



**KATALAZ ENZİMİNİN SİLİKA PARTİKÜLLER ÜZERİNE BASİT VE
ETKİLİ YENİ BİR YÖNTEMLE İMMOBİLİZASYONU**

Ayşenur GENÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2016

Ayşenur GENÇ tarafından hazırlanan “KATALAZ ENZİMİNİN SİLİKA PARTİKÜLLER ÜZERİNE BASİT VE ETKİLİ YENİ BİR YÖNTEMLE İMMOBİLİZASYONU” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan : Prof. Dr. Aydın AKBULUT

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Nurşen SARI

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 23/09/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Hadi GÖKÇEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Ayşenur GENÇ

23/09/2016

KATALAZ ENZİMİNİN SİLİKA PARTİKÜLLER ÜZERİNE BASİT VE ETKİLİ YENİ BİR YÖNTEMLE İMMOBİLİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayşenur GENÇ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2016

ÖZET

İmmobilize enzim sisteminin başarılı bir şekilde uygulanabilmesi ve geliştirilebilmesi için, enzim taşıyıcısı olarak kullanılan destek materyal türünün seçimi önemli bir faktördür. Bu çalışmada geniş yüzey alanı, eşsiz gözenek yapısı , mikrobiyal saldırılara karşı yüksek direnci, üstün ısısal, kimyasal ve mekanik kararlılığından dolayı silika parçacıkları destek materyali olarak seçilmiştir. Silika yüzeyine enzimin kolay bir şekilde immobilizasyonunu sağlamak için yeni bir yöntem geliştirildi. Bu yöntemle göre silika partikül yüzeyinde reaktif duyarlı çift bağların oluşturulması için tek aşamalı bir metod olan Micheal katılma reaksiyonu temel alındı. Bu yöntem temelde alfa morfolin aşılınmış poli(vinil metil keton) p(VMK)'nın ısıtılarak kendini yenileyebilen aşılınmış polimer yüzeyinde reaktif ince film oluşturulmasına dayanır. Silika partikül yüzeyi alfa morfolin aşılınmış p(VMK) ile kaplandı. Silika yüzeyinde oluşturulan çift bağlar Michael katılma yoluyla enzimin hızlı bir şekilde bağlanması için etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir. Micheal katılma reaksiyonu ile reaktif film yüzeyler üzerine immobilizasyon yönteminin verimini test etmek için referans olarak katalaz enzimi kullanıldı. İmmobilize enzim miktarı ve kinetik parametrelerin yanı sıra çeşitli koşullar altında hem serbest enzimin hemde immobilize enzimin aktiviteleri karşılaştırıldı. Son olarak düzensiz akış tipi immobilize enzim reaktörü hidrojen peroksitin ayrışma oranını hesaplamak için kullanıldı. Son derece kararlı olan enzim sistemi 120 saat boyunca 30°C' da sürekli çalıştığında başlangıç aktivitesinin yalnızca %36'sını kaybettiği gözlemlendi.

Bilim Kodu : 20107
Anahtar Kelimeler : Michael katılma, yüzey modifikasyonu, katalaz, immobilize enzim, enzim biyoreaktörleri.
Sayfa Adedi : 67
Danışman : Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

IMMOBILIZATION OF CATALASE ENZYME ON THE SILICA PARTICLES BY A
NEW FACILE AND EFFECTIVE METHOD

(M. Sc. Thesis)

Ayşenur GENÇ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

September 2016

ABSTRACT

To apply and develop immobilized enzyme systems successfully, the choice of support material which is used as the enzyme carrier is an important factor. In this work the support material is selected as the silica particles, due to a large surface area, unique pore structure, high resistance against microbial attack, superior thermal, chemical and mechanical stability. A novel method was developed for facile immobilization of enzymes on silica surfaces. According to this method, single step Michael addition reaction, which is used for making reactive sensitive double-bond on the surface of silica particles, was used. This method was based on reactive thin film generation on the surfaces by heating of impregnated self-curable polymer, alpha-morpholine substituted poly(vinyl methyl ketone) p (VMK). Silica particle surface were coated with Alpha morpholin grafted p (VMK). The generated double bonds was demonstrated to be an efficient way for rapid incorporation of enzymes via Michael addition. Catalase was used as reference enzyme in order to test the effect of immobilization methodology by the reactive film surface through Michael addition reaction. The amount of immobilized enzyme on the support, the activities of both the free and immobilized enzyme under various experimental conditions were compared as well as kinetic parameters. Finally, a plug flow type immobilized enzyme reactor was used to estimate decomposition rate of hydrogen peroxide. The enzyme system, which was very stable, could operate continuously for 120 h at 30 °C with only a loss of about 36 % of its initial activity.

Science Code : 20107

Key Words : Michael addition, surface modification, katalase, immobilized enzymes, enzyme bioreactors.

Page Number : 67

Supervisor : Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın en başından itibaren yanımda olup deneyimlerini ve bilgi birikimini paylaşan, desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU ve Sayın Prof. Dr. Yakup ARICA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bana her zaman yol gösteren , benden bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Sayın Dr. Ömer KANTOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman ve her koşulda yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini hep hissettiğim Sevgili Ceren GÜLBAĞ ve Özgür Can KAYISI' ya en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

Son olarak tüm ömrüm boyunca bana destek olan bugün bulunduğum yere gelmemi sağlayan her zaman yanımda olan aileme en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER	3
2.1. Polimer ve Sentez Yöntemleri	3
2.1.1. Basamaklı (kondenzasyon) polimerizasyonu.....	3
2.1.2. Katılma (zincir) polimerizasyonu	7
2.2. Polimerlerin Yüzey Modifikasyonları	14
2.2.1. Polimerlerin aşılama ile yüzey modifikasyonları.....	14
2.2.2. Kimyasal modifikasyon	16
2.3. Enzimlerin Genel Özellikleri.....	16
2.4. Enzimlerin Uygulama Alanları.....	17
2.5. Enzim İmmobilizasyonu	18
2.5.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler	19
2.6. İmmobilizasyon İşleminde Kullanılan Destek Materyelleri.....	25
2.7. Katalaz Enzimi ve Katalaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	26
2.8. Enzim Kinetiği.....	29
2.9. Enzim Reaktörleri	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35

	Sayfa
3.1. Materyaller.....	35
3.2. Poli (vinilmetil keton) Hazırlanması ve Poli(vinilmetil keton)'nun Bromlanması	35
3.3. α -bromlanmış p(VMK)Üzerine Morfolin Aşılama Tepkimesi	36
3.4. Silika Partikülleri Üzerinde Michael Alıcılarının Oluşturulması	36
3.4.1. P(VMK)-M kaplanmış silika partikülleri üzerindeki Michael alıcı grupların bağlanma kapasitesinin belirlenmesi.....	36
3.5. Kovalent Bağlanma Yöntemi ile Katalaz İmmobilizasyonu	37
3.6. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	38
3.6.1. Serbest ve immobilize katalazın ısısal ve depolama kararlılığının belirlenmesi.....	38
3.6.2. İmmobilize enzimin tekrar kullanım ve işlemsel kararlılığı	39
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları.....	41
4.2. Katalazın Tek Basamakta İmmobilizasyonu	44
4.2.1. Katalazın immobilizasyon verimliliğine bağlanma süresinin etkisi	45
4.2.2. Katalazın immobilizasyon verimliliğine destek miktarının etkisi	46
4.3. Katalaz İmmobilize Sistemin Biyokimyasal Karakterizasyonu	47
4.3.1. pH'ın katalaz aktivitesi üzerine etkisi	47
4.3.2. Sıcaklığın katalaz aktivitesi üzerine etkisi	48
4.3.3. Kinetik parametreler	49
4.3.4. Katalazın ısısal kararlılığı	51
4.3.5. Katalazın depolama kararlılığı	52
4.4. İmmobilize Katalazın Yeniden Kullanım ve İşlemsel Kararlılığı	53
5. DEĞERLENDİRME	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	67

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Radikalik polimerizasyonun başlatılmasında kullanılan kimyasal maddeler ve fiziksel etkenler	9
Çizelge 2.2. Bazı monomerlerin verdikleri katılma tepkime türleri	13
Çizelge 2.3. Enzim reaktör tiplerinin karşılaştırması.....	32
Çizelge 4.1. Farklı destek materyaller üzerine katalaz immobilizasyonunun K_m , V_{max} ve ısısal kararlılık değerlerinin karşılaştırılması.....	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Polimerizasyon reaksiyonları	8
Şekil 2.2. Benzoil peroksit başlatıcısından radikal oluşumu	9
Şekil 2.3. Büyüme basamağında π -elektronu aktarımı	9
Şekil 2.4. Asetil peroksitin bozunması sonucu asetil oksit radikali oluşumu	10
Şekil 2.5. <i>t</i> -bütil oksit radikali oluşumu	10
Şekil 2.6. Hidroperoksit radikalının oluşumu	11
Şekil 2.7. 2,2'-Azobisisobüronitril (AIBN) başlatıcısının radikal oluşumu	11
Şekil 2.8. AB ile gösterilen bir molekülün iyonlaştırıcı ışın varlığında verebileceği tepkimeler	12
Şekil 2.9. Anyonik polimerizasyon monomeri	13
Şekil 2.10. Katyonik polimerizasyon monomeri	14
Şekil 2.11. ATRP genel mekanizması	15
Şekil 2.12. Taşıyıcılarda enzimlerin kovalent immobilizasyonu	21
Şekil 2.13. Silika-bazlı bir materyale enzimin kovalent bağlanması	22
Şekil 2.14. Çapraz bağlayıcı ile amino gruplarından çapraz bağlanma	22
Şekil 2.15. Gluteraldehit ile çapraz bağlama	23
Şekil 2.16. Enzimin desteğe adsorpsiyon metoduyla bağlanması	24
Şekil 2.17. Gözenekli katı bir destek malzemesi içinde enzimlerin tutulması	25
Şekil 2.18. İmmobilizasyon işleminde kullanılan destek materyalleri	26
Şekil 2.19. Katalazın üç boyutlu yapısı	27
Şekil 2.20. Michaelis-Menten grafiği	30
Şekil 2.21. Linewear-Burk grafiği	31
Şekil 2.22. Kesikli karıştırıcılı reaktör	32
Şekil 2.23. Sürekli karıştırıcılı reaktör	33
Şekil 2.24. Akışkan yatak reaktör	33

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Morfolin aşılantmış p(VMK) sentezi ve ısıtarak deaminasyon sonucunda konjuge çift bağ oluşumu	41
Şekil 4.2. FTIR spektrumları	43
Şekil 4.3. Enzim immobilizasyonu için silika partiküllerin morfolin aşılantmış p(VMK) ile kaplanması ve ısıtarak Michael alıcılarının oluşturulmasından sonra p(VMK)-M kaplı silika paritküller üzerine katalaz immobilizasyonunun temsili gösterimi	45
Şekil 4.4. Katalazın immobilizasyon verimliliğine bağlanma süresinin etkisi.....	46
Şekil 4.5. Katalazın immobilizasyon verimliliğine destek miktarının etkisi	47
Şekil 4.6. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine pH etkisi	48
Şekil 4.7. pH 7,0 tamponunda hazırlanan 10 mM H ₂ O ₂ ’ in ayrışabilmesi için serbest ve immobilize katalazın sahip oldukları aktiviteye sıcaklığın etkisi.....	49
Şekil 4.8. 50mM pH 7,0 potasyum fosfat tamponunda 120 dakika boyunca 55 ve 65 °C sıcaklıklarında inkübasyon sonrası immobilize ve serbest katalazın aktivite karşılaştırmaları	51
Şekil 4.9. 50mM pH 7,0 potasyum fosfat tamponunda, 4°C sıcaklığında immobilize ve serbest katalazın depolama kararlılığı	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
[E]	Enzim
[ES]	Enzim-substrat kompleksi
[S]	Substrat konsantrasyonu
[Ü]	Ürün konsantrasyonu
C_i	Başlangıç katalaz konsantrasyonu
C_t	İmmobilizasyon sonrası katalaz konsantrasyonu
D	Saatteki seyreltme oranını
K_m	Michaelis-Menten sabiti
V	Sulu faz hacmini
V	Reaksiyon hızı
V_0	İlk hız
V_{max}	Maksimum hız
w	Silika partiküllerinin ağırlığı

Kısaltmalar	Açıklamalar
AIBN	2,2-azobis(izobutironitril)
ATRP	Atom transfer radikal polimerizasyonu
BSA	Sığır serum albumini
CAT	Katalaz enzimi
GOD	Glikoz oksidaz
HMDA	Heksametilendiamin
P(VMK)	poli(vinil metil klorür)
p(VMK)-M	morfolin aşılınmış poli(vinil metil klorür)
SBR	stiren-bütadien kauçuğu
VMK	vinil metil keton

1. GİRİŞ

Reaktif eşlenikleri ile mikroelektronik ve biyosensör cihazların tasarımı gibi katı yüzeylerin işlevselleştirilmesi, bu materyallerin geniş uygulama alanlarından dolayı hem akademik hemde endüstriyel alanda ilgi görmektedir. (Brinkman, Kratzer ve Schmidt, 1999; Yi, Kim, Yue ve Hsieh, 2000). Plazmon modifikasyonu (Suzuki, 2003) ve iyon aşılama (Liston, Martinu ve Wertheimer, 1993) gibi bazı teknikler son yıllarda popüler olmuştur. Yeni geliştirilen soğuk plazma tekniği daha büyük moleküllerin destek yüzeylerinin istenen fonksiyonları ile kovalent bağlanmasını sağlar (Grzegorzewski, Rohn, Quade, Schroder, Ehlbeck, Schluter ve Kroh, 2010).

Genel olarak bu yöntemler düşük fonksiyonel grup yoğunluğuna ve zararlı uçucu organik madde yayılmasına sebep olurlar. Ancak yüzey modifikasyonu için bazı kimyasal yöntemler yüksek fonksiyonel grup yoğunluğu ve kaplanmış destek polimer kalınlığı için kolay ayarlama sağlar (Bicak, 2014; Bayramoglu ve Arica, 2010) . Bu nedenle kimyasal yöntemler desteğin yüzey modifikasyonu için uygun bir alternatif yaklaşımın yanı sıra tek adımda kolaylıkla enzim immobilizasyonunuda sağlar. Çözünmeyen malzemelere absorplama, polimerik yüzeylere tutuklama, kapsülleme, iki fonksiyonlu reaktif ile çapraz bağlama ve kovalent bağlama gibi farklı enzim immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir (Bayramoglu, Karagoz, Yilmaz, Bicak ve Arica, 2011; Bayramoglu ve Arica 2012; Mohajershojaei, Mahmoodi ve Khosravi, 2015; Preety, 2014; Bressani, Garcia, Hirata ve Mendes, 2015). Bu yöntemler arasında enzimlerin destek malzeme yüzeyleri üzerine kovalent bağlaması en çok tercih edilen immobilizasyon yöntemidir. Çünkü kararlı kovalent bağlar enzim ve enzimin reaksiyon çözeltisi içine süzülmesini sınırlayan destek malzeme arasında oluşur (Feng, Hou, Zhao, Xu, Menkhaus ve Fong, 2014; Feng, Zhao, Wei, Li, Wei ve Fong, 2014; Cowana ve Fernandez-Lafuente, 2011).

Katalaz (EC 1.11.1.6) her biri 506 aminoasitten oluşan dört polipeptidin bir tetrameridir. Hidrojenperoksit ile tepkimeye girmesini sağlayan sahip olduğu dört porfirin hem grubudur. Hidrojen peroksitten kaynaklı dokularda oluşan serbest radikallerin sebep olacağı zararı ortadan kaldırır (Bayramoglu, Arica, Genç, Ozalp, İnce ve Bıçak, 2016). Katalazın gıda veya tekstil sanayisinde hidrojenperoksiti ortadan uzaklaştırmak, analitik alanda hidrojenperoksit veya glukoz biyosensör yapımı gibi farklı uygulama alanları vardır (Bayramoglu, Altintas ve Arica, 2012). Serbest enzimin pratik reaksiyon koşulları altında

geri dönüşümü mümkün değildir. Bu engelin üstesinden gelebilmek için enzim reaktöründe katalazın çeşitli destek materyaller üzerine immobilizasyonu enzimin yeniden kullanılabilirliğini ve sürekli uygulamasını arttırmak için etkili bir yöntemdir. Son yıllarda bir çok çalışmada katalazın immobilizasyonu için kovalent bağlama yöntemi kullanılmıştır (Feng ve diğerleri 2014; Cowana ve diğerleri, 2011; Bayramoglu ve Arica, 2014; Bayramoglu, Altintas ve Arica, 2012; Yang, Wang, Shi, Wang, Zhang, Han ve Jiang, 2016; Zang, Jia, Liu, Wu ve Zhang, 2012; Li, Wang, Jiang, Ye, Zhang ve Zhang, 2015; Cengiz, Cavas ve Yurdakoc, 2012). Örneğin Bayramoğlu ve arkadaşları tarafından poli (itakonik asit) üzerine Fe(III) iyonları şelatlanmış kitosan membranlar üzerine katalaz enzimin immobilize ederek biyokimyasal karakterizasyonunu çalışılmış ve immobilizasyon işlemi ile enzimin ısısal ve depolama kararlılığının arttığını rapor edilmiştir (Bayramoğlu ve Arica, 2010). Cengiz ve diğerleri bentonit ve sepiyolit üzerine katalaz immobilize etmiş devam eden 10 döngü boyunca işlevsel kararlılık sergilediğini göstermiştir (Cengiz ve diğerleri 2012). Feng ve arkadaşları 2-hidroksietil metakrilat, 2-dimetilamino etil metakrilat ve akrilik asit aşılansmış selüloz nanolif membran üzerine sıgır karaciğer katalazının immobilizasyonunu çalışmışlardır (Feng ve diğerleri, 2014). Genel olarak immobilize katalazın serbest katalaz enziminden daha çeşitli pH ve sıcaklıklarda yüksek kararlılık sergilediği gözlenmiştir.

Bu çalışmada alfamorfolin aşılansmış pol (vinil metil keton) silika partiküller sıgır karaciğer katalazını immobilize etmek için kullanıldı. Bu yöntem katalaz immobilizasyonu için oldukça etkilidir. Bu yöntemin en büyük avantajı yaygın modelleme yöntemi kullanılarak katı yüzeyine reaktif eşlenikler oluşturarak konjuge çift bağlar üzerine Michael katılma reaksiyonu ile amin ya da tiyol gruplarının bağlanmasının sağlamasıdır. Ayrıca oda sıcaklığı ve sulu ortamda pH 8.0 de çalışması enzim immobilizasyonu için son derece arzu edilen bir durumdur. Silika parçacıkları yüksek yüzey alanları, eşsiz gözenek yapıları, üstün ısısal ve mekanik kararlılığından dolayı seçilmiştir. Buna ek olarak silika mikrobiyal saldırılara karşı yüksek direncinden dolayı hem kimyasal hemde mekanik olarak kararlıdır. Destek üzerindeki immobilize enzim miktarı ve kinetik parametrelerin yanı sıra çeşitli koşullar altında hem serbest enzimin hemde immobilize enzimin aktiviteleri karşılaştırıldı. Son olarak immobilize katalazın işlemsel kararlılığı yığın ve düzensiz akış enzim reaktörlerinde test edildi.

2. KURAMSAL BİLGİLER

2.1. Polimer ve Sentez Yöntemleri

Polimerler büyük moleküllerden oluşan maddelerdir. Polimer moleküllerini oluşturmak üzere birbirleri ile kimyasal bağlarla bağlanan küçük moleküllere monomer denir. Monomer birimlerinden başlayarak polimer moleküllerinin elde edilmesine yol açan reaksiyonlara ise polimerizasyon reaksiyonları adı verilmektedir (Baysal, 1994:1).

Polimerler, farklı kimyasal tepkimlerden yararlanılarak sentezlenebilir. Bu tepkimeler işleyiş mekanizmalarına göre basamaklı (kondenzasyon) ve katılma (zincir) polimerizasyonu adları verilen iki temel polimerizasyon yöntemi altında toplanırlar (Saçak, 2012:15). Bu iki mekanizma türünü birbirinden farklı kılan birçok faktör vardır, ancak reaksiyonda kullanılan kimyasalların türleri ve polimerin molekül büyüklüğünün reaksiyon oluşumuyla olan ilişkisi en önemli faktörler arasında sayılabilir (Carraher ve Charles 2008).

2.1.1. Basamaklı (kondenzasyon) polimerizasyonu

Basamaklı polimerler; kondenzasyon, Friedel-Crafts, Diels-Alder, Micheal katılması gibi organik tepkimelerle hazırlanabilir. Bu tepkimeler içinde en çok kullanılan kondenzasyon tepkimeleri olduğu için bu kavram basamaklı polimerizasyon yerine kullanılmaktadır. Kondenzasyon polimerleri benzer ya da farklı polifonksiyonel monomerlerden küçük bir molekül çıkışıyla elde edilir. Burada en önemli koşul; monomerlerin polifonksiyonel olmasıdır. Hidroksil, karboksil, amin gibi gruplardan en az iki tanesini taşıyan monomerler; esterleşme, amitleşme gibi reaksiyonlar sonucu HCl, CO₂, H₂O, N₂, NH₃ gibi küçük moleküllerin çıkmasıyla kondenzasyon polimerlerini oluştururlar. Bu sentez yönteminde polimerizasyon reaksiyon boyunca polimerlerin molekül kütlelerinin yavaş yavaş artması ile ilerler ve reaksiyonun herhangi bir basamağında sistemde tüm molekül türlerinin bir karışımı bulunur. Bu özelliğinden dolayı, katılma polimerizasyonu ile kondenzasyon polimerizasyonu arasında önemli bir fark bulunur. Yani kondenzasyon polimerizasyonunda, ortamdaki herhangi iki molekül reaksiyona girip, monomer daha reaksiyonun başında tükenirken; katılma polimerizasyonunda monomer tek tek zincire katılır ve monomer konsantrasyonu reaksiyon süresi boyunca giderek azalır. Basamaklı polimerizasyonda polimerizasyonun başlamasından sonra belli bir aşamada monomer,

dimer türü küçük moleküller kalmaz, yüksek mol kütleli polimer ise ancak polimerizasyonun sonlarına doğru elde edilir (Ođian, 1970; Saçak, 2012:15-16,19).

Polimerlerin üretiminde kullanılan teknikler polimerizasyon ortamının özelliğine göre;

- Yığın polimerizasyon,
- Çözelti polimerizasyonu,
- Emülsiyon polimerizasyonu,
- Dispersiyon polimerizasyonu,
- Süspansiyon polimerizasyonu, başlıkları altında sınıflandırılır.

Yığın polimerizasyonu

Yığın polimerizasyonu, polimerizasyon çeşitlerinin en basitidir. Sıvı, katı, veya gaz halindeki monomerler bu yol ile polimerleştirilse de sıvı (ya da polimerizasyon sıcaklığında eriyen monomerlerin) polimerizasyonu için daha elverişli bir yöntemdir. Monomerlerin doğrudan başlatıcı, ısı, ışın gibi polimerizasyonu başlatıcı etkenler yardımıyla polimerleştirildiği tekniktir. Sadece monomer ve monomerde çözünen başlatıcıdan oluşur. Gerektiği durumlarda, molekül kütlelerinin kontrolü için zincir transfer ajanı kullanılabilir. Yığın polimerizasyonunun diğer polimerizasyon tekniklerinden; polimerizasyon hızının yüksek olması, temiz polimer eldesi, uygulama kolaylığı, polimerin doğrudan işlenebilmesi gibi avantajları vardır. Ancak, polimerizasyon sırasında artan ortam viskozitesi ısı aktarımını ve karıştırmayı zorlaştırır. Yığın polimerizasyonu ile elde edilen polimerlere, poli(metil metakrilat) ve polisitren gibi örnekler verilebilir (Ođian, 2004; Saçak, 2012:143).

