

**AMİNOASİT İÇEREN POLİMERİK SCHİFF BAZI VE Ni(II)
KOMPLEKSİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE
İMMOBİLİZASYONU**

VİLDAN ERDURAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞUBAT 2010
ANKARA**

Vildan ERDURAN tarafından hazırlanan “AMİNOASİT İÇEREN POLİMERİK SCHİFF BAZI VE Ni(II) KOMPLEKSİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE İMMOBİLİZASYONU ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

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

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

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

Doç.Dr. Nurşen SARI
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç.Dr. Yüksel TUFAN
Gazi Eğitim Fakültesi, Kimya Bölümü, Gazi Üniversitesi

Tarih: 19/ 02 / 2010

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

Prof. Dr. Bilal TOKLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Vildan ERDURAN

**AMİNOASİT İÇEREN POLİMERİK SCHİFF BAZI VE Ni(II)
KOMPLEKSİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE
İMMOBİLİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

Vildan ERDURAN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Şubat 2010**

ÖZET

Bu çalışmada, Alanin (Ala) ve (4-formil-3-metoksifenoksimetil)polistirenden (FMPS) Schiff bazı içeren polimer (FMPS-Ala-Sch), ve bunun Ni(II) kompleksi (FMPS-Ala-Sch-Ni) sentezlendi. Polimerik-Schiff bazlarının yapıları element analizi, termogravimetrik analiz (TGA), taramalı elektron mikroskobu (SEM), ve UV-GB spektrumları ile aydınlatıldı. Bu üç farklı polimere kovalent bağlama yönetimi ile β -galaktosidaz immobilize edildi. Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine etki eden sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, depolama süresi gibi çeşitli parametrelerin etkisi ve immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği incelendi. Serbest enzim, (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni) için K_m / V_{mak} değerleri sırasıyla 0,343mM / 0,0259 mM.dak⁻¹, 0,104mM / 0,0126 mM.dak⁻¹, 0,0617 mM / 0,0417 mM.dak⁻¹, 0,210 mM / 0,0287 mM.dak⁻¹ olarak hesaplandı. (FMPS-Ala-Sch-Ni)'in depolama kararlılığının diğer polimerlere oranla daha yüksek olduğu görüldü.

Bilim kodu	: 405.1.117
Anahtar Kelimeler	: Polimer, Schiff bazı, Ni(II) kompleksi, immobilizasyon, β-Galaktosidaz; polistiren
Sayfa Adedi	: 44
Tez Yöneticisi	: Yrd.Doç.Dr.Hayrettin TÜMTÜRK

**SYNTHESES, CHARACTERIZATION OF POLYMERIC-SCHIFF BASE
INCLUDING AMINOACID AND IT'S Ni(II) COMPLEXES AND
IMMOBILIZATION
(M.Sc. Thesis)**

Vildan ERDURAN

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
February 2010**

ABSTRACT

In this study, polymer-bound Schiff bases (FMPS-Ala-Sch) and it's Ni(II) complex were synthesized from alanine and (4-formyl-3-methoxyphenoxyethyl)polystyrene (FMPS). The structure of polymer-bound Schiff bases were characterized elemental analysis, thermogravimetry (TGA), scanning electron microscopy (SEM) and spectrum of UV-GB. β -Galactosidase was immobilized onto the (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) and (FMPS-Ala-Sch-Ni) complexes with using the covalent binding. The influence of temperature, pH, and storage capacity on the free and immobilized β -galactosidase was investigated. In addition, reusability of immobilized β -galactosidase was studied. The K_m / V_{max} values were calculated as 0.343mM/ 0.0259 mMmin⁻¹ for free β -galactosidase and 0.104 mM / 0.0126 mMmin⁻¹, 0.0617 mM / 0.0417 mMmin⁻¹ and 0.210 mM / 0.0287 mMmin⁻¹ for β -galactosidase immobilized to the (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) and (FMPS-Ala-Sch-Ni) supports respectively. The storage capacity of (FMPS-Ala-Sch-Ni) was found higher than that of the other polymers.

Science code : 405.1.117

Key Words : Polymer, Schiff-base, Ni(II) complex, immobilization, β -Galactosidase; polystyrene

Number of pages : 44

Supervisor : Assist.Prof.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım günden itibaren sadece akademik çalışmalarında değil, yardıma her ihtiyacım olduğunda yanımda bulduğum, gelecek yaşamımda yoluma ışık tutacaklarını düşündüğüm çok değerli danışman hocalarım başta Sayın Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK ve Sayın Doç. Dr. Nurşen SARI' ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Uzman Sayın Ferat ŞAHİN' e, SEM resimlerini çeken Sayın Prof. Dr. Zekiye SULUDERE' ye teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yanımda olan, yardım ve desteğini eksik etmeyen çalışma arkadaşım Arş. Gör. Elif AYNACI' ya çok teşekkürler.

Tüm hayatım boyunca mutlulukları ve hüznleri paylaştığım desteğini her an yanımda hissettiğim annem Zeynep DİLEK' e, kardeşlerim Tuğba, Merve ve Beyza Sultan DİLEK' e, eşim Muhammet ERDURAN' a bu süreçte de motivasyonumu sağlamama yardımcı oldukları için sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Koordinasyon Polimerleri	3
2.1.1. Monomer-metal kompleksinin polimerleşmesi ve kopolimerleşmesi ...	3
2.1.2. Akrilik monomer sistemleri	3
2.1.3. Stiren monomer sistemleri	3
2.1.4. Akrilik polimer sistemleri	3
2.1.5. Çeşitli metal-kondensasyon polimer kompleksleri	4
2.1.6. Metal içeren plazma polimerler	4
2.2. Schiff Bazı Takılı Polimerler	5
2.3. Enzimler ve Enzim İmmobilizasyonu	9
2.3.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması	10
2.3.2. Enzimlerin uygulama alanları	10
2.3.3. β -Galaktosidaz enzimi ve özellikleri	10

Sayfa

2.3.4. Enzim immobilizasyonu.....	12
2.3.5. Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri	13
3. MATERYAL VE METOT	14
3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler, Cihazlar ve Teknikler	14
3.1.1 Kimyasal maddeler.....	14
3.1.2. Element analizi	14
3.1.3. Atomik absorpsiyon spektrofotometrisi	14
3.1.4. Ultraviyole görünür bölge spektrumları	15
3.1.5. pH metre.....	15
3.1.6. Çalkalamalı su banyosu.....	15
3.1.7. Fourier transform infrared spektrometresi (FTIR)	15
4. DENEYSEL KISIM.....	16
4.1. Schiff Bazı Takılı Polimerin Hazırlanması (Genel Yöntem)	16
4.1.1. (FMPS-Ala-Sch) Schiff bazının sentezi	16
4.2. Schiff Bazı Takılı Polimerin Ni(II) Kompleksinin Hazırlanması (Genel Yöntem).....	16
4.2.1. Birinci adım; metal-alanin komplekslerinin hazırlanması	16
4.2.2. İkinci adım; koordinasyon polimerlerinin hazırlanması	17
4.3. p-nitrofenil- β -D-galaktosid Kalibrasyon Grafiği	17
4.4. (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni) Polimerlerinin Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilizasyon İşlemleri	18
4.4.1. Aktivlik tayininde kullanılan çözeltiler	18
4.4.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle enzim immobilizasyonu	19

Sayfa

4.4.3. Serbest β -galaktosidaz enziminin aktiflik tayini	19
4.4.4. İmmobilize β -galaktosidaz enziminin aktiflik tayini	20
4.4.5. Serbest β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisi.....	20
4.4.6. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisi	20
4.4.7. Serbest β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisi	20
4.4.8. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	21
4.4.9. Serbest β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	21
4.4.10. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	21
4.4.11. Serbest β -galaktosidaz enziminin depolanma kararlılığı	21
4.4.12. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı	21
4.4.13. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın tekrar kullanılabilirliği	22
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	23
5.1. Schiff Bazı Takılı Polimerin Karakterizasyonu	23
5.1.1. (FMPS-Ala-Sch) Schiff bazı takılı polimer $[C_{17}H_{16}O_4N(C_8H_8)_{10}]$	23
5.1.2. (FMPS-Ala-Sch-Ni) Schiff Bazı-Ni(II) kompleksi $[C_{17}H_{18}O_5N(C_8H_8)_{10}NiCl]$	27
5.2. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen β -galaktosidazın Aktifliğine pH Etkisi	30
5.3. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen β -galaktosidazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	31
5.4. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi	33

Sayfa

5.4.1. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	34
5.5. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen β -galaktosidazın Depolama Kararlılığı.....	36
5.6. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen β -galaktosidazın Aktifliğinin Tekrar Kullanım ile Değişimi.....	36
5.7. SEM Analizi	37
6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	38
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	44

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 5.1. (FMPS-Ala-Sch) Schiff bazının fiziksel özellikleri ve analitik verileri.	23
Çizelge 5.2. (FMPS) ve (FMPS–Ala-Sch) polimerlerinin FTIR ve UV-GB spektrum değerleri	24
Çizelge 5.3. (FMPS) ve (FMPS-Ala-Sch)’in termal analiz değerleri	26
Çizelge 5.4. (FMPS-Ala-Sch-Ni) Schiff bazı-Ni(II) kompleksinin fiziksel özellikleri ve analitik verileri.	28
Çizelge 5.5. (FMPS-Ala-Sch-Ni) Schiff bazının önemli FTIR ve UV-GB spektrum değerleri	29
Çizelge 5.6. (FMPS-Ala-Sch-Ni)’in termal analiz değerleri	30
Çizelge 5.7. Serbest ve polimerlere kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın kinetik parametreleri	35

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Poli(akrilik asit) ile oluşan Co(III) şelatu	4
Şekil 2.2. Metal içeren poliüretanlar	4
Şekil 2.3. Aminopolistirenden iki adımda hazırlanan koordinasyon polimeri.....	6
Şekil 2.4. Fe(III)-Schiff bazı'nın poli(stiren-divinilbenzen) ile kondenzasyon ürünleri	7
Şekil 2.5. <i>N,N</i> -bis (3-alil salisilidin) <i>o</i> -fenilendiamin Kobalt(II) Schiff bazı	7
Şekil 2.6. Modifiye olmamış (a) ve modifiye olmuş polisitirenin (b) SEM fotoğrafları.....	8
Şekil 2.7. Y-zeolit ile aldehitin kondenzasyonu.....	8
Şekil 2.8. Sal-Ala-Mn yapısı.....	9
Şekil 2.9. Aminometilpolistiren-vanilin-Schiff bazı.....	9
Şekil 2.10. β -Galaktosidazın üç boyutlu yapısı.....	11
Şekil 2.11. β -Galaktosidaz enziminin katalizlediği reaksiyon.....	11
Şekil 4.1. Ni-Ala kompleksi için öngörülen yapı.....	17
Şekil 4.2. P-Nitrofenil β -D-galaktosid kalibrasyon grafiği.....	18
Şekil 5.1. Schiff bazı takılı polisitiren.....	23
Şekil 5.2. (FMMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni)'e ait FTIR spektrumu.....	24
Şekil 5.3. (a) (FMPS) ve (b) (FMPS-Ala-Sch) polimerlerinin SEM fotoğrafları	25
Şekil 5.4. (FMPS) polimerine ait UV-GB spektrumu.....	25
Şekil 5.5. (FMPS-Ala-Sch) polimerine ait UV-GB spektrumu	26
Şekil 5.6. (FMPS) polimerlerinin TGA eğrisi.....	27
Şekil 5.7. (FMPS-Ala-Sch) polimerlerinin TGA eğrisi	27

Şekil	Sayfa
Şekil 5.8. Schiff Bazı-Ni(II) takılı polimer	28
Şekil 5.9. (FMPS-Ala-Sch-Ni) polimerine ait UV-GB spektrumu	29
Şekil 5.10. (FMPS-Ala-Sch-Ni) polimerlerinin TGA eğrisi	30
Şekil 5.11. Serbest ve polimerlere kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β- galaktosidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi	31
Şekil 5.12. Serbest ve polimerlere kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β-galaktosidazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi	32
Şekil 5.13. Serbest ve polimerlere kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β-galaktosidaza ait Linewear- Burk grafiği	35
Şekil 5.14. (a) FMPS ve (b) immobilize FMPS SEM resimleri	37
Şekil 6.1. Ön görülen enzim-polimer etkileşimleri	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklama

B

Beta

ΔA

Absorbans değişimi

ΔC

Derişim değişimi

μm

Mikrometre

μL

Mikrolitre

K_m

Michaelis-Menten sabiti

UV

Ultraviyole

V_{mak}

Maksimum hız

V

Hız

Kısaltmalar

Açıklama

BRT

Britton ve Robinson Tamponu

Ala

Alanin

FMPS

4-formil-3 metoksifenoksi metil polistiren

FMPS –Ala-Sch

Schiff bazı ligantı bağlı FMPS

FMPS -Ala-Sch-Ni

Schiff bazı ligantı bağlı FMPS'nin Ni^{2+} kompleksi

1. GİRİŞ

Enzimler, binlerce yıldır ekmek, peynir ve şarap gibi gıda maddelerinin yapımında kullanılmaktadır. Günümüzde ise enzimlerin kullanılmadığı alan hemen hemen yok gibidir. Gıdadan tekstil sektörüne kadar çok geniş ve yaygın bir kullanım sahasına sahip enzimlerle çalışmak bilim dünyası açısından oldukça ilgi görmektedir.

Doğal katalizör olan enzimlerin biyoteknojide kullanımının çeşitlenmesi, bilim çevrelerini bu katalizörlerin daha işlevsel ve ekonomik hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir.

