials*, 135-145.

Alkan M., Demirbaş Ö., Doğan M., 2007, Adsorption kinetics and thermodynamics of an anionic dye onto sepiolite, *Microporous and Mesoporous Materials*, 388-396.

Alvaro A.A., Reinaldo R., Olpa Z.G. and Ribeiro R., 2002, Lactam-Amide graft copolymers as novel support for enzyme immobilization , *Journal Applied Polymer Sci.*, 84,767-777.

Arıca M.Y., Bayramoğlu G.,2006, Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine-grafted poly(GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis, *Journal of Molecular Catalysis*,131-138.

Arslan F., Tümtürk H., Çaykara T., Şen M., Güven O., 2000 , The effect of gel composition on the adsorption of invertase on poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels, *Food Chemistry*, 33-38.

Bagal D., Karve M., 2006, Entrapment of plant invertase within novel composite of agarose-guar gum biopolymer membrane, *Analytica Chimica Acta*,316-321.

Begmeyer H.U., 1994, *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie Int., Second Ed., Florida.

Bektaş N., Ağım B., Kara S., 2004, Kinetic and equilibrium studies in removing lead ions from aqueous solutions by natural sepiolite, *Journal Hazardous Materials*, 115- 122.

Cai Y., Xue J., Polya D.A., 2007, A Fourier transform infrared spectroscopic study of Mg-rich, Mg-poor and acid leached palygorskites, *Spectrochimica Acta Part A*, 66,282-288.

Cengiz S., Cengiz M.,1994, *Enzim Bilgisi*, Bilimsel Ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, Second Ed., İstanbul.

Chen Y., Kang E.T., Neoh K.G., Tan K.L., 2000, Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid, *European Polymer Journal*,2095-2103.

Cirpan A., Alkan S., Toppare L., Hepuzer Y., Yagcı Y., 2003, Immobilization of invertase in conducting copolymers of 3-methylthienyl methacrylate, *Bioelectrochemistry*, 29-33.

Crini G., 2006, Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal, *Bioresource Technology*,1061-1085.

Cubillo A., Tulliani J.M., Pecharroman C., Moya J.S., 2006, Iron-oxide nanoparticles supported on sepiolite as a novel humidity sensor, *Journal of European Ceramic Society*,1983-1989.

Çetinus Akkuş, Ş., Öztop, H. N., 2003, Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 889-894.

D'Souza S.F., Godbole S.S.,2002, Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine, *Biochemical and Biophysical Methods*, 59-62.

Danisman T., Tan S., Kaçar Y., Ergene A., 2004, Covalent immobilization of invertase on microporous PHEMA-GMA membrane, *Food Chemistry*, 85, 461-466.

Delgado L., Hidalgo M., Montes M.C., 2006, Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads, *Food Chemistry*, 299-304.

Ekici S., 2002, Serbest Ve Akrilamid Jelinde Tutuklanmış Sepiyolite Bazı Katyonik Boyarmaddelerin Adsorpsiyonunun İncelenmesi, Doktora Semineri II.

Emregül E., Sungur S., Akbulut U., 2006, Polyacrilamide gelatine carrier system used for invertase immobilization, *Food Chemistry*, 591-597.

Erbil C., Kazancıoğlu E., Uyanık N., 2004, Synthesis, characterization and thermoreversible behaviours of poly(dimethyl siloxane)/poly(*N*-isopropyl acrylamide) semi-interpenetrating networks, *European Polymer Journal*, 40, 1145-1154.

Erginer R., Toppare L., Alkan S., Bakir U., 2000, Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices, *Reactive Functional Polymers*, 45, 227-233.

Gancarz I., Bryjak J., Bryjak M., Tylus W., Pozniak G., 2006, Poly(phenylene oxide) films modified with allylamine plasma as a support for invertase immobilization, *European Polymer Journal*, 2430-2440.

Gordon F., Bickerstaff, 1997, Immobilization of Enzymes and Cells, Methods in Biotechnology, Humana Press, first Ed., New Jersey.

Gültek A., 1998, Kil-polimer sol-jel hibrit materyalinin sentezi ve fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi, I.U., Malatya, s:14

Işık S., Alkan S., Toppare L., 2003, Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) asetat/poliprrole matrices, *European Polymer Journal*, 39, 2375-2381.