Çözelti polimerizasyonu

Çözelti polimerizasyonunun başlangıcında polimerizasyon ortamında monomer, çözücü ve başlatıcı bulunmaktadır. Zincir transferi olmayan uygun bir çözücü içerisinde monomerin polimerleştirilmesi ile elde edilir. Çözücü polimerizasyon ortamını seyrelttiği için viskozite düşer, karıştırma kolaylaşır ve daha etkin bir ısı transferi yapılabilir.

Polimerizasyonda kullanılan çözücü hem monomeri hem de başlatıcıyı çözerse polimerizasyon homojen bir ortamda başlar, ilerler ve sonlanır. Buna homojen çözelti polimerizasyonu denir. Çözücünün monomeri çözüp, polimeri çözmemesi sonucu ortamda çözünmeyen toz ve tanecik halinde polimer kalır. Ortamın homojenliğinden söz edilemez. Bu tür çözelti polimerizasyonlarına heterojen çözelti polimerizasyonu denir.

Çözelti polimerizasyonlarında çözücü seçimine çok dikkat edilmelidir. Daha çok alifatik ve aromatik hidrokarbonlar, esterler, alkoller ve eterler kullanılır. Su çözücü olarak kullanılır, ancak çoğu organik kökenli olan monomerler kullanılarak su içerisinde çözelti polimerizasyonu gerçekleştirilemez. Poli (akrilamit), poli(akrilik asit), poli (metil metakrilat) gibi bazı polimerler ise su ortamında sentezlenebilir. Vinil asetat, akrilonitril ve akrilik asit esterleri çözelti polimerizasyonu ile polimerleştirilir (Ođian, 2004; Saçak, 2012:154).

Emülsiyon polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu genellikle sulu ortamda yürütölen bir işlemdir. Bu yöntemle ilgili ilk patent 1909 yılında Bayer firması tarafından alınmıştır. Endüstriyel boyuttaki üretim 1940'lı yıllarda stiren-bütadien kauçuğu (SBR) üretimi ile önem kazanmıştır. Günümüzde SBR kauçuğunun yanı sıra, polivinil klorür, polivinilasetat, poliakrilat ve metakrilatlar, gibi çeşitli radikal polimerizasyon ürünleri emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile üretilen polimerlerdir.

Süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile elde edilen ürün partiköl boyutu 10 µm ile 10 mm arasında olmasına karşın, emülsiyon polimerizasyonunda 0,05 ile 5,0 µm boyutlarındadır. Ayrıca, emülsiyon polimerizasyonunda sonuç ürün bir sentetik lateks, baska bir ifadeyle, polimer partiköllerinin sulu ortamdaki kararlı bir emülsiyonu şeklindedir. Emülsiyon polimerizasyonunun bir çok uygulamasında ürün lateks doğrudan kullanılır. Boya, yüzey kaplama, yapıştırıcılar, lateks köpük kauçuk bu uygulamalara örnek olarak verilebilir (Ersoy, 2015).

Dispersiyon polimerizasyonu

Dispersiyon polimerizasyonu uzun yıllardır bilinen bir teknik olmakla beraber, tek basamakta mikron veya nano büyüklükte monodispers polimer parçacıklarının hazırlanması için ilgi çekici bir yöntem sunmaktadır. Dispersiyon polimerizasyonu tek basamakta 0,1-15,0 μm büyüklükte, bazen de oldukça dar veya monodispers moleküler ağırlık dağılımına sahip parçacık oluşumunu sağlayan eşsiz bir polimerizasyon yöntemidir (Barret, 1975).

Eş boyutlu partiküllerin sentezlenmesi için seçilen dispersiyon polimerizasyonu, bu özelliğinden dolayı süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyonları arasındaki boşluğu doldurmaktadır. Bu yöntem, birçok polimerin sentezlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Barret, 1975; Karabacak, 2006; Yavuz, Bayramoğlu, Kaçar, Denizli ve Arıca, 2002).

Oluşan parçacıkların boyutları, genellikle ortamda oluşturulan polimerin çözünürlüğüne bağlıdır. Oluşturulan polimer, iyi bir çözünürlüğe sahip ise, polimer zincirlerinin agregasyonu gecikmekte, bu da daha büyük çapa sahip parçacıkların oluşmasına yol açmaktadır. Polimer daha düşük bir çözünürlüğe sahip ise, polimer daha çabuk pıhtılaşır ve daha küçük boyuttaki partiküller elde edilir (Kim, 1996).

Süspansiyon polimerizasyonu

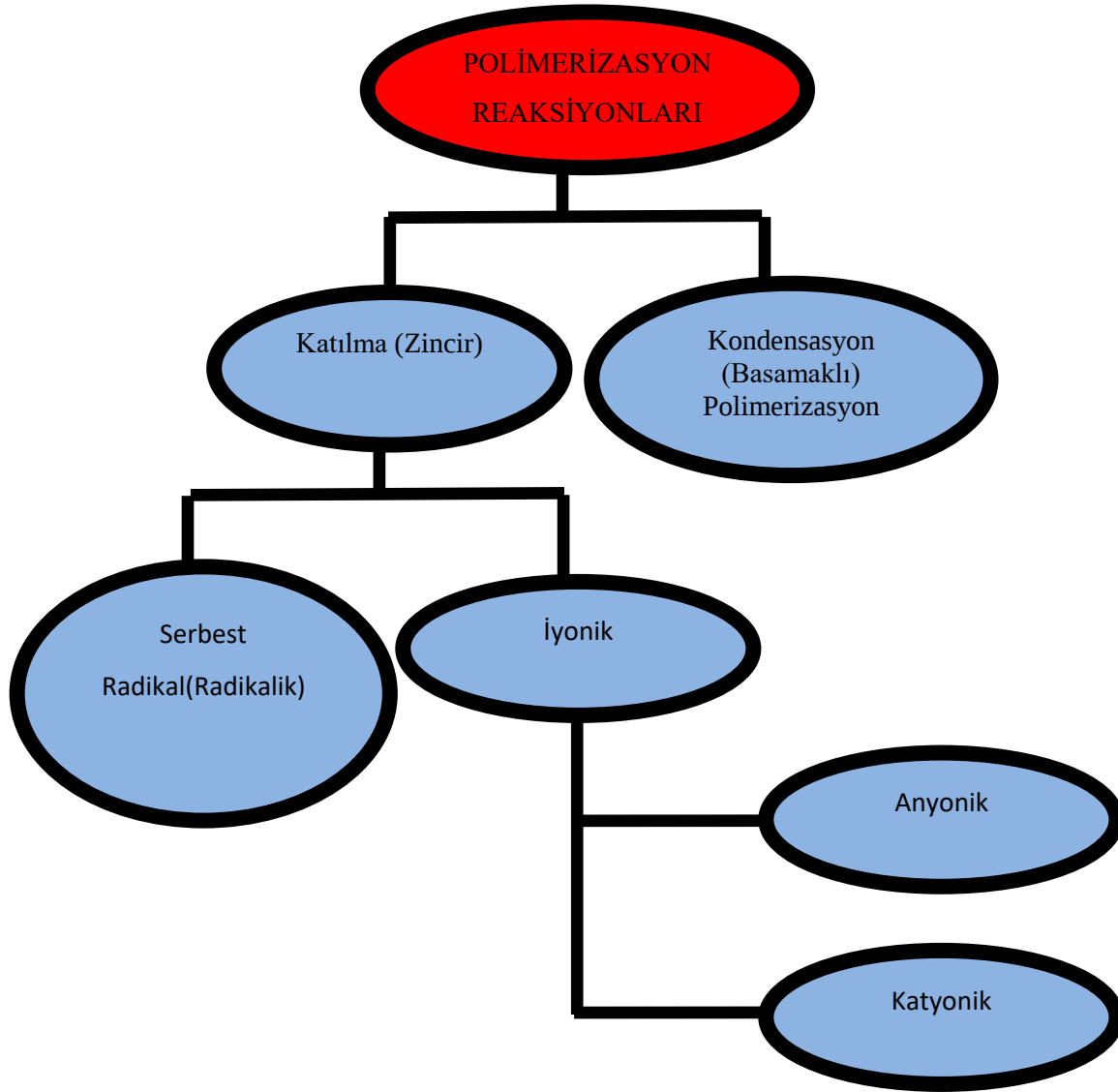
Süspansiyon polimerizasyonu günümüzde birçok ticari polimerin üretiminde kullanılmaktadır. Günümüzde akrilik ve metakrilik asitler, stiren ve kopolimerleri, vinil asetat, vinil klorür ve daha pek çok doymamış monomerin polimerizasyonunda kullanılan bir heterojen polimerizasyon tekniğidir. Düzgün küresel tanecik oluşturması nedeniyle teknik, boncuk ya da inci polimerizasyonu olarak da adlandırılır (Marck ve Gaylord, 1985).

Süspansiyon polimerizasyonu ilk kez 1909 yılında Hoffman ve Delbruch tarafından geliştirilmiştir (Hofmann ve Delbruck, 1909; Vincent ve Dowding, 2000; Arıca, Bayramoğlu ve Altıntaş, 2009). Bu teknikte monomer veya monomerler sürekli karıştırma ile suda asılı damlalar halinde tutulur ve bu yolla, birbiri ile karışmayan iki ayrı faz oluşur. Bu yöntemin avantajları; düşük ortam viskozitesi, sıcaklık kontrolünün iyi yapılabilmesi ve

daha homojen bir molekül kütlesi dağılımı elde edilmesidir. Süspansiyon polimerizasyonunda reaksiyon alanı küçük damlalara bölündüğünden polimerizasyon ısısı daha kolay uzaklaştırılabilir(Elias, 1977). Süspansiyon proseslerinin, önemli avantajlarından biri de, bu yöntemde ürün tanecik boyunun çok daha kolay ayarlanabilmesi ve istenilen boyda ürün elde edilebilmesidir.

2.1.2. Katılma (zincir) polimerizasyonu

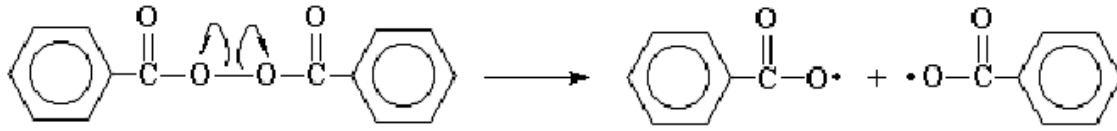
Katılma polimerizasyonunda monomer molekülleri, büyümekte olan polimer zincirlerine birer birer ve hızla katılırlar. Hızlı zincir büyümesi nedeni ile polimerizasyonun her aşamasında yalnız yüksek molekül kütleline sahip polimer ve tepkimeye girmemiş monomer bulunur. Bu yöntem ile genellikle çift bağ içeren; vinil klorür [$\text{CH}_2=\text{CHCl}$], propilen [$\text{CH}_2=\text{CHCH}_3$], etilen [$\text{CH}_2=\text{CH}_2$], akrilonitril [$\text{CNCH}=\text{CH}_2$], izobütilen [$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}_2$], stiren [$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CH}_2$] vb. dienlerin ve vinil monomerlerinin polimerizasyonu gerçekleşmektedir (Saçak, 2012:20-21). Katılma polimerizasyonu başlatmak için iyonlar (katyon veya anyon) veya serbest radikaller (benzoil peroksit, azobisisobütironitril) kullanılmaktadır. Bu başlatıcılar varlığında gerçekleşen katılma polimerizasyonu yöntemlerinde polimer zinciri çok kısa sürede (0,1 saniye) yüksek molekül kütleline ulaşır. Üstelik hiçbir ara ürün oluşumu da gerçekleşmez. Tepkime süresinin ilerlemesi ile monomerlerin polimere dönüşümü artar fakat polimer, monomerlerin aktif merkezlere ard arda hızlı bir şekilde katılmasıyla bir anda oluştuğundan reaksiyon süresinin uzun olması durumunda reaksiyon veriminde artış gözlenirken molekül kütleinde önemli bir artış gözlenmez (O'dian, 2004).



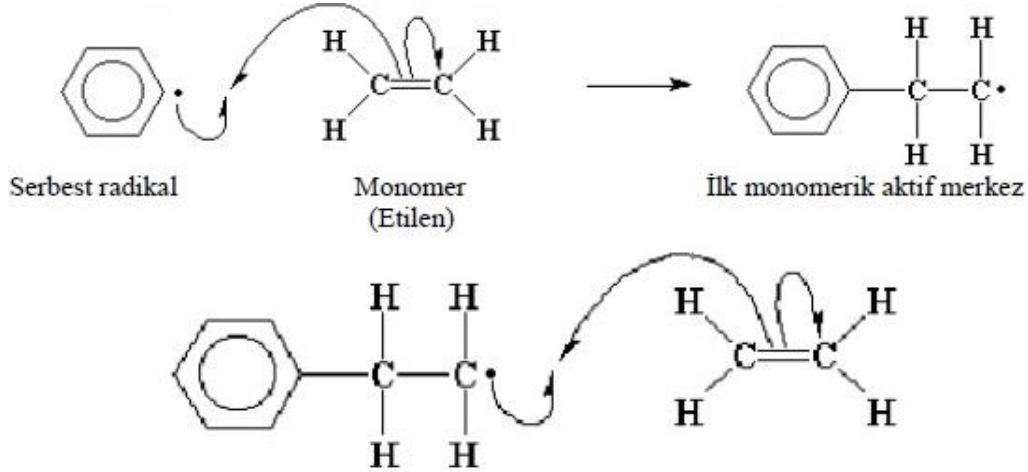
Şekil 2.1. Polimerizasyon reaksiyonları

Radikal katılma polimerizasyonu

Polimerizasyon radikaller üzerinden başlar ve zincir büyümesi de aynı şekilde radikaller üzerinden gerçekleşir (Liu ve Wang, 2016). Radikalik polimerizasyona yatkın bir monomerin polimerizasyonu, bu monomerin varlığında polimerizasyon ortamında serbest radikaller oluşturularak başlatılır (Şekil 2.2). Büyüme basamağında aktif bir zincirin ucundaki tek elektron, monomerin çift bağındaki π -elektronlarından birisi ile etkileşerek yeni bir monomeri polimer zincirine katar. Diğer π -elektronu zincir ucuna aktarılır (Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Benzoil peroksit başlatıcısından radikal oluşumu



Şekil 2.3. Büyüme basamağında π -elektronu aktarımı

Polimerizasyonu başlatabilecek serbest radikaller bazı kimyasal maddeler ve fiziksel etkenlerden oluşmaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Radikalik polimerizasyonun başlatılmasında kullanılan kimyasal maddeler ve fiziksel etkenler

Kimyasallar	Fiziksel Etkenler
Organik peroksit veya hidroperoksitler	Isı
Azo bileşikler	Işık ve UV-ışınları
Redoks başlatıcılar	Yüksek enerjili ışınlar
	Elektrokimyasal yöntem

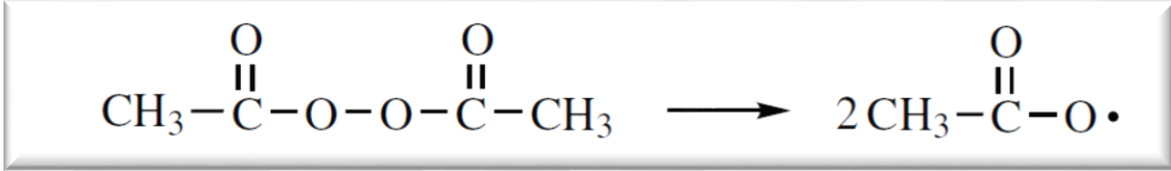
1. Radikalik polimerizasyon işleminde başlatıcı olarak kullanılan kimyasallar

Organik moleküllerin ısı bozunmasıyla parçalanma

Diaçil peroksitler, dialkil peroksitler, organik hidroperoksitler, azo bileşikleri gibi organik bileşikler ısı etkisi ile parçalanarak serbest radikaller oluşturabilmektedir. Bu bileşiklerin radikalik polimerizasyonda başlatıcı olarak kullanılabilmesi için polimerizasyon tepkimlerinin yürütüldüğü sıcaklık aralığında yeterli sayıda radikal üretip üretmediklerinin bilinmesi gerekmektedir (Saçak, 2012: 261).

Diaçil peroksitler

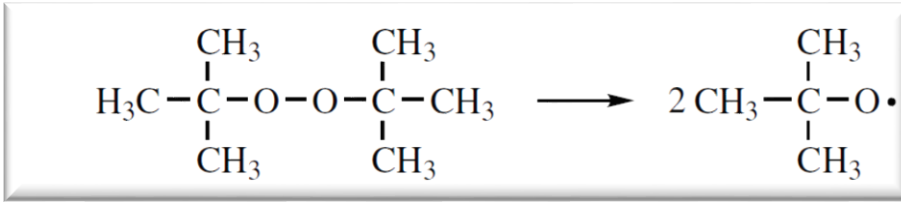
Diaçil peroksitler (R-C(O)-O-O-C(O)-R), oksijen-oksijen bağının homolitik kırılması sonucunda serbest radikal oluştururlar (Şekil 2.4) (Buback, Frauendorf, Günzler ve Vana, 2007).



Şekil 2.4. Asetil peroksitin bozunması sonucu asetil oks radikali oluşumu

Dialkil peroksitler

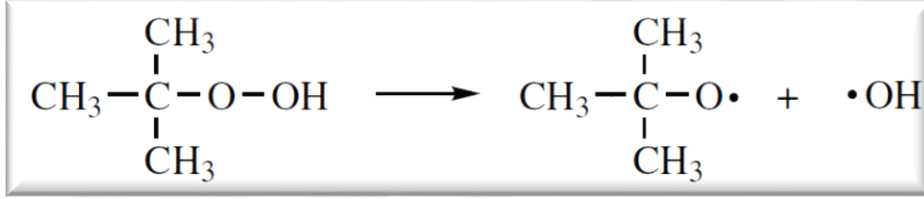
Dialkil peroksitler (R-O-O-R) ısı etkisiyle bozunur ve 2 alkoksi radikali (R-O•) verirler (Şekil 2.5) (Sheppard ve Kamath, 2004).



Şekil 2.5. *t*-bütil oks radikali oluşumu

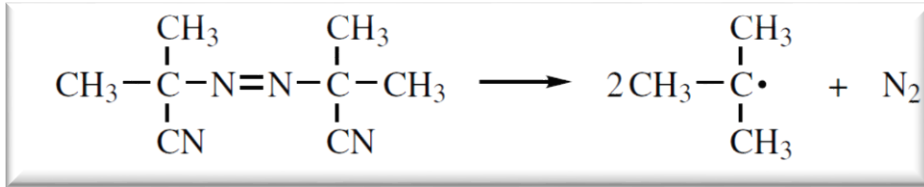
Organik hidroperoksitler

Organik hidroperoksitler (R-O-OH), radikalik başlatıcı olarak kullanılan bir diğer kimyasal madde grubudur. Parçalanmaları oksijen-oksijen bağı üzerinden gerçekleşir. Hidroperoksitler radikallere karşı duyarlı yapılardır. Polimerizasyon ortamında bulunan radikal türleriyle kolayca etkileşime geçerek peroksi radikallerine dönüşürler (Şekil 2.6) (Odion, 1970; Saçak, 2012: 265).



Şekil 2.6. Hidroperoksit radikalinin oluşumu

Bozunma sıcaklıkları düşük olan azo bileşiklerinin (R-N=N-R), kullanım sıcaklık aralıklarının geniş olması ve ayrıca bozunmaları sırasında açığa çıkardıkları azot gazı miktarının kolay bir şekilde belirlenebilmesi sayesinde ürettikleri serbest radikal sayısının hesaplanabilmesi gibi avantajlarından dolayı yaygın olarak kullanılan başlatıcı türleridir (Şekil 2.7) (Chamulitrat, Takahashi ve Mason, 1989).



Şekil 2.7. 2,2'-Azobisisobütironitril (AIBN) başlatıcısının radikal oluşumu

Redoks tepkimeleriyle başlama

Redoks başlatıcılar genellikle suda çözünen ve oda sıcaklığına yakın bir sıcak değerinde indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimleri ile radikal üretebilen bileşikleridir.

1. Radikalik polimerizasyon işleminde başlatıcı olarak fiziksel etkenler

Radikalik polimerizasyon hem ısı hemde fotokatalitik olarak başlatılabilir (Otsu ve Yoshida, 1982).

Isıl başlama

Katılma polimerizasyonunda kullanılan bazı monomer çeşitleri ısı etkisi ile kendiliğinden polimerleşirler. Isıl katılma polimerizasyonunun hızı uygulamanın yapıldığı sıcaklığa bağlıdır ve tepkime genellikle yavaş ilerler. Metil metakrilat ve stiren ısı etkisi ile kendiliğinden polimerleşen monomerlerdendir. Stirenin 60 °C daki ısı polimerizasyonunda 1 saat sonunda monomerin %0,1'inin polimerleştiği, sıcaklığın 127

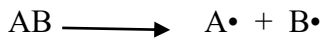
°C'ye çıkarılması ile tepkime hızının %14 ulaştığı rapor edilmiştir (Teramoto, Motoyama, Yasomiya ve Shibata, 2003; Saçak, 2012: 269).

Fotokimyasal başlama

Bazı monomer türleri görünür bölge ve UV-ışınları etkisine maruz kaldığında doğrudan polimerleşir ve bu polimerizasyona *fotopolimerizasyon* adı verilir. Özellikle zayıf karbon-halojen bağları bulunduran monomerler fotopolimerizasyona yatkındırlar. Metil metakrilat, vinil bromür, akrilamit, stiren ve vinil alkil ketonlar monomerleri kullanılarak UV-fotopolimerizasyona tekniği ile polimerler hazırlanabilmektedir (Bayramoğlu ve Arıca, 2009).

Yüksek enerjili ışınlar ile başlama

Radikalik zincir polimerizasyonunu başlatmada kullanılan bir diğer yöntem ise saf haldeki monomerin veya monomer çözeltilerinin hızlandırılmış elektronlar ya da nötronlar gibi taneciklerle, γ - ya da X- ışınları ile etkileştirilmesidir. Vinil klorürü akrilonitril, metil metakrilat, stiren, izopren gibi monomerler iyonlaştırıcı ışınların varlığında polimerleşirler. Yüksek enerjili ışınlar bulunduğu ortamdaki taneciklerden elektron koparacak kadar fazla enerjiye sahiptirler(MaolIn, Jun, Min, Hongfei, 2000). Seçicilik özellikleri olmadığından monomer ve bunun yanında ortamda bulunan diğer türdeki moleküllerden de elektron koparabilirler (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. AB ile gösterilen bir molekülün iyonlaştırıcı ışın varlığında verebileceği tepkimeler

Elektrokimyasal başlama

Elektrokimyasal başlamada, radikal, anyon, katyon gibi polimerizasyonu başlatacak aktif türler elektrotlar üzerinde gerçekleşen tepkimeler ile oluşturulur ve bu tepkimeler elektropolimerizasyon olarak adlandırılır. Polianilin, polipropil gibi iletken polimerlerin hazırlanmasında kullanılan etkin bir yöntem olmasının yanı sıra monomerlerin büyük çoğunluğunun polimerleşmesinde de kullanılır (Silvestri, Gambino ve Filardo, 2005).