Özel katalizör olan enzimler genellikle suda çözünürler. Biyoteknolojik araştırmalar genellikle sulu çözeltilerde yapıldığından, katalizör olarak kullanılan serbest enzimin geri kazanımı kolay ve ekonomik değildir. Enzimlerin bu dezavantajı çalışmaların güçlüğüyle yürütmesine ve oldukça yüklü bir maliyet gerektirmesine sebep olmaktadır. Diğer bir sorun ise serbest enzimin istenildiğinde reaksiyon ortamından uzaklaştırılamaması ve reaksiyon kontrol zorluğudur. İşte tüm bu nedenlerden dolayı doğal katalizör olan enzimlerden gerektiği kadar yararlanılamamaktadır. Bu sorunları ortadan kaldırmak, enzimlerin özelliklerinden sonuna kadar yararlanılabilmek için son yıllarda enzim immobilizasyon araştırmaları önem kazanmıştır [1].

Polimer tabanlı Schiff bazları üzerine enzim immobilizasyon çalışmalarının giderek arttığı görülmektedir. Bu çalışmalar ise genellikle metal [1,2] veya bazı organik moleküllerin [3-5] polimerlere kimyasal bağla bağlanması şeklinde gerçekleşmektedir.

Polimerik-Schiff bazları ile ilgili ilk çalışmalar 1960'lı yıllarda Delman ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [6]. Bu araştırmayı takiben Bottino ve arkadaşları [7] metal seçici özelliklerini incelerken 5-5'-metilen-bis-salisilaldehitin polimerik-Schiff bazını sentezlemişlerdir. Elektrokatalitik etki üzerine araştırma yapan Woo-Seong Kim ve Yong-Kook Choi isimli araştırmacılar, polimerik-Schiff bazının sentezi sırasında aldehit bileşeni olarak salisilaldehiti kullanmışlardır [8].

Son zamanlara kadar bir değerlendirme yapıldığında polimerik-Schiff bazları ile ilgili sentez ve karakterizasyonların devam ettiği, hatta koordinasyon polimerleri adı altında çalışmaların yaygınlaştığı görülmektedir [9, 10].

Bu çalışmada; β -galaktosidaz enziminin Schiff bazı içeren polimeri ve o'nun Ni(II) kompleksi üzerine immobilizasyon özelliklerinin araştırılması üzerine olmuştur. Bu amaçla, 4-formil-3-metoksifenoksimetil)polistiren (FMPS) ve alaninden kondenzasyon yolu ile polimerik-Schiff bazı (FMPS-Ala-Sch) ve bu Schiff bazının Ni(II) kompleksi (FMPS-Ala-Sch-Ni) sentezlendikten sonra, kovalent bağlama yöntemi ile immobilize edilme özellikleri araştırıldı. Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine etki eden sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, depolama süresi gibi çeşitli parametrelerin etkisi ve immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği incelendi. Polimerik-Schiff bazlarının yapıları element analizi, TGA, SEM, ve UV-GB spektrumları ile aydınlatıldı.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Koordinasyon Polimerleri

Koordinasyon polimerlerinin hazırlanmasında kullanılan yöntemler Özcan S. ve Kahraman E. isimli araştırmacıların yüksek lisans tezinde detaylı olarak belirtilmiştir. Aşağıda bu tezlerden faydalanarak bir özet sunulmuştur [11,12].

2.1.1. Monomer-metal kompleksinin polimerleşmesi ve kopolimerleşmesi

Bu işlem verim düşüklüğü sebebiyle sınırlı sayıda kullanılır. Genellikle monomerle metal iyonunun birleşmesinin ardından polimerleşme izlemektedir.

2.1.2. Akrilik monomer sistemleri

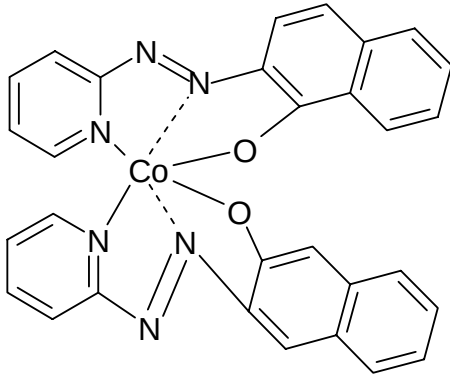
Fe(III)metakrilat ($\text{Fe}[\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}]_3$) ve tributylkalaymetakrilat gibi monomerler sentezi [13]. Sikloheksil, 2-etoksietil, 2-hidroksietil ve 2-hidroksipropil gibi diğer akrilatlarla serbest radikalik polimerleşme veya kopolimerleşme olması akrilik monomer sistemlerine örnek olarak verilebilir [14].

2.1.3. Stiren monomer sistemleri

Zincir transferinde rol oynayan trietilalüminyum (AlEt_3)' un bulunduğu polistirilalüminyum türevlerinin hazırlanması yeni bir işlemdir [15].

2.1.4. Akrilik polimer sistemleri

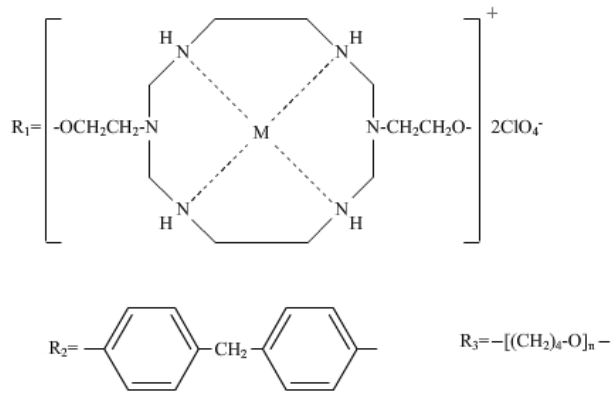
Bir metal tuzunun veya metal içeren şelatın akrilik polimerlerle etkileştirilmesidir. Örneğin, Co(III), şelat olan bis-2-(2-azopiridil)-1-naftol Co(III), ile poliakrilik asit ve diğer polielektrolitlerle etkileştirilerek koordinasyon polimerini sentezleyen araştırmacılar aşağıda gösterilen yapıyı önermişlerdir (Şekil 2.1) [16].



Şekil 2.1. Poli(akrilik asit) ile oluşan Co(III) şelatı

2.1.5. Çeşitli metal-kondensasyon polimer kompleksleri

Bu tür komplekslere poliamit, poli(amido-aminler), polimidler ve poliüretanlar örnek olarak verilebilir. Örneğin metal içeren poliüretanlar; hegzametilendiizosiyonat ve toliendiizosiyonatlı mono(hidroksietil)ftalatın Co(II) ve Cu(II) tuzların polikondenzasyonu ile koordinasyon polimerleri sentezlenmiştir (Şekil 2.2) [17].



Şekil 2.2. Metal içeren poliüretanlar

2.1.6. Metal içeren plazma polimerler

Plazma polimerlerdeki metallerin tutulması günümüze kadar süren çalışmalara konu olmuştur. Metal içeren plazma polimerler için üç metot bilinmektedir, bunlardan birincisi Organometalik bileşiklerin plazma polimerleşmesi, ikincisi, metallerin

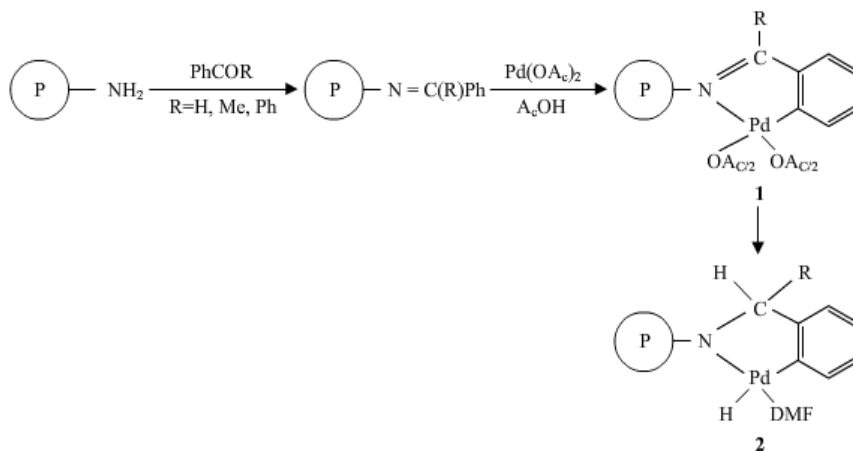
oyulması [18], üçüncüsü ise bir plazma polimerleşme sistemine metal buharının gönderilmesidir [19].

2.2. Schiff Bazı Takılı Polimerler

Schiff bazı takılı polimerler üzerine yapılan çalışmaların 1970 li yıllardan itibaren hızlanarak çeşitlendiği literatür taramaları sonucunda görülmektedir. 1978 yılında Shields ve Boucher [20] silika üzerinde bulunan aminin salisilaldehit ile tepkimesi sonucunda Schiff bazını sentezledikleri ve bu Schiff bazına Cu(II) iyonlarını bağladıklarını ifade etmişlerdir. Bu çalışma, Schiff bazı bağlı silika ve polimerler üzerine olan çalışmalara temel oluşturmuştur. Schiff bazı bağlı polistiren üzerine olan çalışmaların özeti, aşağıda sunulmuştur.

Islam ve arkadaşları aminopolistiren ve PhCOR (R:H, CH₃, C₆H₅) bileşiğinin kondenzasyonu sonucunda oluşan Schiff bazıyla, Palladyum(II)asetatın koordinasyon polimerini sentezleyerek, bu polimerin katalitik aktivitesini ve bazı kinetik özelliklerini incelemişlerdir [21].

Islam ve arkadaşları Palladyum(II)' nin katalitik etkisini artırmak için, aminopolistirenden iki adımda hazırlanan koordinasyon polimerini sentezleyerek, •NO₂, >C=C<, >C=N•, •C=C•, gibi radikal fonksiyonel grupların indirgenmesi üzerine olan çalışmaların daha iyi sonuç verdiğini ifade etmişlerdir (Şekil 2.3) [22].

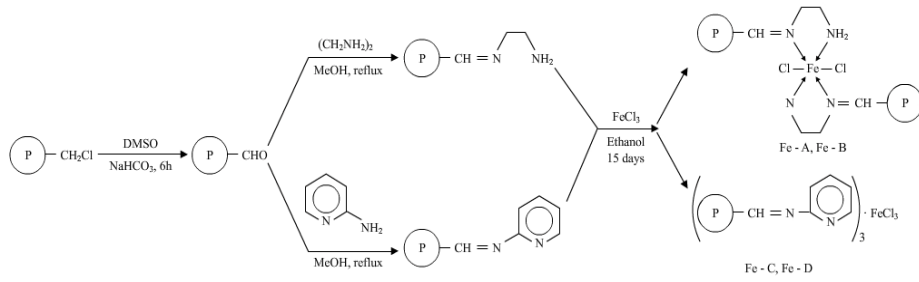


Şekil 2.3. Aminopolistirenden iki adımda hazırlanan koordinasyon polimeri

Wang ve arkadaşları aminoasitlerden fenilalanini kullanarak, salisilaldehit ile oluşturdukları Schiff bazı-Mn(II) kompleksinin, polistiren ile etkileştirilmesi sonucunda oluşan yapıyı, X-ray fotoelektron spektroskopisi (XPS), FTIR spektrumu ile karakterize etmişlerdir. Polimer tabanlı Schiff bazı-Mn kompleksinin; sikloheksan, alifatik olefin ve stiren için O₂'siz ortamda yükseltgenmeyi sağlayacak yeni bir katalizör olabileceğini ifade etmişlerdir [23].

Raman ve arkadaşları Infrared ışınlarının kullanıldığı fotoakustik spektrofotometre ile termal diffüzyon değişimlerini; Cl, Br ve I türevlerini içeren Schiff bazı ve onun Co(II) ve Cu(II) metalleri takılmış polistirenin ısı dağılımlarını incelemişlerdir. Isıl dağılımlarının Cl, Br, I gruplarının bulunduğu sübstütüsyon sırasında arttığı, ayrıca metaller içerisinde Cu(II) iyonunun bulunduğu Schiff bazı destekli polistirendeki ısı yayılımının Co(II) iyonu içeren Schiff bazı destekli polistireninkinden daha fazla olduğu sonucunu bulmuşlardır [24].

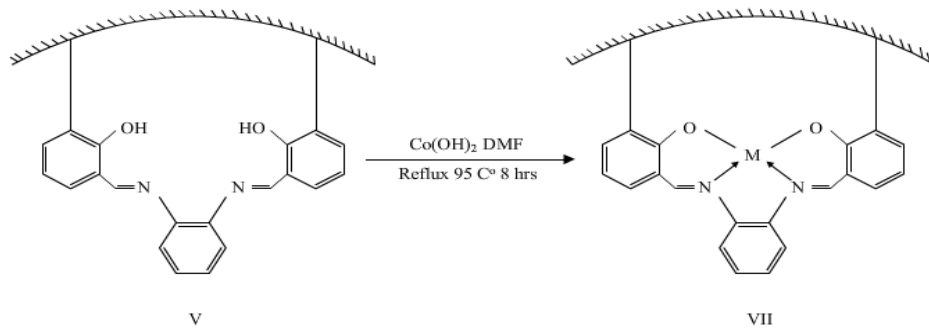
Antony ve arkadaşları poli(stiren-divinilbenzen)'den çıkarak, etilendiamin ve 2-aminopiridinin tepkimesi sonucunda oluşan iki Schiff bazının Fe(III) ile olan komplekslerini sentezlemişlerdir.