Karadağ, E; Saraydın, D; Guven O., 1997a , Interaction of nicotine and its pharmaceutical derivatives with acrylamide/itaconic acid hydrogels, *Journal of Applied Polymer Science*, 66 (4): 733–739.

Karadağ E., Saraydın D., Güven O., 1997b, Cationic dye adsorption by acrylamide itaconic acid hydrogels in aqueous solutions, *Polymer for Advanced Technologies*, 8, 574–578.

Karadağ E., Saraydın D., Güven O., 1997c, Influence of some crosslinkers on the swelling of acrylamide/crotonic acid hydrogels, *Turkish Journal of Chemistry*, 21, 151-161.

Karadağ E., Baris O., Üzum A., Saraydın D., Güven O. 2006, Swelling characterization of gamma-radiation induced crosslinked acrylamide/maleic acid hydrogels in urea solutions, *Materials and Design* ,27 ,576–584.

Kaşgöz H., 2005, Aminofunctionalized acrylamide-maleic acid hydrogels: Adsorption of indigo carmine, *Colloids and Surfaces*, 266, 44-50.

Kılıç N., 2005, Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Palme Yayıncılık, first Ed., Ankara.

Kızılyar N., Akbulut U., Toppare L., Özden M.Y., Yağcı Y., 2000, Immobilization of invertase in conducting polypyrrole/polytetrahydrofuran graft polymer matrices, *Synthetic Metals*, 45-50.

Lehle L., Cohen R.E., Ballou E., 1979, Carbonhydrate Structure of Yeast Invertase, *The Journal of Biological Chemistry*, 23, 2209-2218.

Lemic J., Tomasevic-Canovic M., Djuricic M., Stanic T., 2005, Surface modification of sepiolite with quaternary amines, *Journal of Colloid and Interface Science*, 292, 11-19

Mateo C., Palomo J.M., Lorente-Fernandez G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R., 2007, Improvement of enzyme activity, stability and

selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial Technology*, 1451-1463.

Melo J.S. and D'Souza S.F., 2000, A simple approach for the simultaneous isolation and immobilization of invertase using crude extracts of yeast and jack bean meal, *Journal Biochemica And Biophysical Methods*, 42, 133-135.

Menteş G., Ersöz B., 1993, Harper'in Biyokimyası, Bilim Yayıncılık, second Ed., İstanbul.

Milovanović A., Bozic N., Vujcic Z., 2007, Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads, *Food Chemistry*, 81-86.

Osman B., Kara A., Uzun L., Beşirli N., Denizli A., 2005, Vinyl imidazole carrying metal- chelated beads for reversible use in yeast invertase adsorption, *Journal of Molecular Catalysis*, 88-94.

Oztop HN., Oztop AY., Isikver Y., Saraydın D., 2002, Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* onto radiation crosslinked HEMA/AAM hydrogels for production of ethyl alcohol , *Process Biochemistry*, 37, 651–657.

Özdemir O., Çınar M., Sabah E., Arslan F., Çelik M.S., 2007, Adsorption of anionic surfactants onto sepiolite, *Journal of Hazardous Materials*, (baskıda).

Peppas N.A., Ritger P.L., 1987, A simple equation for description of solute release I. Fickian and Non-Fickian from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or disc, *Journal of Controlled Release*, 5, 23-26.

Rabek J.F., 1980, Experimental methods in polymer chemistry, John Willey, New York.

Rebros M., Rosenberg M., Mlichova Z., Kristofikova L., 2007, Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules, *Food Chemistry*, 102, 784-787.

Rytwo G., Tropp D., Serban C., 2002, Adsorption of diquat, paraquat and methyl green on sepiolite :experimental results and model calculations, *Applied Clay Science*, 273-282.

Sabah E., 2007, Decolorization of vegetable oils: Chlorophyll- α adsorption by acid-activated sepiolite, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1-7.

Sanjay G., Sugunan S., 2005, Invertase immobilised on montronite:reusability enhancement and reduction in leaching, *Catalysis Communications*, 6, 81-86.

Sanjay G., Sungunan S., 2006, Fixed bed reactor performance of invertase immobilized on montronite, *Catalysis*, 1005-1011.