İyonik katılma polimerizasyonu

Her monomer polimerizasyonu sağlayan aktif merkezlere karşı farklı bir ilgi gösterir (Çizelge 2.2). Monomerlerin büyük çoğunluğu radikal başlatıcılar ile polimerleşir fakat tepkime hızları oldukça farklılık gösterir. Monomerler iyonik başlatıcılara karşı seçimli bir davranış gösterirler (Baysal, 1994:119; Silvestri, Gambino ve Filardo, 2005).

Çizelge 2.2. Bazı monomerlerin verdikleri katılma tepkime türleri

Monomer	Formülü	Serbest Radikal	Anyonik	Katyonik
Etilen	$\text{CH}_2 = \text{CH}_2$	+	-	+
Propilen	$\text{CH}_2 = \text{CHR}$	-	-	+
İzobütilen	$\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_3)_2$	-	-	+
Bütadien-1,3	$\text{CH}_2 = \text{CHCH} = \text{CH}_2$	+	+	+
Stiren	$\text{CH}_2 = \text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)$	+	+	+
Akrilatlar	$\text{CH}_2 = \text{CHCOOR}$	+	+	-
Akrilonitril	$\text{CH}_2 = \text{CHCN}$	+	+	-

Katılma polimerizasyon tepkimeleri radikaller ile gerçekleştiği gibi katyon ya da anyonların varlığında da gerçekleşebilmektedir.

Anyonik polimerizasyon

İyonik polimerizasyon tepkimesinin bir türü olan anyonik polimerizasyonda zincir büyümesini sağlayan aktif gruplar anyonik karakterlidir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Anyonik polimerizasyon monomeri

Vinil asetat, metakrilamit, akrilamit, metil metakrilat vinil asetat, stiren gibi elektron çekici gruplarsa sahip olan monomerler anyonik polimerizasyon tepkimesi ile polimerleşirler. Başlatıcı olarak alkali metaller, grignard bileşikleri, iyonlaştııcı ışınlar kullanılabilir.

Szwarc yaptığı çalışmalar sonucunda anyonik polimerizasyon tepkimesi ile istenilen molekül kütesine ship polimer sentezlemeyi başarmıştır ve bu da yüksek performanslı malzemelerin üretiminin önünü açmıştır (Szwarc, 1968).

Kasyonik polimerizasyon

Kasyonik polimerizasyonda büyümeyi sağlayan aktif gruplar pozitif uçludur (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Kasyonik polimerizasyon monomeri

Başlatıcı olarak çoğunkla HCl, H₂SO₄ gibi mineral asitleri, Lewis asitleri ve Friedel Carft katalizörleri kullanılır. Lewis asitleri çoğu zaman Lewis bazları veya proton verici bileşikler ile birlikte kullanılır (Ledwith, 1974).

2.2. Polimerlerin Yüzey Modifikasyonları

Doğal ve sentetik polimerler, sanayinin istediğini bazen tam olarak karşılayamamaktadır. Son yıllarda doğal ve sentetik polimerlerin modifikasyonu ile yeni polimerlerin sentezi büyük önem kazanmıştır. Polimerlerin özelliklerini iyileştirebilmek için kimyasal reaksiyonlar ile polimer moleküllerinde bazı değişiklikler yapılmaktadır. Bu tür değişikliklere modifikasyon adı verilir.

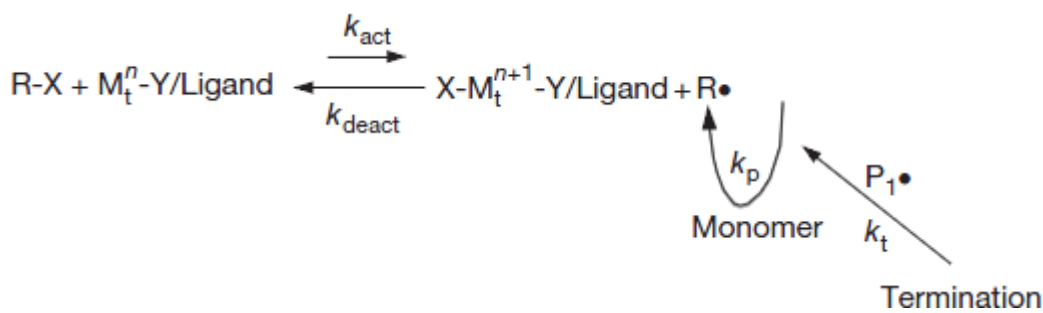
2.2.1. Polimerlerin aşılama ile yüzey modifikasyonları

Polimerlerin modifikasyon yöntemleri arasında, aşılama umut verici yöntemlerden biridir. Prensip olarak, aşı ko-polimerizasyonu bir polimerin fonksiyonel gruplarına çeşitlilik vermek için çekici bir yöntemdir (Marck ve Gaylord, 1985; Bayramoğlu, Metin ve Arıca, 2010; Bayramoğlu ve Arıca, 2016; Bayramoğlu, Tekinay, Ozalp ve Arıca, 2015).

Dikkate değer çalışmalarda, polimerik iskeletlere farklı monomerlerin polimer zincirleri, aşı kopolimerizasyon teknikleri ile yapılmıştır (Rattan ve Sehgal, 2012; Thakur M.K., Thakur V.K. ve Gupta, 2013; Thakur ve Kessler, 2014; Moawia, Nasef, Mohamed ve Ripin, 2016). Bu teknikler arasında kimyasal, radyasyon, fotokimyasal, plazma kaynaklı teknikler ve enzimatik aşılama bulunmaktadır.

Atom transfer radikal polimerizasyonu tekniği ile aşılama (ATRP)

ATRP tekniği, kontrollü ve/veya yaşayan polimerizasyon alanında son yıllarda geliştirilen ve kontrollü, dar molekül kütlesi dağılımına sahip polimerlerin elde edilmesine, tanımlanmış kompleks makromoleküler yapıların sentezine olanak sağlayan bir yöntemdir (Çelikkıçak ve diğerleri, 2014). ATRP, bir polimer zincir sonu ile geçiş metal kompleksi arasındaki, bir halojen atomunun transferini içerir (Şekil 2.11). ATRP’de monomer olarak metakrilat, stiren, akrilamit ve akrilonitril başarıyla kullanılmaktadır. ATRP’de başlatıcı olarak alkil halojenürler (R-X) kullanılmaktadır. Atom transfer radikal polimerizasyonunda kullanılan geçiş metalleri bakır (Cu), demir (Fe), rutenyum (Ru), nikel (Ni), kobalt (Co), paladyum (Pd) ve renyum (Re) tuzlarıdır (Matyjaszewski, 2002). Bu teknikte 2,2-bipiridin, tetrametiletilediamin (TMEDA), tris[2-diametilaminoetilamin] (Me6TREN) ve alkilpiridilmetanimin gibi ligandlar kullanılmaktadır (Karagöz ve diğerleri, 2010; Çelikkıçak ve diğerleri, 2014; Granville ve Brittain, 2004).



Şekil 2.11. ATRP genel mekanizması

ATRP ile homopolimerler, kopolimerler (rastgele, aşı, blok vb.) ve çeşitli topolojilere sahip makromoleküller sentezlenebilir (Wang ve Matyjaszewski 1995). Bu yöntemle, istenilen zincir uzunluğuna sahip fonksiyonel gruplar içeren nano-fibril yapıda polimerik zincirlerin çeşitli polimerik yüzeylerde sentezlenmiş ve biyomedikal ve biyoteknoloji alanında çok sayıda uygulamaları literatürde rapor edilmiştir (Bayramoğlu ve Arica, 2009). Biyolojik katalizörlerin tutuklanmasında zincir aşılama kullanımı bu aşı zincirlerinin kısmi

mobilitesi ve difüzyon kısıtlamalarını azaltması nedeni ile olumlu sonuçlar alındığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Bayramoglu ve diğerleri, 2009).

Bayramoğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada p(HPMA/EGDMA) küreler süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanmış ve 2-bromo-2-methylpropionyl bromide ile kürelerin yüzeyi fonksiyonel hale getirilmiştir. CuBr/ Bipridin ve dioksan varlığında ATRP yöntemiyle küre yüzeyine p(GMA) fırçaları aşılantmıştır. Küreler agmatin ile fonksiyonelleştirilip sulu ortamdan serum albumini adsorpsiyonu çalışmalarda kullanılmıştır.

2.2.2. Kimyasal modifikasyon

Kimyasal modifikasyon son yıllarda polifonksiyonel polimer materyallerinde olan ihtiyaç ile ilgili olarak sürekli gelişme göstermektedir (Kurbanova, 1976). Yüzeylerin modifikasyonunda doğrudan kullanılan veya başka modifikasyon türüyle modifiye edilmiş yüzeylere yeni grupların bağlanmasını sağlayan bir modifikasyon türüdür. Kendiliğinden düzenlenme modifikasyonu da bu modifikasyon yöntemine dahil edilebilir. Özellikle yüzeye bağlı grupların, amitleşme, esterleşme veya shiff bazı oluşumu gibi reaksiyonlarla modifiye edilmesinde oldukça sık kullanılan bir modifikasyon türüdür. Örneğin yüzeye bağlı bir amin ile karbodiimitle aktiflenmiş bir asitin amitleşmesi, tıyoniklorürle aktiflenmiş bir karboksilik asit grubuyla bir alkol grubunun esterleşmesi, amin grubuyla aldehit grubunun alkol ortamında belirli sıcaklıkta shiff bazı oluşturması bu modifikasyon türüne örnek olarak verilebilir (Rahman, Won ve Shim, 2003; Salimi, Hallaj ve Khayatian, 2005).

2.3. Enzimlerin Genel Özellikleri

Protein yapısında olan suda çözünen ve spesifik olarak tepkimeleri katalize eden enzimler, diğer proteinler gibi 12.000 - 1.000.000 arasında değişen hatta bu değerin üstüne çıkabilen moleküler kütleye sahiptirler. Canlı hücrelerde sentezlenen enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek, uzun sürede ve zor şartlar altında gerçekleşen tepkimelerin daha kısa sürede ve az enerji harcanarak gerçekleşmesine olanak tanıdıkları için biyolojik katalizörler olarak da bilinirler (Teramoto, Notoyama, Yasomiya ve Shibata, 2003).

Enzimler düzenli tepkime dizilerindeki aktiviteleriyle besin moleküllerinin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizlerler, böylece kimyasal enerjiyi korur, dönüştürür ve basit moleküllerden biyolojik makromoleküller üretirler (Nelson ve Cox 2005).

2.4. Enzimlerin Uygulama Alanları

Tekstil, eczacılık, tıp, gıda, gibi birçok alanda kullanılan enzimlerin katalizörlere kıyasla düşük sıcaklık ve basınçta çalışabilme, yüksek katalitik aktivite, hassasiyet ve spesifik olma gibi üstünlükleri vardır. Günümüzde kullanılan enzimlerin ilk uygulamaları antik çağa kadar dayanmaktadır. O dönemlerde peynir, bira, mayalı ekmek, şarap, sirke üretiminde; keten, deri gibi malzemelerin yapımında kullanılmaktaydı (Kirk ve diğerleri, 2002). Enzimler seçici olarak endüstriyel kimyasal sentez reaksiyonlarını kataliz eden yararlı biyolojik moleküller olarak kabul edilmektedir. Bu yüzden, saf molekül ihtiyacının fazla olduğu, ilaçların, kimyasalların ve zirai kimyasal maddelerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Dufresne ve Vignon 1998).

Enzimler hücre dışında da katalitik aktivite gösterdikleri için hücrelerinden izole edilerek çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilirler. Enzimlerin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak da üretilmeleri mümkündür. Örneğin, tripsin enzimi büyük baş hayvanların pankreaslarından, nişastayı parçalayan alfa-amilaz enzimi çimlenmekte olan arpadan, lizozim enzimi yumurta akından üretilebilir. İçeceklerin bozulmasını önlemek için *Aspergillus niger*'den biyoteknolojik metotlarla üretilen katalaz enzimi kullanılmaktadır (Chaplin ve Bucke, 1990).

Son yıllarda enzimlerin kağıt hamuru üretiminde ve kağıt endüstrisinde kullanılabilmesi için yapılan çalışmalarda oldukça artış gözlenmiştir. Ağartma ve mürekkep giderme işlemlerinde çoğunlukla lakkaz, selüloz, katalaz, lipaz ve ksilaz enzimleri kullanılmaktadır (Varalakshmi ve Siva, 2013).

Medikal alanda kullanılan birçok enzim arasında hazmı kolaylaştırıcı ve proteini parçalayan proteaz, nişastayı parçalayan selüloz, yağları parçalayan lipaz ve laktozu parçalayan laktaz enzimleri örnek verilebilir (Brant ve diğerleri, 2004).

Enzimlerin çok kullanıldığı bir diğer alan ise deterjan endüstrisidir. Deterjanlar kullanılacakları alana göre içeriğinde değişiklik gösteren kompleks karışımlardır. Bazı deterjanlar alkali koşullarda aktivite gösteren alkali-protez (bazik) enzimlerini içerirler, bazı deterjanların yapımında da amilaz, selüloz ve lipazlar kullanılmaktadır. Bu enzimlerin etkisi ile özellikle protein, yağ ve nişastanın tesiriyle oluşan kirlilik etkisi bir şekilde temizlenir (Fuentes ve Roberts, 1988).

Endüstriyel çalışmaların büyük çoğunluğu sulu çözeltili ortamlarda gerçekleştirildiğinden, katalizör olarak kullanılan serbest enzimlerin aktivitelerini kaybetmeden geri kazanılmaları mümkün değildir. Son yıllarda bu sorunların giderilmesi amacıyla birçok çalışma yapılmış ve çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (John, 1985; Juang, Wu ve Tseng, 2002). Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimlerin geri kazanımlarının düşük ve zor olması, tekrar kullanım imkanlarının sınırlı olması gibi dezavantajlar enzimlerin çözünmeyen katı bir desteğe tutunmasını ifade eden immobilizasyon işlemi ile giderilebilmektedir (Teramoto ve diğerleri, 2003).

2.5. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimlerin katalitik aktivitesini kaybetmeden sürekli ve defalarca kullanımını sağlamak, kararlılıklarını arttırmak için modifikasyon ile çeşitli destek malzemeleri üzerine fiziksel (iyonik bağlanma, afinite, hidrofobik bağlanma v.b.) veya kimyasal (kovalent bağlanma) yöntemle hapsedme (sabitlenme) işlemidir (Zaborsky, 1973). İmmobilizasyon terimi sadece enzimler değil hücreler, mikrobiyal hücreler, bitki ve hayvan hücreleri gibi tüm biyokatalizör tiplerine de uygundur (Tanaka ve Kawamoto, 1999).

Enzim immobilizasyonu işleminin sağladığı avantajları;

- ✓ Yüksek kararlılık ve tepkime sırasında aktivite artışı,
- ✓ Enzimin reaksiyon ortamından istenildiğinde kolayca uzaklaştırılabilmesi,
- ✓ Çoklu enzim reaksiyon sistemleri için kolaylıkla uygulanabilirliği,
- ✓ Tekrar kullanılabilirliğinin fazla olması,
- ✓ Elde edilen ürünleri kirliletmemesi (enzim içermemesi),
- ✓ Enzim çalışma koşullarının kolayca kontrol edilebilmesi,
- ✓ Çevre koşullarına (pH, sıcaklık... vb.) karşı daha dayanıklı olması,

- ✓ Endüstri ve ilaç sanayisinde kullanılabilirliği ve
- ✓ Kirletici atık oluşumunun en az seviyede olması

olarak sıralanabilir (Arica, 2000).

Bu avantajların yanı sıra immobilizasyon işleminin sunduğu bazı dezavantajlar ise;

- ✓ İmmobilizasyon işleminde kullanılan polimerik destek materyalin streik engellemesinden dolayı enzimin biyolojik aktivite kaybına uğrayabilmesi,
- ✓ Enzimin immobilizasyon koşullarından etkilenebilmesi,
- ✓ Aktivasyon için gerekli olan aminoasitler üzerinden bağlanmanın gerçekleşebilmesi,
- ✓ Genelde gelişmiş ve özel ekipmanlar gerektirdiğinden immobilizasyon işleminin maliyetli olması

şeklinde sıralanabilir (Arica, 2000).

2.5.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler

Enzimlerin destek materyallere tutuklanmasında kovalent bağlanma, adsorpsiyon, fiziksel tutuklama gibi çeşitli immobilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır (Arica, 2000). Enzim immobilizasyonunda enzim ve destek malzemesi arasında kimyasal veya fiziksel etkileşimlerin yer aldığı temel iki yöntem vardır. Fiziksel etkileşimler üç boyutlu bir matris içinde enzimin tutuklanması veya organik/inorganik bir polimer içinde kapsüllenmesi yöntemlerini; kimyasal etkileşimler ise adsorpsiyon, kovalent bağlanma veya çapraz bağlanma yöntemlerini içerir. Bu yöntemlerin her birinin kendilerine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (Fernández, Sanromán ve Moldes, 2012).

Enzim immobilizasyon yöntemi seçilirken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın enzimin aktif merkezinde gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon sırasında ve immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezine zarar vermeyecek bir yöntem olmalıdır. Uygun immobilizasyon yöntemi seçiminde 4 ana ölçüt göz önüne alınmalıdır. Bu ölçütler, kararlılık, güvenilirlik, maliyet ve aktivitedir. Bu ölçütler içinde enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir (Önal, 2000).

Enzim immobilizasyon yöntemleri genel olarak iki şekilde sınıflandırılırlar:

1. Kimyasal yöntemler

- ✓ Kovalent bağlama
- ✓ Çapraz bağlama
- ✓ İyonik bağlanma

2. Fiziksel yöntemler

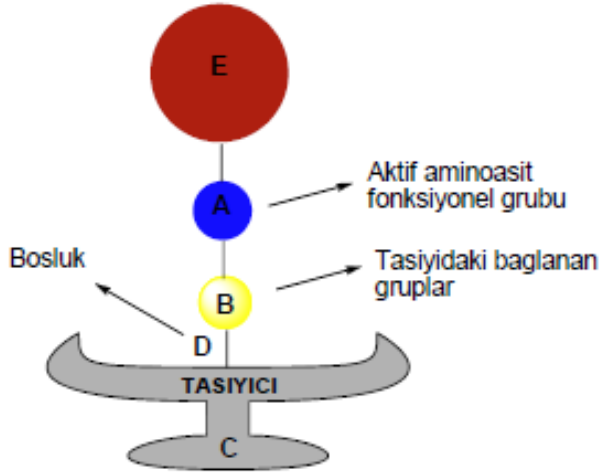
- ✓ Adsorpsiyon
- ✓ Hapsetme

Kimyasal yöntemler

Kovalent bağlama

Enzim immobilizasyonu için kullanılan kimyasal yöntemlerden biri kovalent bağlamadır ve bu yöntem enzim immobilizasyonda geleneksel bir metottur (Nisha, Arun ve Gobi, 2012). Enzimin karboksil, hidroksil, amino gibi fonksiyonel grup içeren desteğe kovalent bağlanması ile immobilizasyon gerçekleşir (Şekil 2.12).

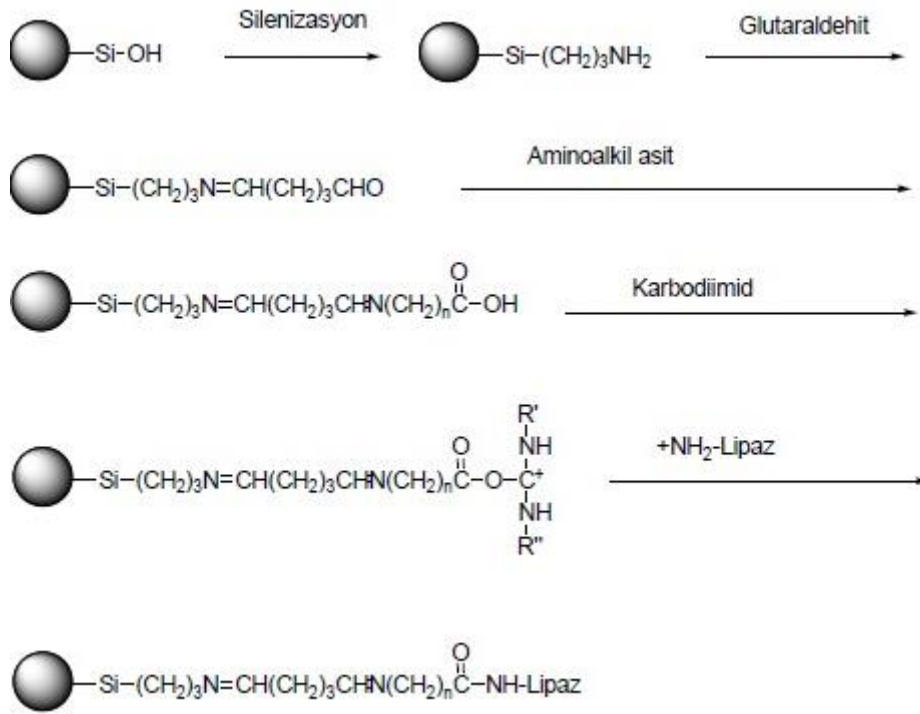
Fonksiyonel grup ve desteğin seçimi enzim ve desteğin davranışı ve enzimin dayanıklılığına bağlıdır. Desteğin fonksiyonel gruplara kovalent bağlanması katalitik hareket için enzimin yapısında gerekli olmayan bölgeden yapılır. Enzim dayanıklılığını artırmak için inhibitör veya substratın varlığında enzimin bağlanması, tersinir enzim-inhibitör kompleksi oluşturma ve enzimin çapraz bağlayıcı ile kimyasal olarak modifiye edilmesi gibi kullanılan bir kaç koruyucu teknikler bulunmaktadır (Cao, Langen ve Sheldon, 2003).



Şekil 2.12. Taşıyıcılarda enzimlerin kovalent immobilizasyonu : (A) Aktif amino asit fonksiyonel grubu; (B) taşıyıcıların bağlama özelliği; (C) taşıyıcı; (D) boşluk

Genellikle, enzimler taşıyıcıya bağlamadan önce veya taşıyıcılar enzim bağlamak için kullanılmadan önce aktivite edilerek daha etkin bir immobilizasyon işlemi gerçekleştirilebilir. Bağların sayısı veya bağlanma modelinin kontrolü olan birçok durumda gereklidir (Gemeiner, 1992; Glazer, Bar-Eli ve Katchaski, 1962).

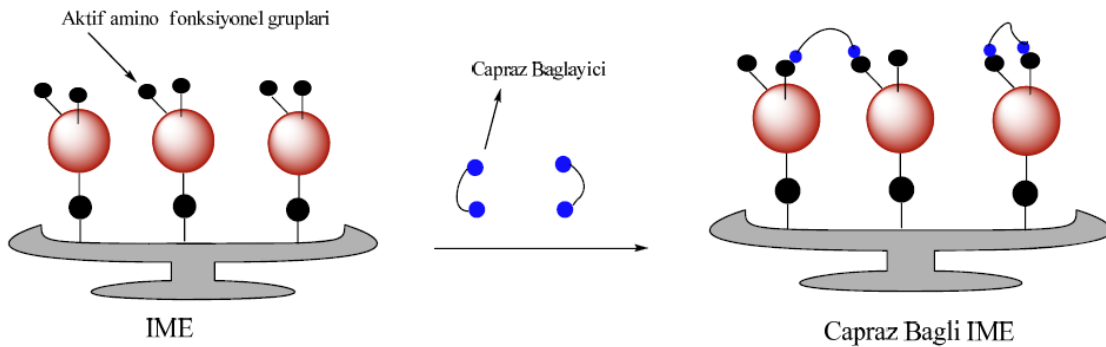
Kovalent immobilizasyona bir örnek olarak Cho ve Rhee (1993) tarafından gerçekleştirilen silika bazlı immobilizasyonu verebiliriz. Bu immobilizasyon şeması Şekil 2.13 de verilmiştir.