Şekil 2.4. Fe(III)-Schiff bazı'nın poli(stiren-divinilbenzen) ile kondenzasyon ürünleri

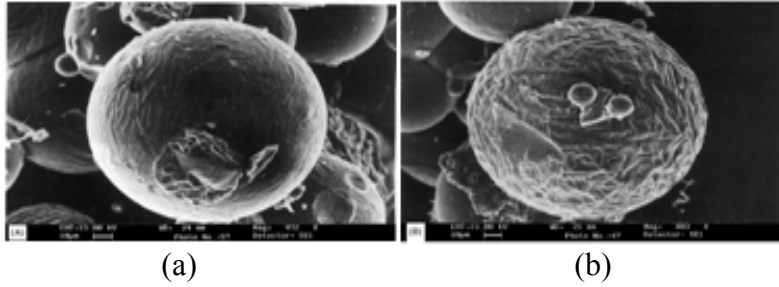
Etilendiaminin bulunduğu polimerde altı koordinasyonlu polimer-kompleksinin meydana geldiğini, 2-aminopiridin içeren polimerde ise kompleksleşmenin olmadığını ifade etmişlerdir (Şekil 2.4) [25].

N,N-bis(3-alil salisilidin)-*o*-fenilendiamin kobalt(II) Schiff bazı kompleksinin polistirene takılması sonucunda oluşan polimerin katalitik etkisini araştırmak isteyen Gupta ve arkadaşları, başlatıcı olarak poli(vinilalkol)'ün kullanıldığı, monomer olarak *N,N*-bis (3-alil salisilidin)-*o*-fenilendiamin'in alındığı ve stiren, divinilbenzen azobisisobutironitril ve Co(II) iyonunun tepkimeye girmesi ile Şekil 2.5'de görülen koordinasyon polimerini sentezlemişlerdir.



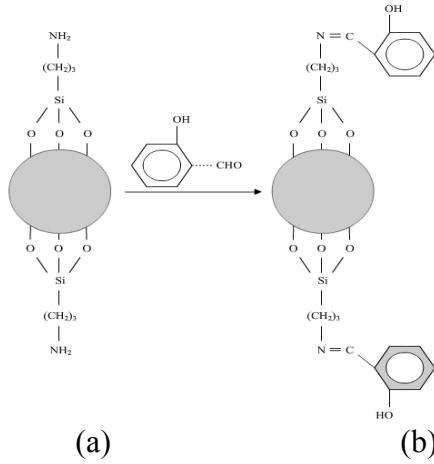
Şekil 2.5. *N,N*-bis (3-alil salisilidin)-*o*-fenilendiamin Kobalt(II) Schiff bazı

Ayrıca taramalı elektron mikroskobu ile polistiren ve *N,N*-bis (3-alil salisilidin)-*o*-fenilendiamin Kobalt(II)-Schiff bazı'nın takılı olduğu polistiren'in fotoğraflarının karşılaştırılması sonucunda yüzey morfolojilerinde farklılık olduğunu göstermişlerdir [26].



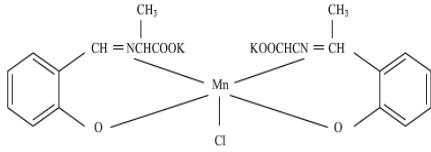
Şekil 2.6. Modifiye olmamış (a) ve modifiye olmuş polisitirenin (b) SEM fotoğrafları

Y-zeolit'te bulunan $-NH_2$ grubu üzerine (Şekil 2.7) 2-hidroksi benzaldehit'in kondenzasyonu sonucunda Schiff bazının sentezlendiğini (Şekil 2.7(b)) spektral yöntemler ile açıklayan Sahar ve arkadaşları 1-propenin oksidasyonunun $373^\circ K$ de O_2 ortamına gerek kalmadan gerçekleştiğini açıklamışlardır [27].



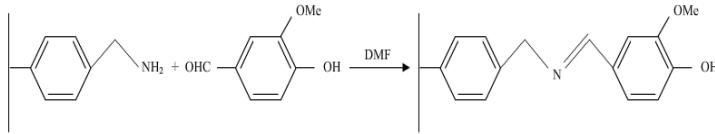
Şekil 2.7. Y-zeolit ile aldehitin kondenzasyonu

Zhao ve arkadaşları sikloheksanın O_2 'li ortamdaki yükseltgenme hızını araştırmak için sol-jel metodunu kullanarak SiO_2 'e, alanin-salisilaldehit Schiff bazı ve o'nun $Mn(III)$ kompleksini tutuklamışlardır. Yapılarını FTIR spektrumu ve X-ray fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile açıkladıktan sonra, SiO_2 destekli Schiff bazı- $Mn(III)$ polimerinin, SiO_2 destekli Schiff bazından daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğunu açıklamışlardır [28].



Şekil 2.8. Sal-Ala-Mn yapısı

Şekil 2.9’ de görüldüğü gibi, aminometil polistirenin, vanilin ile olan Schiff bazlarının, altı yeni koordinasyon polimerleri için Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II) Fe(III) ve Mn(II) metal tuzları ile çalışmışan G.K. Krishnapillai ve arkadaşları, Cu(II) kompleksinin karedüzlem, Zn(II) kompleksinin tetrahedral diğer komplekslerin oktahedral geometrik yapıya sahip olduğunu açıklamışlar, ayrıca (aminometil)polistiren-vanilin-Schiff bazlarının Ni(II) iyonuna karşı seçici olduğunu ifade etmişlerdir [29].



Şekil 2.9. Aminometilpolistiren-vanilin-Schiff bazı

2.3. Enzimler ve Enzim İmmobilizasyonu

Katalizörler kendileri tepkimeye girmedikleri halde aktivasyon enerjisini düşürerek tepkime hızını artıran maddeler olarak tanımlanır. Enzimler genellikle 15 000 ile birkaç milyon arasında değişen yüksek molekül ağırlığına sahip protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Enzimler tepkimenin kinetiğini etkiler. Buna karşılık tepkimenin termodinamiği üzerinde etkisi yoktur. Enzimler diğer katalizörler gibi katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini (E_a) düşürürler.

Hücredeki reaksiyonlar yan ürün oluşturmazlar, reaksiyonlar %100 verimle sonuçlanır. Enzimatik reaksiyonlar fizyolojik pH’da, canlının vücut sıcaklığında ve az enerji ile gerçekleşir. Normal laboratuvar koşullarında yüksek sıcaklık ve enerji

gerektiren pek çok reaksiyon, enzimlerin kullanılmasıyla daha düşük sıcaklıkta ve daha düşük enerji ile gerçekleştirilebilir [30].

2.3.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzimlerin adlandırması ve sınıflandırması işlemi, Uluslararası Biyokimya Birliğinin (IUB) düzenlemesine göre yapılmaktadır [30].

IUB sisteminin özellikleri şunlardır:

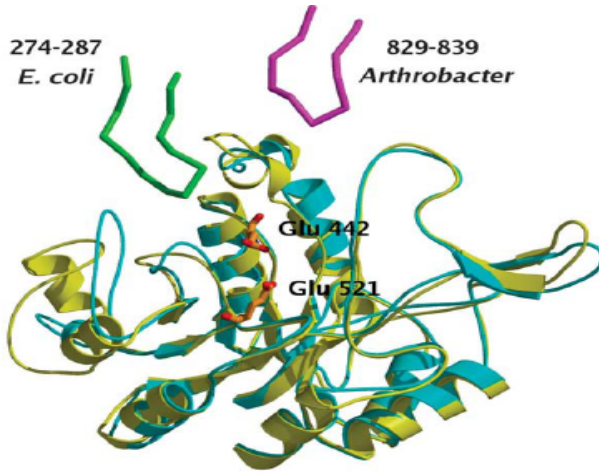
1. Reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler 6 sınıfa bölünürler; bunların her birinin 4-13 alt sınıfı vardır.
2. Enzim adının iki kısmı vardır. İlki substrat veya substratların adıdır; “-az” ile sonlanan ikincisi katalize olunan reaksiyon tipini gösterir.
3. Söz konusu reaksiyonun doğasını aydınlatmak için eğer ek bilgi gerekli ise, parantez içinde verilebilir.
4. Her enzimin bir kod numarası (EC) vardır; bu numarada reaksiyon tipini 1. sayı, vericinin etkiledi grubu 2. sayı, alıcı olarak yararlanılan grubu 3. sayı ve adlandırılan enzimi 4. sayı belirlemektedir [31].

2.3.2. Enzimlerin uygulama alanları

Enzimler doğal katalizördürler. Bu doğal katalizörlerin etkinlikleri ise kimyasal katalizörlerden $10^6 - 10^{16}$ kat daha fazladır [30]. Bu özellikleri enzimlerin endüstriyel alanda ilgi görmelerine neden olmaktadır. Enzimler sadece kimya sanayiinde değil, gıda sektörü, ilaç sanayi, deri ve tekstil sanayiinde de oldukça yaygın bir kullanıma sahiptirler.

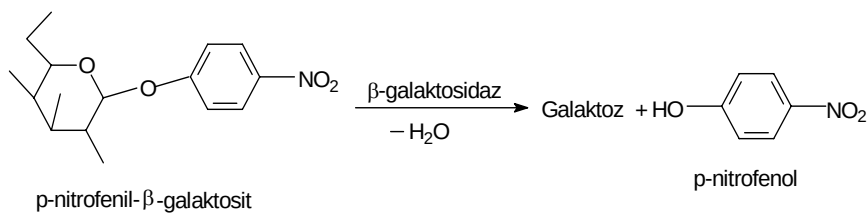
2.3.3. β -Galaktosidaz enzimi ve özellikleri

Na^+ ve Mg^{2+} iyonları içeren bir metalo enzim [32] olan β -galaktosidazın üç boyutlu yapısı Şekil 2.10’ de gösterilmiştir.



Şekil 2.10. β -Galaktosidazın üç boyutlu yapısı

β -Galaktosidaz enziminin görevi, bir disakkarit olan laktozu onun bileşenleri olan monosakkaritlere glukoz ve galaktoza hidroliz etmektir. Bir başka deyişle süt şekerini üzüm şekerine çeviren bağırsak enzimi olarak da tanımlanabilir. Gıda teknolojisi ve beslenme açısından, laktozun glukoz ve galaktoza parçalanması, büyük önem taşır. Çünkü yapılan hidrolizin temel ürünleri daha tatlı, daha çözünabilir, fermente edilebilir ve ince bağırsak tarafından doğrudan absorbe edilebilir niteliktedir [33, 34].



Şekil 2.11. β -Galaktosidaz enziminin katalizlediği reaksiyon

β -Galaktosidaz, substrat olarak p-nitrofenil- β -galaktosid kullandığında ortamdan su ayrılarak ürün olarak galaktoz ve p-nitrofenolü oluşturur.

2.3.4. Enzim immobilizasyonu

Enzimler, reaksiyonları çok yüksek hızda katalizledikleri için, onları canlı organizma dışında kullanabilme düşüncesi ortaya çıkmış ve ilk olarak 1926 yılında Sumner tarafından üreaz enzimi kristal halde elde edilmiştir. Bu çalışmanın ardından da birçok farklı organizmadan enzimler izole edilmiş ve kristalize formlarda piyasaya sunulmuştur [30].

Serbest enzimlerle gerçekleştirilen işlemlerde, reaksiyon ortamından istenilen anda enzimin alınamaması uygulamaların kontrolünü güçleştirmektedir. İstenilen anda reaksiyonu durdurmak için ortama eklenen inhibitör ise enzim tarafından kirlenilen ortama yeni bir kirlilik unsuru katmaktadır. Kirliliğin artmasıyla yüksek olan maliyet daha da artmaktadır. Enzimi tekrar kullanmak için ortamdan çıkarmak da bu sayede imkansızlaşmaktadır. Bu sorunlardan dolayı enzimlerin bir taşıyıcıya bağlanıp kullanılması ya da bir matrikse hapsedilip kullanılması son zamanlarda özellikle endüstriyel açıdan önem kazanmış ve teknolojik uygulamalarına önem verilmiştir [35].

İmmobilizasyon, enzim teknolojisinin en pratik ve en çok gelişen yollarından birisidir. İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, " tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış, çözünmez hale getirilmiş " demektir. Enzimlerin ya da mikroorganizmaların fiziksel ve / veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara tutturulmasıdır [30].

İmmobilizasyonda enzimlerin bağlandığı materyaller genel olarak taşıyıcı veya destek materyali olarak adlandırılırlar. İmmobilize enzimlerin kinetik davranışları da, enzim konformasyonundaki değişme, sterik etkiler, mikroçevre etkileri, iç ve dış difüzyon etkilerinden dolayı serbest enzimlerinkinden farklılık gösterirler [35].

2.3.5. Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri değişik şekillerde sınıflandırılmalarına karşın kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir.

- | | |
|-----------------------|------------------------------------|
| 1) Kimyasal yöntemler | 2) Fiziksel yöntemler |
| a) Kovalent bağlama | a) Adsorpsiyon ile immobilizasyon |
| b) Çapraz bağlama | b) Hapsetme ile immobilizasyon |
| | - Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi |
| | - Kafes tipi hapsetme yöntemi |

Kovalent bağlanmayla immobilizasyon

Kovalent bağlama, genellikle enzim yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Kovalent bağlama ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamak destek maddesinin aktive edilmesi (tezin kapsamında aktive edici olarak Schiff bazı ve Ni(II) kompleksi takılmıştır), ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir. Destek maddesi; karboksil, hidroksil, amino gibi fonksiyonel gruplar taşımaktadır [30].