Sanjay G., Sungunan S., 2007, Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity, *Applied Clay Science*, 35, 67-75.

Santiago-Hernandez J.A., Vasquez-Bahena J.M., Calixto-Romo M.A., Xoconostle-Cázares G.B., Ortega-López J., Ruíz-Medrano R., Montes-Horcasitas M.C., Hidalgo-Lara M.E., 2006, Direct immobilization of a recombinant invertase to Avicel by *E. coli* overexpression of a fusion protein containing the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* and the carbohydrate-binding domain CBD_{Cex} from *Cellulomonas fimi*, *Enzyme and Microbial Technology*, 172-176.

Saraydın D., Karadağ E., Çetinkaya S., Güven O., 1995, Preparation of acrylamide/maleic acid hydrogels and their biocompatibility with some biochemical parameters of human serum, *Radiation Physics and Chemistry*, 46, 1049-1052.

Saraydın D., Oztop H.N., Karadağ E., Çaldıran Y., Güven O., 1999, Influence of some amino acids on the dynamic swelling behaviour of radiation-induced acrylamide hydrogel, *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 115-125.

Saraydın D., Işıkver Y., Karadağ E., Şahiner N., Güven O., 2002, In vitro dynamic swelling behaviours of radiation synthesized polyacrylamide with crosslinker in the stimulated physiological body fluids, *Nuclear Inst. And Met. In Phys. Res. B*, 187, 340-344.

Saraydın D; Unver–Saraydın S; Karadağ E; Koptagel E; Guven O., 2004, In vivo biocompatibility of radiation crosslinked acrylamide copolymers, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Sectionβ*, 217 (2): 281–292.

Şolpan D., Duran S., Saraydın D., Güven O., 2003, Adsorption of methyl violet in aqueous solutions by poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels, *Radiation Physics and Chemistry*, 66,117-127.

Tanrıseven A., Doğan Ş., 2001, Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules, *Process Biochemistry*,1081-1083.

Tekin N., Dinçer A., Demirbaş Ö., Alkan M., 2006, Adsorption of cationic polyacrylamide onto sepiolite, *Journal of Hazardous Materials*, B314, 211-219.

Tümtürk H., Arslan F., Dişli A., Tufan Y., 2000, Immobilization of invertase attached to a granular dimer acid-co-alkyl polyamine, *Food Chemistry*,5-9.

Ünal H.İ., Erdoğan B., 1998, The use of sepiolite for decolorization of sugar juice, *Applied Clay Science*, 12, 419-429.

Valentin J.L., Lopez-Manchado M.A., Rodriguez A., Posadas P., Ibarra L., 2007, Novel anhydrous unfolded structure by heating of acid pre-treated sepiolite, *Applied Clay Science*, 36, 245-255.

Wisemann A., 1994, Handbook of Enzyme Biotechnology, Ellis Horwood, third Ed., U.K.

www.egitimteknolojikarastirmalar.com.tr

www.gurcانبanger.com/calismalarim/ag10.html

www.sigmaaldrich.com/catalog/search/productDetail/sigma/GAGO20

www.journalstubitak.gov.tr/engineering/issues/muh-99-23-4/muh-23-4-7-98086.pdf

www.tubitak.gov.tr/kulup/projeler/luletasi/gizemli_mineral.htm

www.wikipedia.org/wiki/Bal

www.wikipedia.org/wiki/kompozit_malzemeler

Xie S., Zhang S., Wang F., Yang M., Sequela R., Letebure J.M., 2007, Preparation, structure and thermomechanical properties of nylon-6 nanocomposites with lamella-type and fiber-type sepiolite, *Composites Science and Technology*, 2334-2341.

Yamada K., Kojima T., Bantog N., Tetsuji S., Mori H., Shiratake K., Yamaki S., 2007, Cloning of two isoforms of soluble acid invertase of Japanese pear and their expression during fruit development, *Journal of Plant Physiology*, 164, 746-755

Zhang J., Wang A., 2007, Study on superabsorbent composites. IX: Synthesis, characterization and swelling behaviors of polyacrylamide/clay composites based on various clays, *Reactive & Functional Polymers*, (baskıda).