Şekil 2.13. Silika-bazlı bir materyale enzimin kovalent bağlanması

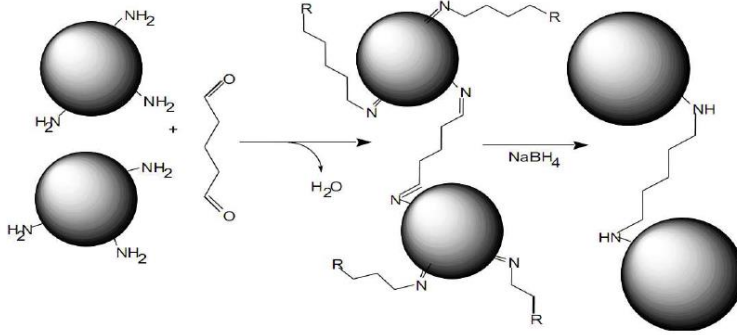
Çapraz bağlama

Çapraz bağlama yönteminin temeli; küçük moleküllü iki veya çoklu fonksiyonel reaktifler ile enzim moleküllerin etkileşimi ile suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasına dayanır. Yöntemde, molekül içi bağların yanı sıra moleküller arası bağ türleri de söz konusudur (Topçu, 2008). Enzim moleküllerinin birbirleriyle bağlanması ise glutaraldehit gibi çift fonksiyonlu bir reaktif kullanılarak enzimlerin çapraz bağlanmasıyla sağlanabilir (Brady ve Jordaan, 2009). Diğer çapraz bağlayıcılar karbodiimid tarafından aktive edilmiş dialdehidler, diimino esterler, diizosiyanatlar ve diaminlerdir (Şekil 2.14) (Arroyo, 1998).



Şekil 2.14. Çapraz bağlayıcı ile amino gruplarından çapraz bağlanma

Glutaraldehit enzim moleküllerinin amino gruplarından (Şekil 2.15), diaminler ise karboksil gruplarından çapraz bağlarlar (Sheldon, 2010).



Şekil 2.15. Glutaraldehit ile çapraz bağlama

İyonik bağlama

İyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanmaktadır (Wang, 1993).

Enzim aktivitesi kovalent bağlama ve fiziksel adsorpsiyona kıyasla daha yüksek olduğu için, iyonik bağlama bir enzimi immobilize etmek için çok daha uygun bir metottur (Cao ve diğerleri 2003). Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ, kovalent bağ kadar güçlü değildir.

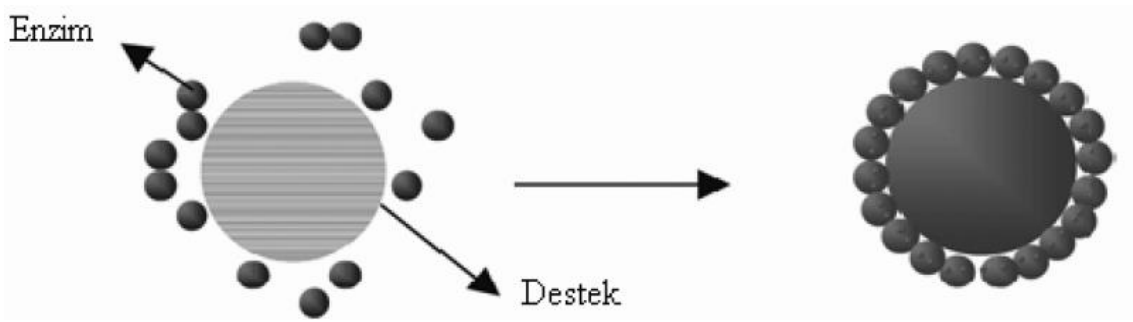
Fiziksel yöntemler

Adsorpsiyon

Yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, gözenekli cam, kül, silikajel, CaCO₃, nişasta, gluten gibi) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak ortamdan uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Nelson ve Griffen, 1916). Adsorpsiyon metodu, zayıf çekim kuvvetleri (hidrojen bağı, hidrofilik bağ, van der Waals etkileşimleri vb.) ile enzimin inert bir taşıyıcıya bağlanması işlemi kapsamaktadır (Şekil 2.16) (Arica, 2000). Adsorpsiyon, işlemin basit ve ucuz olması, yüksek katalitik aktivite sağlaması ve en önemlisi tutuklu enzimin inaktivasyonundan sonra, destek materyalinin tekrar tekrar kullanılabilmesi gibi nedenlerden dolayı diğer metotlardan daha yüksek bir

ticari potansiyele sahiptir (Bayramoğlu, Yalçın ve Arıca, 2005; Arıca ve Bayramoğlu, 2004).

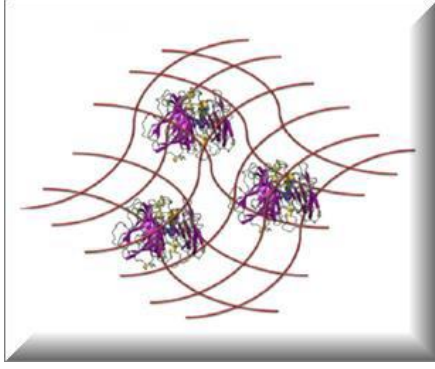
Bu metot, bu nedenlerden dolayı, ekonomik olarak ilgi çekicidir, ancak etkileşimler nispeten zayıf olduğundan, matriksden enzim kaçıışı olabilmesi nedeniyle de sorun oluşturmaktadır (Mateo, Abian, Fernandez-Lafuente ve Guisan, 2000; Pryakhin, Chukhrai ve Poltorak 1977; Kumakura ve Kaetsu, 2003). Fiziksel adsorpsiyonda taşıyıcı materyalin yüzey kimyasına bağlı olarak enzimin denaturasyonu görülebilir.



Şekil 2.16. Enzimin desteğe adsorpsiyon metoduyla bağlanması

Hapsetme

Polimer maddelerde ya da yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsolması yöntemidir (Şekil 2.17). Enzimin sulu bir polimer çözeltisinde veya monomer çözeltisinde çözülmesi gerekir. Polimerin oluşturulması, UV radyasyonu, gama ışınları veya ısıyla başlatılarak, oluşturulan polimer içerisinde enzim hapsedilir. Bu yöntemde seçilen polimerin, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verip ürünü hapsetmesi beklenir. Bu yüzden polimerin yeteri kadar sıkı olması gerekir. Bu metot kullanılarak, bütün hücreler, farklı büyüklükteki mikroorganizmalar, diğer biyokatalizörler hapsedilebilir (Yener, 2007; Malkoç, 2011).

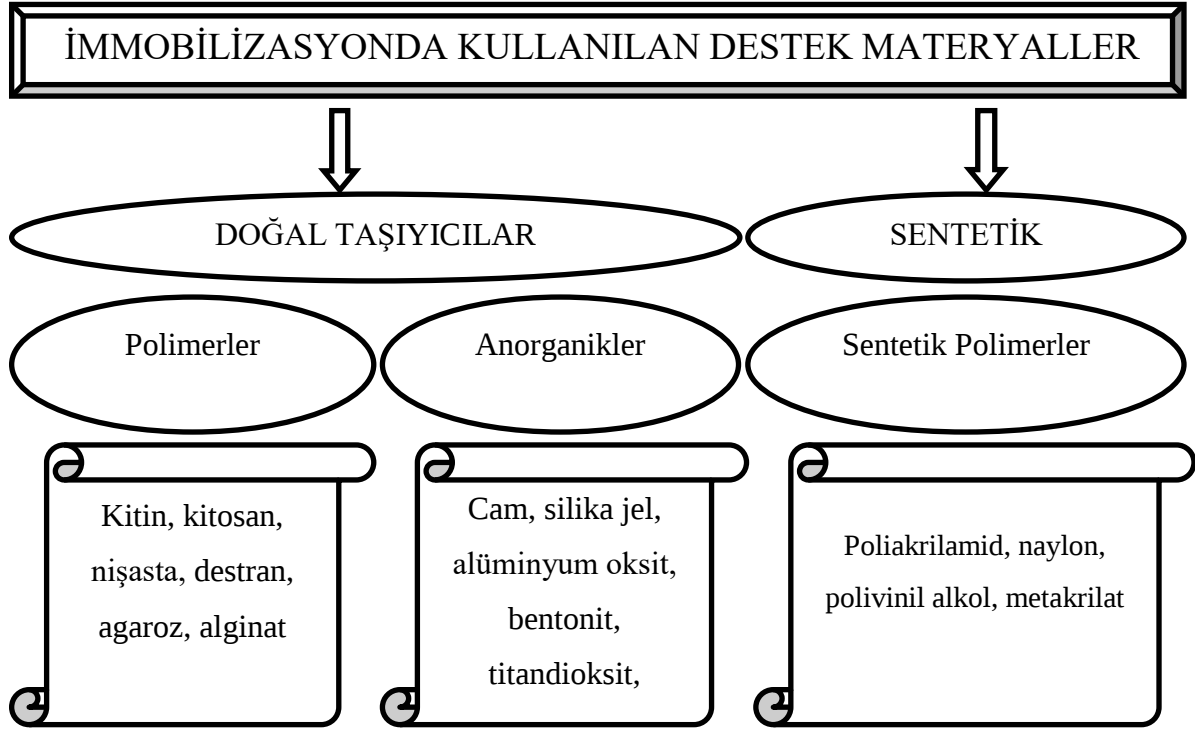


Şekil 2.17. Gözenekli katı bir destek malzemesi içinde enzimlerin tutulması (matriks içi tutuklama)

2.6. İmmobilizasyon İşleminde Kullanılan Destek Materyelleri

İmmobilizasyon işleminde kullanılacak ideal bir destek genel olarak; basınca karşı fiziksel dayanıklılık, hidrofilik özellik, enzimin seçiciliğini artırma, biyolojik uyumluluk, mikrobiyal saldırıya karşı direnç, düşük maliyet gibi özelliklere sahip olabilmelidir (Karube, Yugeta ve Suzuki, 1977; Trevan, 1980; Buchholz ve Klein; 1987, Jegannathan ve Abang, 2008). Enzimler, boncuklar, lifler (elyaf), filmler, membranlar ve kapalı kapsüller gibi farklı matriks üzerine immobilize edilebilir (Twyman, 2005). Geometrik olarak küre, çubuk veya membran yapılarına sahip polimerik destek materyallerinin kullanılabildiği uygulamalarda, özellikle küre yapıdaki taşıyıcı destekler sağladığı avantajlardan dolayı tercih edilir. Küre yapıdaki destek malzemelerinin kullanılması hedef moleküllerin karışımından direkt izole edilmesi ve saflaştırılmasını sağlamasının yanında, işlem zamanını da önemli ölçüde kısaltmış olur (Bayramoğlu, Tunalı ve Arıca, 2007).

Taşıyıcılar kimyasal bileşimlerine göre organik veya inorganik olarak sınıflandırılabilirler (Şekil 2.18). Organik taşıyıcılar doğal ve sentetik olarak iki gruba ayrılırlar (Cabral ve Kennedy, 1991).



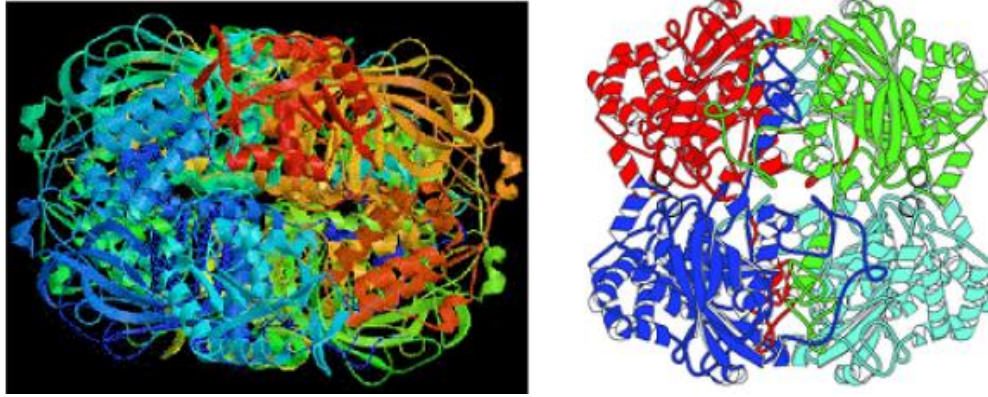
Şekil 2.18. İmmobilizasyon işleminde kullanılan destek materyalleri

Sürekli işletim koşulları altında uzun süre kararlılığını koruması amacı ile enzimlerin, farklı doğal veya sentetik katı destek materyallerine immobilizasyonu ve optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiş ve enzim immobilizasyonu uygulamalarında başarı ile uygulanmıştır (Arica ve Bayramoğlu, 2006). Gözeneksiz taşıyıcılarda az miktarda difüzyonel sınırlamalar gözlenir, fakat bağlanma kapasiteleri düşüktür. Bu yüzden genellikle gözenekli taşıyıcılar tercih edilir. Bunun nedeni, geniş yüzey alanının daha fazla enzimin bağlanmasını sağlaması ve immobilize edilmiş enzimi çevresel etkilerinden korumasıdır. Gözenekli taşıyıcıların, kapasite ve akış özelliklerini optimize etmek için gözenek dağılımını kontrol altında tutmak büyük önem taşır (Afaq ve Iqbal, 2001).

2.7. Katalaz Enzimi ve Katalaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Katalaz enzimi (H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreductase E.C.1.11.1.6) 4 tane hem grubu ve prostetik grup olarak Fe^{+3} içeren ve tabiatta çok yaygın olarak bulunan bir enzim çeşididir. Her biri 506 aminoasitten oluşan dört polipeptidin bir tetrameridir (Şekil 2.19). Hidrojen peroksitten kaynaklı dokularda oluşan serbest radikallerin sebep olacağı zararı ortadan kaldırır (Bayramoğlu, Arica, Genç, Ozalp, İnce ve Bıçak, 2016). Katalaz oksidoredüktazların bir grubu olan hidroperoksidazlar sınıfında yer alır.

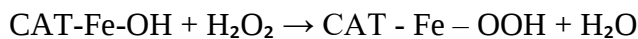
Hidroperoksidazlar, substrat olarak hidrojen peroksit veya diğer organik peroksitleri kullanırlar (Higashi, Kawamata ve Sakamoto, 1974; Halliwell ve Gutteridge, 1990; Nicholls, Fita ve Loewen, 2000).



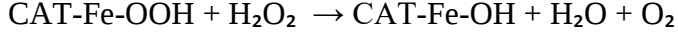
Şekil 2.19. Katalazın üç boyutlu yapısı

Bitkilerin yaprak, kotiledon ve köklerinin peroksizom ve glioksizom kısımlarında lokalize olmuştur. Hayvansal dokularda ise karaciğer, böbrek, miyokart, çizgili kaslar ve eritrositler en fazla aktivite gösterdiği yerlerdir (Demir, 2006). Katalaz temel fonksiyonu, moleküler O_2 mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, H_2O_2 ve $ROOH$ gibi bir peroksidi gidererek, özellikle membranlarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektir. Peroksitlerin birikmesi serbest radikallerin ortaya çıkmasına ve membran yapısının bozulmasına ve dolayısıyla kanser oluşumuna neden olur. Çünkü H_2O_2 , singlet oksijen ve hidroksil radikalının potansiyel kaynağıdır (Başak, 2011). Katalaz, hidrojen peroksiti substrat olarak, hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak kullanılmaktadır (Lanir ve Schejter, 1975; Jones ve Masters, 1976; Nicholls ve diğerleri, 2000). Enzim, yüksek derişimdeki H_2O_2 'i indirgeyebildiği gibi, peroksidatif etki gösterebilmek amacıyla düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında indirgenmiş substrat olan fenol, alkol ve askorbatı kullandığı saptanmıştır (Chaudiere ve Ferrari- Iliou, 1999; Ahmad, 2001).

Katalaz (CAT), H_2O_2 'in zararlı etkilerini iki kademedeki ortadan kaldırır. Birinci adımda katalazın hem demiri H_2O_2 ile etkileşerek oksijence zengin demir peroksit oluşturur.



Bileşik I (CAT - Fe – OOH) olarak adlandırılan demir peroksit ara ürünü, katalaz heminin spektrofotometrik özelliklerini değiştirdiği için in vitro ve in vivo koşullarda tayin edilebilir. H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarında bileşik-I ikinci H_2O_2 ile reaksiyona girerek su ve moleküler oksijen oluşturur.



Katalaz, H_2O_2 'i parçalayan bir enzim olduğundan, H_2O_2 'in kullanıldığı ve aşırısının ortamdaki uzaklaştırılmasının gerekli olduğu tüm işlemlerde kullanılabilir. Ancak enzimin bu proses koşullarında aktivite gösterebilmesi gereklidir (Seriner, 2010). Katalazın gıda veya tekstil sanayisinde hidrojenperoksiti ortadan kaldırmak, analitik alanda hidrojenperoksit veya glukoz biyosensör yapımı gibi endüstride çeşitli uygulama alanları vardır (Bayramoğlu, Altıntaş ve Arıca, 2012).

Kağıt sanayinde kağıdın ağartılmasından sonra kalan H_2O_2 'nin, reçine ve plastik üretiminde oksitleyici ve köpükleştirici olarak kullanılan H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında katalaz enzimi kullanılabilir (Wiseman, 1986).

Tekstil endüstrisinde ağartma işleminin birinci amacı pamukta istenmeyen renkli safsızlıkları gidermektir. Ağartma işleminde oksidatif ağartma maddeleri kullanılır. Oksidatif ağartma maddelerinin en önemlilerinden biri olan hidrojen peroksit pamuklu mamüllerin ağartılmasında daha çok kullanılır. Pamuk üzerindeki bütün yabancı maddelerin oksitlenmesi bittikten sonra ortamda H_2O_2 kalır ve ağartmaya devam edilirse lifler zarar görmüş olur (Akar, 2015). Kumaşın H_2O_2 ile ağartılmasından sonra boyama işleminden hemen önce H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında yaygın olarak kullanılan yöntem su ile yıkamaktır. H_2O_2 içeren yıkama suyundaki H_2O_2 'nin parçalanması ve yıkama suyunun tekrar sisteme kazandırılması için katalaz enziminin faydalanılabilir (Paar, 2002).

Katalaz enzimi, kontak lens hijyeninde, H_2O_2 solüsyonu kullanılarak lensin dezenfekte edilmesinde kullanılmaktadır. Katalaz enzimi içeren solüsyon, kontakt lensin tekrar kullanılmadan önce ortamdaki H_2O_2 'in parçalanmasını sağlamaktadır (İnal, 1998).

UV ışınları serbest radikal oluşumunu hızlandırır. Serbest radikaller ise deriye zarar verir ve deri yapısında bozulmalara neden olur. Günümüzde serbest radikaller deri

yaşlanmasının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir. Antioksidan moleküller değişik etkiler göstererek derinin oksidasyon sonucu gördüğü zararı azaltır. Son zamanlarda katalaz enzimi, epiderminin üst tabakalarındaki hücresel oksitlenmeyi artırmak amacı ile H_2O_2 ve enzimden oluşan ve yüze uygulanan değişik maske uygulamaları için ve vitiligo tedavisinde de kullanılmaktadır (Rieger, 1993; Schallreu ve Moore, 2002).

Sütün işlenmesinden hemen önce sütteki (veya peynir altı suyundaki) H_2O_2 'in toksik etkisinin önlenmesi için katalaz enzimi kullanımı önerilmektedir (Tarhan, 1995; Uhlig, 1998).

PET şişelerin ve plastik kapların düşük sıcaklıklarda sterilizasyonu amacıyla kullanılan H_2O_2 'nin işlem sonrasında uzaklaştırılması amacıyla katalaz enzimi kullanılabilmektedir (Lida, Maruyuma ve Fukunuga, 2000).

Glukoz oksidaz (GOD) enzimi ile birlikte glukonik asit üretiminde ve glukoz veya oksijenin gıdalardan uzaklaştırılmasında katalaz enziminin kullanılabildiği Godjevargova ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Godjevargova, Dayal ve Marinov, 2004).

H_2O_2 'nin miktarının belirlenmesi amacıyla biyosensörlerde katalaz enzimi kullanılabilmektedir (Ertaş, Timur, Akyılmaz ve Dinçkaya, 2004; Varma ve Mattiasson, 2005; Salimi, Noorbakhsh ve Ghadermarz, 2005; Jiang, Yang ve Akins, 2008; O'Brien, Killoan, O'Neill ve Lowrya, 2007; Modrzejewska, Guwy, Dinsdale ve Hawkes, 2007; Prakash, Yogeswaran ve Chen, 2009). Chen ve arkadaşları, yaban turpu peroksidazı ile nitrit miktarının belirlenmesi için biyosensör geliştirilmesinde katalaz enzimini kullanmışlardır (Chen, Mousty, Chen ve Cosnier, 2008). Katalaz enziminin kullanıldığı bir diğer biyosensör uygulaması ise meyve suları gibi çeşitli örneklerde asit miktarının belirlenmesine yöneliktir (Sezgintürk, Göktuğ ve Dinçkaya, 2005).

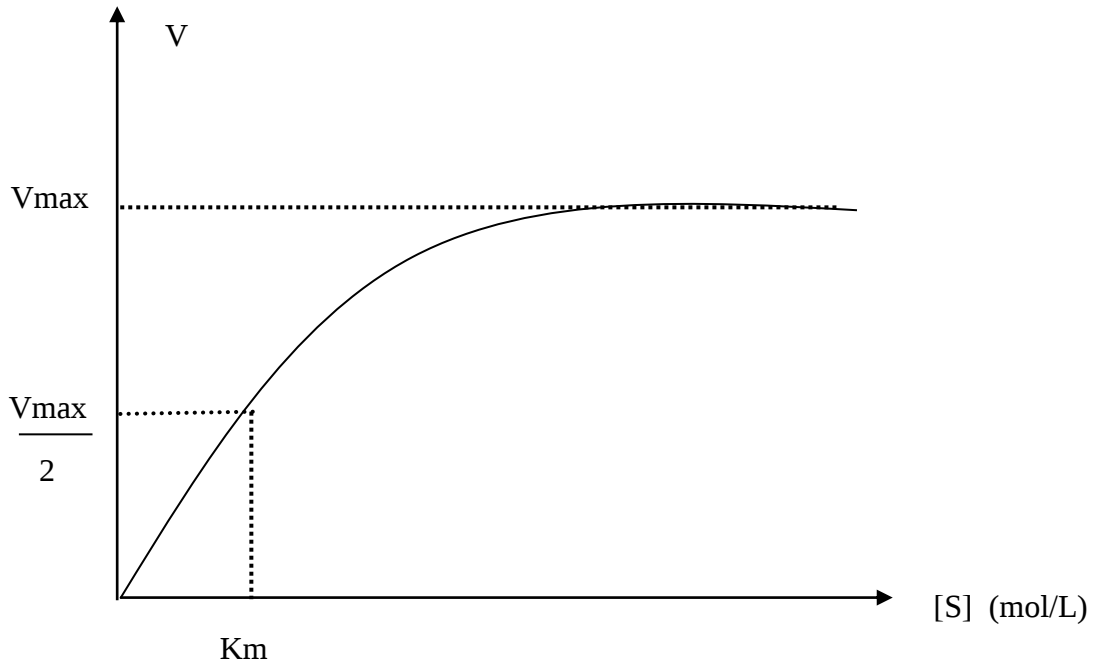
2.8. Enzim Kinetiği

Biyolojik katalizörler olan enzimler tarafından katalize edilen biyokimyasal reaksiyonların hızları kantitatif olarak incelendiği gibi tepkime hızına etki eden parametreler de belirlenebilir (Geoffrey, 2000).