Kovalent bağlama yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması nedeniyle her türlü ortamda kullanılabilir olmasıdır. Enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması kolaydır. Ayrıca enzim molekülü ve destek materyali birlikte genellikle ısı kararlılık gösterirler. Yöntemin dezavantajı, destek materyali ile enzim arasında sıkı etkileşim enzimin doğal konformasyonunu bozabilir [32].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler, Cihazlar ve Teknikler

3.1.1. Kimyasal maddeler

<u>Kimyasal Madde</u>	<u>Temin Edilen Üretici Firma</u>
NiCl ₂ .6H ₂ O	Merck
Metanol	Merck
Etanol	Merck
Dimetilformamid (DMF)	Sigma
β-galaktosidaz: (EC.3.2.1.23 9.4 U/mg E.Coli bakterisinden elde edilen)	Sigma
p-nitrofenil-β-D-galaktopironosit	Sigma
Fosforik asit: (H ₃ PO ₄ , MA: 60 g/mol)	Aldrich
Borik asit: (H ₃ BO ₄ , MA: 61,83 g/mol)	Aldrich
Sodyum karbonat : (Na ₂ CO ₃ , MA: 118 g/mol)	Merck
Sodyum hidroksit : (NaOH, MA: 40 g/mol)	Merck
Asetik asit: (CH ₃ COOH, MA: 97,99 g/mol)	Aldrich

3.1.2. Element analizi

Element analizleri LECO-CHNS-9320 Model element analizi cihazı ile Bozok Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü enstrümental analiz laboratuvarında yapıldı.

3.1.3. Atomik absorpsiyon spektrofotometrisi

Komplekslerin metal yüzdeleri TUBİTAK Mikro Analiz laboratuvarlarında yapıldı.

3.1.4. Ultraviyole görünür bölge spektrumları

UV-GB spektrumları Unicam-UV 2-100 model spektrofotometre ile 800-200 nm aralığında DMF de alındı.

3.1.5. pH metre

Orion pH metre 420 A model pH metre, immobilizasyon çalışmalarında kullanıldı.

3.1.6. Çalkalamalı su banyosu

ST 402 NÜVE marka sıcaklık kontrollü su banyosu, enzim aktifliği tayininde kullanıldı.

3.1.7. Fourier transform infrared spektrometresi (FTIR)

Numunelerin IR' leri saf KBR içinde disk hazırlanarak Mattson-1000 model spektrometre kullanılarak alındı.

4. DENEYSEL KISIM

4.1. Schiff Bazı Takılı Polimerin Hazırlanması (Genel Yöntem)

Schiff bazı takılı polimer, geri soğutucu altında sentezlendi. Geri soğutucu altında kaynatma ve karıştırma işlemleri yapılırken yaklaşık 70 °C’de damlatıcı musluğu açılarak alkolde çözülmüş alanin çözeltisi balondaki polimer çözeltisi üzerine yaklaşık 10 dakikalık bir süre içinde damlatılmaya başlandı. Böylece alanin çözeltisinin tamamı polimer çözeltisi üzerine damlatıldı. Alanin çözeltisinin ilavesinden sonra 2(iki) gün geri soğutucu altında kaynatma ve karıştırma işlemine devam edildi. Bu işlemden sonra süzülen polimerler etilalkol ile üç kere yıkandıktan sonra temiz bir tüpe alındı ve etüvde kurutuldu.

4.1.1. (FMPS-Ala-Sch) Schiff bazının sentezi

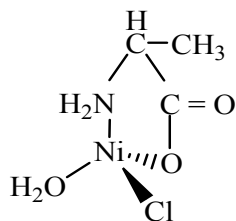
4-formil-3 metoksifenoksi metil polistiren (FMPS) (2 g, 1.0-1.5 mmol/g -CHO içeren) 2 boyunlu cam balona alınarak 25 mL etanol ilave edildi. Alanin (0.134g, 1,5 mmol) 5 mL saf etanol içinde oda sıcaklığında çözülerek hazırlanan çözeltisi, damlatma hunisine konularak Bölüm 4.1’de açıklanan yönteme göre sentezi yapıldı. Sentezlenen schiff bazı takılı polimer 50°C’de 4 saat etüvde kurutuldu.

4.2. Schiff Bazı Takılı Polimerin Ni(II) Kompleksinin Hazırlanması (Genel Yöntem)

4.2.1. Birinci adım; metal-alanin komplekslerinin hazırlanması

4 mmol $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ’ ün 10 ml etanolde ve 4 mmol alaninin 10 mL etanol içindeki çözeltisi, Ni(II) klorür ile alanin oranı 1:1 olacak şekilde hazırlanarak, geri soğutucu altında 1(bir) saat kaynatma ve karıştırma işlemi yapıldı [36]. Bu karışım süzülerek temiz bir behere alındı, yaklaşık 8 (sekiz) saat sonra yeşil kristal elde edildi, oluşan kristaller süzüldü, etil asetatda yıkandı ve 70°C’de 24 saat etüvde kurutuldu.

Oluşan Ni-Ala kompleksine ait magnetik moment 3,08 Bohr magnetonu olarak bulundu. Bu veriye dayanarak aşağıdaki gibi bir yapıya sahip olabileceği öngörüldü (Şekil 4.1).



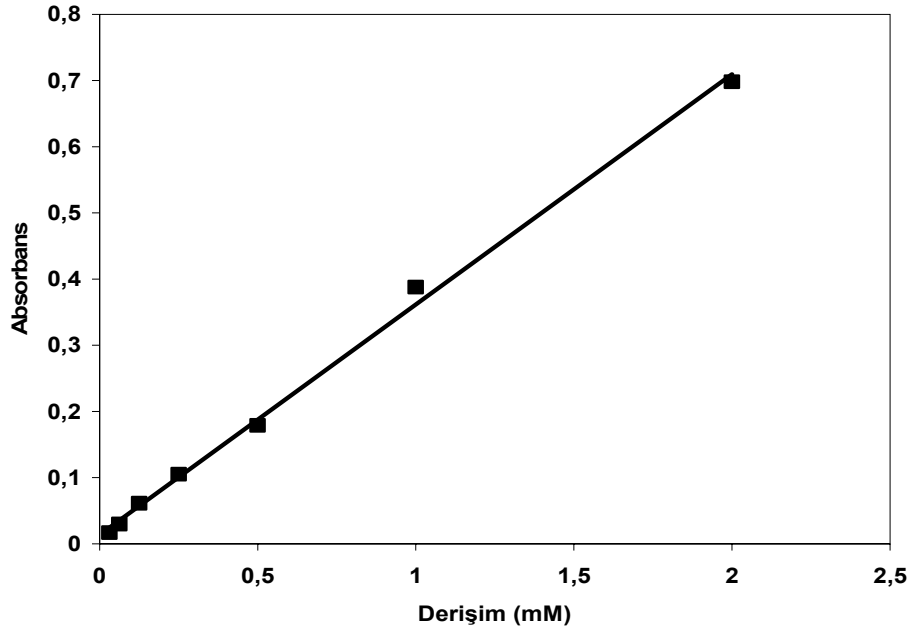
Şekil 4.1. Ni-Ala kompleksi için öngörülen yapı

4.2.2. İkinci adım; koordinasyon polimerlerinin hazırlanması

(4-formil-3-metoksifenoksimetil)polistirenin (2 g, 1.0-1.5 mmol/g -CHO yüklü) metanoldeki (15 mL) çözeltisine, 10 mL lik metanolde çözülmüş 1,5 mmol metal-alanin kompleksi bölüm 4.1' de anlatıldığı gibi hazırlanarak, sentezlendi.

4.3. p-nitrofenil-β-D-galaktosid Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiği hazırlamak amacıyla çeşitli derişimlerde (2,00-0,031 mM) p-nitrofenil-β-D-galaktosid çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin 398 nm de U.V spektrofotometresi kullanılarak absorbans değerleri ölçüldü. p-Nitrofenil-β-D-galaktosid derişimlerine karşı gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. P-Nitrofenil β -D-galaktosid kalibrasyon grafiği

4.4. (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni) Polimerlerinin Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilizasyon İşlemleri

4.4.1. Aktivlik tayininde kullanılan çözeltiler

NaOH çözeltisi:

2 M 50 mL NaOH çözeltisi hazırlamak için 3,84 g NaOH bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL ye tamamlandı.

Na_2CO_3 çözeltisi:

0,1 M 50 mL Na_2CO_3 çözeltisi hazırlamak için 0,53 g Na_2CO_3 bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL ye tamamlandı.

Britton-Robinson (B-R) tamponu:

2,3 mL buzlu asetik asit, 2,7 mL fosforik asit, 2,4720 g borik asit, üç katı saf suyla sulandırıldıktan sonra hacmi saf su ile 1,0 L ye tamamlandı. Bu çözeltiden 50 mL alınarak 2,0 M NaOH ile pH 2,0-9,0 arasında ayarlandı.

p-nitrofenil-β-D-galaktosid substrat çözeltisi:

5 mM p-nitrofenil-β-D-galaktopironosit substrat çözeltisi hazırlamak için 0,0015 g p-nitrofenil-β-D-galaktopironosit bir miktar BR tamponunda çözüldükten sonra hacmi tampon çözeltisi ile 10 mL ye tamamlandı.

4.4.2. Kovalent bağlanma yöntemiyle enzim immobilizasyonu

3,3 mg β-galaktosidaz, 20 mL BRT (pH: 4,0) çözeltisinde çözüldükten sonra 1-2,5 g polimerin üzerine ilave edildi. Karışım 5 saat süre boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak immobilizasyon reaksiyonunun gerçekleştirilmesi sağlandı. Reaksiyon sonunda polimerler süzülerek alındı ve üzerindeki serbest enzimleri uzaklaştırmak için BRT (pH: 4,0) ile yıkandı. İmmobilize enzimler 4 °C de muhafaza edildi.

4.4.3. Serbest β-galaktosidaz enziminin aktiflik tayini

β-Galaktosidazın aktifliği Hernaiz ve Crout tarafından tanımlanan metoda göre tayin edildi [37]. Bunun için reaksiyon balonuna 20 µL enzim çözeltisi (0,0015 mM) ve 200 µL P-nitrofenil-β-D-galaktosid (substrat çözeltisi, 5mM) eklendi ardından 30 °C de 10 dakika çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Su banyosundan alınarak balon içerisine 3,9 mL Na₂CO₃ çözeltisi ilave edildi. Ardından U.V. spektrofotometresi yardımı ile 398 nm de BR tamponuna (pH:4) karşı absorbansı değeri ölçüldü. Tepkime hızı, ölçülen absorbans değerleri ve kalibrasyon eğrisinin eğiminden faydalanarak aşağıdaki bağıntıya göre hesaplandı.

$$H_{12}(V) = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{398}}{\Delta t} \times \frac{\Delta C}{\Delta A_{398}} \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte ΔC, g/mL olarak p-nitrofenil-β-D-Galaktosid derişimindeki değışimi gösterir, ΔA₃₉₈ (A₀-A_t) absorbanstaki, Δt zamandaki değışimi gösterir.

β -Galaktosidaz için 1 ünite enzim veya birim aktiflik, pH 4 de 10 dakikada ve 30 °C de 1 μ mol p-nitrofenil- β -D-galaktosidi parçalayan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

4.4.4. İmmobilize β -galaktosidaz enziminin aktiflik tayini

İmmobilize β -galaktosidaz enziminin aktifliği Bölüm 4.4.3'de belirtilen işlemler serbest enzim yerine 0,05 g immobilize enzim kullanılarak aynı şekilde tayin edildi.

4.4.5. Serbest β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisi

Serbest β -galaktosidaz enziminin aktifliğine pH etkisini incelemek amacı ile çeşitli pH değerlerinde (2,0 - 7,0) BR tamponunda çözünen enzim ve p-nitrofenil- β -D-galaktosid (200 μ L, 5 mM) çözeltileriyle Bölüm 4.4.3'de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilmek suretiyle enzim aktifliği tayin edildi.

4.4.6. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine pH etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine pH etkisini incelemek amacı ile çeşitli pH larda (2,0-7,0) Bölüm 4.4.3'de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

4.4.7. Serbest β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile çeşitli sıcaklık değerlerinde (20°C-55°C) Bölüm 4.4.3'de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

4.4.8. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

İmmobilize edilen β -galaktosidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile çeşitli sıcaklık değerlerinde (20°C-55°C) Bölüm 4.4.3’de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayinleri yapıldı.

4.4.9. Serbest β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest β -galaktosidaz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile farklı derişimlerde (2,000-0,031 mM) hazırlanan substrat çözeltileri ile Bölüm 4.4.3’de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflikleri tayin edildi.

4.4.10. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

İmmobilize β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile farklı derişimlerde (2,000-0,031 mM) hazırlanan substrat çözeltileri ile Bölüm 4.4.3’de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflik tayin edildi.

4.4.11. Serbest β -galaktosidaz enziminin depolanma kararlılığı

Serbest β -galaktosidaz enziminin depolama kararlılığı incelemek amacı ile BR tamponunda (pH:4) hazırlanan enzim çözeltisi buzdolabında 4°C de saklandı. Enzim çözeltisinden belirli aralıklarda alınan örneklerle Bölüm 4.4.3’de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiflikleri tayin edildi.

4.4.12. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı

İmmobilize edilen β -galaktosidaz enziminin depolama kararlılığını incelemek amacı ile buzdolabında 4 °C de ayrı ayrı hem BRT’de (pH:4) (ıslak), hem de kuru olarak

steril petri kabında saklandı. Belirli aralıklarda alınan örneklerden yola çıkarak Bölüm 4.4.3’de belirtilen yöntem uygulanmak suretiyle aktiflikleri tayin edildi.

4.4.13. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın tekrar kullanılabilirliği

İmmobilize β -galaktosidaz enziminin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla belli aralıklarla Bölüm 4.4.3’de verilen yöntem ile enzim aktiflikleri tayin edildi.