Sabit konsantrasyonda tutulan enzimlerin reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna bağlı olarak doğrusal şekilde artar. Reaksiyon hızı (V) ile substrat konsantrasyonu ([S]) arasındaki eğrisel değişimi (Şekil 2.20), Michaelis ve Menten matematiksel olarak tanımlamış olup enzimatik reaksiyonlarda oluşan enzim-substrat komplekslerinin ([ES]) önemli olduğunu ifade etmişlerdir (Michaelis ve Menten, 1913; Kenneth ve Roger, 2011).



[E] enzim, [S] substrat, $[\ddot{U}]$ ürün, k_1 [ES]'nin oluşumundaki reaksiyon hız sabiti, k_2 [ES]'nin [E] ve [S]'ye yıkılmasındaki hız sabiti, k_3 ürün oluşumundaki hız sabiti, k_4 $[\ddot{U}]$ ve [E]'den [ES] oluşmasındaki hız sabitidir (Gözükara, 2011).



Şekil 2.20. Michaelis-Menten grafiği

Michaelis-Menten eşitliği;

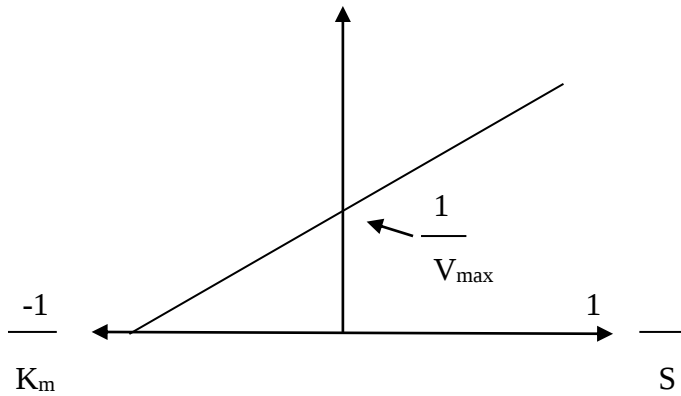
$$V_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad K_m = \frac{(k_1 + k_2)}{k_1} \quad (2.2)$$

V_0 ilk hız, $V_{\max}$ maksimum hız, K_m Michaelis-Menten sabitidir. Michaelis-Menten eşitliği $V_{\max}$ ve K_m 'nin belirlenmesinde ve inhibitör etkinliğinin analizinde kullanılır (Nelson ve Cox, 2005).

Michaelis-Menten eşitliğinin her iki tarafının tersinin alınması ile eşitlik;

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.3)$$

halini alır ve buna da Linewear-Burk eşitliği adı verilir (Lineweaver ve Burk, 1934). Michaelis-Menten eşitliğine uyan enzim reaksiyonları için $1/V_0$ 'ın $1/[S]$ 'ye karşı grafiği çizildiğinde bir doğru elde edilir ve bu grafiğe Linewear-Burk grafiği denir (Şekil 2.21). Linewear-Burk grafiği $V_{\max}$ 'ı daha doğru bulmak için avantaj sağlar.



Şekil 2.21. Linewear-Burk grafiği

2.9. Enzim Reaktörleri

Enzim reaktörleri, sabit veya akışkan yatağa sahip, sürekli veya kesikli çalışan tipleri olan, bir katalizör yardımıyla kimyasal tepkime yaparak üretim elde edilen endüstriyel cihazdır. Enzim reaktörünün seçiminde enzimin sahip olduğu en yüksek aktivitede çalışmasının yanında bunun için uygun destek materyalinin seçimi oldukça önemlidir (Yang, ve Chase, 1998). İmmobilize enzimlerin kullanıldığı reaktör tipleri

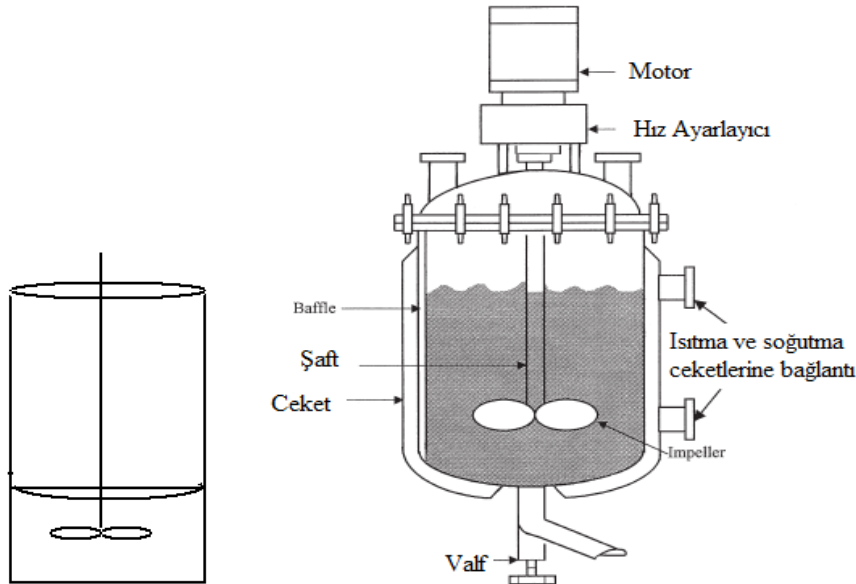
- i) Kesikli Karıştırıcılı Tank(Şekil 2.22),
- ii) Sürekli Karıştırıcılı Tank(Şekil 2.23),

- iii) Akışkan Yatak(Şekil 2.24) ve
iv) Sıkıştırılmış(Sabit) Yatak reaktörlerdir.

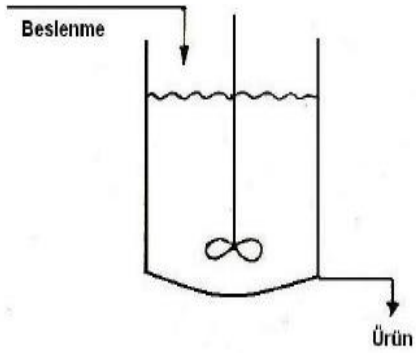
Bu reaktörlerin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları vardır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Enzim reaktör tiplerinin karşılaştırması

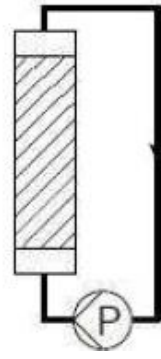
Tip	Avantaj	Dezavantaj
Kesikli Karıştırıcılı Tank	-Basit -Başarılı kinetik etkinlik -Küçük partikül boyutu kullanılabilir.	-Yüksek hacim -Enzimin geri alınması -Karıştırma enzime zarar verebilir -Doldurma ve boşaltma sırasında zaman kaybı
Sürekli Karıştırıcılı Tank	-Basit -Küçük partikül boyutu kullanılabilir.	-Yüksek hacim gerekliliği -Enzimin geri alınması -Karıştırma enzime zarar verebilir -Çok basamak kullanılmadığında kötü bir dönüşüm
Akışkan Yatak	-Plug akış kolay olmaz -Basınç düşmesi minimum -Küçük partikül boyutu kullanılabilir. -Düşük hacim gerekliliği	-Hareket enzime zarar verebilir -Yüksek dönüşüm gerektiğinde çok etkin değil
Sıkıştırılmış Yatak	-Etkin kinetik -Düşük hacim gerekliliği -Çok basamaklı kullanılabilir	-Besleme temiz olmalı -Büyük partikül boyutu kullanılmalı



Şekil 2.22. Kesikli karıştırıcılı reaktör



Şekil 2.23. Sürekli karıştırıcılı reaktör



Şekil 2.24. Akışkan yatak reaktör

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

Katalaz (hidrojen peroksit oksidoredüktaz; EC.1.11.1.6) sığır karaciğerinden (yaklaşık 2000-5000 U/mg katı; protein içeriği %60; spesifik aktivitesi 2513 U/mg; C 9322), α - α' -Azobisisobütironitir (AIBN), sodyum bromür ve %30'luk hidrojen peroksit, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edildi ve alındığı hali ile kullanıldı. Vinil metil keton (VMK) monomeri Sigma-Aldrich'den tedarik edildi ve kullanılmadan önce damıtıldı. 30-60 μ m boyutlarında mikro silika tozu Sigma-Aldrich'den satın alındı. Morfolin sodyum bromür ve diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta Merck AG (Darmstadt, Almanya)'den temin edildi. Fosfat tamponu bileşenleri monopotasyum dihidrojen (KH_2PO_4) posfat ve dipotasyum monohidrojen fosfat (K_2HPO_4) kullanılarak hazırlandı. Çalışmada kullanılan su Barnstead su arıtma sistemi kullanılarak saflaştırıldı (Dubuque, IA, ABD).

3.2. Poli(vinilmetil keton) Hazırlanması ve Poli(vinilmetil keton)'nun Bromlanması

Vinilmetil keton (VMK) polimerizasyonu AIBN varlığında serbest radikal polimerizasyon tepkimesi ile gerçekleştirildi (Bıçak, 2014). Yeniden damıtılmış 0,5 mol (42ml) VMK ve 2,5 mmol (0,41 g) AIBN karıştırıldı. Ortamdaki oksijeni uzaklaştırmak için sistemden sürekli azot gazı geçişi sağlandı. Polimerizasyon işlemi 65 °C'da 14 saat boyunca sürekli karıştırılarak gerçekleştirildi. Polimerizasyon sonrası geriye kalan monomer kalıntıları 65°C'da döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırıldı. Elde edilen polimer metanol kullanılarak çöktürüldü. Ürün filtre edildi ve 18 saat boyunca düşük basınç altında 40 °C'da kurutuldu.

Elde edilen polimer su-diklorometan karışımı içinde peroksi bromlamaya maruz bırakıldı ve bu reaksiyon polimerin seçici metil karbonunun bromlanması ile sonuçlandı (Bıçak, 2014). Bu reaksiyonu özetlemek gerekirse; 9,0 g poli (vinil metil keton) 30 mL diklorometan içinde çözüldü. Bu karışım 40 ml'lik 0,136 mol NaBr ve 0,135 mol H_2SO_4 karışımı içerisine alındı. Elde edilen karışım 0 °C buz banyosunda soğutuldu ve sürekli karıştırarak damla damla % 30' luk 14 mL 0,136 mol H_2O_2 eklendi. Çözelti 3 saat boyunca 0 °C daha sonra 36 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda sürekli

karıştırıldı. Yoğun haldeki polimer 30 ml THF ve 250 ml buzlu su içinde yeniden çöktürüldü. Elde edilen ürün filtre edildi ve bir gece boyunca 40°C’da vakum altında kurutuldu. Reaksiyon karışımı 150 ml su içine alınarak diklorometan döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı.

3.3. α -bromlanmış p(VMK)Üzerine Morfolin Aşılama Tepkimesi

Öncelikle 100 ml erlene 25 ml 0,28 mol morfolin alındı. Erlen buz banyosu içine yerleştirildi ve 0 °C’a kadar soğutuldu daha sonra 8,2 g 0,055 mol bromlanmış p(VMK) erlene yavaş yavaş aktarıldı ve 3 saat boyunca sürekli karıştırıldıktan sonra bir gece boyunca buzdolabında bekletildi. Sonrasında morfolin modifiye edilmiş p(VMK) 250ml %3’lük Na₂CO₃ çözeltisi içerisinde çöktürülerek saflaştırıldı. Karışım filtre edildi ve 20ml THF içerisinde çözüldü. Daha sonra polimer 200ml buzlu su içine alınarak filtreleme işlemine maruz bırakılarak saflaştırıldı. Polimerin kendi kendine çapraz bağlanmasını önlemek için çeker ocak içinde hava akımı ile kurutuldu. Morfolin aşılansmış polimer CH₂Cl₂, CHCl₃, DMF, THF ve aseton içinde çözüldü.

3.4. Silika Partikülleri Üzerinde Michael Alıcılarının Oluşturulması

Yaklaşık 1,0 g morfolin ile modifiye edilmiş p(VMK) partiküller 20 ml aseton içinde çözüldü. Daha sonra bu çözeltiye 10 g silika partikülleri eklendi. Çözücü oda sıcaklığında hava akımı ile yavaş yavaş (20 mL/s) uzaklaştırıldı. Kabaca kurutulan partiküller 100 °C sıcaklığındaki fırında 1 saat boyunca ısıtıldı. Ürün üçer kere 25 ml aseton(3x25ml) ikişer kerede 25 ml THF(2x25ml) ile yıkandı. Vakum altında 60 °C’da bir gece boyunca kurutuldu. Morfolin kaplanmış silika partikülleri p(VMK)-M kısaltması ile gösterildi.

3.4.1. P(VMK)-M kaplanmış silika partikülleri üzerindeki Michael alıcı grupların bağlanma kapasitesinin belirlenmesi

p(VMK)-M kaplanmış silika partikülleri üzerindeki Michael alıcı grupların bağlanma kapasitesi heksametilendiamin (HMDA) ile tepkimeye sokulması ile belirlendi. 0,2g p(VMK)-M kaplanmış silika partikülleri 10 mL, 2 mg/mL HMDA içeren reaktör içine yerleştirildi ve reaksiyon 60°C’da pH 9,0’da gerçekleştirildi. Reaktörde manyetik karıştırıcı ile 8 saat boyunca karıştırma işlemi yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra

HMDA bağlanmış p(VMK)-M kaplanmış silika partikülleri saf su ile yıkandı. Bağlanmış HMDA miktarını belirlemek amacıyla çift ışın yollu UV/GB spektrofotometre (PG Instrument Ltd., Model T80+ ; PRC) cihazında reaksiyon öncesi ve sonrası çözeltilerinin 211nm’de absorbensları ölçüldü. Derişimi bilinen HMDA çözletisi kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi ve bu eğri yardımıyla p(VMK)-M kaplanmış silika partiküllerine bağlanan HMDA miktarı belirlendi.

3.5. Kovalent Bağlanma Yöntemi ile Katalaz İmmobilizasyonu

Silika partiküller üzerinde oluşturulan reaktif çift bağlar üzerine katalaz immobilizasyonu 50 mM pH 8,0 potasyum fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirildi. İmmobilizasyon ortamında katalazın başlangıç konsantrasyonu 3,0 mg/mL olarak seçildi. İmmobilizasyon denemeleri 2 ile 10 saat arasında 20 °C’da sürekli karıştırma yapılarak gerçekleştirildi. Katalaz enzimi immobilize edilmiş silika partiküller 40 ml 1M NaCl çözeltisi ve 50 mM, pH 7,0 tamponu ile yıkandı. Yıkanan partiküller daha sonra kullanılmak üzere 4 °C’da taze tampon çözeltisi içinde saklandı. İmmobilizasyon işleminde kullanılan silika partiküllerinin miktarının, immobilizasyon kapasitesi üzerine etkisini incelemek amacı ile sabit katalaz enzimi konsantrasyonunda olmak üzere destek materyalinin miktarı yaklaşık 1,0 ile 5,0 mg/ml aralığında değiştirildiği immobilizasyon koşullarında 6 saat süresi boyunca inkübe edildi. Reaksiyon ortamı hacmi 1,0 ml iken başlangıç katalaz konsantrasyonu 3,0 mg/ml olarak seçildi. Katı destek üzerine immobilize katalaz miktarı

$$q = [(C_i - C_t)V] / w \quad (3.1)$$

eşitliği ile hesaplandı. Burada q aktivie edilmiş silika partiküllerin (mg/ml) üzerindeki immobilize edilmiş g cinsinden katalaz miktarını, C_i başlangıç C_t immobilizasyon sonrası katalaz konsantrasyonunu (mg/ml), V sulu faz hacmini, w ise silika partiküllerin ağırlığını (g) göstermektedir. Enzim örnekleri ve yıkama çözletisindeki protein miktarı Braford metodu ile tayin edildi (Bradford, 1976). Konsantrasyonu bilinen sığır serum albumini (BSA) (0,05–0,5 mg/mL) ile yapılan kalibrasyon eğrisi kullanılarak enzim konsantrasyonu hesaplandı. Bu çözeltilerin absoransı 595 nm’ de UV–GB (PG Instruments Ltd., Model T80+; PRC) spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü.

3.6. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesi hidrojen peroksitin enzim tarafından ayrıştırma tepkisi sonucunda 240 nm'deki absorbans miktarındaki azalma hesaplanarak belirlendi. 0,5 g immobilize katalaz ve fosfat tamponu (50 mM, pH 7,0) içerisinde hazırlanan 10 mM derişimindeki 10 ml hidrojen peroksit çözeltisi ile karıştırıldı. Hazırlanan bu karışım 25 °C 150 rpm'de 5 dakika çalkalandı ve katalaz immobilize edilmiş silika partiküller ortamdan uzaklaştırılarak reaksiyon sonlandırıldı. 25 °C ve pH 7,0'de 1,0 µmol hidrojen peroksitin ayrışması bir birimlik aktive olarak belirlendi. Aktivite çalışmaları serbest ve immobilize enzimin karalı pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi için 50 mM pH 4-5 asetat tamponu ve 50 mM pH 6-9 potasyum fosfat tampon sistemlerinde ve 15-60 °C aralığında değişen sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.

Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametrelerini belirlemek amacıyla hidrojen peroksitin konsantrasyonu 2,5-40 mM aralığındaki değerlerde değiştirilmiştir. Michaelis-Menten formülü ile V_{max} ve K_m değerleri

$$1/V = K_m / V_{max} \times 1/[S] + 1/ V_{max} \quad (3.2)$$

formülü ile hesaplandı. Formülde yer alan V (mM/dak) başlangıç reaksiyon hızını, K_m (mM) Michaelis-Menten sabitini, V_{max} (mM/dak) başlangıç substrat konsantrasyonunda elde edilen maksimum hızı ve $[S]$ (mM) başlangıçtaki substrat konsantrasyonunu göstermektedir.

3.6.1. Serbest ve immobilize katalazın ısısal ve depolama kararlılığının belirlenmesi

Serbest ve immobilize katalazın ısısal kararlılığının belirlenmesi için örnekler 55 ve 65 °C sıcaklıklarda 120 dakika boyunca 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda bekletilerek aktivite tayini yapıldı. Depolama kararlılığını belirlemek amacıyla 4 °C da 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içinde saklanan serbest ve immobilize enzimin aktivitesi haftada bir kez olmak üzere bir ay boyunca aynı koşullarda ölçüldü.

3.6.2. İmmobilize enzimin tekrar kullanım ve işlemsel kararlılığı

Kesikli reaktörde katalaz immobilize edilmiş silika partiküllerinin yeniden kullanılabilirliği 30 dakika boyunca 25 °C’da ard arda gerçekleşen reaksiyonlar sonucundaki absorban değerleri okunarak test edildi. Her aktivite ölçümünden sonra katalaz immobilize edilmiş silika partikülleri 50 mM pH 7,0 fosfat tamponuyla yıkandı ve bir sonrasındaki aktivite ölçümü için immobilize katalaz üzerine substratı olan taze hidrojen peroksit çözeltisi ilave edildi.

İşleme kararlılığının belirlenebilmesi için katalaz immobilize edilmiş silika partikülleri 1 saat boyunca 4 °C’da 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda bekletildi. 1,0 g partikül yaklaşık 0,4 ml boşluk hacmine sahip reaktör içine koyuldu. Peristaltik pompa (Ismatech IPC Model, Switzerland) kullanılarak 120 saat boyunca reaktörün alt tabakası 30 °C’da 10 ml/saat akış hızında pH 7,0 fosfat tamponu ile hazırlanmış 10 mM H₂O₂ substrat çözeltisi ile beslenmiştir. 10 ml/saat akış hızını belirleyebilmek için aşağıda verilen denklemden yararlanılmıştır.

$$D = V_o / \varepsilon V \quad (3.3)$$

Eşitlikte yer alan D , saatteki seyreltme oranını; V_o , substratın akış hızını (ml/saat); V , reaktör sisteminin toplam hacmini (ml) ve ε ise reaktörün toplam hacminin boşluk hacmine oranını ifade etmektedir.

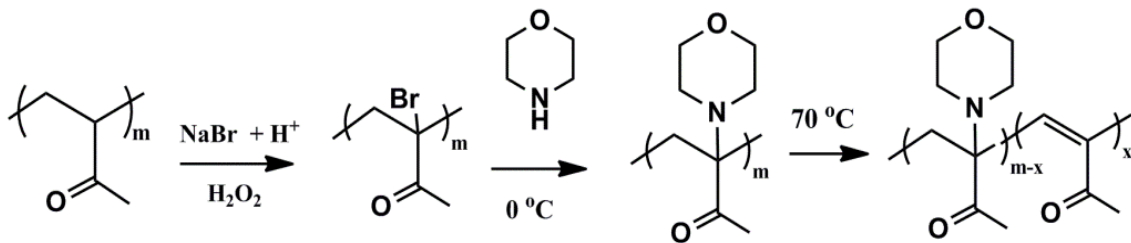
4. SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Karakterizasyon Çalışmaları

Vinilmetil ketonun, azobisisobutironitril (AIBN) başlatıcısı varlığında serbest radikalik polimerizasyonu tepkimesi sonucunda 33,2 g ürün olarak poli(vinilmetil keton), pVMK, % 94,7 verim ile elde edildi. İzole edilen polimerin, THF varlığında jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) kullanılarak 18,2 kDa molekül ağırlığına ve 2,3 polidispersiteye (PDI) sahip olduğu belirlendi.

Elde edilen pVMK polimeri, su-diklorometan karışımı içinde peroksi bromlamaya maruz bırakıldı ve bu reaksiyon polimerin seçici metil karbonunun bromlanması ile sonuçlandı (Bıçak, 2014). Bromlanan polimerin, CDCl_3 içinde $^1\text{HNMR}$ spektrumunda 2,4 ve 1,6 ppm’de sergilediği iki pikin sırasıyla metil ve metilen karbonlarıyla ilişkili olduğu gözlemlendi.

α -bromlanmış p(VMK) üzerine morfolin aşılama reaksiyonu gerçekleştirildi. 103,82 g kuru ağırlığında morfolin kaplanmış silika partikülleri elde edildi ve bu partiküller p(VMK)-M kısaltması ile gösterildi. Alfamorfolin aşılama reaksiyonu p(VMK)-M 70 °C ve 100 °C aralığında sertleşmesi sırasında hızlı bir şekilde kendiliğinden çapraz bağlanmaya maruz bırakılmıştır. Morfolin aşılama reaksiyonu p(VMK), p(VMK)’nın metilen karbonunun seçici bromlanması ve onu takip eden daha morfolin aşılama reaksiyonu sonucunda elde edilmiştir ve 70 °C’nin üzerinde ısıtma yapıldığında polimerin çözünemez forma dönüştüğünü göstermiştir (Şekil 4.1).