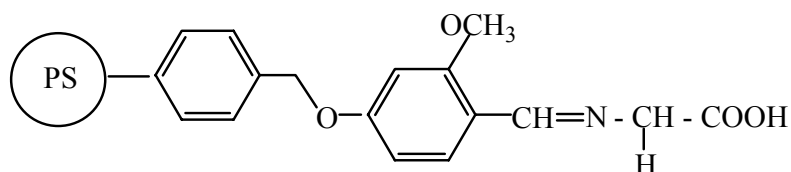
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. Schiff Bazı Takılı Polimerin Karakterizasyonu

Schiff Bazı takılı polimerlerin C, H ve N tayini sırasında meydana gelen sapmaların ve IR spektrumlarındaki geniş bandların polimerdeki, polidispersite özelliğine sahip olmasından dolayı kaynaklandığı söylenebilir [38].

5.1.1. (FMPS-Ala-Sch) Schiff bazı takılı polimer [C₁₇H₁₆O₄N(C₈H₈)₁₀]

Önerilen yapıyı (Şekil 5.1) destekleyen analiz değerlendirmeleri aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir:



Şekil 5.1. Schiff bazı takılı polisitiren

1. (FMPS-Ala-Sch) Schiff Bazının, kütlece moleküler kütle (M_w) değeri 1338 olarak belirlendi.
2. Element analizine göre, bulunan ve hesaplanan değerlerin önerilen yapı için uyumlu olduğu görüldü.

Çizelge 5.1. (FMPS-Ala-Sch) Schiff bazının fiziksel özellikleri ve analitik verileri

Bileşik		Bulunan (Hesaplanan) %				Renk
Gösterim (M_w)	Önerilen Yapı	C	H	N	M	
(FMPS-Ala-Sch) 1338	[C ₁₇ H ₁₆ O ₄ N(C ₈ H ₈) ₁₀]	88,41 (86,99)	7,11 (7,17)	1,44 (1,04)	-	koyu krem

3. Tekrarlanan birim içerisindeki N'un kütlesinin % 1,44 olarak bulunması, düşünülen yapının mümkün olduğunu göstermektedir.

4. (FMPS) ve (FMPS–Ala–Sch)'ye ait, 2926, 2853 cm^{-1} 'de bulunan titreşim bandlarının sırasıyla $\nu(\text{CH}_2)_{\text{as}}$, $\nu(\text{CH}_2)_{\text{s}}$ titreşim bandlarına, 2963-2962, 2872-2869 cm^{-1} 'de bulunan titreşim bandlarının ise $\nu(\text{CH}_3)_{\text{as}}$, $\nu(\text{CH}_3)_{\text{s}}$ titreşim bandlarına karşılık geldiği söylenebilir (Çizelge 5.2).

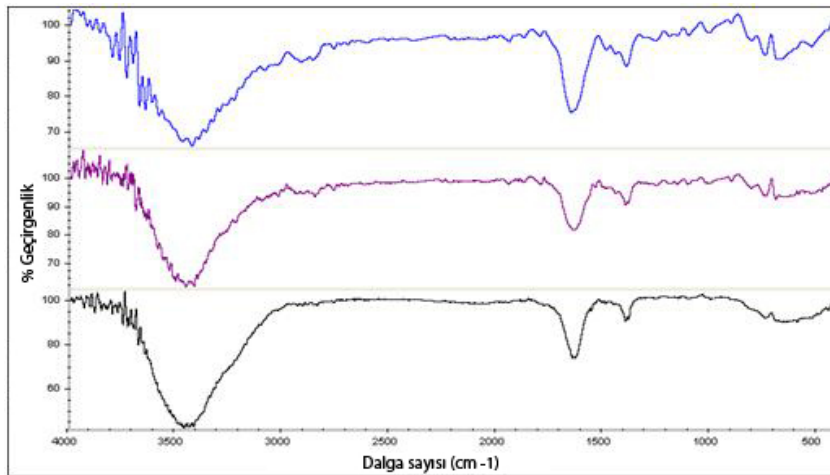
Çizelge 5.2. (FMPS) ve (FMPS–Ala–Sch) polimerlerinin FTIR ve UV-GB spektrum değerleri

Bileşik	$\nu(\text{CH}_2)_{\text{as,s}}$ $\nu(\text{CH}_3)_{\text{as,s}}$	$\nu(\text{C=O})_{\text{carbox.}}$ $\nu(\text{CH=N})$	$\nu(\text{MO})$ $\nu(\text{MN})$	λ_{max} , (Absorbans)
(FMPS)	2926, 2853 2963, 2872	- -	- -	274 (0,74), 315 (0,55)
(FMPS–Ala–Sch)	2926, 2853 2962, 2869	1587 1710	- -	239 (2,64), 314 (0,21)

as: asimmetrik

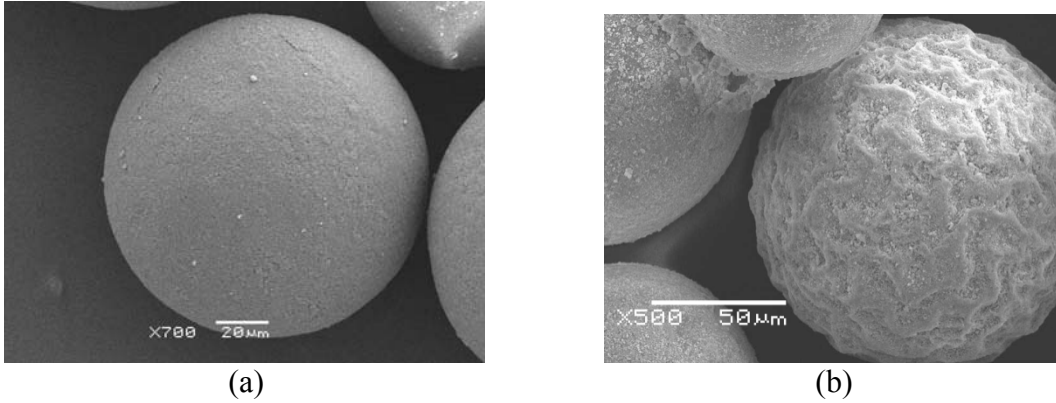
s: simetrik

(FMPS–Ala–Sch) FTIR spektrumunda, (FMPS) polimerinde bulunmayan 1587-1710 cm^{-1} 'de yeni bantların ortaya çıkması aldehit katılımının gerçekleştiği söylenebilir (Şekil 5.2).



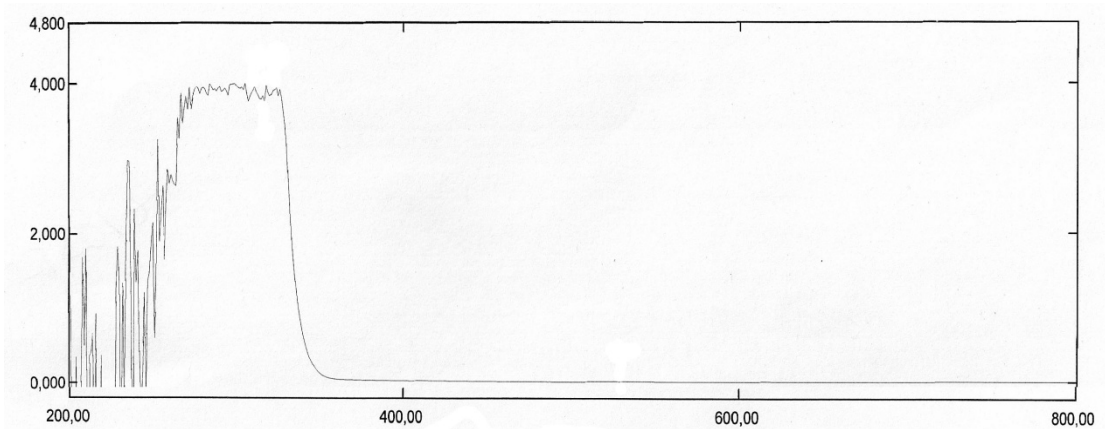
Şekil 5.2. (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni)'e ait FTIR spektrumu

5. (FMPS) ve (FMPS-Ala-Sch)'nin taramalı elektron spektrum değerlendirmesi sonucunda yüzey morfolojilerinde farklılıklar görülmüştür (Şekil 5.3). Bu farklılığın, alaninin (FMPS) polimerine kondenzasyonu sonucunda meydana geldiği söylenebilir.

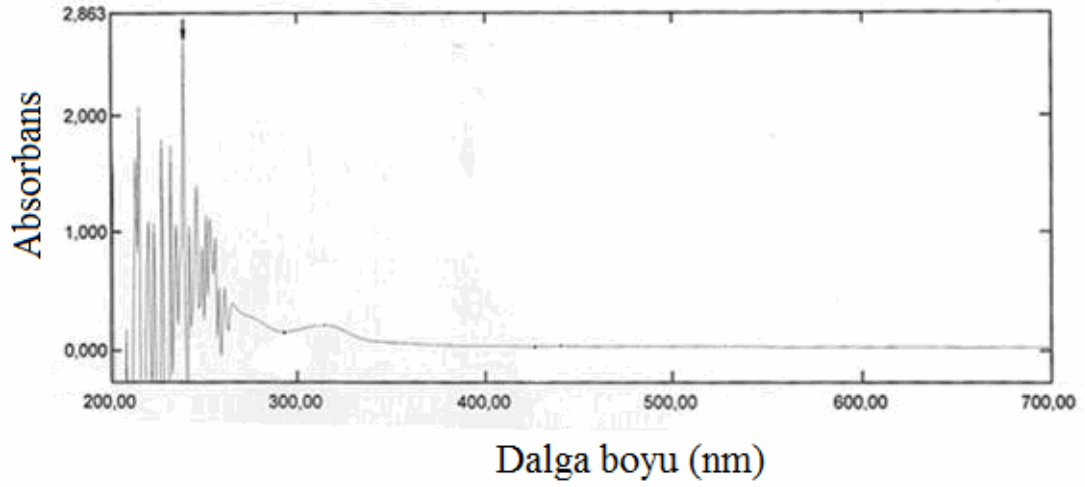


Şekil 5.3. (a) (FMPS) ve (b) (FMPS-Ala-Sch) polimerlerinin SEM fotoğrafları

6. Şekil 5.4 ve Şekil 5.5’de görüldüğü gibi, (FMPS), ve (FMPS-Ala-Sch)’nin UV-GB spektrumları karşılaştırıldığında (FMPS-Ala-Sch)’na ait spektrumda ortaya çıkan 239 nm deki, yeni bir bandın $-\text{CH}=\text{N}-$ oluşumu sonucunda ortaya çıkan $n \rightarrow \pi^*$ geçişine karşılık olabileceği söylenebilir.



Şekil 5.4. (FMPS) polimerine ait UV-GB Spektrumu



Şekil 5.5. (FMPS-Ala-Sch) polimerine ait UV-GB Spektrumu

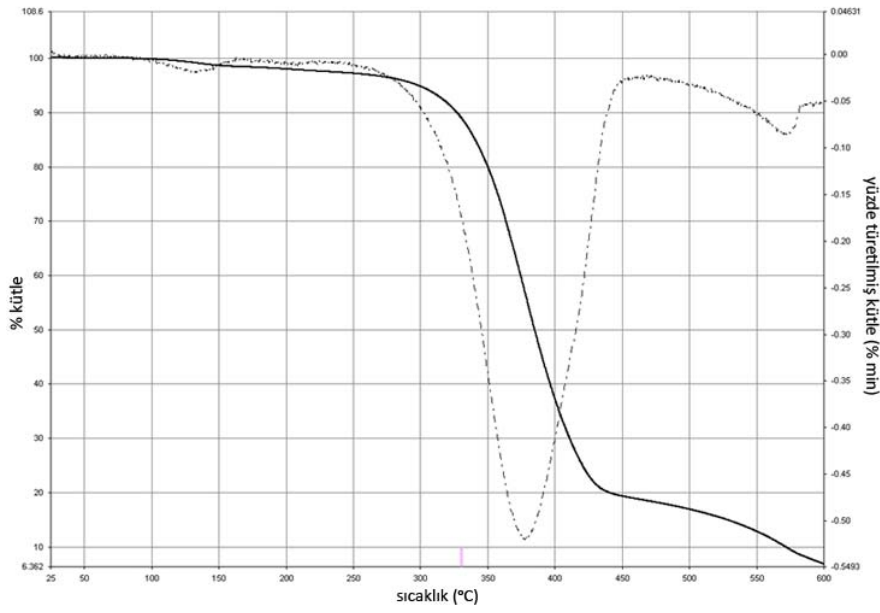
7. Çizelge 5.3’de verilen (FMPS) ve (FMPS-Ala-Sch) ’in termal analiz değerlerinin verildiği tablo incelendiğinde aldehit katılımı sonucunda termal bozunma sıcaklıklarında farklılıkların olduğu görülmektedir. Bu da aldehit katılımının gerçekleştiği düşüncesini oluşturmaktadır.

Çizelge 5.3. (FMPS) ve (FMPS-Ala-Sch)’in termal analiz değerleri

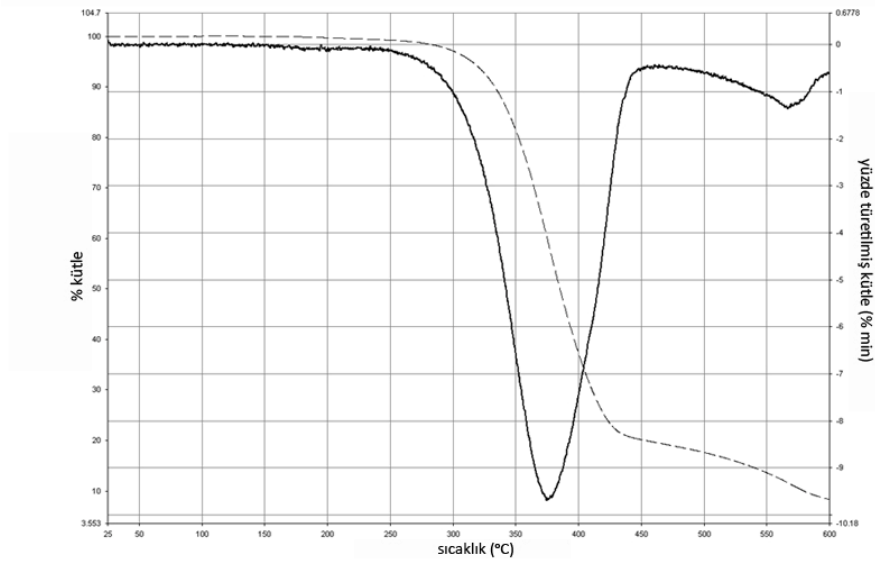
Gösterim	*Termal Bozunma				600 °C’deki kalıntı (wt%)
	T_i	$T_{1/2}$	T_{max}	T_f	
(FMPS)	335	387	379	421	6,36
(FMPS–Ala-Sch)	310	388	377	416	3,55

* T_i : İlk bozunma sıcaklığı, T_{max} : Maksimum bozunma sıcaklığı

T_f : Son bozunma sıcaklığı, $T_{(1/2)}$: Yarı bozunma sıcaklığı



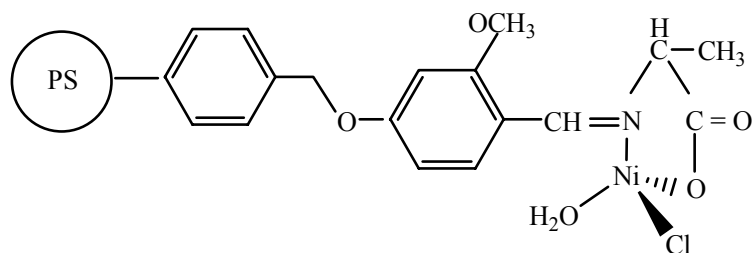
Şekil 5.6. (FMPS) polimerlerinin TGA eğrisi



Şekil 5.7. (FMPS-Ala-Sch) polimerlerinin TGA eğrisi

5.1.2. (FMPS-Ala-Sch-Ni) Schiff Bazı-Ni(II) kompleksi, [C₁₇H₁₈O₅N(C₈H₈)₁₀NiCl]

Önerilen yapıyı (Şekil 5.8) destekleyen analiz değerlendirmeleri aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir:



Şekil 5.8. Schiff Bazı-Ni(II) takılı polimer

1. (FMPS-Ala-Sch-Ni) Schiff Bazının, kütlece moleküler kütle (M_w) değeri 2194 olarak belirlendi.
2. Element analizine göre, bulunan ve hesaplanan değerlerin önerilen yapı için uyumlu olduğu görüldü.

Çizelge 5.4. (FMPS-Ala-Sch-Ni) Schiff bazı-Ni(II) kompleksinin fiziksel özellikleri ve analitik verileri.

Bileşik		Bulunan (Hesaplanan) %				Renk
Gösterim (M_w)	Önerilen Yapı	C	H	N	M	
(FMPS-Ala-Sch-Ni)	$[C_{17}H_{18}O_5N(C_8H_8)_{10}NiCl]$	82,63	7,03	0,95	0,03	açık yeşil
1450		(80,27)	(6,76)	(0,97)	(0,04)	

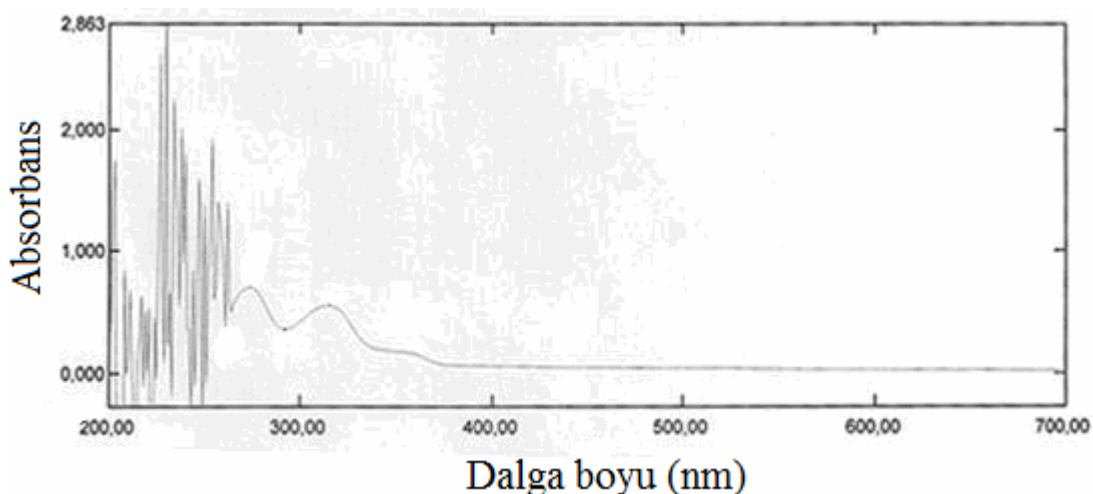
3. Tekrarlanan birim içerisindeki Ni ün kütlelerinin 0,95 % olarak bulunması, düşünülen yapının mümkün olduğunu göstermektedir.
4. (FMPS)' ye ait, $2926-2963\text{ cm}^{-1}$, $2853-2872\text{ cm}^{-1}$ de bulunan titreşim bandlarının sırasıyla $\nu(\text{CH}_2)_{as}$, $\nu(\text{CH}_2)_s$ titreşim bandlarına karşılık geldiği söylenebilir. FTIR spektrumunda (Çizelge 5.5) alaninin katılımı sonucunda 2926 cm^{-1} , 2853 cm^{-1} deki titreşim bantlarının yanı sıra 2962 cm^{-1} ve 2869 cm^{-1} deki titreşim bantlarının aldehitteki $-\text{CH}_3$ grubuna ait $\nu(\text{CH}_3)_{as}$ ve $\nu(\text{CH}_3)_s$ titreşim bandlarına karşılık geldiği söylenebilir. Ayrıca kompleksleşme sonucunda (FMPS-Ala-Sch) polimerinde görülen 1587 cm^{-1} deki titreşim bandının 1710 cm^{-1} e kayması kompleksleşmenin olduğunun bir kanıtı olarak bakılabilir. Kompleksleşme

sonucunda 520 cm^{-1} ' deki yeni bir bandın Ni(II)-N bağ oluşumuna karşılık geldiği söylenebilir.

Çizelge 5.5. (FMPS-Ala-Sch-Ni) Schiff bazının önemli FTIR ve UV-GB spektrum değerleri

Bileşik	$\nu(\text{CH}_2)_{\text{as,s}}$ $\nu(\text{CH}_3)_{\text{as,s}}$	$\nu(\text{C=O})_{\text{carbox.}}$ $\nu(\text{CH=N})$	$\nu(\text{MO})$ $\nu(\text{MN})$	λ_{max} , (Absorbans)
(FMPS)	2926, 2853 2963, 2872	- -	- -	274 (0,74), 315 (0,55)
(FMPS-Ala-Sch)	2926, 2853 *2962, *2869	1587 1710	- -	239 (2,64), 314 (0,21)
(FMPS-Ala-Sch-Ni)	2926, 2853 *2964,*2871	1571 1721	520 418	311 (3,96), 324 (3,94), 440 (0,04)

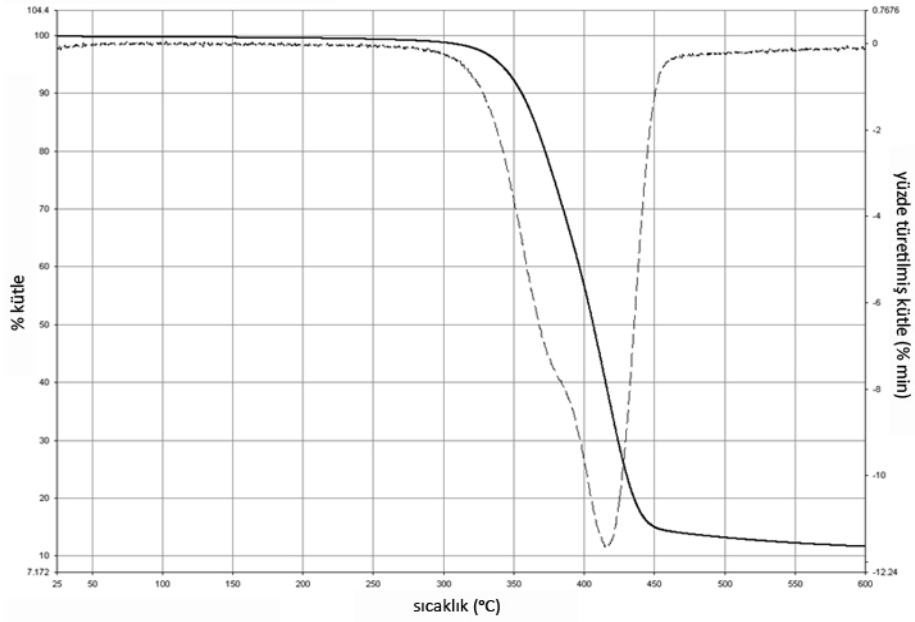
5. (FMPS-Ala-Sch-Ni) koordinasyon polimerinin DMF çözücüsünde alınan UV-GB spektrum bandları diğer polimere göre farklı dalga boylarında geçişlerin olduğu Şekil 5.9'da görülmektedir. (FMPS-Ala-Sch-Ni) koordinasyon polimerinde ise ortaya çıkan 324 nm ve 360 nm'deki iki yeni badların, metalin d-d geçişlerine karşılık gelebileceği yorumu yapılabilir.



Şekil 5.9. (FMPS-Ala-Sch-Ni) polimerine ait UV-GB Spektrumu

6. Çizelge 5.6.'daki (FMPS-Ala-Sch-Ni)'in termal analiz değerlerine bakıldığında çalışılan diğer polimerler göre bozunma sıcaklığının düştüğü görülmektedir. Bu

durum koordinasyon ile yapının kararlılığında bir azalma olduğu yorumu ile açıklanabilir.



Şekil 5.10. (FMPS-Ala-Sch-Ni) polimerlerinin TGA eğrisi

Çizelge 5.6. (FMPS-Ala-Sch-Ni)'in termal analiz değerleri

Gösterim	*Termal Bozunma				600 °C'deki kalıntı (wt%)
	T_i	$T_{1/2}$	T_{max}	T_f	
(FMPS–Ala–Sch–Ni)	356	406	406	442	7,17

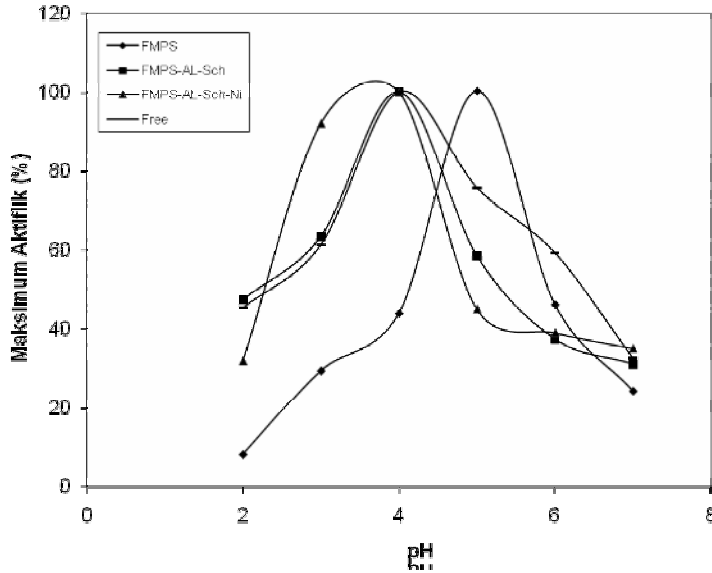
* T_i : İlk bozunma sıcaklığı, T_{max} : Maksimum bozunma sıcaklığı

T_f : Son bozunma sıcaklığı, $T_{(1/2)}$: Yarı bozunma sıcaklığı

5.2. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen β -galaktosidazın Aktivliğine pH Etkisi

Serbest ve farklı polimerler kullanılarak kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktivliğine pH etkisini incelemek amacı ile Bölüm 4.4.3' de

anlatılan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerlerinin pH ile değişimi Şekil 5.11’ de verildi.