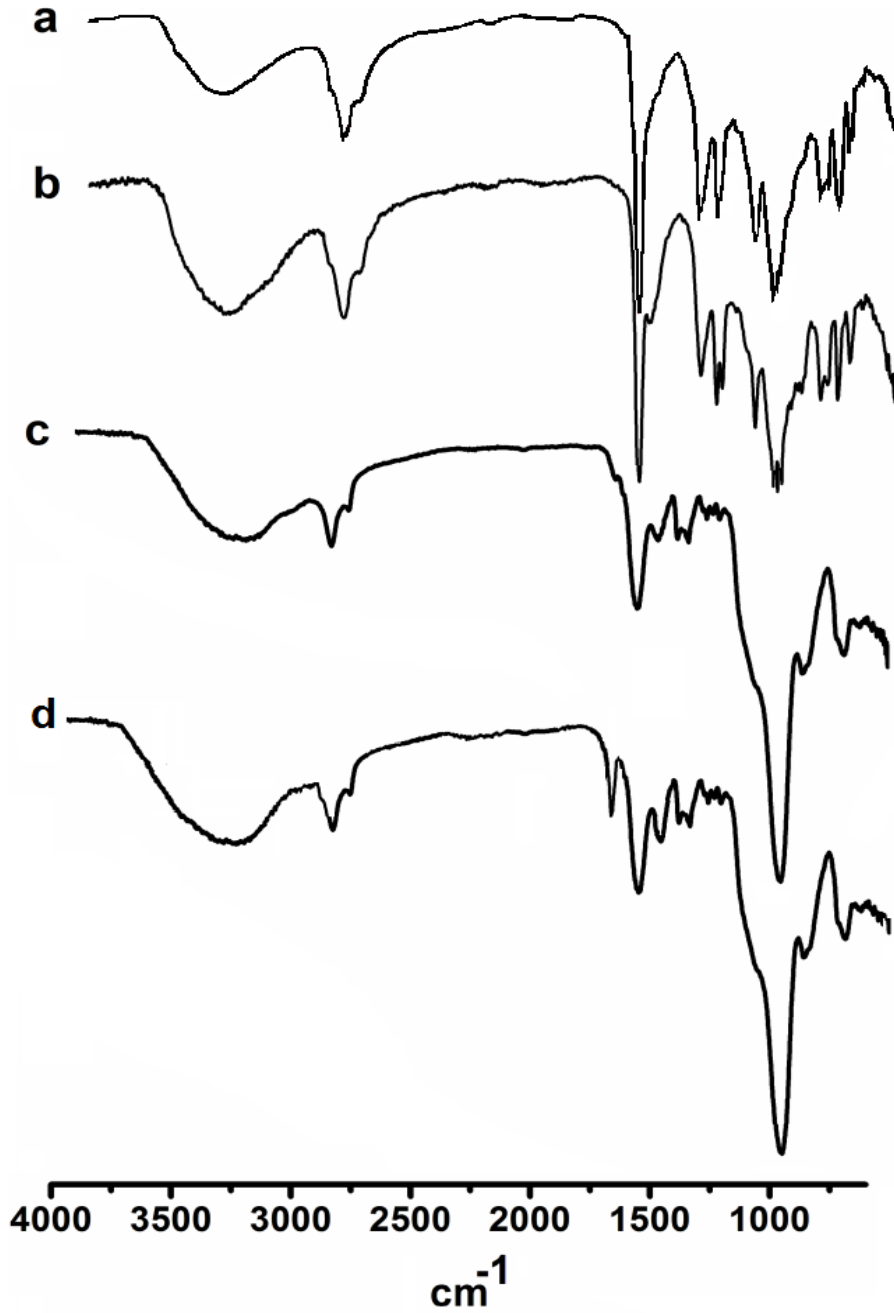
Şekil 4.1. Morfolin aşılama p(VMK) sentezi ve ısıtarak deaminasyon sonucunda konjuge çift bağ oluşumu

Partiküllerin morfolin ile modifikasyonu işleminde yapıya katılan kimyasalların dönüşümü TGA, DSC, $^1\text{HNMR}$ ve katı hal ^{13}C NMR teknikleri ile ve bir önceki çalışmalar izlenerek

rapor edildi (Bıçak, 2014). Bu amaçla, morfolin aşılansmış polimer CH_2Cl_2 , CHCl_3 , DMF, THF ve aseton içinde çözüldü. Metanol ve dietil eter içinde sınırlı miktarda çözüldüğü, petrol eteri ve suda çözünmediği gözlemlendi. ^1H NMR spektrumları incelendiğinde δ (3,4 ppm, s, 4H, $-\text{CH}_2-\text{O}$), (2,5 ppm, s, 4H, $-\text{CH}_2-\text{N}$), (2,51 ppm, s, 2H, $-\text{CH}_2-$), (2,1 ppm, s, 3H, $-\text{CH}_3$) pikleri elde edildi.

Şekil 4.1’ de görüldüğü gibi karbonil gruplarına komşu reaktif çift bağlı gruplara morfolin aşılansması ısıtma ile gerçekleşmiştir. TGA’da gözlenen %18’lik kütle kaybı %32.4 oranın morfolin aşılansdığını göstermektedir (Bıçak, 2014). Eşzamanlı çağraz bağlanma bazı çift bağların Diels-Alder reaksiyonları sonucunda meydana gelebilir. Ancak prosedür sonunda elde edilen polimerin renginin hafif sarıya dönmesi çapraz bağlanma ya da homojen olmayan birleşme ile morfolin aşılansmada bir kesinti olduğunu gösterir.

Perkin Elmer FT-IR Spectrum One B spektrofotometresi ile FT-IR spektrumları alındı. P(VMK)-M’nın FT-IR analizi Şekil 4.2a’ da görüldüğü gibi güçlü C=O gerilme titreşim bandı polimerin 1720 cm^{-1} ’de ve 1110 cm^{-1} civarında güçlü titreşim bandı morfoline ait C-O bağının varlığını göstermektedir. Kuru polimer $90\text{ }^\circ\text{C}$ ’da 1 saat boyunca ısıtıldıktan sonra 1660 cm^{-1} ’ de yeni bir pik ortaya çıktı ve 1110 cm^{-1} ’deki pikin yoğunluğunda ciddi bir azalma meydana geldi (Şekil 4.2b). FTIR verileri çift bağ oluşumunu ve morfolin aşılansmasını göstermektedir. Benzer şekilde Şekil 4.2c’de p(VMK)-M aşılansdıktan sonra ve daha sonraki 1 saat boyunca $90\text{ }^\circ\text{C}$ ’da ısıtılan silika partiküllerin FT-IR spektrumu verilmiştir. 1660 cm^{-1} ’ de yeniden bir C=C titreşim bandı gözlemlendi ayrıca 1080 cm^{-1} ’de silikanın güçlü titreşim bandı yoğunlaşmıştır ve bu da reaktif C=C bağlarının silika yüzeyindeki oluşumunu doğrular. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi p(VMK)-M kaplanmış silika partiküllerin FTIR spektrumunun (Şekil 4.2c) ve HMDA bağlı p(VMK)-M (Şekil 4.2d) ile benzer olduğu gözlemlendi. $1560\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ ’deki geniş bant HMDA bağlanmasının başarılı olduğunu göstermektedir. 3450 cm^{-1} ’ de görülen bant p(VMK)-M- $\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ yapısındaki grupların Michael ekleme reaksiyonu ile oluşturulan p(VMK)-M kaplı silika partiküllerin reaktif çift bağları ve HMDA’ nın amin gruplarının adsorpsiyonu ile ilişkilendirilebilir. Destek üzerine bağlanan HMDA miktarının $0,723\text{ mmol/g}$ olduğu bulunmuştur.



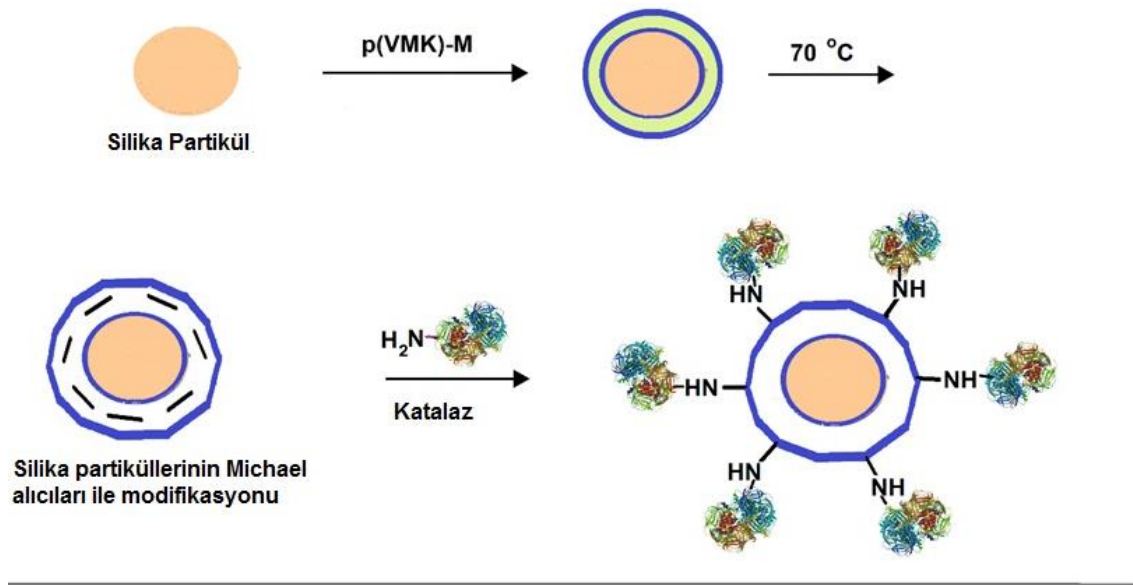
Şekil 4.2. FTIR spektrumları: (a) ısıtmadan önce morfolin aşıl原因mış p(VMK) ; (b) 1 saat boyunca kuru halde 90°C’ da ısıttıktan sonra p(VMK)-M; (c) p(VMK)’nın 90°C’ da ısıttıktan sonra silika partiküller üzerine aşıl原因ması; (d) HMDA bağılı p(VMK)-M kaplı silika partiküller.

Yüzey alanı ölçümü, hızlandırılmış yüzey alanı ve gözenek sistemi (Micromeritics, Model ASAP 2010, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Silika parçacıklarının gözenek boyutu azot adsorpsiyon izotermelerinden hesaplandı. Parçacıkların gözenek boyutunun 4,2 nm olduğu belirlendi. Toplam yüzey alanı 924 m²/g ve serbest partiküllerin gözenek hacmi 0,76 cm³/g olarak tespit edildi. Yüzey p(VMK)-M kaplandıktan sonra yüzey alanı ve por hacminde düşüş olduğu bu değerlerin sırasıyla 769 m²/g ve 0,53 cm³/g olduğu bulundu.

4.2. Katalazın Tek Basamakta İmmobilizasyonu

Bu çalışmada tek adımda katalaz immobilizasyonunu gerçekleştirebilmek amacıyla silika partiküllerin yüzeyinde Michael katılma tepkimesine elverişli reaktif çift bağlar oluşturan bir yöntem tercih edildi. Yüksek kararlılık, sürekli bir tepkime işleyişi ve kontrollü reaksiyonlar sağlamak amacıyla katalazın immobilizasyonu için bentonit, sepiyolit, kitosan boncuklar, ipek lifleri, titanat nanotüpler, kollajen lifler gibi çeşitli matriksler kullanılmaktadır (Cetinus , Sahin, Saraydin, 2009; Chen, Huang, Liao, Shi, 2011; Wang, Qi, Yu, Yuan, Cui, Tang, Wang, Fan, 2015). Katalaz yüksek ürün maliyetine sahip bir enzim olduğu için immobilizasyon yöntemi ile daha kararlı bir yapı elde etmek oldukça arzu edilen bir durum olsa da hala büyük bir sorun teşkil etmektedir. Bu çalışmada sunulan yöntem morfolin aşılansmış p(VMK)'nın 70-90 °C' da ısıtarak deaminasyonunu sağlamaya dayanır. Silika partikül yüzeyine bu polimerin aşılansması ve ardından kısa bir süre ısıtarak polimerin çapraz bağlandığını gösteren açık kahverengi kaplanmış yapılar elde edilmiştir. Morfolin aşılansarak oluşturulan C=C çift bağı komşu karbonil grupları ve bunların çift bağlarından dolayı amin, tiol ve proteinler, peptideler gibi biyolojik moleküllerin katılması için iyi bir Michael alıcı olarak kabul edilen yüksek reaktiftir. p(VMK)-M kaplanmış silika partikülleri amin grupları içeren reaktif boyanın (Reactive Blue 4 gibi) kendiliğinden immobilizasyonu için kullanıldı. Silanizasyon sağlayan çoğunlukla aktive edilen reaktif grupların silika yüzeyinde hazırlanması tek adımda basit immobilizasyonu bu yöntemin diğer geleneksel yöntemlerden üstünlüğüdür. Bu alternatif immobilizasyonu gerçekleştirmek için silika partikül yüzeylerinin, morfolin aşılansmış p(VMK) ile kaplanması sağlandı ve sonrasında oda sıcaklığındaki enzimin kendiliğinden çapraz bağlanmasını sağlamak amacıyla yüzeye Michael alıcıları oluşturabilmek için ısıtma işlemi yapıldı. Ayrıca oda sıcaklığında enzimin tek adımda bağlanması bir diğer önemli avantaj olarak kabul edilebilir. Bu çalışmada Michael alıcıları oluşturulan silika yüzeylerine kovalent bağlı immobilizasyon gerçekleştirmek için enzim olarak katalaz enzimi kullanıldı. Katalaz neredeyse her canlı organizmada bulunan ve hücrel savunma mekanizması olan hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü sağlayan bir enzimdir. Katalazın yaygın bir kullanım alanı olduğundan nanomateryallere immobilizasyon çalışmalarında, farklı immobilizasyon çalışmaları arasında doğrudan bir karşılaştırma sağlar.

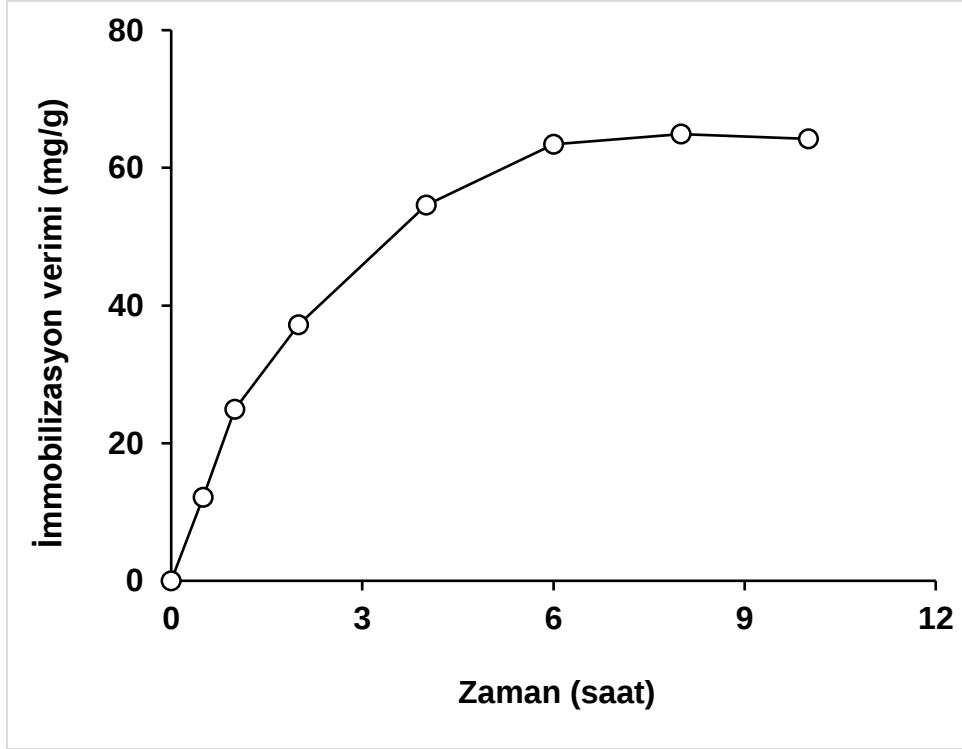
Silika partiküllerin morfolin aşılantmış p(VMK) ile kaplanması ve ısıtarak Michael alıcılarının oluşturulmasından sonra p(VMK)-M kaplı silika paritkülleri yüzeyindeki reaktif C=C bağı ve katalazın amino ya da tiol grupları arasında bağlanma sayesinde katalaz enziminin immobilizasyonu aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Enzim immobilizasyonu için silika partiküllerin morfolin aşılantmış p(VMK) ile kaplanması ve ısıtarak Michael alıcılarının oluşturulmasından sonra p(VMK)-M kaplı silika paritküller üzerine katalaz immobilizasyonunun temsili gösterimi

4.2.1. Katalazın immobilizasyon verimliliğine bağlanma süresinin etkisi

Katalazın immobilizasyon verimliliğine bağlanma süresinin etkisi 20°C’ da 2-10 saat inkübasyon periyot aralıklarında incelendi. İmmobilize katalazın miktarı 2 saatlik temasın sonunda 37,2 mg enzim/g destek olarak hesaplandı. 6 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda enzim immobilizasyon etkinliğinin önemli miktarda arttığı ve maksimum 63,4 mg enzim / g destek değerine ulaştığı görüldü. 6 saatlik bu süre zarfından sonra dengeye ulaştığı ve 10.saate varıncaya kadar kayda değer bir artış olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4). Bu nedenle, çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde, katalazın p(VMK)-M kaplanmış silika partikülleri üzerine immobilizasyonu için 6 saatlik işlem periyodu seçildi.



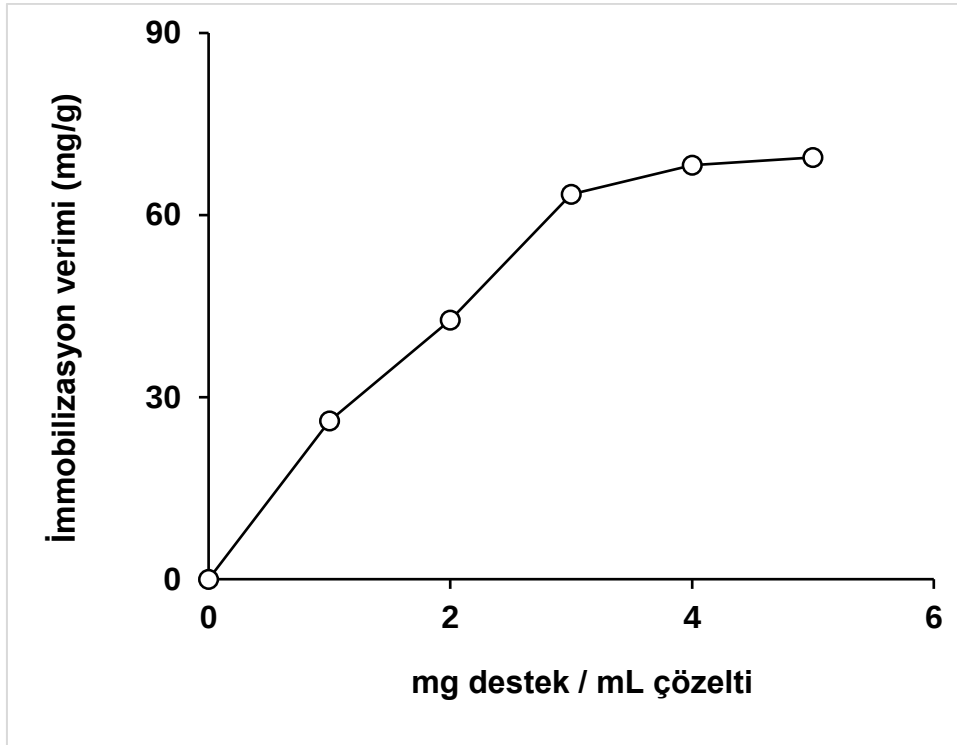
Şekil 4.4. Katalazın immobilizasyon verimliliğine bağlanma süresinin etkisi

p(VMK)-M kaplanmış silika partiküllere immobilize edilen enzim miktarı ve aktivitesi sırasıyla $63,4 \pm 2,1$ ve $73,6\%$ olarak belirlendi. 20°C 'da enzim immobilizasyonu boyunca ortamdaki serbest enzim konsantrasyonu analiz edildiğinde, 6 saatlik bağlanma süresinden sonra ortamda enzim konsantrasyonunda değişiklik olmadığı gözlemlendi. Bu sonuç 6 saat süren immobilizasyon işlemi sonunda reaksiyonun başarıyla sonuçlandığını gösterdi. Artan bağlanma reaksiyon süresi ile birlikte 1 gram p(VMK)-M kaplanmış silika partiküllerine immobilize edilen katalaz miktarı $63,4 \text{ mg/g}$ destek (ya da $2,54 \times 10^{-7} \text{ mmol enzim/g silika partikülleri}$) olarak bulundu. p(VMK)-M kaplanmış silika partiküllerinin reaktif C=C bağı ve HMDA'nın serbest amino grupları arasında bağlanma işlemi Michael katılma reaksiyonu sağlandığı için bağlanan HMDA'nın miktarı ile p(VMK)-M kaplanmış silika partiküllerinin sahip olduğu C=C bağı miktarının eş olması gerektiği bilgisine dayanarak bağlanan HMDA miktarı tespit edildi.

4.2.2. Katalazın immobilizasyon verimliliğine destek miktarının etkisi

Katalazın immobilizasyonuna destek miktarının etkisi farklı miktarlarda p(VMK)-M kaplanmış silika partikülleri üzerine $3,0 \text{ mg/ml}$ katalaz enziminin immobilizasyonu ile incelendi. Şekil 4.5'de görüldüğü gibi silika partiküllerin miktarının artmasıyla

immobilizasyon veriminin de arttığı gözlemlendi. Katalazın p(VMK)-M kaplanmış silika partikülleri ile immobilizasyon veriminin desteğin 1,0-5,0 mg'nın 1,0 ml çözeltide 26,1 ve 69,5 mg/ml arasındaki değerlerde değiştiği ve 3,0 mg/ml destek miktarında maksimum verime ulaştığı ancak 3,0 mg/ml destek miktarının üzerinde bir değerde kayda değer bir artış olmadığı gözlemlendi.