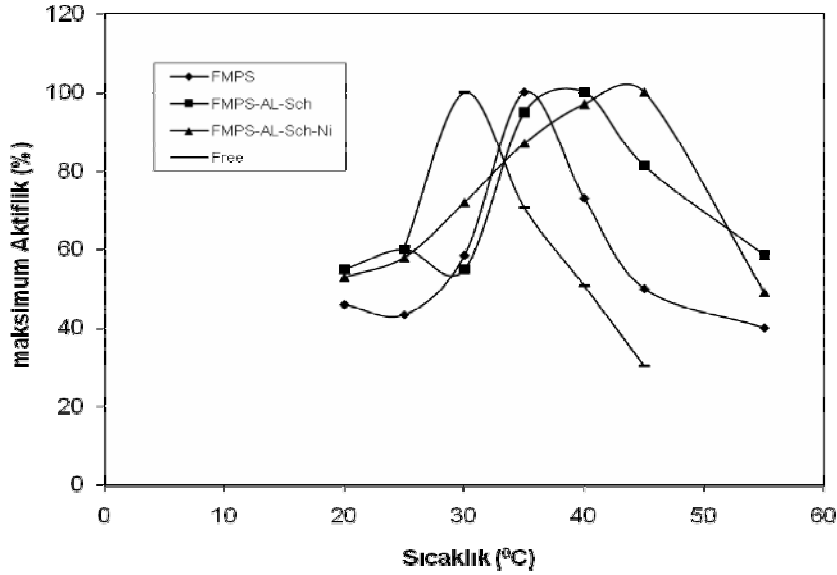
Şekil 5.11. Serbest ve polimerlere kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

Serbest β -galaktosidaz enzimi için optimum pH değeri 4,0 olarak bulundu. (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni) destekleri üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimi için optimum pH değerleri sırasıyla 5,0, 4,0 ve 4,0 olarak bulundu. İmmobilize edilen enzimin pH değerlerinin (FMPS) için 5,0' a kaymasının nedeni ise immobilize edilen sistemlerinde matriks ile enzim arasındaki ikincil etkileşimler (hidrojen bağı, iyonik polar etkileşimler) sonucu olabilir [39].

5.3. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen β -galaktosidazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Kovalent bağlanma yöntemiyle (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni) üzerine immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile Bölüm 4.4.3' de anlatılan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen

reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerlerinin sıcaklık ile değişiminden elde edilen sonuçlar Şekil 5.12’ de verildi.



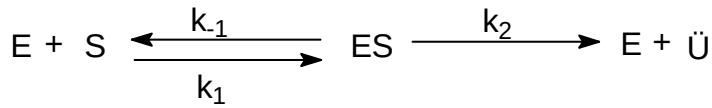
Şekil 5.12. Serbest ve polimerlere kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi

Serbest β -galaktosidaz enzimi için optimum sıcaklık değeri 30°C olarak bulundu. (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni) üzerine immobilize edilen β -galaktosidaz için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 35°C , 40°C , 45°C olarak bulundu. İmmobilize β -galaktosidazın optimum sıcaklığı serbest β -galaktosidaza göre daha yüksek bulunmuştur. Enzim ve polimer arasındaki etkileşimin düşmesi, enzim hareketinin konformasyonel olarak sınırlanmasına sebep olur [40]. İmmobilize β -galaktosidazın optimum sıcaklığındaki artış, enzimin polimere kovalent bağlanması sonucu enzimde meydana gelen konformasyonel değişimden kaynaklanmış olabilir.

5.4. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi incelenmiş ve çeşitli substrat derişimlerinde (2,000-0,0312 mM) hesaplanan K_m ve V_{mak} değerleri çizelgelerde verilmiştir.

Enzim-substrat (ES) reaksiyonu aşağıda gösterildiği gibidir.



Bu eşitlikte E= Enzim, S= Substrat, ES= Enzim-substrat kompleksi, $\ddot{U}$ = Ürünü gösterir.

Enzim reaksiyon hızı Michaelis-Menten Eşitliği ile verilir.

$$V = \frac{V_{mak} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{Michaelis-Menten Eşitliği} \quad (5.1)$$

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

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{mak} S} + \frac{1}{V_{mak}} \quad (5.2)$$

Bu eşitliklerde; V= Başlangıç hızı, V_{mak} = Maksimum hızı, K_m =Michaelis sabiti, S=substrat derişimi olarak belirtilir.

İmmobilizasyon sırasında enzim proteinindeki konformasyonel değişiklikler, sterik etkiler, mikroçevre etkileri ve difüzyon etkileri immobilize enzimlerin serbest

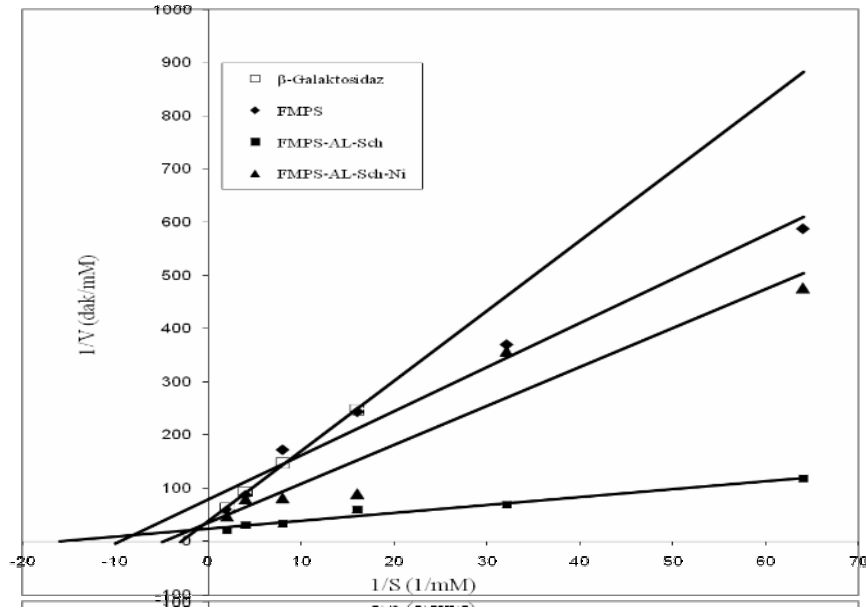
enziminkinden farklı kinetik davranışlar göstermesine neden olurlar. O nedenle immobilize enzimlerin kinetik davranışlarının incelenmesi, kinetik sabitlerin tayini ve serbest enzimle kıyaslanması oldukça önemlidir [30].

Bu değerlerin üzerindeki derişimlerde aktiflikte belirgin değişiklikler gözlenmemektedir.

İmmobilize enzimin K_m değeri serbest enzimine göre daha yüksektir. K_m 'deki bu artışın nedeni, uygulanan immobilizasyon işleminde enzimin yapısal bir değişikliğe uğramasının doğal bir sonucu olabileceği ya da substratın immobilize enzimin aktif merkezine yaklaşmasının zor olduğu şeklinde açıklanabilir.

5.4.1. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest ve kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini araştırmak amacıyla çeşitli derişimlerde hazırlanan substrat çözeltileriyle Bölüm 4.4.3' de anlatılan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen reaksiyonlardan ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen eğimler yardımıyla hesaplanan reaksiyon hızlarından yararlanılarak Linewear- Burk grafiği Şekil 5.13' de verildi. Grafikten yararlanarak K_m ve V_{mak} değerleri hesaplandı ve Çizelge 5.7' de verildi. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen sistemlerde difüzyonel etkiler sebebiyle K_m ve V_{mak} değerlerinde değişiklikler gözlemlendi.



Şekil 5.13. Serbest ve polimerlere kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaza ait Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 5.7. Serbest ve polimerlere kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın kinetik parametreleri

Destek	K_m (mM)	V_{mak} (mM.dak ⁻¹)
Serbest β -Galaktosidaz	0,343	0,0259
(FMPS)	0,104	0,0126
(FMPS-Ala-Sch)	0,0617	0,0417
(FMPS-Ala-Sch-Ni)	0,210	0,0287

İmmobilizasyonla K_m değerlerinin değiştiği gözlenmiştir. Substrat ve polimerik destek arasındaki etkileşimle, substrat-enzim kompleks oluşum ihtimalini düşüren enzimdeki yapısal değişikliklerle, sterik etkilerle, diffüzyonel sınırlamalarla K_m değişebilir ve genellikle immobilizasyonla K_m değerlerinde artma gözlenebilir [40,41]. Yapılan bu çalışmada, serbest enzime oranla, (FMPS), (FMPS-Ala-Sch), (FMPS-Ala-Sch-Ni) polimerlerinin K_m değerlerinde düşüş görülmüştür. K_m , her enzim için spesifiktir ve enzimlerin substratlarına karşı ilgilerini ifade eder. Düşük K_m değerleri enzimin substrata karşı yüksek ilgisini ifade eder. Dolayısıyla

polimerlere yapılan immobilizasyonda enzim, substrata daha fazla ilgi göstermiştir yorumu yapılabilir.

5.5. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen β -galaktosidazın Depolama Kararlılığı

Serbest ve kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı Bölüm 4.4.3' de açıklandığı gibi gerçekleştirildi. Bu çalışmanın sonuçları şöyle açıklanabilir; Serbest enzim 30. gün sonunda aktifliğinin % 10' unu korurken, 90. gün sonunda kovalent bağlanma yöntemiyle (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni)' e immobilize edilen enzimler sırasıyla aktifliklerini yaklaşık % 90, % 91 ve % 98 oranında koruduğu belirlendi. Polimer ve modifiye polimerlerin depolama kararlılık aktiviteleri oldukça yüksek bulunmuştur, özellikle de (FMPS-Ala-Sch-Ni) için. Bu durum, modifiye polimer desteklerin, immobilize enzimlere yüksek konformasyonel kararlılık sağlaması ile açıklanabilir [40].

Depolama kararlılığı enzimin saklama koşullarına bağlı bir parametredir. Genellikle suda çözünmez enzim preparatları ya da kuru olarak steril petri kaplarında ya da tampon çözeltilerin içinde süspansiyon şeklinde 4°C de saklanabilir. Kovalent bağlanma ve hapsedme yöntemleriyle immobilize edilen β -Galaktosidaz enzimi 4°C de BR tamponu içerisinde saklandığında enzimin aktifliğini uzun süre koruduğu gözlenmiştir.

Genellikle enzimlerin immobilizasyonu sonunda enzimatik aktifliğinin artmasının normal bir durum olduğu belirtilmektedir. Bu durum enzimin o koşullarda sahip olduğu yapısal formundan kaynaklandığı düşünülebilir.

5.6. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen β -galaktosidazın Aktifliğinin Tekrar Kullanım ile Değişimi

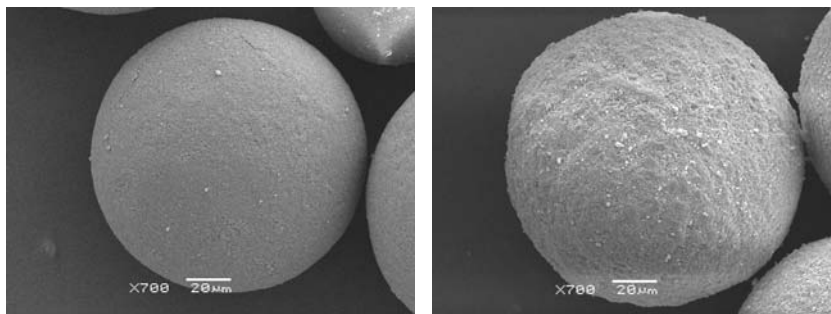
İmmobilize enzimlerin aktifliklerini etkileyen bir parametrede bunların bir çok kez ve uzun süre kullanılabilmesidir. Bu amaçla Bölüm 4.4.3'de açıklandığı gibi

yapılan denemelerle, immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği araştırıldı. Bir gün içinde aynı immobilize enzim ile en fazla 10 kez çalışılabilir.

(FMPS) için 10 kullanımından sonra aktifliğinin yaklaşık % 73' unu koruduğu gözlenmiştir. 10 kullanımından sonra (FMPS-Ala-Sch)'e immobilize olmuş enzim aktifliğinin yaklaşık % 26' ını muhafaza ettiği ve yine 10 kullanımdan sonra (FMPS-Ala-Sch-Ni)'e immobilize olmuş enzim aktifliğinin yaklaşık % 35' sini koruduğu belirlenmiştir. Kovalent bağla β -Galaktosidaz immobilize edilmiş bu üç polimerik yapı karşılaştırıldığında, (FMPS) 'in tekrar kullanım için daha ümit vadeci olduğu görülmektedir.

5.7. SEM Analizi

(FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni) polimerleri üzerine immobilizasyon uygulaması yapıldığında, bu polimerlerin yüzey morfolojisinin de değişiklik olduğu SEM fotoğraflarından görülmektedir (Şekil 5.14). Immobilize olan polimerlerin yüzeylerinin portakal kabuğu görüntüsüne büründüğü, buna karşılık immobilize uygulamasının yapılmadığı polimerin yüzeyinin düzgün formatta kaldığı görülmektedir.