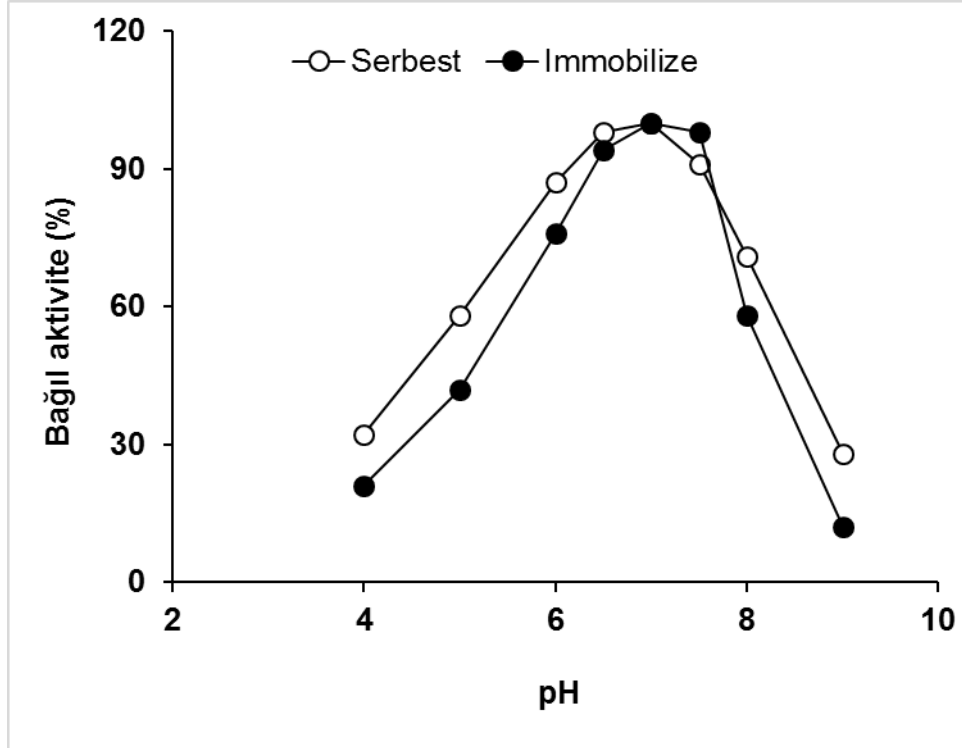
Şekil 4.5. Katalazın immobilizasyon verimliliğine destek miktarının etkisi

4.3. Katalaz İmmobilize Sistemin Biyokimyasal Karakterizasyonu

4.3.1. pH'ın katalaz aktivitesi üzerine etkisi

Serbest ve immobilize katalaz enziminin aktivitesine pH etkisini belirleyebilmek için farklı pH ortamlarında (4,0-9,0) hidrojen peroksitin ayrışması reaksiyonu gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize katalazın başlangıç aktiviteleri sırasıyla $2,513 \times 10^3$ ve $1,850 \times 10^3$ U/mg olarak not edildi. Şekil 4.6' da görüldüğü gibi serbest ve immobilize katalazın en uygun çalıştığı pH değeri her ikisinde de pH 7,0 olarak belirlenmiştir. Ancak serbest enzim immobilize enzim kıyaslandığında muhtemelen enzim ve p(VMK)-M kaplanmış silika partikülleri arasındaki ikincil etkileşimlerden dolayı immobilize enzimin daha geniş pH aralığında çalışabildiği görülmüştür. Özellikle asidik (pH 4,0) ve bazik (pH 9,0) pH

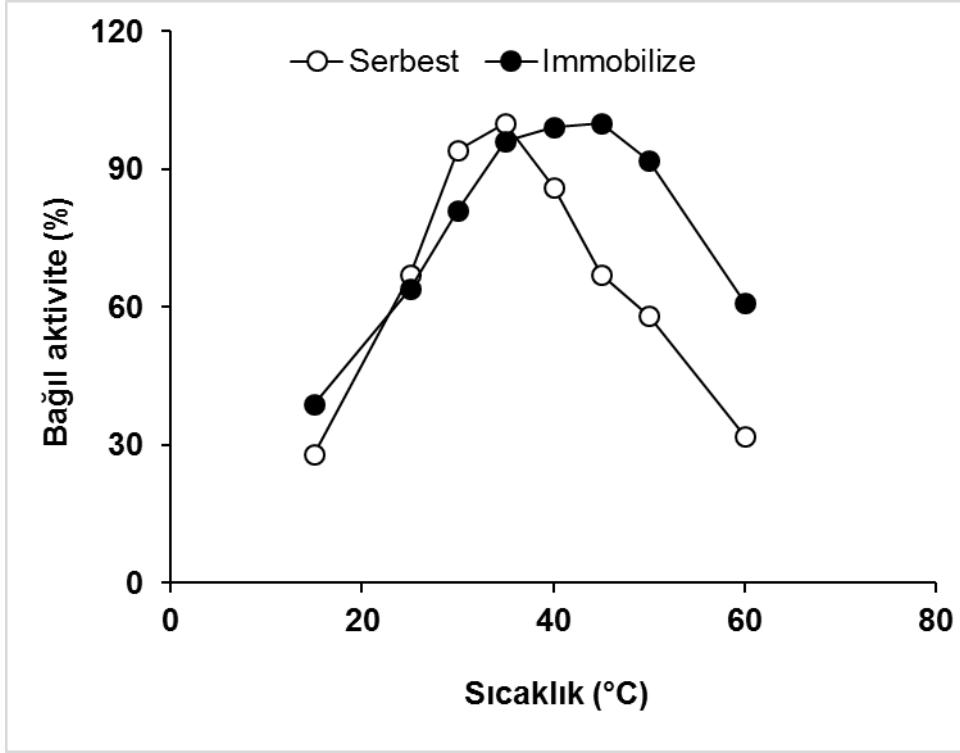
değerlerinde immobilize katalazın %46' ya kadar aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Serbest enzime kıyasla gösterdiği bu aktivitenin immobilizasyon işlemi sırasında enzim ve destek materyal arasında kurulan kovalent bağ olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.6. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine pH etkisi

4.3.2. Sıcaklığın katalaz aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklığın serbest ve immobilize enzimin aktivitesine etkisinin belirlenebilmesi için 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 15 ile 60 °C aralığında değişen sıcaklıklarda çalışıldı. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi immobilize katalaz için en uygun çalışma sıcaklığının 45 °C civarı olduğu aynı zamanda 20-50 °C aralığında da aktivite gösterebildiği serbest enzim için ise bu çalışma aralığının yalnızca 15-35 °C olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.7. pH 7,0 tamponunda hazırlanan 10 mM H_2O_2 ' in ayrışabilmesi için serbest ve immobilize katalazın sahip oldukları aktiviteye sıcaklığın etkisi

4.3.3. Kinetik parametreler

Enzim reaktörleri ve biyosensörlerin yapısında, immobilizasyon sonrası ortaya çıkan kinetik parametrelerin bilinmesi çok önemlidir. İmmobilizasyon metodu tarafından sebebiyet verilen yapısal değişikliklerin sonucu olarak enzimin substratına karşı olan ilgisinin değişmesinden dolayı immobilize enzimin K_m değeri serbest enziminkinden farklıdır (Romo-Sanchez, Arevalo-Villena, Romero, Ramirez ve Perez, 2014; Wang, Ke ve Xu, 2007; Basak, Aydemir, Dincer ve Becerik, 2013). Kinetik parametreler Michael sabiti K_m ve serbest ve immobilize katalaz için V_{max} substrat olarak H_2O_2 kullanılarak belirlendi. Serbest enzimin K_m değeri 13,8 mM olarak belirlendiğinde V_{max} değeri $2,41 \times 10^3$ U/mg protein olarak hesaplanırken, immobilize katalaz için K_m değeri 17,9 mM bulunduğunda p(VMK)-M kaplanmış silika partikülleri üzerindeki immobilize enzimin V_{max} değeri ise $1,87 \times 10^3$ U/mg olarak bulundu. Beklenildiği gibi K_m ve V_{max} değerleri immobilizasyon işleminden önemli ölçüde etkilendi. İmmobilizasyon işlemi sonrasında V_{max} değerindeki düşmenin ve K_m değerindeki artışın enzim ve substrat arasında daha büyük bir ilgiye sebep olduğu düşünüldüğünde immobilize enziminin serbest enzime kıyasla substratına karşı daha ilgili olduğu sonucuna varılmaktadır (Yang, Wang, Shi, Wang, Zhang, Han ve Jiang,

2016; Zang, Jia, Liu, Wu ve Zhang, 2012). Katalazın çeşitli destek materyalleri üzerindeki immobilizasyonu sonrasındaki K_m değerleri (Çizelge 4.1) incelendiğinde, bu çalışmada elde edilen K_m değerinin çok daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır. İmmobilizasyon sonrası katalazın V_{max} değeri literatür değerlerinden daha yüksek olduğu yalnızca, polidopamin-grafen oksit- Fe_3O_4 'in V_{max} değerinden düşük olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı destek materyaller üzerine katalaz immobilizasyonunun K_m , V_{max} ve ısısal kararlılık değerlerinin karşılaştırılması

Destek Materyal	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	Isıl dayanıklılık	
Pol(itaklinik asit)-Fe(III)	25,8	1103	87 % (55 °C, 2 saat)	(Grzegorzewski , Rohn , Quade , Schroder , Ehlbeck , Schluter , Kroh, 2010)
Pol(S-D-GMA)-tetraetil-dietilentriamin	0,43	3560	96 % (55 °C, 2 saat)	(Bayramoğlu , Karagöz , Yılmaz , Bıçak , Arica , 2011)
Kaolinite	29,2	3330	-	(Demirbas , Alkan , Demirbaş, 2013)
Hybrid epoxy/ $CaCO_3$	31,4	421	60 % (75 °C, 1 saat)	(Preety , 2014)
PVA/PA6-Cu(II)	41,1	3774	-	(Feng , Zhao , Wei , Li , Wei , Fong, 2014)
PVA-Cu(II)	43,5	3106	-	
Polidopamin-grafen oksit- Fe_3O_4	115,7	57,500	-	(Bayramoğlu , Altıntaş , Arica, 2012)
Karboksilik asit-titania	27,4	13400	60 % (50 °C, 2 saat)	(Wu, Liang, Shi , Wang , Yang , Jiang, 2013)
Bentonite	55,6	6,6	19 % (65 °C, 1 saat)	Cengiz S, Cavas L, Yurdakoç K (2012)
Sepiolite	49,2	8,7	22 % (55 °C, 1 saat)	
Amidoksim-polakrilonitril	69,2	7123	-	(Feng , Wang , Tang , Wie , Wang , Wie , Huang , Cai, Hou, Bi, 2013)
Pol(akrilpnitril-ko-akrilik asit)	77,9	9243	60 % (50 °C, 2 saat)	(Wang , Ke, Xu,2007)
Ktosan- Fe_3O_4	26,67	195	57 % (60 °C, 2 saat)	(Başak, Aydemir, Dinçer, Becerik, 2013)
p(VMK)-M-silika partikül	17,9	1870	63 % (55 °C, 1 saat)	

İmmobilize enzim ($V_{immobilize}$) tarafından katalizlenen reaksiyonun hızı, aynı miktardaki serbest enzim çözeltisinde ($V_{serbest}$) daha düşüktür. Çünkü yığın fazdan enzimin immobilize edildiği destek materyal üzerine yüzey veya gözenek alanından dolayı substrat difüzyonunda kısıtlama olur. Ayrıca desteğin gözenek boşluklarındaki substrat miktarı

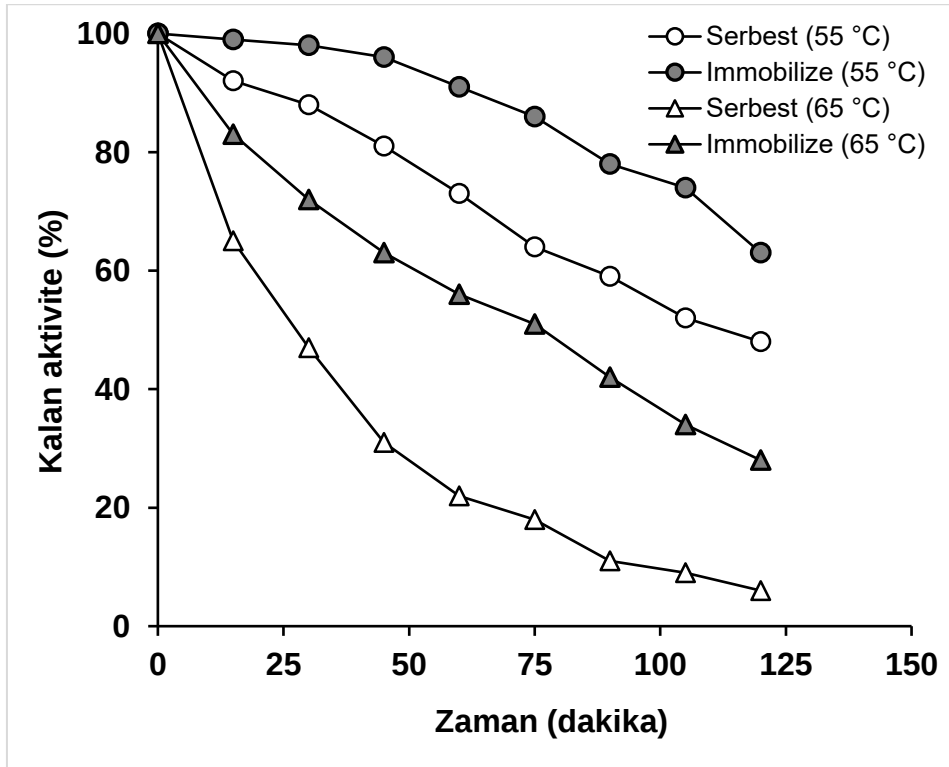
mikrogözeneklerde enzimatik reaksiyonlar tarafından tüketildiğinden dolayı yığın fazdakinden daha düşüktür. Bu yüzden reaktördeki immobilize enzimin işlevselliği için verimliliğe etki eden faktörler iyi bir şekilde belirlenmelidir. Verim faktörü (η) immobilize enzimin serbest enzime oranından eşitlik 4.1’ de verildiği gibi hesaplanabilir.

$$\eta = V_{\text{immobilize}} / V_{\text{serbest}} \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte $V_{\text{immobilize}}$ immobilize enzimin reaksiyon oranı, V_{serbest} ise serbest enzimin reaksiyon oranıdır. Bu eşitlik ile yapılan hesaplamaya göre p(VMK)-M kaplanmış silika partiküllü enzim sistemi immobilize katalaz için 0,776’lık bir verim faktörü sağlar.

4.3.4. Katalazın ısısal kararlılığı

55 ve 65 °C sıcaklıklarda 50 mM potasyum fosfat tamponun 120 dakika boyunca inkübasyondan sonra serbest ve immobilize katalazın aktivite karşılaştırmaları ve serbest ve immobilize katalazın ısısal kararlılık sonuçları Şekil 4.8’ de görülmektedir.

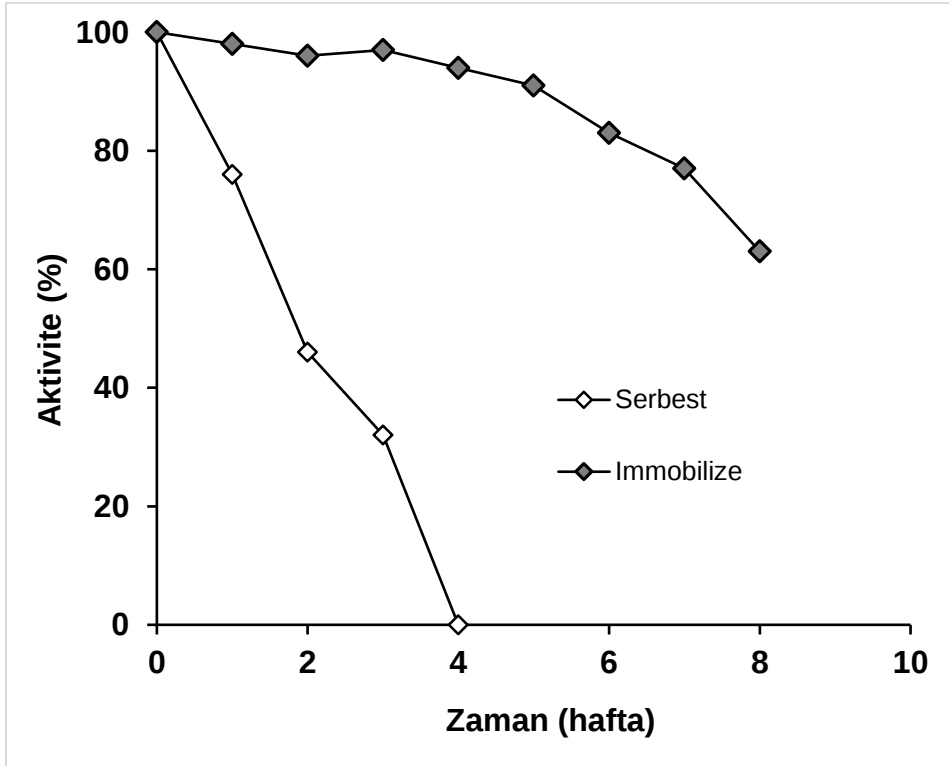


Şekil 4.8. 50mM pH 7,0 potasyum fosfat tamponunda 120 dakika boyunca 55 ve 65 °C sıcaklıklarında inkübasyon sonrası immobilize ve serbest katalazın aktivite karşılaştırmaları

İnkübasyon sıcaklığının artışı ile birlikte serbest ve immobilize enzimin aktivitesinde önemli ölçüde azalma gözlenmektedir. Diğer taraftan immobilize katalazın kalıcı aktivitesinde serbest enziminkinden daha az azalma meydana gelmektedir. Serbest ve immobilize katalazın kalan aktivitelerin 120 dakikalık inkübasyon süresi boyunca asıl aktivitelerinin sırasıyla %48 ve %63'ü olduğu bulundu. Diğer katalaz immobilizasyon verileriyle (Çizelge 4.1) karşılaştırıldığında bu değerlerin poli(itakonik asit)-Fe(III) ve poli(S-D-GMA)-tetraetil-dietilentriamin dışındaki diğer desteklerle daha çok benzerliğe sahip olduğu görüldü. Serbest katalaz enziminin kalan aktivitesinin 65 °C'da 120 dakikalık inkübasyon süresinde orjinal aktivitesinin yaklaşık %6'sı ve immobilize katalazın aynı periyotta aktivitesinin %28'nin korunduğu tespit edildi. Serbest enzimin tersiyer yapısının sıcaklık artışıyla kolayca deforme olması enzimin aktivitesinde şiddetli azalmaya sebep olmaktadır. Ancak enzim immobilizasyonunda destek üzerine katalaz moleküllerinin kovalent bağlanması katalazın aktif yapılarının deformasyonunu engeller (Bayramoglu, Akbulut, Ozalp ve Arica, 2015; Mateo, Abian, Fernandez-Lafuente ve Guisan, 2000).

4.3.5. Katalazın depolama kararlılığı

Depolama kararlılığı serbest enzimlerden ziyade immobilize enzimlerin önemli bir avantajıdır çünkü serbest enzimler aktivitelerini oldukça hızlı bir şekilde kaybederler. Genellikle bir enzim süspansiyon haline getirilmiş sulu bir ortamda uzun süre boyunca kararlı kalmaz ve aktivitesi giderek azalır. p(VMK)-M kaplanmış silika partiküller üzerine immobilize edilmiş katalaz ve serbest katalaz numuneleri aktivitelerinin karşılaştırılması için 4°C'da 50mM pH 7,0 potasyum fosfat tamponunda depolandı. Aktivite ölçümleri 8 haftalık bir süre boyunca gerçekleştirildi. Bu inkübasyon süresi boyunca depo çözeltisinde destekten materyalden enzim sızıntısı gerçekleşmedi. Serbest enzim 4 hafta içinde tüm aktivitesini kaybederken, immobilize enzim 8 haftalık inkübasyon periyodunda aktivitesinin yalnızca %37'sini kaybetti (Şekil 4.9). Bu sonuçlar immobilize enzimin depolama kararlılığının serbest enziminkinden önemli ölçüde daha fazla olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9. 50mM pH 7,0 potasyum fosfat tamponunda, 4°C sıcaklığında immobilize ve serbest katalazın depolama kararlılığı

4.4. İmmobilize Katalazın Yeniden Kullanım ve İşlemsel Kararlılığı

Bu çalışmadaki yeniden kullanım kararlılığı literatürdeki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Örneğin Cengiz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1 saatlik reaksiyonun 10 kere tekrarlanmasından sonra bentonit ve sepiyolit üzerine immobilize edilen katalazın aktivitesinde %36'lık bir kayıp olduğu rapor edilmiştir (Cengiz, Cavas ve Yurdakoc, 2012). Tez çalışmasında ise, P(VMK)-M üzerine immobilize edilen katalazın aktivitesinde ise 1,0 saatlik reaksiyonun 10 kere tekrarlanmasından sonra %23'lük bir azalma gözlenmiştir.

Kovalent bağlanma ile immobilize edilen katalazın işlemsel kararlılığı önceden belirtildiği gibi kesikli akış reaktöründe enzim aktivitesi ölçülerek incelendi. Enzimin reaktör kalış süresi 3,12 dakika olarak hesaplandı. Temas süresinin reaktör $117,29 \times 10^3$ birim katalaz içeren 1,0 g immobilize edilmiş p(VMK)-M kaplanmış silika partiküller ile yüklendiğinde 10ml akış oranında 10 mM H_2O_2 'nin hidrolizini tamamlamak için yeterli olduğu gözlemlendi. H_2O_2 'nin belirli deney koşulları altında hidrolizinin tamamlanması için 120 saat süren işlem sonunda bile reaktör verimli çalışmayı sürdürmüştür ancak bu süre zarfı sonunda

reaktöre yüklenen enzimin başlangıç aktivitesinin %36'sını kaybettiği gözlenmiştir. Birinci dereceden işlevsel inaktivasyon hız sabiti (k_i) (4.2) eşitliği ile hesaplanır.

$$\ln A = \ln A_0 - k_i t \quad (4.2)$$

Burada A_0 ve A sırasıyla başlangıç ve t dakika süre sonundaki aktivite değerlerini göstermektedir. İmmobilize enzimin inaktivasyon oran sabiti 30°C'da 10 mM H_2O_2 ile devam eden sistemde $6,4 \times 10^{-5}$ /dakika olarak hesaplanmıştır. Ancak inaktivasyon oran değeri yığın sistemler için $8,71 \times 10^{-4}$ / dakika olarak hesaplanmıştır. Yığın sistemde inaktivasyon oran sabitinin sürekli sisteminkinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yığın sistemde her çalıştırmadan sonra destek temizlendi ve reaksiyon ortamı yeniden süspansiyon haline getirildi ancak tekrar eden bu temizleme işlemi enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olabilir.

5. DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada alfa morfolin aşılantmış p(VMK) hazırlandı ve silika partiküller üzerine kaplandı. P(VMK)-M sentezi ve silika katısı üzerine aşılama yönteminin organik ve inorganik substratların modifikasyonunun Michael alıcı filmler oluşturmak için oldukça umut verici bir yöntem olduğu bulunmuştur.

P(VMK)-M aşılantmış silika partiküller katalazın tek adımda immobilizasyonu için kullanılmıştır.

Uygun koşullar araştırılırken immobilizasyonun pH'a bir etkisi olmadığı tespit edilirken immobilizasyon sonrası optimum sıcaklığın 35 °C'dan 45 °C'a çıktığı, ısı kararlılığının arttığı gözlemlendi.

P(VMK)-M kaplanmış silika partiküller üzerine immobilize edilen katalazın daha uzun depolama kararlılığına sahip olduğu tespit edildi.

Son olarak immobilize katalaz H₂O₂'nin sürekli bozunmasını test edebilmek için düzensiz akış reaktörü kullanıldı. Immobilize katalazın enzim reaktörü ile geniş bir zaman periyodunda kararlı bir işlevsel aktivite gösterdiği belirlendi. Böylece katalazın tek adımda immobilizasyonu için p(VMK)-M kaplanmış silika partiküllerin hazırlanıp kullanılmasının gelişmiş alternatif bir yöntem olabileceği görülmektedir. Bu yöntem organik veya inorganik moleküllerin basit ve verimli immobilizasyonu sağladığından dolayı diğer silika immobilizasyon yöntemlerinden daha avantajlıdır. Biyomolekül immobilize edilmiş silika içeren biyoteknolojik materyallerde, uygulamalarda destek malzeme olarak p(VMK)-M kaplanmış silika partiküllerin kullanılmasının yeni materyaller, sistemler geliştirmek veya mevcut materyalleri iyileştirmek amacıyla kullanılabilecek etkili ve kullanışlı bir uygulama olacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Afaq, S. and Iqbal, J. (2001). Immobilisation and stabilisation of papain on chelating. Sepharose: a metal chelate regenerable carrier. *Electronic Journal of Biotechnolog*, 4, 1–5.
- Ahmad, S., Anwar, A. and Saleemuddin, M. (2001). Immobilization and stabilization of invertase on Cajanus cajan lectin support. *Journal of Bioresource Technology*, 79(2), 121-127.
- Akar, Ç. (2015). Katalaz enziminin cevizden (*juglans regia*) saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Arica, M.Y. (2000-2008). Epoxy-derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization: covalently bound urease in a continuous model system. *Journal of Applied Polymer Science*, 77(9), 2000-2008.
- Arica, M.Y. ve Bayramoğlu, G. (2004). Polyethyleneimine coated poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) membranes for glucose oxidase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, 20(1), 73-77.
- Arica, M.Y. ve Bayramoğlu, G. (2006). Invertase reversibly immobilized onto polyethyleneimine-grafted poly(GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38, 131-138.
- Arica, M.Y., Bayramoğlu, G. ve Altıntaş, B. (2009). Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. *Bioresource Technology*, 100, 665-669.
- Arroyo, M. (1998). Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23–39.
- Basak, E., Aydemir, T., Dincer, A. ve Becerik, S.C. (2013). Comparative study of catalase immobilization on chitosan, magnetic chitosan and chitosan-clay composite beads. *Artif Cells Nanomed Biotechnology*, 41, 408–413.
- Başak, E. (2011). *Modifiye edilmiş kitosan boncuklar üzerinde katalaz enziminin immobilizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Bayramoglu, G., Akbulut, A., Ozalp, V.C. ve Arica, M.Y. (2015). Immobilized lipase on microporous biosilica for enzymatic transesterification of algal oil. *Chemical Engineering Research and Design*, 95, 12–21.
- Bayramoglu, G., Altintas, B. ve Arica, M.Y. (2012). Cross-linking of horseradish peroxidase adsorbed on polycationic films: utilization for direct dye degradation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 1355–1365.
- Bayramoglu, G., Arica, M.Y., Genc, A., Ozalp, V.Y., İnce, A. ve Bıçak, Y., (2016). A facile and efficient method of enzyme immobilization on silica particles via Michael

- acceptor film coatings: immobilized catalase in a plug flow reactor. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 39(6), 871–881.
- Bayramoglu, G., Tekinay, T., Ozalp, V.C. ve Arica, M.Y. (2015). Fibrous polymer grafted magnetic chitosan beads with strong poly(cation-exchange) groups for single step purification of lysozyme. *Journal of Chromatography B*, 990, 84–95.
- Bayramoglu, G., Yalçın, E. ve Arica, M.Y. (2005). Immobilisation of urease via adsorption onto L-histidine –Ni(II) complexed poly(HEMA-MAH) microspheres: Preparation and characterization. *Process Biochemistry*, 40(11), 3505-3513.
- Bayramoğlu, G. ve Arica, M.Y. (2009). Immobilization of laccase onto poly (glycidylmethacrylate) brush grafted poly (hydroxyethylmethacrylate) films: Enzymatic oxidation of phenolic compounds. *Materials Science and Engineering*, 29, 1990-1997.
- Bayramoğlu, G. ve Arica, M.Y. (2016). MCM-41 silica particles grafted with polyacrylonitrile: Modification in to amidoxime and carboxyl groups for enhanced uranium removal from aqueous medium. *Microporous and Mesoporous Materials*, 226, 117–124.
- Bayramoğlu, G., Tunalı, Y. ve Arica, M.Y. (2007). Immobilization of betagalactosidase onto magnetic poly(GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catalysis Communications*, 8(7), 1094-1101.
- Bhatia, R.B., Brinker, C.J., Ashley, C.S. and Haris, T.M. (1998). Synthesis of sol-gel matrices for encapsulation of enzymes using an aqueous routes, *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 519, 183-190.
- Bicak, N. (2014). A facile method for generating Michael acceptor thin films via amine substituted poly(vinyl methyl ketone). *Pure and Applied Chemistry*, 86, 1829–1838.
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brady, D. and Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*, 31, 1639-1650.
- Brant, A., Hole, A., Cannon, J., Helm, J., Swales, C., Welch, J., Taylor, A. and Cullinan, P. (2004). Occupational asthma caused by cellulase and lipase in the detergent industry. *Occupational Environmental Medicine*, 61, 793-795.
- Buback, M., Frauendorf, H., Günzler, F. and Vana, P. (2007). Electrospray ionization mass spectrometric end-group analysis of PMMA produced by radical polymerization using diacyl peroxide initiators. *Polymer*, 48, 5590–5598.
- Buchholz, K. and Klein, J. (1987). *Characterization of immobilized biocatalysts*. In: methods in enzymology, (Mosbach, K. ed.), London: Academic Press, 22-30.
- Cao, L.Q., Van-Langen, L. and Sheldon, R.A. (2003). Immobilised enzymes carrier-bound or carrier free. *Current Opinion Biotechnology*, 14, 387-394.

- Cengiz, S., Cavas, L. and Yurdakoc, K. (2012). Bentonite and sepiolite as supporting media: immobilization of catalase. *Applied Clay Science*, 65, 114–120.
- Cetinus, S.A., Sahin, E. ve Saraydin, D. (2009). Preparation of Cu(II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization. *Food Chemistry*, 114, 962–969.
- Chamulitrat, W., Takahashi, N. and Mason, R.P. (1989). Peroxyl, alkoxyl, and carbon-centered radical formation from organic hydroperoxides by chloroperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 7889–7899.
- Chaplin, M. and Bucke, C. (1990). *Enzyme technology*. New York: Cambridge University Press, 31–39.
- Charles, E. and Carraher, J. (2008). *Seymour/Carraher's polymer chemistry*. (Seventh Edition). Florida: CRC Press, 185–186.
- Chaudière, J. and Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms, *Food and Chemical Toxicology*, 37(9–10), 949–62.
- Chen, H., Mousty, C., Chen, L. and Cosnier, S. (2008). A new approach for nitrite determination based on a hrp/catalase biosensor. *Materials Science and Engineering C*, 28, 726–730.
- Chen, N., Huang, S., Liao, X.P. and Shi, B. (2011). Immobilization of catalase by using Zr(IV)-modified collagen fiber as the supporting matrix. *Process Biochemistry*, 46, 2187–2193.
- Cho, S.W. and Rhee, J.S. (1993). Immobilization of lipase for effective interesterification of fats and oils in organic solvent, *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 204–210.
- Demir, H. (2006, 24–26 Mayıs). *Aşotu (Coriandrum sativum) yapraklarından katalaz enziminin saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin araştırılması*. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.
- Dufresne, A. and Vignon, M.R. (1998). Improvement of starch film performances using cellulose microfibrils. *Macromolecules*, 31, 2693–2696.
- Duran, N., Rosa, M.A., Dannibale, A. and Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 907.
- Ertas, N., Timur, S., Akyılmaz, E. ve Dinçkaya, E. (2004). Specific determination of hydrogen peroxide with a catalase biosensor based on mercury thin film electrodes. *Turkish Journal of Chemistry*, 24, 95–99.
- Feng, Q., Wang, Q., Tang, B., Wie, A., Wang, X., Wie, Q., Huang, F., Cai, Y., Hou, D. and Bi, S. (2013). Immobilization of catalases on amidoxime polyacrylonitrile nanofibrous membranes. *Polymer International*, 62, 251–256.
- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M.A. and Moldes, D. (2012). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1808–1825.

- Fuentes, J.L. and Roberts, M. (1988). *Process of treatment of a paper pulp by an enzymic solution*. European Patent, 262040.
- Gao, X. (2004). *Immobilization of lipases via sol-gel procedures and application of the immobilized lipases in oleochemical reactions*. Phd Thesis, University of Nebraska, Lincoln.
- Gemeiner, P. (1992). *Materials for enzyme engineering in enzyme engineering*. New York: Ellis Horwood, 23-108.
- Geoffrey, M.C. (2000). *The cell a molecular approach* (2nd edition). Sunderland: Sinauer Associates, 73-79.
- Glazer, A.N., Bar-Eli, A. and Katchaski, E. (1962). Preparation and Characterization of Polytyrosyl Trypsin. *The Journal of Biological Chemistry*, 237, 1832–1838.
- Godjevargova, T., Dayal, R. and Marinov, I. (2004). Simultaneous covalent immobilization of glucose oxidase and catalase onto chemically modified acrylonitrile copolymer membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 91, 4057-4063.
- Gözükara, E.M. (2011). *Biyokimya*. 5. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 34-35.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymology*, 186, 1-95.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. and Magner, E. (2009). Understanding enzymes, Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cell, 15-30. *The royal Society of Chemistry*, 38, 453-468.
- Higashi, T., Kawamata, F. and Sakamoto, T. (1974). Studies on rat liver catalase.VII. double-labeling of catalase by ¹⁴C-leucine and 3H-d- aminolevulinic acid. Tokyo, *Journal Biochem*, 76, 703-708.
- Hofman, F. and Delbruck, K. (1909). *Farbenfabriken bayer*, German Patent, 250, 690.
- İnal, Ö. ve Yüksel, A. (1998). Kontakt Lensler ve Lens Çözeltileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27(1), 31-49.
- Jegannathan, K.R. and Abang, S. (2008). Production of biodiesel using immobilized lipase-a critical review. *Critical Review in Biotechnology*, 28, 253–264.
- Jiang, H.J., Yang, H. and Akins, D.L. (2008). Direct electrochemistry and electrocatalysis of catalase immobilized on a swnt-nanocomposite film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 623,181–186.
- John, E.S. (1985). *Biotechnology Principle*. Washington: American Society for Microbiology, 32-50.
- Jones, G.L. and Masters, C.J. (1976). On the comparative characteristics of mammalian catalases. *Biochemistry and molecular biology*, 55(4), 511-518.

- Juang, R.S., Wu, F.C. and Tseng, R.L. (2002). Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization. *Advances in Environmental Research*, 6, 171.
- Karube, I., Yugeta, Y. and Suzuki, S. (1977). Electric field control of lipase membrane activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 1493–1501.
- Kenneth, A.J. and Roger, S.G. (2011). The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264–8269.
- Kıran, Ö., Çömlekçiöğlu, U. ve Dostbil, N. (2006). Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1), 12-19.
- Kırk, O., Borchert, T. V. and Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications, *curr. Opin, Biotechnol*, 13, 345-351.
- Kumakura, M. and Kaetsu, I. (2003). Immobilization of cellulase using porous polymer matrix. *Journal Applied Polymer Science*, 29(9), 2713–2718.
- Kurbanova, R.A., Ragimov, A.V. and Aliyeva, D.N. (1976). Polistirenin açılmasının incelenmesi, *Plasticheskie Massy*, 9, 70-73.
- Lanır, A. and Schejter, A. (1975). On the sixth coordination position of beef liver catalase. *FEBS Letters Journal Impact*, 55 (1), 254–256.
- Ledwith, A. and Sherrington, D. C. (1974). *Reactivity, mechanism and structure in polymer chemistry*. New York: Wiley, 252.
- Li, Y., Wang, X.Y., Jiang, X.P., Ye, J.J., Zhang, Y.W. and Zhang, X.Y. (2015). Fabrication of graphene oxide decorated with Fe₃O₄@- SiO₂ for immobilization of cellulase. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(1), 1-12.
- Lida, T., Maruyama, D. and Fukunaga, K. (2000). Stabilization of entrapped catalase using photo crosslinked resin gel for use in wastewater containing hydrogen peroxide. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 75, 1026-1030.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658–666.
- Liu, Z. and Wang, Q. (2016). Radical addition-coupling polymerization (RACP) of various benzyl-type biradical toward periodic polymers. *Polymer*, 94, 14-18.
- Malkoç, A. (2011). *Polimer modifiyeli silika nanopartiküllerin enzim immobilizasyonunda kullanımı*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- MaolIn, Z., Jun, L., Min, Y. and Hongfei, H. (2000). The swelling behavior of radiation prepared semi-interpenetrating polymer networks composed of polyNIPAAm and hydrophilic polymers. *Radiation Physics and Chemistry*, 58, 397-400.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M. (2000). Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by

- favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microbial Technology*, 26, 509–515.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M. (2000). Reversible enzyme immobilisation via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 98–105.
- Michaelis, L. and Menten, M. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333–369.
- Moawia, R.M., Nasef, M.M., Mohamed, N.H. and Ripin, A. (2016). Modification of flax fibres by radiation induced emulsion graft copolymerization of glycidyl methacrylate. *Radiation Physics and Chemistry*, 122, 35–42.
- Modrzejewska, B., Guwy, A.J., Dinsdale, R. and Hawkes, D.L. (2007). Measurement of hydrogen peroxide in an advanced oxidation process using an automated biosensor. *Water Research*, 41, 260–268.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2005). *Lehninger biyokimyanın ilkeleri*. (Çeviri: Kılıç, N.). 3. Baskı, Ankara: Palme Yayınları, 22–46.
- Nelson, J.M. and Griffin, E.G. (1916). Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society*, 38, 1109–1115.
- Netto, C.G.C.M., Toma, H.E. and Andrade, L.H. (2013). Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85, 71–92.
- Nicholls, P., Fita, I. and Loewen, P.C. (2000). Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*, 51, 51–106.
- Nisha, S., Arun-Karthick, S. and Gobi, N. (2012). A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chemical Science Review and Letters*, 1(3), 148–155.
- O'Brien, K.B., Killoran, S.J., O'Neill, R.D. and Lowry, J.P. (2007). Development and characterization in vitro of a catalase-based biosensor for hydrogen peroxide monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2994–3000.
- Odian, G. (1970). *Principles of polymerization*. New York: McGraw-Hill Book Company, 21–130.
- Odian, G. (2004). *Principles of Polymerization*. (Fourth edition). New Jersey: Wiley, 1–87.
- Otsu, T. and Yoshida, M. (1982). Role of initiator-transfer agent-terminator (iniferter) in radical polymerizations: Polymer design by organic disulfides as iniferters. *Die Makromolekulare Chemie Rapid Communications*, 3, 127–132.
- Önal, T.S. (2000). *Karpuz (sitruş vulgaris) a-galaktozidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu*. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- Özhan, F. (2014). *Katalaz aktivitesi üzerine cyprodinil ve fludioxonil pestisitlerin etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adıyaman.
- Paar, A., Costa, S., Tzanov, T., Gudelj, M., Robra, K.H., Cavacopaulo, A. and Gubitz, G.M. (2002). Thermo-alkali-stable catalases from newly isolated *bacillus* sp. for the treatment and recycling of textile bleaching effluents. *Journal of Biotechnology*, 89, 147-153.
- Prakash, P.A., Yogeswaran, U. and Chen, S.M. (2009). Direct electrochemistry of catalase at multiwalled carbon nanotubes-nafion in presence of needle shaped DDAB for H₂O₂ sensor. *Talanta*, 15, 1414-1421.
- Pryakhin, A.N., Chukhrai, E.S. and Poltorak, O.M. (1977). Glucose 6-phosphate dehydrogenase immobilized by adsorption on silica gel solid supports. *Vestnik Moskovskogo Universiteta Seriya 2: Khimiya*, 18(1), 125.
- Rahman, M.A., Won, M.S. and Shim, Y.B. (2003). Characterization of an EDTA bonded conducting polymer modified electrode: its application for the simultaneous determination of heavy metal ions. *Analytical Chemistry*, 75, 1123-1129.
- Rattan, S. and Sehgal, T. (2012). Stimuli-Responsive polymeric membranes through graft copolymerization of n-isopropylacrylamide onto polycarbonate track etched membranes for biomedical applications. *Procedia Chemistry*, 4, 194-201.
- Rieger, M.M. (1993). Oxidative Reactions in and on Skin: mechanism and prevention, *Cosmetics&Toiletries*, 108, 43-56.
- Romo-Sanchez, S., Arevalo-Villena, M., Romero, E.G., Ramirez, H.L. and Perez, A.B. (2014). Immobilization of b-glucosidase and its application for enhancement of aroma precursors in muscat wine. *Food Bioprocess Technology*, 7, 1381–1392.
- Salimi, A., Hallaj, R. and Khayatian, G.R. (2005). Amperometric detection of morphine at preheated glassy carbon electrode modified with multiwall carbon nanotubes. amperometric detection of morphine at preheated glassy carbon electrode modified with multiwall carbon nanotubes. *Electroanalysis*, 17, 873-879.
- Salimi, A., Noorbakhsh, A. and Ghadermarz, M. (2005). Direct Electrochemistry and electrocatalytic activity of catalase incorporated onto multiwall carbon nanotubes-modified glassy carbon electrode. *Analytical Biochemistry*, 344, 16–24.
- Schallreuter, K.U. and Moore, J. (2002). Behrens-Williams S et al. Rapid initiation of repigmentation in vitiligo with Dead Sea climatotherapy in combination with pseudocatalase (PC-KUS). *International Journal of Dermatology*, 41, 482- 487.
- Seriner, R. (2010). *Katalaz enziminin hıyardan (cucumis sativus) saflaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Sezgintürk, M.K., Göktuğ, S. ve Dinçkaya, E. (2005). A biosensor based on catalase for determination of highly toxic chemical azide in fruit juices. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 684–688.

- Sheldon, R.A. (2010). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) as industrial biocatalysts. Biocatalysis challenges for pharmaceuticals and fine chemicals. SCI HQ, London. *Delft University of Technology CLEA Technologies*, 2, 1831–2000.
- Sheppard, C.S. and Kamath, V.R. (2004). The selection and use of free radical initiators. *Polymer Engineering & Science*, 19, 597-606.
- Silvestri, G., Gambino, S. and Filardo, G. (2005). Electrochemical production of initiators for polymerization processes. *Advances in Polymer Science*, 38, 27-54.
- Sweeny, W., Sorenson, W.R. and Campbell, T.W. (1961). *Preparative methods of polymer chemistry*. New York: Wiley-Interscience, 54-98.
- Szwarc, M. (1968). *Carbanions living polymers and electron transfer processes*. New York: Wiley 221-348.
- Tanaka, A. and Kawamoto, T. (1999). *Cell and enzyme immobilization*. In: *manual of industrial microbiology and biotechnology*. Washington: American Society for Microbiology, 165-180.
- Tarhan, L. (1995). Use of immobilised catalase to remove H₂O₂ used in the sterilisation of milk. *Process Biochemistry*, 30(7), 623-628.
- Teramoto, N., Motoyama, T., Yasomiya, R. and Shibata, M. (2003). Synthesis, thermal properties, and biodegradability of propyl-etherified starch. *European Polymer Journal*, 39, 255–261.
- Teramoto, N., Motoyama, T., Yasomiya, R. and Shibata, M. (2003). Synthesis, thermal properties, and biodegradability of propyl-etherified starch. *European Polymer Journal*, 39, 255–261.
- Thakur, V.K. and Kessler, M.R. (2014). Free radical induced graft copolymerization of ethyl acrylate onto SOY for multifunctional materials. *Materials Today Communications*, 1, 34-41.
- Thakur, V.K., Thakur, M.K. and Gupta, R.K. (2013). Development of functionalized cellulosic biopolymers by graft copolymerization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 44-51.
- Topçu, A. (2008). *Hidrojen peroksit elektrodu tasarımıda kullanılmak üzere katalazın manyetik kürelere immobilizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.
- Trevañ, M. (1980). *Techniques of immobilization*. In: *immobilized enzymes. An introduction and applications in biotechnology*. New York: Wiley, 42-46.
- Twyman, R.M. (2005). *Immobilized enzyme*. London: Encyclopedia of Analytical Science, 520-528.
- Uhlìg, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications*. Canada: Wiley, 147-366.

- Varalakshmi, V. and Siva, D. (2013). Enzyme immobilization: The fascinating challenge in biotechnology. *Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology*, 2(3), 840-853.
- Varma, S. and Mattiasson, B. (2005). Amperometric biosensor for the detection of hydrogen peroxide using catalase modified electrodes in polyacrylamide. *Journal of Biotechnology*, 119, 172–180.
- Wang, F., Guo, C., Yang, L.R. and Liu, C.Z. (2013). Magnetic mesoporous silica nanoparticles: fabrication and their laccase immobilization performance. *Bioresource Technology*, 101, 8931–8935.
- Wang, P., Qi, C., Yu, Y., Yuan, J., Cui, L., Tang, G., Wang, Q. and Fan, X. (2015). Covalent immobilization of catalase onto regenerated silk fibroins via tyrosinase-catalyzed cross-linking. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 177, 472–485.
- Wang, S.S. (1993). *Chemistry of protein conjugation and cross linking*. Florida: CRC Press, 89-290.
- Wang, Z.G., Ke, B.B. and Xu, Z.K. (2007). Covalent immobilization of redox enzyme on electrospun nonwoven poly (acrylonitrile-coacrylic acid) nanofiber mesh filled with carbon nanotubes: a comprehensive study. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 708–720.
- Wiseman, A. (1986). *Handbook of enzyme biotechnology*. London: Wiley, 241-390.
- Woo, E.J., Kwon, H.S. and Lee, C.H. (2015). Preparation of nanomagnetite impregnated mesocellular foam composite with a Cu ligand for His-tagged enzyme immobilization. *Chemical Engineering Journal*, 274, 1–8.
- Yang, D., Wang, X., Shi, J., Wang, X., Zhang, S., Han, P. and Jiang, Z. (2016). In situ synthesized rGO–Fe₃O₄ nanocomposites as enzyme immobilization support for achieving high activity recovery and easy recycling. *Biochemical Engineering Journal* 105, 273–280.
- Yang, Y.G. and Chase, H.A. (1998). Immobilisation of α -amylase on poly(vinyl alcohol)-coated perfluoropolymer supports for use in enzyme reactors. *Biotechnology, Applied Biochemistry*, 2, 145–154.
- Yavuz, H., Bayramoğlu, G., Kaçar, Y., Denizli, A. ve Arıca, M.Y. (2002). Congo Red attached monosize poly(HEMA-co-MMA) microspheres for use in reversible enzyme immobilisation. *Biochemical Engineering Journal*, 10, 1-8.
- Yener, F. (2007). *Pektinaz enziminin farklı iki destek üzerine immobilizasyonu ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Zaborsky, O. (1973). *Immobilized enzymes*. Cheveland: CRC Press, 5-22.
- Zang, J., Jia, S., Liu, Y., Wu, S. and Zhang, Y. (2012). A facile method to prepare chemically cross-linked and efficient polyvinyl alcohol/chitosan beads for catalase immobilization. *Catalysis Communications*, 27, 73–77.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : GENÇ, Ayşenur
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 22.04.1991, Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 05306170289
 e-mail : gencaysenur53@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi	2014
Lise	Ali Naili Erdem Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-2016	B.Ü. Özel Ayşeabla Okulları	Kimya Öğretmeni

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Bayramoğlu, G., Arica, M.Y., Genc, A., Ersoy, G., Özalp, V.C., İnce, A. ve Bıcak, N. (2016). A facile and efficient method of enzyme immobilization on silica particles via Michael acceptor film coatings: immobilized catalase in a plug flow reactor. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 39(6), 871–881.



GAZİ GELECEKTİR..