(a) (FMPS)

(b) (immobilize FMPS)

Şekil 5.14. (a) FMPS ve (b) immobilize FMPS SEM resimleri

6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

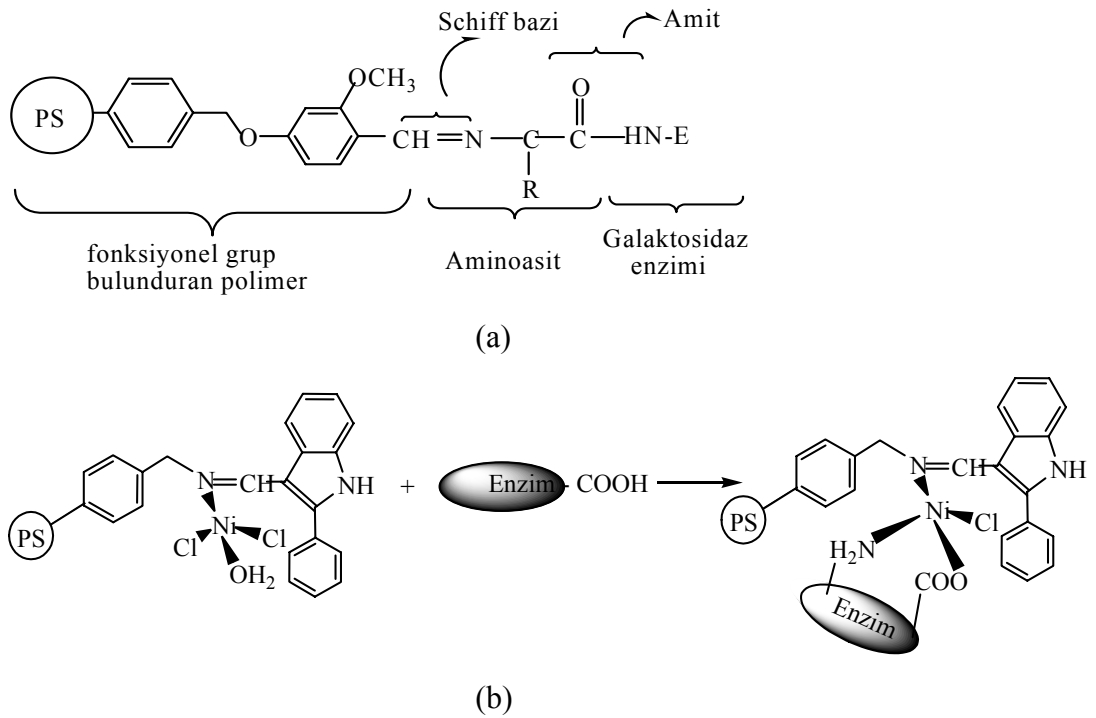
Serbest ve immobilize β -galaktosidaz enziminin aktivitesine etki eden çeşitli parametreler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni) destekleri üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimi için optimum pH değerleri sırasıyla 5,0, 4,0 ve 4,0 olarak bulundu. İmmobilize edilen enzimin pH değerlerinin (FMPS) için 5,0' a kaymasının nedeni ise immobilize edilen sistemlerinde matriks ile enzim arasındaki ikincil etkileşimler (hidrojen bağı, iyonik polar etkileşim, koordinasyon, amid bağların oluşumu vb) sonucu olabilir.
2. Serbest β -galaktosidaz için optimum sıcaklık 30° C olarak bulunmuştur. (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni) destekleri üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β -galaktosidaz enzimleri için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 35°C, 40°C, 45°C'ye kaydı. Optimum sıcaklıktaki artışın, enzimin polimere bağlanması sonucunda, meydana gelen konformasyonel değişimden kaynaklanmış olabileceği düşünüldü (Şekil 6.1).
3. Serbest β -galaktosidaz için K_m değeri 0,343 mM olarak bulundu. (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni) destekleri üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β -galaktosidaz enzimleri için K_m değerleri sırasıyla; 0,104, 0,0617 ve 0,210 mM olarak hesaplanmıştır. İmmobilizasyon ile daha uygun konformasyonel bir hale geldiği söylenebilir. Bu durum da K_m değerlerinde bir düşüşe neden olabilir.
4. Serbest β -galaktosidaz için V_{mak} değeri 0,0259 mM.dak⁻¹, kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β -galaktosidaz enzimleri için ise V_{mak} değerleri 0,0126, 0,0417 ve 0,0287 mM.dak⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

5. Serbest β -galaktosidaz 60 dakikada aktifliğinin (45°C) yaklaşık % 20 sini korudu. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz enzimleri 100 dakikada aktifliklerini yaklaşık %26 - %73 arasında koruduğu gözlemlendi.

6. Immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlikleri değerlendirildiğinde, (FMPS)'nin aktifliğinin (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni)'den fazla olmasının Şekil 6.1 (a)'da gösterildiği gibi Schiff bazının meydana gelmesinden kaynaklandığı yorumu yapılabilir.

7. (FMPS), (FMPS-Ala-Sch) ve (FMPS-Ala-Sch-Ni)'e immobilize edilen enzimin sırasıyla aktifliklerini yaklaşık % 90 , % 91 ve % 98 oranında koruduğu belirlendi. (FMPS-Ala-Sch-Ni) için immobilize edilen enzimin depolama kararlılık aktivitesinin diğer polimerlere göre büyük olmasının sebebi, enzimin $-\text{COO}^-$ ve $-\text{NH}_2$ gruplarıyla koordinasyon oluşturması (Şekil 6.1-b) sonucunda kararlı bir yapının meydana geldiği ile açıklanabilir.



Şekil 6.1. Ön görülen enzim-polimer etkileşimleri

(a) (FMPS) -enzim arasındaki muhtemel etkileşim

(b) (FMPS-Ala-Sch)-enzim arasındaki muhtemel koordinasyon yapısı

KAYNAKLAR

1. Gadd, G. M., "Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization", *Current Opinion in Biotechnology*, 11 (3): 271-279 (2000).
2. Juliette, J. J. J., Rutherford, D., Horváth, I. T., And Gladysz, J. A., "Transition metal catalysis in fluorous media: practical application of a new immobilization principle to rhodium-catalyzed hydroborations of alkenes and alkynes", *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (12): 2696–2704 (1999).
3. Lu, J.P, Jijun, Z., And Jie, H., "Noncovalent functionalization of carbon nanotubes by aromatic organic molecules", *Appl. Phys. Lett.*, 82: 3746 (2003).
4. Cestari, A. R. And Airoidi, C., "Diamine immobilization on silica gel through the sol–gel process and increase in the organic chain by using glutaraldehyde followed by ethylenediamine", *Langmuir*, 13 (10): 2681–2686 (1997).
5. Rao, M. A., Gianfreda, L., And Palmiero, F. V., "Interactions of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes", *Soil Science*, 161 (11): 751-760 (1996).
6. Li, W. And Wang, M., "Electrical and magnetic properties of conjugated schiff base polymers" *Journal of Applied Polymer Science*, 62: 941-950 (1996).
7. Bottino, F. A., Finocchiaro, P., Emanuela, L., Reale, A., And Recca, A., "Metal selectivity properties of polymeric schiff bases", *Inorganic and Nuclear Chemistry Letters*, 16 (7): 417-421 (1980).
8. Kim, W. S. And Choi, Y. K., "Electrocatalytic effects of thionyl chloride reduction by polymeric schiff base transition metal(II) complexes", *Applied Catalysis A:General*, 252(1): 163-172 (2003).
9. Maurya, M.R., Kumar, A., Manikandan, P., And Chand, S., "Synthesis and characterization and catalytic potential of oxovanadium(IV) based coordination polymers having a bridging methylene group", *Applied Catalyses A:General*, 277 (1-2): 45-53 (2004).
10. Kitagawa, S., Kitaura, R., And Noro, S., "Functional porous coordination polymers", *Angewandte Chemie International Edition*, 43 (18): 2334 – 2375 (2004).
11. Özcan, S., "Poli(akril amit) ve bazı aldehitlerden schiff bazı hazırlanması", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2, 3, 54-59 (2007).

12. Kahraman, E., "Bazı polimer-metal komplekslerinin sentezi ve yapılarının aydınlatılması", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 3,4, 42-48 (2004).
13. Biswas, M. And Mukherjee, A., "Synthesis and evaluation of metal containing polymers", *Eur. Polym. J.*, 115: 91-93 (1994).
14. Itoh, H., Kondo, S., Masuda, E., Hnabusa, K., Shirai, H., And Nojo, N."Functional metallo-macrocycle derivatives and their polymers, 16. synthesis of a vinyl monomer containing a covalently bound cobaltophthocyanine moiety and its copolymerization with 9-vinylcarbazole", *Macromol. Rapid Communications*, 7: 585-589 (1986).
15. Milovskaya, E. B. And Zamoiskaya, L. V., "Synthesis and characterization of polystyryl aluminium derivatives and their reaction with benzoyl peroxide", *Polymer*, 23: 891-896 (1992).
16. Yamagishi, A. And Katsutoshi, N., "Electric dichroism studies of Co(III) chelate with synthetic polyelectrolytes", *Polymer*, 23: 1177-1182 (1982).
17. Georgoussis, G., Kanapitsas, A., Pissis, P., Savelyev, Yu. V., Veselov, V. Ya., And Privalko, E. G., "Structure-property relationships in segmented polyurethanes with metal chelates in the main chain", *Eur. Polym. J.*, 36: 1113-1126 (2000).
18. Xie, X. Thiele, J. U., Steiner, R., And Oelhafen, P. "Preparation and characterization of conductind tetracyanoquinodimethane (TCNQ) with quinoline", *Synthetic Metals*, 63: 221-224 (1994).
19. Matsumaya, H., Kariya, A., And Tremoto, M., "Characteristic of plasma polymerized membrane from actamethyltrisiloxane and its application to the pervaporation of ethanol water mixture", *Journal of Membrane Science*, 88: 85-92 (1994).
20. Shields, G. D. And Boucher, L. J., "Metal complexes covalently anchored to silica. I. Schiff base complexes of copper(II)", *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 40(7): 1341-5 (1978).
21. Islam, S. M., Bose, A., Palit, B.K., And Saha1, C.R., "Dihydrogen reduction of nitroorganics, alkenes, alkynes, and schiff Bases using polymer-anchored orthometalated schiff-base complexes of palladium(II) as catalysts", *Journal of Catalysis*, 173: 268-281 (1998).
22. Islam, M., Bose, A., Mal, D., And Saha, C. R., "A reusable polymer-anchored palladium catalyst for reduction of nitroorganics, alkenes, alkynes and schiff bases", *Journal of Chemical Research*, 44: 45 (1998).

23. Wang, R., Hao, C., He, Y., Xia, C., Wang, J., And Wang, Y., “Polymer-bound schiff-base complex catalyst for effective oxidation of olefins with molecular oxygen”, *Journal of Applied Polymer Science*, 75: 1138-1143 (1999).
24. Raman, S. S., Nampoori, V. P. N., Vallabhan, C. P. G., Saravanan, N., And Mohammed Yusuf, K. K., “Thermal diffusivity of some polymer supported halogeno benzimidazole complexes of cobalt(II) and copper(II)—a photoacoustic study”, *Journal of Materials Science Letters*, 18: 261-8028 (1999).
25. Antony, R., Tembea, G.L., Ravindranathan, M., And Ramb, R.N., “Synthesis and catalytic activity of Fe(III) anchored to a polystyrene–schiff base support”, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 171: 159-168 (2001).
26. Gupta, K.C., Abdulkadir, H.K., And Chand, S., “Synthesis of polymer anchored *N,N*-bis(3-allylsalicylidene)*o*-phenylenediamine cobalt(II) schiff base complex and its catalytic activity for decomposition of hydrogen peroxide”, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 202: 253-268 (2003).
27. Sahar, M., I., Ikedab, S., And Ohtanic, B., “Transition metal schiff-base complexes chemically anchored on Y-zeolite: their preparation and catalytic epoxidation of 1-octene in the suspension and phase boundary systems”, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 225: 181-188 (2005).
28. Zhao, J., Han, J., And Zhang, Y., “Preparation of encapsulated and anchored alanine–salicylaldehyde schiff base Mn(III) (Sal–Ala–Mn) complexes by sol–gel method and their performance in aerobic epoxidation of cyclohexene”, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 231: 129-135 (2005).
29. Krishnapillai, G. K., John, K. S., And Poduval, R., “Polystyrene anchored vanillin schiff base-complexation and ion removal studies”, *Journal of Applied Polymer Science*, 98: 1536-1539 (2005).
30. Öcal, B. L., “Poli(vinil alkol) - kalsiyum aljinat, poli(n-izopropilakrilamit)-kalsiyum aljinat kürelerine β -galaktosidaz immobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2, 3, 10-11 (2007).
31. Murray, R. K., Granner, D.K., And Mayes, P.A., “Harper’ın biyokimyası”, *Barış Kitabevi*, 73 (74): 341-349 (1993).
32. Merritt, E. A. And Bacon, D. J., “Raster3D: photorealistic molecular graphics”, *Methods Enzymoloji*, 277: 505–524 (1997).

33. Lartillot, S., "Immobilization of lactase an silica gel:study of lactase hydrolysis wing the immobilized material", *Biochemical Education*, 21(3): 157-159 (1993).
34. Boze, H., Moulin, G., And Galzy, P., "Uptake of galactose and kluyveramyces lactis; biochemical characteristic and attempted genetical analysis", *Journal General Microbiology*, 133: 15-23 (1987).
35. Önal, S. Ç., "Karpuz (Citrullus Vulgaris) α -galaktosidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu", Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 39-41 (2000).
36. Bajpai, D. N., Rai, S., And Bajpai, A., "Synthesis and characterization of metal containing coordination polymers of poly(mehylene diphenylene terphthalamide" , *J. Appl. Polym. Sci.*, 48: 1241-1246 (1993).
37. Hernaiz M. J. And Crout H. G., "A highly selective synthesis of N-acetyllactosamine catalyzed by immobilised β -galactosidase from Bacillus circulans", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10: 403-408 (2000).
38. Cowie, J. M. G., *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials*, 2nd ed., Chapman and Hall, New York, 138: 42-48 (1991).
39. Hasırcı, N., Aksoy, S., And Tümtürk, H., "Activation of poly(dimer acid-co-alkyl polyamine) particles for covalent immobilization of a-amylase", *Reactive & Functional Polymers*, 66: 1546-1551 (2006).
40. Arslan, F., Tümtürk, H., Çaykara, T., Şen, M., And Güven, O., "The effect of gel composition on the adsorption of invertase on poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels", *Food Chemistry*, 70: 33-38 (2000).
41. Anita, A., Sastry, C.A., And Hashim, M.A., "Immobilization of urease on vermiculite", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 16(6): 375-380 (1997).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ERDURAN, Vildan
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 04.08.1982 Trabzon
Medeni hali: : Evli
Telefon : 0 (505) 498 97 47
e-mail : vildandilek61@hotmail.com

Eğitim Derece

Eğitim Birimi

Mezuniyet tarihi

Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2010
Lisans	KTÜ/ Kimya Eğitimi Bölümü	2006
Lise	Yunus Emre Anadolu Lisesi	2000

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Resim, Ebru, Kitap okumak